

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：34401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18521

研究課題名（和文）IgA抗体応答性からみた2型糖尿病患者の唾液細菌叢研究

研究課題名（英文）IgA response in relation to the salivary microbiota of diabetic patients with periodontal disease.

研究代表者

大森 実知 (Omori, Michi)

大阪医科薬科大学・医学部・助教

研究者番号：60803137

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）：本研究は、糖尿病患者の口腔細菌環境の特徴を、唾液中の細菌叢、さらに免疫グロブリンA（IgA）抗体応答性に着目して明らかにすることを目的とした。その結果、糖尿病および前糖尿病の対象者の唾液細菌叢は健常者と異なること、およびその特徴を明らかにした。さらに唾液のIgA抗体応答性は細菌の種類によって異なり、細菌叢に影響を及ぼすこと、血糖状態と関連する可能性があることが示唆された。2型糖尿病患者の口腔管理において、唾液を利用した口腔細菌環境の診断、リスク評価のための基礎的データになると考える。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔細菌叢は、全身状態と関連することが近年明らかになってきている。口腔細菌叢を規定する要因の一つとして宿主の免疫応答性、なかでも口腔のIgA抗体応答性が関連する可能性を明らかにしたことは、学術的意義がある。また、本研究結果は、糖尿病および前糖尿病の段階を唾液の細菌叢によってスクリーニングできる可能性を示唆している。世界的な高齢化の進行により、今後糖尿病患者の増加が予測されていること、早期の発見が糖尿病予後と関連することから、臨床的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to characterize the oral bacterial environment of diabetic patients with a focus on the salivary microbiota and immunoglobulin A (IgA) antibody response. We found that the salivary microbiota of diabetic and prediabetic subjects was different from that of healthy subjects. In addition, salivary IgA antibody responses differed among bacterial species and were associated with salivary microbiota, and may be related to glycemic status.

研究分野：口腔微生物学，口腔免疫学

キーワード：口腔細菌叢 IgA抗体 糖尿病

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

糖尿病は歯周病と相互に関連することから、糖尿病患者の歯周病治療、口腔管理の重要性が認識されてきている。糖尿病患者の口腔細菌環境およびそれに対する応答性は健常者とは異なることが示唆されているがその詳細は明らかでない。近年の細菌叢研究の進展により、唾液細菌叢が2型糖尿病と関連することが明らかになってきた。

粘膜組織の免疫応答の主役である免疫グロブリン A (IgA) が細菌叢の維持に重要であるという知見が増え (Okai S. *et al.*, *Nat Microbiol.* 2016), 注目されている。腸内の IgA 抗体は抗原特異的に病原菌を排除する機能だけでなく、常に一部の常在細菌に結合 (コーティング) し、腸内細菌と宿主との共生関係を維持していることがわかってきた (Bunker JJ. *et al.*, *Science.* 2017)。腸内 IgA 抗体結合細菌は炎症性腸疾患に関連すること (Palm NW *et al.*, *Cell.* 2014)、高齢者で IgA 抗体の腸内細菌に対する反応性が低下していること (Sugahara H *et al.*, *Front Microbiol.* 2017) が報告されている。したがって、口腔に分泌される IgA 抗体の応答性は、2型糖尿病患者の口腔細菌叢に影響を及ぼす可能性がある。

本研究は、2型糖尿病の歯周病患者の口腔細菌環境の特徴を、唾液の細菌叢、歯周病細菌の相対量、さらに IgA 抗体応答性に着目して明らかにすることを目的とした。宿主の全身状態、免疫系や代謝系の変化に対して、口腔細菌叢の構成比や構成菌種は変化すると予測されることから、糖尿病患者の口腔細菌叢の特徴を把握する必要がある。2型糖尿病患者の唾液細菌叢を遺伝子レベルで網羅的に評価することに加え、従来から歯周病に対する病原性が高いとされる既知の口腔細菌量を評価して合わせて解析することによって、その特徴を把握しようとする点が本研究の学術的な独自性である。さらに口腔内の IgA がどのような口腔細菌に対してどのようにはたらき、口腔細菌叢に影響するかどうかに関してはこれまでほとんどわかっていない。2型糖尿病患者の口腔細菌の特徴を宿主の応答性、なかでも IgA 抗体応答性に着目して評価しようとする試みは、独自の発想である。本研究において、2型糖尿病患者に特徴的な口腔細菌叢、さらに関連する IgA 抗体応答性が明らかになれば、唾液を用いた侵襲の少ない診断法の開発に繋がると考えられ、創造性があるといえる。さらに2型糖尿病患者に対する口腔細菌をコントロールする新規の方法の開発に繋がる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究は、糖尿病患者の口腔細菌環境の特徴を、唾液の細菌叢および IgA 抗体応答性に着目して明らかにすることを目的とした。さらに口腔内の IgA 抗体が果たす機能の一端を明らかにしようとするものである。

### 3. 研究の方法

(1) 口腔サンプル: 対象者は、大阪医科大学附属病院歯科口腔外科に当院糖尿病代謝内分泌内科から紹介受診された教育入院目的の血糖コントロール不良の2型糖尿病患者およびコントロールとして、性別および年齢をマッチングさせた糖尿病の既往のない高槻市民健康調査の対象者とした。本学の研究倫理委員会承認 (承認番号: 2145) のもと、十分な説明を行った上で口腔サンプルを採取し、口腔および全身状態の情報を得た。サンプル採取は、我々が以前に報告したコットン法 (Omori M, *et al.*, *Clin Oral Investig.* 2021) で行った。

(2) 口腔細菌叢の解析: 口腔サンプルの 16S rRNA メタゲノム解析を行った。すなわち、細菌 DNA を抽出、16S rRNA 遺伝子 V1-V2 領域を PCR 増幅後、次世代シーケンサー (Miseq®: イルミナ社製) にて解析した。シーケンスデータを用いて、比較分析および線形判別分析効果量 (LEfSe) 解析を行った。さらに、機械学習の手法を用いて、糖尿病患者群を唾液細菌叢によって予測するモデルを作成し、その予測性能を検証した。

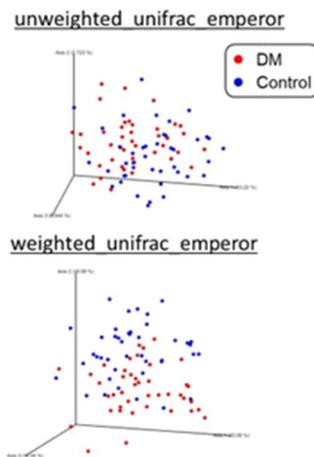
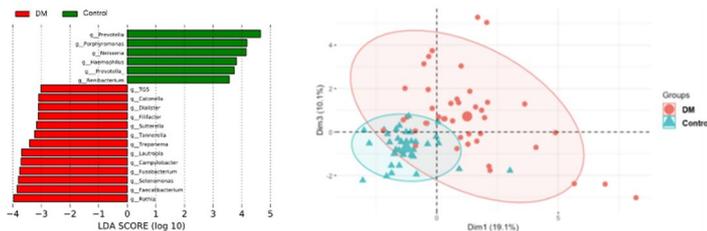
(3) 口腔内 IgA 抗体応答性の解析: 口腔サンプルの sIgA 濃度は ELISA によって定量した。口腔細菌叢に対する口腔内 IgA 抗体応答性を評価するために、口腔サンプル内の IgA 抗体結合細菌と非結合細菌を IgA 特異 PE 標識抗体および MACS システム (Miltenyi Biotec) の PE 磁気ビーズを使用して分離し、(2)の方法で 16S rRNA メタゲノム解析を行った (IgA-Seq)。シーケンスデータを用いて、主要な細菌属の IgA 結合度を結合指数によって評価し、血糖コントロール状態と口腔サンプル中の IgA 抗体応答性の関連を検討した。

### 4. 研究成果

(1) 高齢者の2型糖尿病患者の唾液細菌叢の特徴

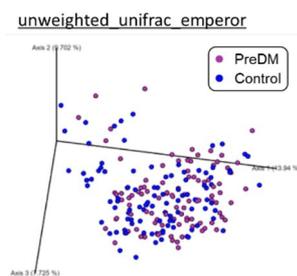
日本人高齢者集団の2型糖尿病に関連する唾液細菌叢の特徴を見出した。対象者は、65~84歳 (平均74歳) の日本人高齢者84人とした。糖尿病患者 (DM) 42人と、年齢および性別をマッチングした健常者 (control) 42人から採取した唾液サンプルを用いて、16S rRNA メタゲノム解析を行い、唾液細菌叢の構成比率を2群間で比較解析した。多様性の解析では、 $\alpha$ 多様性に違いはなかったが (OTU 指数,  $p = 0.939$ ; Shannon 指数,  $p = 0.879$ )、 $\beta$ 多様性は有意な違いを示した (unweighted UniFrac distances,  $p = 0.001$ ; weighted UniFrac distances,  $p = 0.001$ )。

LEfSe 解析の結果、DM 群は、門レベルでは Firmicutes などの細菌比率が高く、Bacteroidetes が低かった。ランダムフォレスト解析によって、DM 患者の判別に寄与する重要度の高い細菌属 18 種を同定した。唾液細菌叢データに基づいたランダムフォレスト解析による DM 予測モデルの予測性能は高かった (曲線下面積 (AUC) = 0.938)。



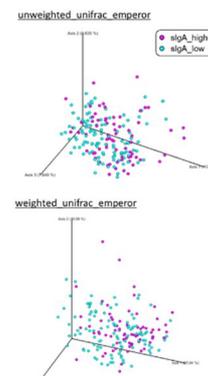
### (2) 前糖尿病対象者の唾液細菌叢の特徴

糖尿病を発症する前段階である前糖尿病の対象者 (PreDM, 空腹時血糖 100 - 125 mg/dL または HbA1c 5.6 - 6.4%, かつ糖尿病治療薬の服用なし) と、年齢および性別をマッチングさせた糖代謝正常者 (Normal) の唾液細菌叢を比較し、その特徴を明らかにした。α 多様性の解析から、PreDM 群と比較して Normal 群では、口腔細菌の豊富さや均等性が低下していた (OTU 指数:  $p = 0.037$ )。β 多様性の解析から、PreDM 群と Normal 群間で細菌叢構成が異なることが明らかになった (unweighted UniFrac distance:  $p = 0.005$ )。LEfSe 解析の結果、属レベルでは、Normal 群では *Streptococcus*, *Treponema*, *Staphylococcus* などが多いことが明らかになった。これらの結果は、前糖尿病の段階を唾液の細菌叢によってスクリーニングできる可能性を示唆している。世界的な高齢化の進行により、今後糖尿病患者の増加が予測されていること、早期の発見が糖尿病予後と関連することから、臨床的意義がある。



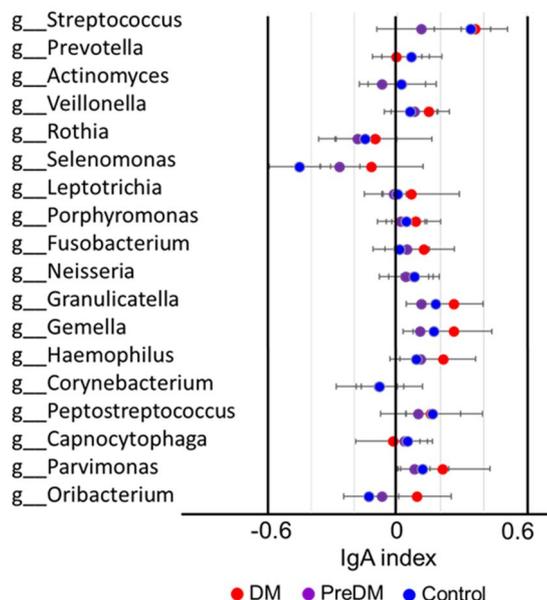
### (3) 口腔内 sIgA 濃度と唾液細菌叢

DM 群, PreDM 群, Normal 群間で口腔内 sIgA 濃度に有意差はみられなかった。sIgA 濃度の高い群 (sIgA\_high) と低い群 (sIgA\_low) の口腔細菌叢構成を比較したところ、有意に異なることが明らかになった (unweighted UniFrac distance:  $p = 0.001$ , weighted UniFrac distance:  $p = 0.002$ )。LEfSe 解析の結果、sIgA\_high 群では *Streptococcus*, *Veillonella*, *Filifactor* などが多く、*Porphyromonas*, *Prevotella*, *Peptococcus* などが少なかった。したがって、口腔内の sIgA は口腔細菌叢構成に影響を及ぼしうる可能性が示唆されたことから、口腔細菌叢を規定する要因のひとつとしての sIgA の役割をさらに調べる必要がある。



### (4) 口腔内 IgA 抗体応答性と糖尿病

IgA 結合細菌が糖尿病および前糖尿病と関連する可能性について検討した。IgA 結合指数を用いて主要な細菌属の IgA 結合度を評価した。細菌によって IgA 結合度は異なり、一部の細菌 (*Rothia*, *Selenomonas*, *Oribacterium* など) は IgA 結合が弱かった。糖尿病患者群 (DM) では、多くの細菌で IgA 結合度が高かったが、*Prevotella*, *Capnocytophaga* は健康者群 (Normal) の方が DM と比較して IgA 結合度が高かった。前糖尿病群 (PreDM) は、Normal と比較して IgA 結合が低い細菌が多かったが、*Selenomonas*, *Fusobacterium*, *Oribacterium* は IgA 結合度が高かった。これらの細菌に対する IgA 抗体応答性は、血糖異常と関連している可能性があり、これまでの報告 (Brown EL, et al. *Infect Immun.* 2020.) と一致することから興味深い。これらのデータは、糖尿病および前糖尿病患者の口腔管理において、口腔細菌叢に着目するのみでなく、宿主の免疫応答性も考慮するための基礎的データとなり得ると考える。



唾液細菌叢において平均細菌構成比率が 0.7% 以上の 18 細菌属の IgA index の平均値 ± 標準偏差 (n = 9) を示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Omori Michi, Kato-Kogoe Nahoko, Sakaguchi Shoichi, Kamiya Kuniyasu, Fukui Nozomu, Gu Yan-Hong, Nakamura Shota, Nakano Takashi, Hoshiga Masaaki, Imagawa Akihisa, Kit Chee Hoe, Tamaki Junko, Ueno Takaaki	4. 巻 26
2. 論文標題 Characterization of salivary microbiota in elderly patients with type 2 diabetes mellitus: a matched case-control study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 493 ~ 504
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-021-04027-y	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 該当する

1. 著者名 Omori Michi, Kato-Kogoe Nahoko, Sakaguchi Shoichi, Fukui Nozomu, Yamamoto Kayoko, Nakajima Yoichiro, Inoue Kazuya, Nakano Hiroyuki, Motooka Daisuke, Nakano Takashi, Nakamura Shota, Ueno Takaaki	4. 巻 25
2. 論文標題 Comparative evaluation of microbial profiles of oral samples obtained at different collection time points and using different methods	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 2779 ~ 2789
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-020-03592-y	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9件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大森実知 小越菜保子 井上和也 中島世市郎 中野旬之 植野高章
2. 発表標題 高齢2型糖尿病患者のOral Microbiomeの特徴
3. 学会等名 日本口腔科学会関東地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大森実知 小越菜保子 井上和也 中島世市郎 中野旬之 植野高章
2. 発表標題 高齢2型糖尿病患者の唾液細菌叢のメタゲノム解析
3. 学会等名 第33回日本口腔科学会近畿地方会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Michi Oomori.
2. 発表標題 Exploratory research on the relationship between oral microbiome and systemic conditions.
3. 学会等名 Meenakshi Academy of Higher Educational and Research. (招待講演)
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
研究協力者	小越 菜保子 (Kato-kogoe nahoko)  (60509115)	大阪医科薬科大学・医学部・助教  (34401)	

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		
シンガポール	National Dental Centre Singapore		