

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10218

研究課題名（和文）口腔内にランチビオテクス産生細菌保菌することは腸内細菌叢攪乱の原因となりうるか

研究課題名（英文）Analysis of the possibility that colonization of bacteriocin-producing bacteria in the oral cavity may cause intestinal microbiota dysbiosis

研究代表者

米澤 英雄（Hideo, Yonezawa）

東京歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：60453528

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：う蝕原因細菌であるStreptococcus mutansは抗菌物質（バクテリオシン）を産生する。これらのバクテリオシンは唾液とともに腸管へと流入する。これまで本菌が産生したバクテリオシンが、腸内細菌叢dysbiosisの原因となり得る可能性を、小児の腸内細菌叢解析より証明してきた。本研究はS. mutansの機能未知のバクテリオシンについて性状解析を行い、結果を基に腸内細菌叢に影響をもたらすバクテリオシン産生細菌の有無で群分けを行い、腸内細菌叢を解析した。以上より口腔内にバクテリオシンを産生する細菌を保菌することが腸内細菌叢のdysbiosisの原因となるか、について検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト腸内細菌叢の構成異常（dysbiosis）は、全身疾患である自己免疫疾患、生活習慣病（肥満、動脈硬化、糖尿病など）や自閉症と言った精神的な疾患の原因となることが明らかとされている。腸内細菌叢のdysbiosisは、種々の疾患への罹患や抗菌薬の投与、食餌、ストレス、加齢などが挙げられるものの原因の全容は未だ明らかにはなっていない。ヒト体内における他の臓器由来の細菌とその産生物質が腸内細菌叢dysbiosisを誘導するという報告は学術的、そして社会的の両面で有意義なものであり、口腔ケアにより腸内細菌叢の管理、疾病予防といった全身マネジメントを可能とする研究に繋がると考える。

研究成果の概要（英文）：The caries-causing bacterium Streptococcus mutans produces antimicrobial substances (bacteriocins). These bacteriocins enter the intestinal tract with saliva. We have demonstrated that bacteriocins produced by S. mutans may be the cause of intestinal microbiota dysbiosis in children. In this study, we analyzed the bacteriocins of S. mutans with unknown function and grouped them according to the presence or absence of bacteriocin-producing bacteria that affect the intestinal microbiota. Based on these results, we examined whether the possession of bacteriocin-producing bacteria in the oral cavity is a cause of dysbiosis of the intestinal microbiota..

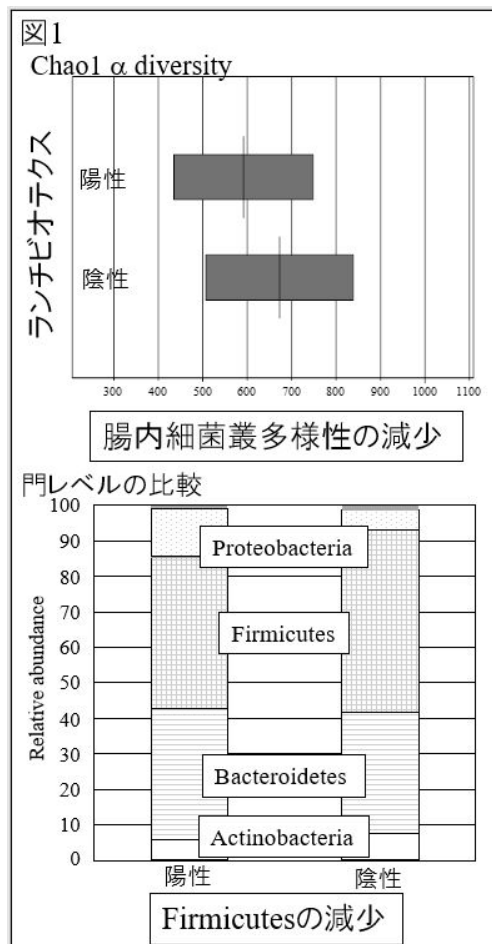
研究分野：細菌学

キーワード：ミュータンス菌 バクテリオシン

1. 研究開始当初の背景

ヒトには、約 100 兆個以上の常在細菌が棲息している。常在細菌が最も多く存在するのは消化管部位であり、腸内細菌叢を形成している。腸内細菌が行なう代謝は、細菌自身の生命維持のための活動である一方で、その代謝産物が宿主の健康維持促進に関与することが解明され、常在細菌と宿主であるヒトは、共生関係を保っていることが明らかとされている。近年、腸内細菌叢細菌構成の異常 (dysbiosis) は、全身的な疾患である自己免疫疾患、生活習慣病 (肥満、動脈硬化、糖尿病など) や自閉症などの原因となることが明らかになっている。

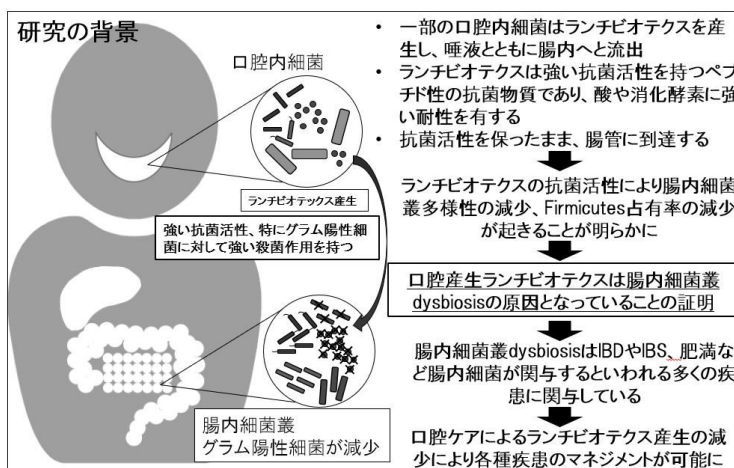
これまで、口腔内細菌が産生する抗菌物質 (バクテリオシン) の中でも特に抗菌活性が強いランチビオテクス (Muacin I/III または Smb) を産生する細菌を口腔に保菌すると、腸内細菌叢の α -diversity が減少すること、Firmicutes の占有率が有意に低下することを健康小児 69 人の腸内細菌叢 16s メタゲノム解析より明らかとしてきた (yonezawa et al. Int J Mol Sci.、右図)。ランチビオテクスとはグラム陽性菌が産生するバクテリオシンの一種であり、強い安定性 (耐熱、耐酸、耐消化酵素性) を有し、グラム陽性細菌に対して広い抗菌スペクトラムと強い抗菌活性を示す抗菌物質である。本結果はランチビオテクスを産生する細菌を口腔に保菌することは、腸内細菌叢を構成するグラム陽性細菌に抗菌的に作用し、Firmicutes 占有率の低下が起きている、つまり dysbiosis を引き起こす原因となり得ることを示唆している。これまで腸内細菌叢 dysbiosis の原因となる抗菌薬投与や食餌、加齢といった外的要素でなく、ヒトに定着している細菌がその原因の 1 つとなることを初めて証明した。



2. 研究の目的

口腔には約 1 兆個を超える細菌が棲息し、唾液とともに 1 日におおよそ 1500 億から 1 兆個の口腔細菌が腸管へと流入している。口腔細菌の一部は抗菌物質 (バクテリオシン) を産生し、こうした産生物質も唾液とともに腸管へと流入する。う蝕原因細菌である *Streptococcus mutans* は代表的なバクテリオシン産生細菌であり、これまで 5 種類のランチビオテクスを産生することが報告されている。そのうち Mutacin I, II, III および Smb は機能

や発現メカニズムの解明が進んでいるものの、K8 に関してはまだ遺伝子発現や抗菌活性機能など詳細には検討されていない。さらに *S. mutans* はランチビオテクス以外のバクテリオシンも産生することも報告されている。従って「口腔内にランチビオテクスバクテリオシンを産生する細菌を保菌することが腸内細菌叢の dysbiosis の原因となるか」については、口腔内細菌が産生するバクテリオシンに関してより詳細な検討、そしてその結果に基づくグループ分けを行うことで、より明確に証明することが可能となる。本研究は、これまで明らかとされていないバクテリオシンの抗菌活性や発現メカニズムの解明を行い、これらバクテリオシンの性状からより適した口腔内細菌のグループ分けを行うことで、口腔内にバクテリオシンを産生する細菌を保菌することが腸内細菌叢の dysbiosis の原因となるか、を証明することである。



3. 研究の方法

(1) 未検討である口腔内細菌産生ランチビオテクスの性状解析

これまでの基盤研究 C(18K09890)において分離した *S. mutans* 臨床分離株より、バクテリオシン産生性を確認する。バクテリオシン産生の確認は agar diffuse assay を用いる。Indicator となる菌は腸内細菌叢構成細菌である *Eubacterium* 属細菌、*Clostridium* 属細菌などを使用する。バクテリオシン産生が認められた *S. mutans* 株においては、バクテリオシンの同定を行う。これまで報告されているバクテリオシンの PCR によるスクリーニングを行う。既知のバクテリオシンでないものは、遺伝子配列の検討から新規バクテリオシンを同定する。得られた遺伝子配列より、欠損株の作製による抗菌活性の確認、抗菌スペクトラムや発現制御などの性状の解明を行う。

(2) 既存の小児データを用いて、新しい群分けにて腸内細菌叢を再解析し、その比較検討

上記 1 で得られたバクテリオシンの性状の結果を考慮し、腸内細菌叢に影響を与える可能性のあるバクテリオシン産生細菌保菌および非保菌者のグループ分けによる比較解析をこれまで得ている小児 69 名の腸内細菌叢の結果から行う。新しいグループ分けによるデータ解析の有効性について検討する。

(3) 成人健常者500人より唾液および便検体を収集し、細菌DNAを抽出

杏林大学病院人間ドック受診者より便検体および唾液を採取する。採取条件は全身疾患のない、そして抗菌薬投与をしていない健常者で歯が残存していることとする。採取した検体

より細菌 DNA を抽出する。

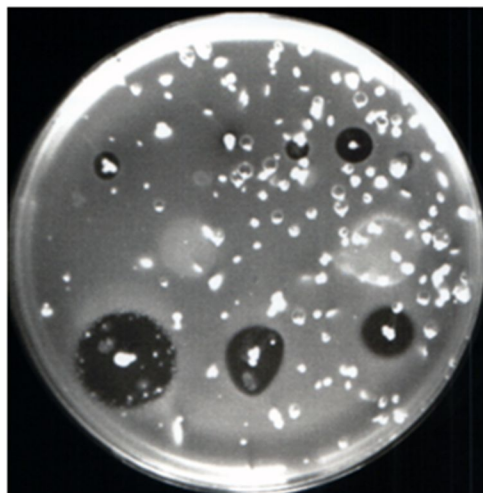
(4) 上記群分けによる腸内細菌叢の比較解析

便検体由来細菌 DNA を用いた 16s メタゲノム解析により、上記 2 で検討したグループ分けを利用して腸内細菌叢の群間比較解析を行う。

4. 研究成果

これまで分離した *S. mutans* 26 臨床分離株にて、agar diffuse assay より抗菌物質産生株を同定したところ 16 株が抗菌物質産生株であった。既存のバクテリオシンである Mutacin I/III, II, および Smb の分布を調べたところ、Mutacin I/III 陽性 5 株、Mutacin II 陽性 0 株、Smb 陽性 9 株であった。性状は明らかでないものの遺伝子が同定されているバクテリオシン、Mutacin IV, K8 の分布を調べると、Mutacin K8 は 5 株、Mutacin IV は 2 株であった。これらのバクテリオシンに関して、2 種類以上のバクテリオシンを保有する株は存在しなかった。次にバクテリオシン非保有株 5 株について agar diffuse assay を行った。Indicator として腸内細菌叢構成細菌の 1 種である *Clostridium perfringens* を用いたところ、2 株ではっきりとした増殖阻止円が確認できた（右写真、左下阻止円は陽性コントロール、下中、および右で阻止円が確認できる）。この 2 株について全ゲノム解析を行い、抗菌物質産生に関する遺伝子を探索すると、抗菌物質産生に関与する reutericyclin 遺伝子群が確認できた。Reutericyclin は *Lactobacillus reuteri* (現 *Limosilactobacillus reuteri*) で報告されているバクテリオシンであり、*S. mutans* でも 9 つの遺伝子群から生成されるバクテリオシンであることが報告されたばかりであった (Tang et al. ACS Infectious Diseases, 2020)。そこで reutericyclin 遺伝子群にある 2 つの transcriptional regulator, TetR に着目し、これら遺伝子群の遺伝子発現制御について解析を行った。2 つの TetR は正および負に働く regulator であり、遺伝子群内で生成された物質をリガンドとすることで発現調整が行われるといった、これまでにない様相を示すことが明らかとなった。また Reutericyclin は口腔内レンサ球菌、腸内細菌叢構成細菌である *Clostridium* 属細菌、*Eubacterium* 属細菌、*Lactobacillus* 属細菌や *Bifidobacterium* 属細菌に対して強い抗菌活性を示すことが明らかとした。

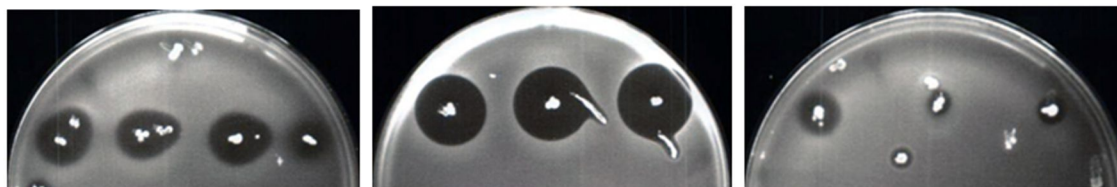
Mutacin K8 はランチビオテクスに分類されるバクテリオシンであり、強い抗菌活性を示すことが報告されている。11 つの遺伝子群から生成される抗菌物質であり、*Streptococcus* 属細菌や *Lactococcus* 属細菌に対して抗菌活性を示すことが報告されている。Mutacin K8 遺伝



Agar diffuse assay
Indicator *Clostridium perfringens*
左下は Smb 産生株 (陽性コントロール)

子保有株は5株あり、これら株の抗菌活性について検討した。Indicatorとして各種腸内細菌叢構成細菌を使用し抗菌活性を確認したところ、Mutacin K8株ははっきりとした増殖阻止円を確認できなかった(写真下)。PCRにて遺伝子群の確認をしたところ、部分欠失している株が殆どであり、全長の遺伝子群を保有している株は認められなかった。

Indicator : *Eubacterium limosum*



Smb

Mutacin I/III

Mutacin K8

また *S. mutans* が産生するバクテリオシンには Mutacin IV が報告されている。Mutacin IV は報告数も多く、*S. pyogenes* などに抗菌活性を示すことが明らかとされている。今回腸内細菌叢は Mutacin IV は抗菌活性を示すことはなかった。

以上の結果から、小児において腸内細菌叢解析に用いた群分けには Mutacin I/III および Mutacin Smb 産生細菌陽性および陰性に群分けしたものの、バクテリオシン保有者群において reutericyclin 保有者も加えて群分けを行うこととした。現在大人 500 名の唾液および便検体の腸内細菌叢の解析を行っている。細菌叢の解析が終了し、データのより詳細な解析を進め、口腔内にバクテリオシンを産生する細菌を保菌することが腸内細菌叢の dysbiosis の原因となるか、について検討する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Osaki T, Lin Y, Sasahira N, Ueno M, Yonezawa H, Hojo F, Okuda M, Matsuyama M, Sasaki T, Kobayashi S, Tezuka S, Tanaka K, Dan N, Kuruma S, Egawa N, Kamiya S, Kikuchi S.	4. 巻 27(1)
2. 論文標題 Prevalence estimates of Helicobacter species infection in pancreatic and biliary tract cancers.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Helicobacter	6. 最初と最後の頁 12866
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hel.12866.	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 Yokota K, Osaki T, Hayashi S, Yokota SI, Takeuchi H, Rimbara E, Ojima H, Sato T, Yonezawa H, Shibayama K, Tokunaga K, Kamiya S, Murakami K, Kato M, Sugiyama T.	4. 巻 27(3)
2. 論文標題 Establishment of a reference panel of Helicobacter pylori strains for antimicrobial susceptibility testing.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Helicobacter	6. 最初と最後の頁 12874
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/hel.12874.	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 Yonezawa Hideo, Kokubu Eitoyo, Kikuchi Yuichiro, Ishihara Kazuyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 Complete genome sequence of <i>Fusobacterium vincentii</i> strain TDC100 isolated from an apical periodontitis lesion	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 119723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mra.01197-23	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 -
1. 著者名 Nakamura Tomoyo, Yonezawa Hideo, Kawarai Taketo, Narisawa Naoki, Senpuku Hidenobu	4. 巻 204
2. 論文標題 Inhibitory effect of the combination of xylitol and funoran on Streptococcus mutans biofilm formation on the uncoated surface	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Archives of Microbiology	6. 最初と最後の頁 723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00203-022-03299-6	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 米澤 英雄, 国分 栄仁, 菊池 有一郎, 三戸部 治郎, 石原 和幸
2. 発表標題 Streptococcus mutansロイテリサイクリン産生の発現メカニズムの解析
3. 学会等名 第96回日本細菌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米澤英雄, 北条史, 大崎敬子, 神谷茂
2. 発表標題 口腔内細菌が産生するlantibioticsは腸内dysbiosisの原因となる可能性の検討
3. 学会等名 第27回日本ヘリコバクター学会学術集会
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
研究分担者	今井 健一 (Imai Kenichi) (60381810)	日本大学・歯学部・教授 (32665)	

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
---------	---------