

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K18827

研究課題名（和文）食と口腔細菌叢の相互作用から紐解く歯周病病因論の新展開

研究課題名（英文）New Insights into periodontal pathogenesis through the interaction between diet and oral microbiota

研究代表者

坂中 哲人（Sakanaka, Akito）

大阪大学・大学院歯学研究科・助教

研究者番号：90815557

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：食事と腸内細菌叢の相互作用によって生成される多種多様な代謝物のうち、宿主の生理機能や疾患傾向に影響を及ぼすものを機能性代謝物と呼び、その探索と利活用に注目が集まっている。口腔は消化器官の入り口であり、腸内と同様に豊かで複雑な細菌叢が存在する。当然、食物と最初に接触するこの部位では多くの代謝物が生成されると考えられるが、限られた知見を除き、その詳細はほとんどわかっていない。本研究ではメタボロームとメタゲノム解析を用いて、食事との相互作用を介して口腔細菌叢により産生される代謝物のうち、歯周病の病原性に影響を及ぼすものを探索することで、口腔細菌叢と食のケミカルクロストークの一端を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化管の一部である口腔には、腸と同様に複雑な微生物叢が存在するが、食を介した口腔細菌叢と宿主の相互作用については、発酵性糖質によるう蝕の形成以外は、まだ多くの点が未解明である。特に、食と口腔細菌叢の相互作用が歯周病に及ぼす影響については、ほとんど分かっていない。本研究で口腔細菌叢と食のケミカルクロストークの一端が明らかになり、これまで見過ごされてきた食の歯周病の発症と重症化への影響が示唆されたことで、新たな歯周病の予防と治療に役立つ方法の開発に貢献する可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Functional metabolites, generated through the interaction between diet and gut microbiota, impact host physiological functions and disease tendencies. The exploration and utilization of these metabolites are gaining attention. The oral cavity, the entry point of the digestive system, houses a rich and complex microbiota similar to the gut. It is expected that many metabolites are produced through interactions with food in this area, but their details remain largely unknown. In this study, we used metabolomic and metagenomic analyses to investigate metabolites produced by oral microbiota through interactions with diet. We aimed to identify those that influence the pathogenicity of periodontal disease, thereby shedding light on the chemical crosstalk between oral microbiota and diet.

研究分野：予防歯科学

キーワード：口腔細菌 食 機能性代謝物 歯周病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、食と腸内細菌叢の相互作用を介して産生される代謝物(メタボライト)が、宿主の様々な生理機能や疾患傾向に影響を及ぼすことが見出されている。これらの物質は生理活性メタボライトとも呼ばれ、ヒトの健康を左右するこうしたメタボライトや原因細菌の探索が、学术界のみならず製薬業界や健康食品産業において活発に進められ、社会全体で関心が高まっている。こうした中、消化器官の入り口である口腔には腸内に匹敵する豊かで複雑な細菌叢が存在し、真っ先に食物に対峙するにも関わらず、摂食の過程で生理活性を有するメタボライトが産生され、口腔や全身の健康への影響に関する詳細はほとんど分かっていない。特に、歯周病と食の関連性については、ビタミンや全粒穀物の不足、または欧米型の食事が歯周病のリスク要因になることが示されているが、そこに口腔細菌の関与があるかについては定かではない。また歯間部への食片圧入は歯周病発症の契機となるが、機械的刺激によるものと理解され、細菌叢による代謝やそれが細菌叢の乱れにつながる可能性について言及されたことはない。

2. 研究の目的

食品が歯間部に挟まり歯肉縁から歯肉溝内にかけてその残渣物が長期間留置されると、歯肉の炎症を来し垂直性骨吸収を伴う歯周病発症の端緒となることが古くから知られている。この食片圧入による歯周炎の発症については、機械的刺激を主要因とする持続的な炎症性破壊によるものと考えられ、歯肉溝内で食物と口腔細菌叢の相互作用の結果産生されるメタボライトが潜在的に持つインパクトについて考慮してこなかった。これまでに申請者らは、口腔細菌や唾液試料を用いてメタボローム解析を実施し、口腔細菌が菌種特異的に様々な代謝物を産生・放出する能力を有していることを確認している。したがって、口腔細菌叢と食の相互作用により機能性代謝物が産生され、それらが宿主や細菌叢自体に作用することで、歯周病や全身の健康状態に影響を及ぼすことは十分考えられる。本研究ではこうした背景のもと、口腔細菌叢と食の相互作用に注目し、メタボロームおよびメタゲノム情報を活用し、口腔細菌による食の代謝が歯周病発症に寄与するという仮説の検証を行う。

3. 研究の方法

(1) 口腔常在菌と食の相互作用による歯周病 dysbiosis モデルの構築

歯間部に高頻度で留置されやすい食品として野菜や肉類等の繊維質を多く含んだ食品が挙げられる。こうした歯間部に留置されやすい食品と代表的口腔常在菌 (*Streptococcus oralis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus gordonii*, *Fusobacterium nucleatum*, *Veillonella parvula*, *Actinomyces naeslundii* 等) を共培養し、ガスクロマトグラフ質量分析計 (GCMS) および超高速分離液体クロマトグラフ (UPLC) を用いて上清中の代謝物(糖類、アミノ酸、脂肪酸、ポリアミン、核酸、ビタミン類等) をノンターゲットで網羅的に測定し、各食品に対する各細菌の代謝プロファイルを比較する。その上で、各細菌を特徴付ける代謝物を選定し、代表的な歯周病菌である *Porphyromonas gingivalis* に対する応答(増殖能、バイオフィーム形成能、生存能、ジンジパインや線毛等の病原因子の発現量や活性等) を *in vitro* で評価し、その病原性に影響を及ぼす代謝物を同定する。さらに、2菌種以上の口腔常在菌を用いて特定の食品との共培養実験を行い、歯周病菌の病原性を高める代謝物の産生量を最大化させる食品と細菌群の組み合わせを探索する。

(2) ヒト歯垢を用いた歯周病 dysbiosis モデルの検証

ヒト歯垢を用いて(1)のモデルの妥当性を検証する。被験者から縁上歯垢を採取するとともに歯周検査を行い、歯周病重篤度を Periodontal Inflamed Surface Area (PISA) を用いて評価する。得られた歯垢サンプルを特定の食品と一定時間共培養し、遠心操作で液体成分と微生物成分に分け、液体成分中のメタボローム解析を GC-MS と UPLC を用いて実施するとともに、微生物成分についてはショットガンメタゲノム解析を実施し、細菌叢の構成と機能の変化を確認する。その後、(1)の結果の妥当性を検討しながら、食品の存在が細菌叢およびメタボロームに与える影響を評価する。さらに(1)で同定した機能性代謝物を用いて同様の実験を行い、メタゲノム解析を実施して細菌叢構成割合の変動を評価することで、機能性代謝物が歯周病の病態形成に及ぼす影響について検討を加える。

4. 研究成果

基礎学的な実験的研究に関しては、特定の食品と代表的口腔細菌の in vitro 共培養システムを構築し、上清中の代謝物プロファイルの変動と口腔細菌の増殖率の変化を調べ、各食品に対する口腔細菌の代謝特性、および環境中へのメタボライト産生能を評価した。具体的には、歯間部に高頻度で留置されやすい食品として野菜や肉類等の繊維質を多く含んだ食品が挙げられる。その中でも特に食片残渣の留置を来しやすいものとして、ほうれん草と鶏肉をモデル食品に選定し実験を進めた。成分既知の最小培地中にモデル食品を入れ、オートクレーブ滅菌後、代表的口腔細菌を懸濁し一定時間経過後、培養上清を回収するとともに増殖率を評価した。回収した培養上清は、GCMS および UPLC を用いた代謝物解析に供し、各食品に対する各細菌の代謝プロファイルの評価した。その結果、ビタミン、補酵素、アミノ酸等、特定の食品と口腔細菌を組み合わせた際に顕著に増加するメタボライトを複数同定した。なかでも鶏肉と共培養した場合、ビタミンのひとつであるチアミンを特異的に産生する口腔細菌、あるいはスティックランド発酵として知られるアミノ酸由来の有機酸を盛んに産生する口腔細菌を認めた。さらに、こうした物質を代表的な歯周病菌である *P. gingivalis* に作用させ、バイオフィーム形成能等、その病原性に及ぼす影響を評価したところ、一部のアミノ酸由来有機酸において、*P. gingivalis* のバイオフィーム形成能を促進させる効果があることが示された。

臨床検体を用いた検証については、被験者から歯垢を採取後、速やかに食品と一定時間共培養した試料からゲノム DNA を抽出し、細菌叢の構成や機能の変動を解析した。解析には Python によるバイオインフォマティクス環境を構築し、ショットガンメタゲノムデータの解析パイプラインである HUMAnN3.0 (Human microbiome project Unified Metabolic Analysis Network) を用いて解析を行った。これにより、細菌叢の組成および酵素遺伝子の変動を定量的に解析することが可能となった。現在解析を進めている段階ではあるが、これまでの解析により、タンパク質の豊富な食品との共培養により歯垢中で *Prevotella* 属や *Fusobacterium* 属の複数の細菌、およびこれらの細菌群の寄与によるスティックランド発酵に関連する酵素遺伝子が複数増加することが確認された。こうした酵素の最終代謝産物の中には、in vitro で *P. gingivalis* のバイオフィーム形成能を促進する作用を認めたメタボライトも含まれていた。こうした知見から、食と口腔細菌叢のクロストークが歯周病の発症と進行に影響する可能性が多角的に示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 4件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hara T, Sakanaka A, Lamont RJ, Amano A, Kuboniwa M	4. 巻 9
2. 論文標題 Interspecies metabolite transfer fuels the methionine metabolism of <i>Fusobacterium nucleatum</i> to stimulate volatile methyl mercaptan production	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 mSystems	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/msystems.00764-23	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 該当する
1. 著者名 Sakanaka A, Kuboniwa M, Shimma S, Alghamdi SA, Mayumi S, Lamont RJ, Fukusaki E, Amano A	4. 巻 7
2. 論文標題 <i>Fusobacterium nucleatum</i> metabolically integrates commensals and pathogens in oral biofilms	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 mSystems	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/msystems.00170-22	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 該当する
1. 著者名 Sakanaka A, Katakami N, Furuno M, Nishizawa H, Omori K, Taya N, Ishikawa A, Mayumi S, Inoue M, Isomura ET, Amano A, Shimomura I, Fukusaki E, Kuboniwa M	4. 巻 9
2. 論文標題 Salivary metabolic signatures of carotid atherosclerosis in patients with type 2 diabetes hospitalized for treatment.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmolb.2022.1074285	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 Sakanaka A, Kuboniwa M, Katakami N, Furuno M, Nishizawa H, Omori K, Taya N, Ishikawa A, Mayumi S, Tanaka-Isomura E, Shimomura I, Fukusaki E, Amano A	4. 巻 8
2. 論文標題 Saliva and Plasma Reflect Metabolism Altered by Diabetes and Periodontitis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Molecular Biosciences	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/fmolb.2021.742002	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 該当する

1. 著者名 Mayumi S, Kuboniwa M, Sakanaka A, Hashino E, Ishikawa A, Iijima Y, Amano A	4. 巻 11
2. 論文標題 Potential of Prebiotic D-Tagatose for Prevention of Oral Disease	5. 発行年 2021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.2021.767944	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 該当する

1. 著者名 橋野恵衣, 久保庭雅恵, 坂中哲人, 石川明日香, 眞弓昌大, 竹内洋輝, 天野敦雄	4. 巻 71
2. 論文標題 エリスリトールがPorphyromonas gingivalisおよびTreponema denticolaの揮発性硫化物産生に及ぼす影響の検討	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 口腔衛生学会雑誌	6. 最初と最後の頁 88-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5834/jdh.71.2_88	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 坂中哲人	4. 巻 73
2. 論文標題 地球と口腔と私	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生産と技術	6. 最初と最後の頁 31-33
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kuboniwa M, Sakanaka A	4. 巻 99
2. 論文標題 Letter to the Editor: "Examining Bias and Reporting in Oral Health Prediction Modeling Studies"	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Dental Research	6. 最初と最後の頁 1306
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/0022034520934721	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 坂中哲人
2. 発表標題 口腔と全身をつなぐ唾液科学の深化
3. 学会等名 第71回日本口腔衛生学会学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 天野敦雄、坂中哲人、久保庭雅恵
2. 発表標題 マイクロビオームの変動を反映する唾液メタボローム解析から全身を見据える
3. 学会等名 第76回日本口腔科学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 原 武史、久保庭 雅恵、坂中 哲人、天野 敦雄
2. 発表標題 口腔細菌間ネットワークが口臭成分メチルメルカプタンの産生を促進する
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上 萌、坂中哲人、久保庭雅恵、天野敦雄
2. 発表標題 糖尿病入院治療によりPISAが改善した患者群を特徴づける血漿・唾液代謝物の探索
3. 学会等名 第33回近畿・中国・四国口腔衛生学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Inoue M, Sakanaka A, Choi YH, Kuboniwa M, Amano A
2. 発表標題 Exploring saliva and plasma metabolites characterizing diabetes patients with improved periodontal inflammation by hospitalized glycemic-control treatment
3. 学会等名 2022 General Session of the Korean Academy of Preventive Dentistry and Oral Health Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Iijima Y, Kuboniwa M, Sakanaka A, Takeuchi H, Mayumi S, Choi YH, Amano A
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalis infection alters the metabolome of human gingival epithelial cells and enhances cell proliferation.
3. 学会等名 2022 General Session of the Korean Academy of Preventive Dentistry and Oral Health Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 井上 萌、坂中哲人、久保庭雅恵、天野敦雄
2. 発表標題 糖尿病入院治療によりPISAが改善した患者群を特徴づける血漿・唾液代謝物の探索
3. 学会等名 第134回大阪大学歯学会例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 工藤摩周、久保庭雅恵、坂中哲人、眞弓昌大、天野敦雄
2. 発表標題 Porphyromonas gingivalisのアルギニン脱炭酸酵素は同菌の生育とバイオフィルム形成に影響を及ぼす
3. 学会等名 第134回大阪大学歯学会例会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 坂中哲人, 久保庭雅恵, 石川明日香, 眞弓昌大, 天野敦雄
2. 発表標題 唾液メタボロームの個人間の異同に影響を及ぼす因子の検討
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 Sakanaka A, Kuboniwa M, Shimma S, Mayumi S, Lamont RJ, Fukusaki E, Amano A
2. 発表標題 Fusobacterium nucleatum metabolically integrates commensals and pathogens in oral biofilms
3. 学会等名 第68回JADR総会・学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坂中哲人
2. 発表標題 口腔フローラ研究の最前線
3. 学会等名 池田市歯科医師会学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 坂中哲人 (分担執筆、第5節 口腔とバイオフィルム)	4. 発行年 2023年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 342
3. 書名 バイオフィルム革新的制御技術	

1. 著者名 久保庭雅恵, 坂中哲人 (分担執筆、 デンタルバイオフィルムと歯周病)	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ヒョーロン・パブリッシャーズ	5. 総ページ数 102
3. 書名 よくわかる!口腔バイオフィルムと歯科治療 : 感染制御のポイントと治療戦略	

〔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