

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11851

研究課題名(和文) 呼気中の揮発性有機成分の選択的検出による早期肺がんの高感度スクリーニング

研究課題名(英文) Feasibility of using the marmoset as a human oral disease model

研究代表者

竹原 祥子 (Takehara, Sachiko)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：60622438

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：研究計画段階で研究実施を予定していた海外病院の事情により、計画変更を余儀なくされた。主目的の達成に支障をきたすことなく研究を遂行するためにヒトに最も近い霊長類を用いて、口腔状況、歯列弓が近い霊長類コモンマーモセットを用いることとした。本研究の結果が得られれば、臨床・基礎の橋渡し研究となりうると考えた。マーモセットの口腔内細菌のメタゲノム解析を行い、口腔内状況との関連を分析すると同時に、ヒトとの比較検討を行った。その結果、歯肉に炎症所見が認められる個体には、ヒトと同様の歯周病と関連のある細菌の存在が認められた。また、ヒトとコモンマーモセットで共通して存在する細菌が多く認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

超高齢化社会を迎え、健康寿命をいかに伸ばすかが課題である。多くの疫学研究により健康寿命に口腔状態が関連していることが報告されているが、加齢に伴う変化は個人差が大きく、様々な交絡因子が関与していることから、人を対象とした研究は難しい。基礎研究ではマウス、ラット、犬などの実験動物が用いられているが、口腔細菌叢はヒトと大きく異なることが報告されている。一方、マーモセットはヒトに最も近い霊長類で、平均寿命はヒトの約6分の1、顎骨の形態・歯種などの口腔の解剖学的特徴がヒトとほぼ同じである。マーモセットの口腔細菌叢に関する本研究の結果は、歯科疾患・加齢モデルとしてのマーモセットの可能性を示すものである。

研究成果の概要(英文)：The common marmoset may offer several advantages over other non-human primates in terms of its smaller size, shorter life-span, and dental anatomy identical to humans. Our results indicated that the types of oral microbiomes detected among human and marmoset were nearly indistinguishable. In contrast, the oral microbiomes of our human and marmoset subjects were distinctly different from those reported for rats and dogs, which are popular research animals. The oral microbiomes of marmosets showed greater diversity than those of humans. However, the oral microbiota of marmosets exhibited less variation than those of humans. The characteristics of its oral microbiota, combined with other technical advantages, suggest that the marmoset may provide the best animal model thus far for the study of oral health. This study characterized the oral microbes of the marmoset, thereby providing information to support future application of the marmoset as a model for age-related oral disease.

研究分野：予防歯科

キーワード：コモンマーモセット 霊長類 口腔細菌 メタゲノム解析 老齢歯学 歯周病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺がんによる死亡者数は世界中で年間160万人にのぼり、がん死の中で最も多く全体の約2割を占めている。日本においても死因の第1位はがんで、肺がんが部位別がん死亡率の第1位である。肺がん罹患率はさらに増加しており、早期発見や治療法の開発が急務である。わが国では肺がんの早期発見を目的として、成人を対象に胸部X線検査や喀痰細胞診による定期検診が行われているが、依然として肺がんの死亡率は高い。ステージの早期肺がんは5年生存率が高いが(図1)、自覚症状を伴わないことが多く、現行の検診方法では大きさや部位による見逃しなど、早期発見が難しい。肺がん検診において、病変の小さな早期がんを、いかにして高感度に見つけるか、その高感度スクリーニング法の開発が急務である。

がん患者には、がん罹患部位に特有の臭いがあり、これを利用して肺がん患者から特定物質の検出が報告されている。これらの物質を肺がんのマーカーとして、呼気によるスクリーニング法が研究されているが、呼気中VOCの大半が口腔由来であること、肺がん由来VOCは微量であることが十分考慮されていないため、精度の低い研究結果となっている。

歯科では口臭と歯科疾患との関連についての研究が進んでおり、呼気に含まれる揮発性硫黄化合物(Volatile Sulfur Compounds)の分析、診断基準および治療法が確立している。本研究では、申請者が研究し臨床で用いている口臭分析技術を応用し、口腔由来の揮発性有機化合物(Volatile Organic Compounds: VOC)を特異的に除去する方法の開発を行う。呼気中VOCの大半を占める口腔由来VOCを除去することができれば、呼気を用いた肺がんスクリーニングに応用することで、より高感度なスクリーニングが実現可能となる。

研究開始当初、研究実施場所として予定していた海外病院の事情により、一部計画の変更を余儀なくされた。そこで、主目的の達成に支障をきたすことなく、研究を遂行するためにヒトに最も近い霊長類を用いて、口腔状況、顎骨、歯列弓が近い霊長類コモンマーモセットを用いることとした。ライフサイエンスの分野において、マーモセットを用いた実験の重要性が注目されているが、コモンマーモセットに関する研究、特に歯科分野の研究は少ない。

2. 研究の目的

肺がんは、がんの中で死亡率が最も高い疾患であり、早期発見が生存率の鍵を握る。現在、肺がん検診として胸部X線や喀痰細胞診が行われているが、腫瘍の発生部位や大きさによっては発見が難しく、早期肺がんは見逃しも多い。呼気を用いた肺がん検出法が研究されているが、肺がん由来の臭い成分は微量であるため、口腔由来の揮発性有機化合物(VOC)の妨害を受けやすく、高感度に肺がんをスクリーニングするのは難しい。本研究では、申請者の口臭研究における実績をもとにして、呼気から口腔由来VOCを選択的に除去する方法を開発する。

研究計画段階で、一部計画の変更を余儀なくされた。主目的の達成に支障をきたすことなく研究を遂行するためにヒトに最も近い霊長類であるマーモセットを用いた研究計画を練り直した。マーモセットを用いる有用性と意義について検証するために、ヒトとマーモセットサンプルの比較分析を追加し、ヒト疾患モデルとしてのマーモセットの可能性を検証し、臨床・基礎の橋渡し研究とすることを目的とした。

3. 研究の方法

霊長類コモンマーモセット *Callithrix jacchus* はヒトに近い歯列(12C1P2M3, 全32歯)を持つことで知られている。本研究では、高齢マーモセット(オス:4頭、メス:4頭)および比較対照として若年マーモセット2頭、さらにヒトモデルとしての検証対照としてヒト(男性:4名、女性4名)試料を用いた。一般的な歯科診断(現存歯数、歯肉炎の有無、プラークおよび歯石の付着状況など)に加えて、唾液中の細菌叢の解析を行い、種間比較解析を行った。採取した唾液から核酸を抽出し、シーケンスライブラリを作成し、得られた塩基配列データを基にして細菌叢プロファイルを作成し、サンプル間のプロファイル比較解析を行なった。これと並行して、マーモセットから採取した唾液に含まれるアミラーゼの定量を行い、主要タンパク質の観点でヒトの唾液成分との違いを検討した。

4. 研究成果

口腔内には500種以上の細菌が生息しているといわれており、多種多様な細菌が細菌叢(口腔内フローラ)を形成している(図1)。ヒトとマーモセットの口腔内細菌叢の比較検討の結果、Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria, Fusobacteriumといった門レベルで共通する細菌叢が認められた。この結果は霊長類を扱った先行研究に一致するものである。Spirochaetesはヒトには認められなかったが、マーモセットには認められた(図2)。これはマーモセットの口腔内には歯肉の炎症所見が認められたが、ヒトには認められなかったことに関連していると思われる。

マーモセットはヒトに比べて Shannon's index および Chao 1 index が有意に高い結果であった。これはマーモセットの口腔内細菌叢の多様性が高いことを示している(図3)。多様性が高いことは個体内の細菌の種類数が多いことを示すものである。サンプルの OTU (Operational Taxonomic Unit) から、細菌叢の違いを距離として計算する手法(UniFrac 解析)で解析した結果、ヒトと比較してマーモセット個体間の多様性が少ないことを示す結果であった(図4)。マーモセットの口腔内細菌叢に多様性が少なかったのは、同じ環境で飼育され、同

じ食べ物を食べていることが関係していると考えられた。

本研究によって、ヒトと同じ歯列・歯牙数をもつコモンマーモセットにおいて、共通する細菌および種特有の細菌などを明らかにすることが出来た。ヒトの口腔内細菌叢に比べて、マーモセットの口腔内細菌叢は個体間の多様性が低かったことは、マーモセットの疾患モデルとしての可能性を示すものである。

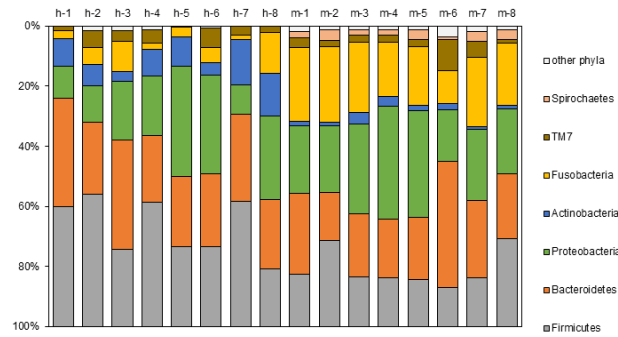


図 1 . ヒトとマーモセットの口腔内細菌叢

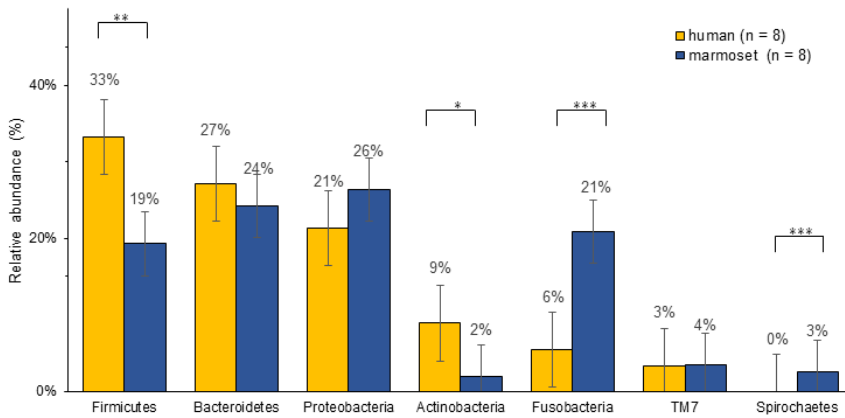


図 2 . 口腔内細菌の相対量 (門レベル) (*: $p = 0.002$, **: $p = 0.004$, ***: $p < 0.0001$)

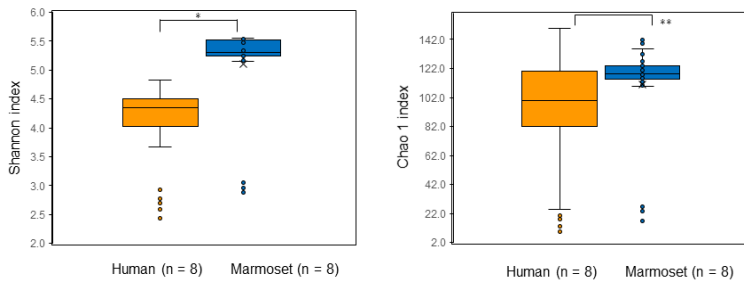


図 3 . ヒトとマーモセットの口腔内細菌叢の多様性(OTU 解析) (*: $p < 0.001$, **: $p = 0.0013$)

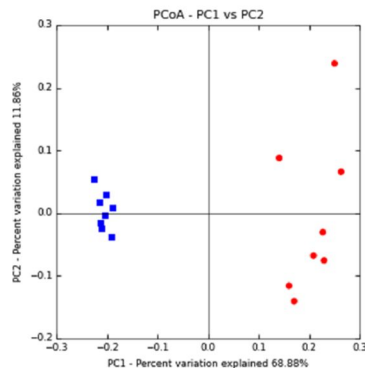


図 4 . 重み付き Unifrac メトリックに基づく口腔内細菌叢の主座標分析

: マーモセット : ヒト

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takehara S, Zeredo JL, Kumei Y, Kagiya K, Fukasawa K, Oshiro A, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Characterization of oral microbiota in marmosets: Feasibility of using the marmoset as a human oral disease model	5. 発行年 2019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） doi.org/10.1371/journal.pone.0207560	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

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Rezende LO, Borges LS, de Campos PS, Kagiya K, Baba O, Picinato M, Takehara S, Kumei Y, Zeredo JLL
2. 発表標題 Cineradiographic study of the development of mastication in the common marmoset
3. 学会等名 日本神経科学会（国際学会）
4. 発表年 2018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	川口 陽子 (Kawaguchi Yoko) (20126220)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
研究分担者	品田 佳世子 (Shinada Kayoko) (60251542)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
研究分担者	桑井 康宏 (Kumei Yasuhiro) (30161714)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師 (12602)	

6. 研究組織（つづき）

	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	植野 正之 (Ueno Masayuki) (70401388)	埼玉県立大学・保健医療福祉学部・教授 (22401)	
研究 協 力 者	ゼレド ジョージ (Jorge L. Zeredo)	国立ブラジリア大学・健康科学部・教授	