

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18808

研究課題名（和文）腸管への口腔細菌異所性定着リスクを高める口腔マイクロバイオームの同定

研究課題名（英文）Identification of oral microbiota associated with oral bacterial colonization in gut

研究代表者

影山 伸哉（Kageyama, Shinya）

九州大学・歯学研究院・助教

研究者番号：90822495

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、唾液中の細菌構成を調べ、特定の細菌構成バランスの口腔には、腸管に移行する可能性の高い細菌が多く存在することが明らかとなった。この結果は、口腔細菌のバランスを整えることで口腔細菌の腸管への移行を制御できる可能性を示唆している。今後、このバランスを変化させる方法について解析を進めていきたい。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔細菌の腸管への流入が、腸内細菌のバランス異常に関わると考えられるようになってきた。本研究では、唾液中の細菌構成を調べ、特定の細菌構成バランスの口腔には、腸管に移行する可能性の高い細菌が多く存在することを明らかにした。本研究から得られる結果は、将来的に口腔細菌のバランスをコントロールすることで腸内細菌のバランス異常を制御し疾患を予防する、新たな治療法につながる可能性を有している。

研究成果の概要（英文）：In this study, we examined bacterial composition in saliva and identified that oral microbiota with a specific bacterial balance abundantly harbors highly-transmissible bacteria into gut. This result suggests that controlling oral microbiota balance could regulate microbial transmission from oral cavity to the gut. Further studies should be required to identify approaches that can change the oral microbiota balance.

研究分野：予防歯科学

キーワード：口腔マイクロバイオーム 腸管マイクロバイオーム

1. 研究開始当初の背景

人体には膨大な数の細菌が存在し、それらが複雑な常在微生物叢(マイクロバイーム、MB)を構築している。近年、MB解析手法の急速な進歩によって、常在MBが宿主の健康に重要な役割を果たしていることが次々と報告され、常在細菌への関心は世界的に高まっている。特に、腸管MBは人体で最も主要な常在MBの一つであり、そのバランス異常(dysbiosis)は炎症性腸疾患や大腸がんなどの消化管疾患だけでなく、糖尿病や関節リウマチ、認知症など多様な全身疾患に関わると考えられている。

消化管の入り口に位置する口腔もまた常在細菌の主要なリザーバーの一つで、腸管とは異なるさまざまな細菌種が口腔MBを構築している。口腔MBがう蝕や歯周病などの口腔疾患に関わることは、これまで数多くの研究によって示されてきたが、我々が常に口腔細菌を唾液とともに飲み込んでいることから、現在口腔MBは全身への微生物の供給源、またそれに伴う遠隔部位の疾患発症のトリガーとしても注目を集めている。例えば、嚥下機能の低下した高齢者では、誤嚥により多量の口腔細菌が下気道に流れ込んでしまうが、*Prevotella*や*Veillonella*など一部の口腔細菌が肺の炎症を増強することが指摘されている。また申請者らも、高齢者施設の入所者を対象とした前向きコホート研究において、肺炎死亡のリスクを高める口腔MBの存在について明らかにしている。

一方、唾液とともに飲み込まれた口腔細菌のほとんどは、食道を経由して胃、腸管に運ばれる。一般に口腔細菌は、胃酸や胆汁酸によって腸管に到達する前に死滅することが想定されるが、最近では健康な人においても微量の口腔細菌が腸に到達することが指摘されている。そんな中、炎症性腸疾患や消化管がん、関節リウマチなど様々な疾患患者の腸管MBにおいて、特定の口腔細菌が高比率に検出されることが次々と報告され、口腔細菌が腸管MBのdysbiosisに関与していると考えられるようになってきた。このことから、口腔MBが腸管MBに及ぼす影響を理解することは、腸管MBのdysbiosisの予防、ひいては全身疾患の予防につながることを期待されるが、その関連性については未だエビデンスが十分ではない。

2. 研究の目的

腸管MBを解析した我々の最近の研究で、腸管で高頻度に検出される口腔細菌種を同定した(未発表データ)。そのため、これらの腸管へ移行する可能性の高い細菌(highly-transmissible bacteria、HT細菌)が豊富に存在する口腔MBが、腸管への異所性定着リスクを高める口腔MBである可能性が考えられる。また興味深いことに、同一の細菌種の中にも腸管MBから検出されやすいものと、検出されにくいものが存在することが示唆された。そのため、従来のショートリードシーケンサーを用いた手法より、さらに精密な菌種識別が必要となる。

そこで本研究では、ロングリードシーケンサーによる16S rRNA遺伝子全長解析と、一塩基レベルで塩基配列を識別できるASV(amplicon sequence variant)アプローチを組み合わせ、口腔細菌叢の細菌構成を高解像度に同定し、上述のHT細菌を高精度に特定した。本研究の目的は、HT細菌の比率が高い口腔MBを同定し、腸管への異所性定着リスクを高める口腔MBの特徴を明らかにすることである。

3. 研究の方法

COVID-19の影響により十分なサンプル数が確保できなかったため、本研究ではこれまでに採取した唾液サンプルを用いて解析を行った。まず、これらのサンプルから抽出されたDNAを鋳型とし、PCR法を用いて細菌16S rRNA遺伝子の全長(V1からV9までで全ての変領域を含む)を網羅的に増幅した。プライマーには8塩基の検体識別用タグ配列を付与した8Fと1492Rプライマーを用いた。得られた増幅断片を精製した後、異なるタグ配列を持つ増幅断片を等濃度ずつ混合した。その後、混合された増幅断片の塩基配列をロングリードシーケンサーのPacBio Sequel II(Pacific Biosciences社)にて解読した。解読した塩基配列から、Rスクリプトを用いて低品質の配列(断片長、クオリティスコア、プライマー配列の有無)を除外し、高品質の配列のみを選別した。得られた高品質配列のエラー補正を行った後、expanded Human Oral Microbiome Database(eHOMD)の配列データとRDP(Ribosomal Database Project) classifierを用いて各サンプルに含まれる細菌種とその構成比率を決定した。各サンプル間の細菌構成の類似度はUnifrac距離を用いて評価し、グループ間の細菌構成比較にはAnalysis of similarities(ANOSIM)を使用した。グループ間の菌種多様性、構成比率の比較にはMann-Whitney U testを使用した。

4. 研究成果

唾液MBの細菌構成を菌属レベルで明らかにしたところ、平均構成比率が1%以上の主要な菌属が10菌属同定され、それらが唾液MBの95.5%を占めていた。特に、*Streptococcus*、*Neisseria*、*Veillonella*が高い比率を占めていた。菌種レベルでは、25菌種が平均構成比率の1%以上を占

めており、中でも *S. salivarius* HMT-755 が最も高い構成比率を示した。また、*Streptococcus mitis* HMT-677、*Streptococcus parasanguinis* HMT-411、*Streptococcus infantis* HMT-638、*Neisseria subflava* HMT-476 などが平均構成比率 5%以上を占めていた。

各唾液検体における HT 細菌比率を算出したところ、43.1%の対象者で HT 細菌の占める割合が 10%以上を示した。この対象者を高 HT 細菌群、10%未満だった対象者を低 HT 細菌群と定義し、唾液 MB の細菌構成を比較した。その結果、高 HT 細菌群と低 HT 細菌群の唾液 MB の細菌構成は、有意に異なることが明らかとなった (ANOSIM $P < 0.001$)。また、高 HT 細菌群では、アルファ多様性が有意に高くなっていた ($P < 0.01$)。

そこで、これら二群の細菌構成を菌属レベルで比較した。その結果、高 HT 細菌群では低 HT 細菌群と比較して、*Streptococcus*、*Veillonella*、*Prevotella* が有意に高い比率を占めていた (すべて $P < 0.001$)。一方、低 HT 細菌群では *Neisseria*、*Porphyromonas*、*Gemella* が有意に高い構成比率を示した (それぞれ、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$ 、 $P < 0.01$)。

以上より、一部の細菌構成バランスの口腔 MB では、腸管に移行する可能性の高い細菌が多く存在することが明らかとなった。興味深いことに、HT 細菌として特定された細菌の中に *Prevotella* は含まれていなかったにも関わらず、高 HT 細菌群に特徴的な細菌属として同定された。これは、高 HT 細菌群では単に HT 細菌の比率が高いだけでなく、口腔 MB 全体のバランスが HT 細菌の生息しやすい環境を作り出している可能性を示唆している。このような口腔細菌の構成バランスを、HT 細菌の少ない細菌構成バランスに変化させる方法については、今後研究を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kageyama Shinya, Nagao Yuka, Ma Jiale, Asakawa Mikari, Yoshida Ryoji, Takeshita Toru, Hirose Akiyuki, Yamashita Yoshihisa, Nakayama Hideki	4. 巻 10
2. 論文標題 Compositional Shift of Oral Microbiota Following Surgical Resection of Tongue Cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2020.600884	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ma Jiale, Kageyama Shinya, Takeshita Toru, Shibata Yukie, Furuta Michiko, Asakawa Mikari, Yamashita Yoshihisa	4. 巻 16
2. 論文標題 Clinical utility of subgingival plaque-specific bacteria in salivary microbiota for detecting periodontitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0253502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kageyama Shinya, Furuta Michiko, Takeshita Toru, Ma Jiale, Asakawa Mikari, Yamashita Yoshihisa	4. 巻 13
2. 論文標題 High-Level Acquisition of Maternal Oral Bacteria in Formula-Fed Infant Oral Microbiota	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mBio	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mbio.03452-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 影山伸哉、竹下徹、竹内研時、朝川美加季、古田美智子、柴田幸江、山下喜久
2. 発表標題 消化管がん患者の唾液マイクロバイオーームに特徴的な細菌種の同定
3. 学会等名 第69回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Shinya Kageyama
2. 発表標題 Development of oral microbiota during the first two years of life
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 影山伸哉、馬佳楽、竹下徹、柴田幸江、古田美智子、朝川美加李、山下喜久
2. 発表標題 縁下ブランク細菌に着目した唾液検査による歯周病スクリーニング
3. 学会等名 第24回日本歯科医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daixi Zhang, Toru Takeshita, Shinya Kageyama, Yukie Shibata, Yoshihisa Yamashita
2. 発表標題 Identification of oral bacteria by the ribosomal ITS region amplicon sequencing
3. 学会等名 第69回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jiale Ma, Shinya Kageyama, Toru Takeshita, Yukie Shibata, Mikari Asakawa, Wataru Yamanaka, Yoshihisa Yamashita
2. 発表標題 Clinical utilization of subgingival bacteria in salivary microbiota for detecting the severe periodontitis
3. 学会等名 第69回日本口腔衛生学会・総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Jiale Ma, Shinya Kageyama, Toru Takeshita, Mikari Asakawa, Yoshihisa Yamashita
2. 発表標題 Relationship between periodontitis severity and combination of abundance and diversity of subgingival plaque-specific bacteria in salivary microbiota
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Mikari Asakawa, Toru Takeshita, Shinya Kageyama, Jiale Ma, Yoshihisa Yamashita
2. 発表標題 Tongue microbiota and health-related conditions in elderly adults receiving day service
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Jiale Ma, Michiko Furuta, Toru Takeshita, Shinya Kageyama, Mikari Asakawa, Shino Suma, Yoshihisa Yamashita
2. 発表標題 Fermented dairy food intake reduces risk of tooth loss in a Japanese community
3. 学会等名 第69国際歯科研究学会日本部会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------