

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09890

研究課題名(和文) 口腔マイクロビオータが及ぼす腸内マイクロビオータへの影響の解明

研究課題名(英文) Effect of lantibiotics bacteriocin produced by oral bacteria on intestinal microbiota

研究代表者

米澤 英雄 (Yonezawa, Hideo)

杏林大学・医学部・講師

研究者番号：60453528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：口腔内にはランチビオテクスと呼ばれるグラム陽性菌に対して強い抗菌活性を示す抗菌物質を産生する細菌が存在する。これらランチビオティックは、腸内細菌叢に影響を与える可能性が考えられる。本研究では小児69人の唾液および便検体の解析より、口腔細菌が産生する代表的なランチビオテクス Mutacin I/IIIおよびSmb産生細菌を口腔内に保菌すると、腸内細菌叢の多様性減少、およびFirmicutes門細菌占有率の有意な減少が認められた。またMutacin I産生細菌の培養上清を投与したマウスの糞便細菌叢でも同様の結果が得た。以上より、口腔細菌が腸内細菌叢のdysbiosisの原因となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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しており、ヒトと常在細菌叢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、腸内細菌叢の機能解明により、腸内細菌叢細菌構成の異常(dysbiosis)は、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ものであり、ヒト細菌叢研究にインパクトを与える研究であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lantibiotics are a type of bacteriocin produced by Gram-positive bacteria with a wide spectrum of Gram-positive antimicrobial activity. Several oral bacteria have been reported to produce several kinds of lantibiotics. We hypothesized that these bacteriocins may be able to persist into the intestinal tract maintaining a strong antimicrobial activity, affecting the intestinal microbiota. We demonstrate that subjects possessing lantibiotic-producing bacteria in their oral cavity exhibited a tendency of decreased species richness and have significantly reduced abundance of the phylum Firmicutes in their intestinal microbiota. Similar results were obtained in the fecal microbiota of mice fed with the lantibiotic bacteriocin Mutacin I. These results showed that lantibiotic bacteriocins produced in the oral cavity perturb the intestinal microbiota and suggest that oral bacteria may be one of the causative factors of intestinal microbiota dysbiosis.

研究分野：細菌学

キーワード：ランチビオテクス

1. 研究開始時当初の背景

1 私たちの身体には 500～1000 種類、数にして 100 兆個以上の細菌が常在し、常在細菌叢を形成している。常在細菌が最も多く存在するのは腸管内であり、腸内細菌叢が形成されている。腸内細菌叢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など、宿主であるヒトと共生しながら棲息している。

口腔には 700 種類、多い人では 1 兆個を超える細菌が棲息している。口腔は食物・飲料を摂取する開口部であり、消化管へ繋がっている。唾液には 1mL あたり約 10^9 - 10^{10} 個もの口腔内細菌が含まれている。ヒトは 1 日あたり約 1.5L もの唾液が腸管へと流入している。つまり単純計算でおおよそ 1500 億から 1 兆個の口腔細菌が 1 日で腸管へと流入している。口腔細菌叢にはレンサ球菌属が細菌主として存在する。一部のレンサ球菌属細菌は、口腔内で抗菌物質（バクテリオシン）を産生することが報告されている。う蝕原因細菌である *Streptococcus mutans* が代表的なバクテリオシン産生細菌である。我々は、*S. mutans* の新規のバクテリオシン Smb を同定し、その性状解析を報告している（1）。*S. mutans* は Smb の他にも Mutacin と呼ばれるバクテリオシンを産生する。Smb や Mutacin はランチビオテックスと呼ばれるバクテリオシンの 1 種であり、グラム陽性菌に対して非常に強い抗菌活性と広い抗菌スペクトラムを示す特徴を持つ。さらにランチビオテックスはペプチド性であり、消化酵素等で失活しないものもあるため、そのようなランチビオテックスは抗菌活性を保ったまま絶えず腸管に流入している可能性が高い。

ヒトの腸内細菌叢の異常は dysbiosis と呼ばれ、炎症性腸疾患や過敏性腸症候群、心血管疾患、自己免疫疾患、生活習慣病（肥満、動脈硬化、糖尿病など）や自閉症など多岐にわたる疾患との関連性が示唆されている（3, 4, 5）。dysbiosis の原因としては抗菌薬の服用に加えて食餌や加齢で引き起こされることが報告されているものの（6, 7）、dysbiosis を引き起こす原因の全容は明らかにされてはいない。

2. 研究の目的

これまでの口腔マイクロビオータ研究は、そのほとんどは口腔内二大疾患であるう蝕および歯周病の病因論を解明するために行なわれてきている。さらに歯周病や歯周病原細菌が、糖尿病や動脈硬化性心疾患、誤嚥性肺炎などの全身疾患の病態発症とその促進に関与していることや、関節リウマチや脳症といった全身疾患で、口腔マイクロビオータに変化が現れるなど、特定の疾患と口腔内細菌叢の関係に関する報告もなされている。その一方で口腔内細菌叢と腸内細菌叢との直接的な関係に関する報告はなされていない。本研究の目的は「口腔内にランチビオテックスバクテリオシン産生細菌を保菌することは、腸内 dysbiosis の原因となり得るか」について証明することである。口腔細菌叢を検査することで、腸内細菌叢の細菌構成が予測できるかについて、基礎的な検討を行う。得られた結果は、口腔細菌叢解析を行なうことで、新たな疾患予防システムを構築することができる可能性を示すことが可能となる。

3. 研究の方法

東京医科歯科大学小児歯科外来を受診した小児 69 名から唾液および便検体を採取した。本研究は、東京医科歯科大学および京林大学の倫理委員会の承認を得て、ヘルシンキ宣言に従って実施された（東京医科歯科大学：D2015-517、2016 年 5 月 13 日および京林大学：813-01、2016 年 8 月 18 日）。検体は 3 歳から 10 歳までの平均年齢 6.4 歳の少女 19 人と少年 50 人の患者から収集された。すべてのボランティアは、歯科治療（虫歯治療や定期的な歯科検診など）以外の治療を受けておらず、過去 2 週間以内に抗生物質を含む薬を服用していないことを条件とした。唾液および便検体より細菌 DNA を抽出した。便検体からの最近 DNA 抽出方法は、まず便検体を含む溶解緩衝液をガラスビーズと混合し、マルチビーズショッカー（MB755U、安井菊、東京、日本）を使用して 4200rpm の設定で 30 秒間ビーズにて便検体を破砕した。75 °C で 5 分間培養した後、同じ方法で再度破砕作業を行った。その後、QIAamp DNA Stool キット（Qiagen、Germantown、MD、U.S.A.）を使用して、キットのプロトコールに従い DNA 抽出を行った。唾液検体は、唾液より回収した細菌を 3 mg/mL リゾチームと 40U のムタノリシンを含む 100 mL の Tris-EDTA バッファーに懸濁し、37 °C で 1.5 時間インキュベートした後、QIAamp DNA Mini Kit（Qiagen）を使用してキットのプロトコールに従って細菌 DNA を抽出した。

唾液由来細菌 DNA よりランチビオテクスである Mutacin I/III および Smb 遺伝子領域特異的プライマーを用いた PCR にて、DNA 中にこれらランチビオテクス遺伝子が存在するかについて明らかとした。また唾液由来および便由来細菌 DNA は次世代シーケンサーを用いた 16S ribosomal RNA sequence により、腸内細菌叢の解析を行った。

口腔内う蝕原因細菌である *S. mutans* の Mutacin I 産生株の培養上精を、SPF マウスへ 1 日 2 回 4 日間経口投与した。コントロールとして Mutacin I 遺伝子欠損株の培養上精を同条件で投与した。投与終了後翌日に便サンプルを採取し、細菌 DNA を抽出し細菌叢の解析を、次世代シーケンサーを用いた 16S rRNA シーケンスにて行った。

4. 研究成果

小児 69 名の唾液由来細菌 DNA において 5 名が Mutacin I/III 遺伝子陽性、8 名が Smb 遺伝子陽性であった。そこでランチビオテクス陽性者 13 名および陰性者 56 名とで群分けし、16S rRNA シーケンスによる口腔内細菌叢および腸内細菌叢の解析を行った。口腔内細菌叢の解析結果より、多様性解析（アルファ多様性およびベータ多様性）、細菌叢分類学的変化において、群間における大きな変化は認められなかった。次に腸内細菌叢の解析結果より腸内細菌叢アルファ多様性においてランチビオテクス陽性群（Group1）において Chao 1 および Shannon index において有意差は認められなかったもののランチビオテクス陰性群（Group2）と比較して多様性が減少する傾向が認められた（図 1）。一方ベータ多様性解析においては Weighted Unifrac 距離、Unweighted Unifrac 距離とグループ感における違いは

認められなかった。次に門レベルにおける分類学的変化を確認したところ、ランチビオテクス陽性群において Firmicutes 占有率の有意な減少とそれに相応する Proteobacteria や Bacteroidetes の増加の傾向が認められた(図2)。ランチビオテクス陽性群における Firmicutes の減少は特異的プライマーを用いた Real-time PCR においても確認できた。

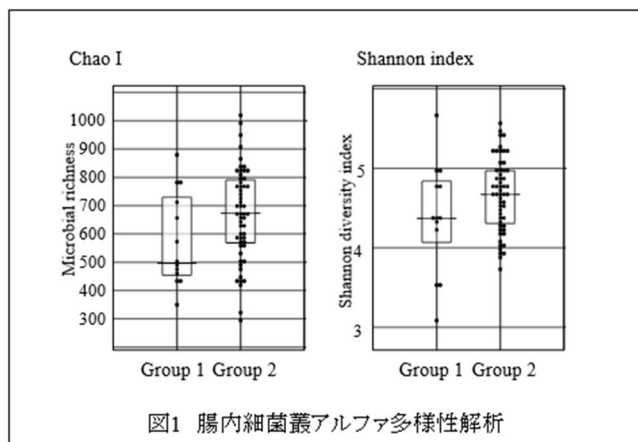


図1 腸内細菌叢アルファ多様性解析

Firmicutes に属する細菌種はそのほとんどはグラム陽性細菌でありランチビオテクス感受性の細菌である。本結果は口腔から流出したランチビオテクスにより、腸内細菌叢構成グラム陽性細菌が減少した結果であることが示唆された。一方口腔内で産生されたランチビオテクスは、そのほとんどは口腔内細菌に対して消費されると予測していたものの、口腔内細菌叢の Firmicute の占有率減少は認められなかった。この結果は、口腔内細菌は平素より口腔内で産生されたランチビオテクスに暴露され、耐性機構を持つ細菌が多く占めている可能性が考えられる。ランチビオテクスの作用機序は標的細菌に付着することから始まる。その耐性機構としては付着抑制が挙げられる。つまり口腔内で消費されないランチビオテクスが腸管へ流出しやすくなっている可能性が示唆された。

次にマウスにおけるランチビオテクス産生細菌の腸内細菌叢への影響についての検討を行った。マウス口腔に代表的なランチビオテクス産生細菌である *S. mutans* を定着させることは可能であるものの、その際に砂糖を多く含む餌を与える必要がある。また口腔内への定着期間に関しても検討が必要であることから、本研究においてはランチビオテクスである Mutacin I 産生 *S. mutans* の培養上精をマウス胃内へ直接投与し、その腸内細菌叢への影響を確認した。

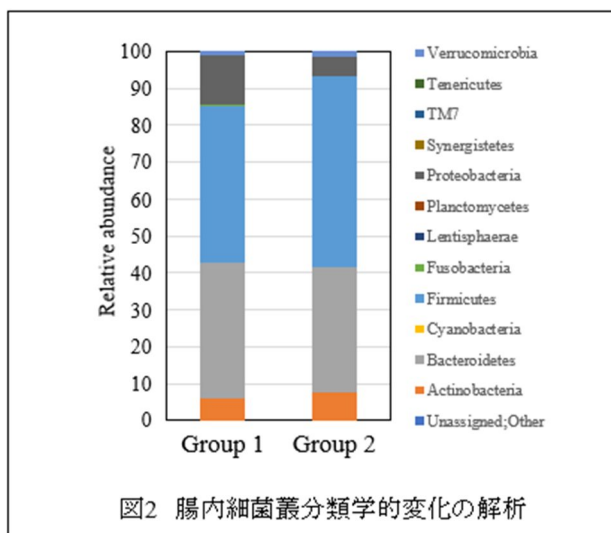


図2 腸内細菌叢分類学的変化の解析

の影響を確認した。コントロールとして同じ *S. mutans* 株の Mutacin I 遺伝子欠損株の培養上精を投与した。投与後便検体を採取し、腸内細菌叢の解析を行った。Mutacin I 陽性群 (Group3) および欠損株群 (Group4) の群分けによる解析の結果、アルファ多様性解析は群間による変化は認められなかった。多様性解析では Weighted Unifrac 距離において群間による異なるクラスタリングを示した。次に門レベルにおける分類学的変化を確認した

ところ、ヒト腸内細菌叢解析と同様に Mutacin I 投与群で Firmicutes 占有率の有意な減少が認められた。

以上より口腔内にランチビオテクス産生細菌を保菌することは腸内細菌叢の dysbiosis 誘導の原因となる可能性が示唆された。口腔は多種多数の細菌が存在する部位である一方で外界に繋がる器官であり、ブラッシングや歯科医におけるケアにより比較的コントロールが行いやすい部位である。本研究は、口腔内細菌のコントロールにより腸内細菌叢の管理を行うことが出来る、口腔内管理が全身の健康のマネジメントに繋がることが期待できる、基礎的な証明ができた研究であると考えられる。

< 引用文献 >

1. Yonezawa H, Kuramitsu HK. Genetic analysis of a unique bacteriocin, Smb, produced by *Streptococcus mutans* GS5. *Antimicrob Agents Chemother.* 49: 541-8. 2005.
2. Manges AR, et al. Comparative metagenomic study of alterations to the intestinal microbiota and risk of nosocomial *Clostridium difficile*-associated disease. *The Journal of infectious diseases* 202: 1877-1884. 2010.
3. Ley RE, Backhed F, Turnbaugh P, Lozupone CA, Knight RD, Gordon JI. Obesity alters gut microbial ecology. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 11070-11075. 2005.
4. Forslund K, et al. Disentangling type 2 diabetes and metformin treatment signatures in the human gut microbiota. *Nature* 528, 262-266 (2015).
5. Blaser MJ. Fecal Microbiota Transplantation for Dysbiosis - Predictable Risks. *N Engl J Med* 381: 2064-2066. 2019.
6. Das B, Nair GB. Homeostasis and dysbiosis of the gut microbiome in health and disease. *J Biosci* 44. 2019.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Yonezawa H, Motegi M, Oishi A, Hojo F, Higashi S, Nozaki E, Oka K, Takahashi M, Osaki T, Kamiya S.	4. 巻 25
2. 論文標題 Lantibiotics Produced by Oral Inhabitants as a Trigger for Dysbiosis of Human Intestinal Microbiota.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22073343	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
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 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
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 Hojo Fuhito, Osaki Takako, Yonezawa Hideo, Hanawa Tomoko, Kurata Satoshi, Kamiya Shigeru	4. 巻 26
2. 論文標題 Acanthamoeba castellanii supports extracellular survival of Helicobacter pylori in co-culture	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy	6. 最初と最後の頁 946 ~ 954
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jiac.2020.04.016	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 Fauzia Kartika Afrida, Miftahussurur Muhammad, Syam Ari Fahrial, Waskito Langgeng Agung, Doohan Dalla, Rezkiha Yudith Annisa Ayu, Matsumoto Takashi, Tuan Vo Phuoc, Akada Junko, Yonezawa Hideo, Kamiya Shigeru, Yamaoka Yoshio	4. 巻 12
2. 論文標題 Biofilm Formation and Antibiotic Resistance Phenotype of Helicobacter pylori Clinical Isolates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Toxins	6. 最初と最後の頁 473 ~ 473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/toxins12080473	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 Yonezawa H, Osaki T, Hojo F, Kamiya S	4. 巻 132
2. 論文標題 Effect of Helicobacter pylori biofilm formation on susceptibility to amoxicillin, metronidazole and clarithromycin.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbial Pathogenesis	6. 最初と最後の頁 100-108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.micpath.2019.04.030.	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 Kamiya s, Yonezawa H, Osaki T	4. 巻 1149
2. 論文標題 Role of Probiotics in Eradication Therapy for Helicobacter pylori Infection.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advances in Experimental Medicine and Biology	6. 最初と最後の頁 243-255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/5584_2019_369.	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 Zaman C, Osaki T, Furuta Y, Hojo F, Yonezawa H, Konno M, Kurata S, Hanawa T, Kamiya S	4. 巻 68
2. 論文標題 Enhanced infectivity of strains of Helicobacter pylori isolated from children compared with parental strains.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JOURNAL OF MEDICAL MICROBIOLOGY	6. 最初と最後の頁 633-641
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jmm.0.000918.	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 Osaki Takako, Zaman Cynthia, Yonezawa Hideo, Lin Yingsong, Okuda Masumi, Nozaki Eriko, Hojo Fuhito, Kurata Satoshi, Hanawa Tomoko, Kikuchi Shogo, Kamiya Shigeru	4. 巻 9
2. 論文標題 Influence of Intestinal Indigenous Microbiota on Intrafamilial Infection by Helicobacter pylori in Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 287
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2018.00287	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8件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

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

1. 発表者名 米澤英雄, 大崎敬子, 神谷茂, 塩谷昭子
2. 発表標題 Helicobacter pylori感染者および除菌後患者の胃内細菌叢 多様性解析とクラスター解析
3. 学会等名 第26回日本ヘリコバクター学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 米澤英雄, 茂木瑞穂, 大石敦史, 北条史, 東聖也, 野崎江里子, 岡健太郎, 高橋志達, 大崎敬子, 神谷茂
2. 発表標題 口腔内産生lantibioticsの腸内細菌叢に及ぼす影響
3. 学会等名 第23回日本臨床腸内微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yonezawa H, Motegi M, Osaki T, Hojo F, Kuroki Y, Oka K, Kurata K, Hanawa T, Takahashi M, Kamiya S
2. 発表標題 Effect of lantibiotics bacteriocin produced by oral bacteria on intestinal microbiota.
3. 学会等名 第92回日本細菌学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 米澤英雄, 茂木瑞穂、北条史, 黒木靖敏、岡健太郎、高橋志達、大崎敬子、神谷茂
2. 発表標題 Streptococcus mutansが産生するlantibiotics bacteriocinが及ぼす腸内細菌叢への影響の解明
3. 学会等名 第102回日本細菌学会関東支部総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 米澤英雄, 茂木瑞穂、北条史, 黒木靖敏、岡健太郎、高橋志達、大崎敬子、神谷茂
2. 発表標題 口腔内産生lantibiotics bacteriocinが及ぼす腸内細菌叢への影響
3. 学会等名 第93回日本細菌学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hideo Yonezawa, Takako Osaki, Shigeru Kamiya
2. 発表標題 An outer membrane protein, AlpA, affects AlpB expression and biofilm formation in Helicobacter pylori
3. 学会等名 40th International Congress of the Society for Microbial Ecology and Diseases SOMED2018 Congress (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 米澤英雄、大崎敬子、北条史、神谷茂
2. 発表標題 Helicobacter pylori高バイオフィルム形成株TK1402株のバイオフィルム形成に関わる遺伝子の同定
3. 学会等名 第25回日本ヘリコバクター学会学術集会
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	中尾 龍馬 (Nakao Ryoma)	国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官	
	(10370959)	(82603)	

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