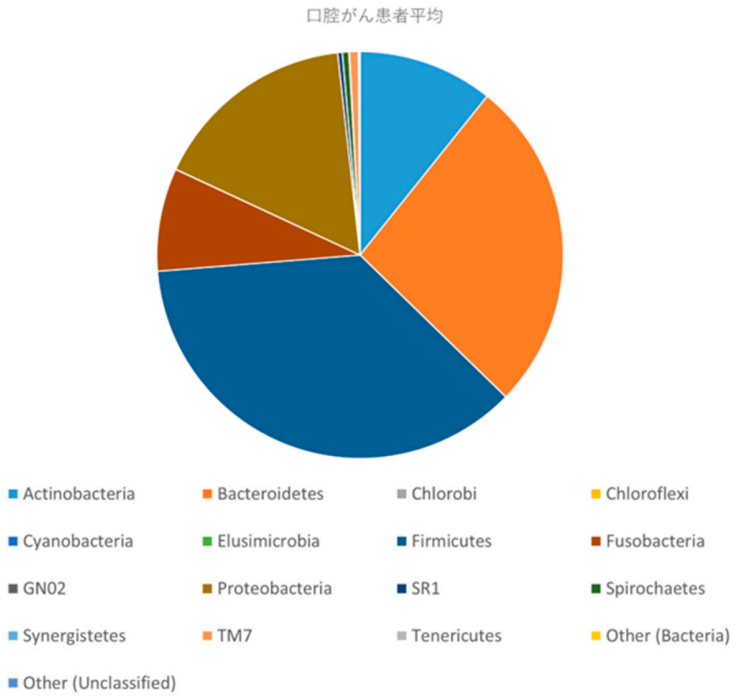
171　口腔がん発症に関与する細菌叢と免疫応答の解明	熊谷　賢一

【目的】本研究では、口腔がん患者を研究対象とし、唾液中の口腔内細菌叢の変化を比較検討することで、口腔がんの発症に関与する口腔内細菌叢を解明することを目的とした。
【方法】口腔癌患者 13 名と健常者 16 名を研究対象とし、唾液中の菌叢を次世代シークエンサーによるメタゲノム解析を実施した。
【結果】門レベルでは口腔がん患者と健常者ともに Firmicutes、Bacteroidetes、Proteobacteria、Actinobacteria の順での存在頻度は同一であったが、口腔がん患者では Fusobacteria、TM7、健常者では TM7、Fusobacteria の順であった。Fusobacteria が口腔がん患者の唾液中に多く認められたことから、口腔がん患者の発癌に関与している可能性が示唆された。

口腔がん患者の唾液中の菌叢（門レベル）



171. 口腔がん発症に関与する細菌叢と免疫応答の解明

熊谷　賢一

鶴見大学 歯学部 口腔顎顔面外科学講座

Key words：口腔癌，唾液，菌叢解析

緒　言

口腔粘膜の免疫システムは主に粘膜免疫によって制御されており、細菌・ウイルス・真菌と多岐にわたる外来性の病原微生物の侵入および定着を自然免疫系の働きによって防御している。口腔内には膨大な数（100 兆個／個体）の常在菌が存在し、宿主との間で複雑な自然免疫応答が存在するが、その自然免疫系を破綻させて発生する自己細胞由来のがん細胞は、多くは免疫監視機構が挙動することで病変形成を行う事無く淘汰されて消失することとなる。しかし、発生した一部のがん細胞の増殖能や浸潤能が異常に高く、生体内の免疫応答では制御困難とされた場合には「がん」病変として出現し生体内に生着することとなる。臨床医は「がん」病変が自然免疫および獲得免疫による免疫応答を凌駕して「がん」として発生・存在し得た場合に限り、「がん」病変と診断され治療が開始されることとなる。

口腔には、歯および歯周組織が存在することで、多彩な無数の微生物が共存している。多種多様な微生物が腸管や皮膚などと同様に菌叢（フローラ）と呼ばれる生態系を形成している。微生物の多くは人為的な培養が難しく、微生物の特定は困難であった。培養という過程を経ずに、微生物の集団から DNA を丸ごと抽出し、遺伝子プールを構成するゲノム配列を直接シークエンス解析し、群集構造を明らかにするとともに、遺伝子プールの変動や環境との相互作用を解明することが可能になった。近年の次世代シークエンサーの登場、ならびにバイオインフォマティクスによる情報解析技術の向上により、これまで未踏の領域であった細菌叢の全ゲノム解析が、飛躍的に進歩した［1］。

う蝕と歯周病に代表される口腔感染症は、国民の大部分が罹患する感染症であるにも関わらず、直接生命を脅かすような感染症ではないという認識がなされているが、歯周病などの口腔感染症が糖尿病や動脈硬化、自己免疫疾患、心臓血管障害などさまざまな全身疾患の誘因となっていることが明らかとなっている。また、周術期の口腔ケアを実践することで口腔内細菌が起炎菌となりうる誤嚥性肺炎の発症を抑制し、さらには患者の術後状態が改善することで入院日数期間の短縮化にも寄与していることから、口腔感染症の制御は様々な形で全身の健康に影響を与えていると考えられる［2］。口腔感染症は常在細菌による内因性の感染症で、主な原因は宿主側の菌叢の不均衡にあるとされている。

「口腔は全身の健康の鏡である」ことから、健康に寿命を全うするためには細菌学および免疫学的にも体内の常在菌とのより良い共生関係を維持することが重要であるとされている。このように、口腔ケアによる口腔内細菌叢の制御が全身の健康に影響を与えているとされているが、バランスのとれた口腔内細菌叢を形成・維持する上で免疫系がどのように作用しているのか、逆に、バランスのとれた口腔内細菌叢が免疫系にどのような影響を及ぼしているのかについての詳細については全くの不明である。

微生物が発がん機序に関与していることは、胃がんにおけるピロリ菌の関連性が挙げられる。ピロリ菌は 1983 年に培養が成功するまで、未知の微生物であった。それは、それまでの培養条件ではピロリ菌は増殖できなかったためである。分離・培養をせずに、微生物群集のゲノムを網羅的に解析するメタゲノム解析は、微生物群集に関するゲノム情報が得られるだけでなく、生体内細菌叢による環境要因が発がんに及ぼす影響、がん発生に直接的もしくは間接的に関与する難培養性の未知の微生物の発見や生体内の代謝に関与する新規酵素の探索にも有用である。また、近年の大腸癌発症モデルマウスでの実験では、腸内細菌叢と制御性 T 細胞による免疫制御との関連性が示唆されており［3］、腸内細菌叢と免疫系との間の双方向制御によって発癌の制御が保たれているという新しい概念を示している。これらの知見は胃・腸内などの各種臓器内の細菌叢の変化が「がん」発症に影響を及ぶことから、細菌叢の把握が将来的に様々な疾患の予防や新規治療法を考慮する上でも重要であることを示す科学的根拠である。

口腔内の唾液中には 10^8～10^{10} 個の細菌が存在し、600 以上の菌種が存在するとされている。唾液の役割としては消化作用、保護/円滑作用、洗浄作用、pH 緩衝作用、再石灰化作用に加えて分泌型 IgA による抗菌作用が挙げられる。唾液は、口腔内細菌叢と生体内の免疫応答のインターフェイスなフィールドとしての役割分担を担っていること、非侵襲的に均一の検体を供給可能であることからも、口腔内細菌叢とがん発症機序との関連性を解明する上で最適かつ合理的なバイオソースであると考えられる。

方　法

1. 研究対象者および検体採取

山形大学医学部附属病院および鶴見大学歯学部附属病院で加療中の口腔がん患者 13 名を対象に、唾液を 5 cc 採取後、ただちに氷上あるいはアイスボックス中に保管、数時間以内に冷凍保存し、菌叢解析実験まで保管した。対照として健常者 16 名の唾液を用いた。

2. 細菌 DNA の抽出

唾液は Extrap Soil DNA Kit Plus ver.2（日鉄住金環境株式会社、Tsukuba）を用い細菌ゲノム DNA の抽出を行った。検体 0.5 ml 程度をキット中の破砕 beads の入ったチューブに入れ、MagNALyzer 振盪破砕機（Roche、Basel）で菌体を破砕する。以下キットのプロトコールに従い DNA 結合性マグネット beads を用いた方法で細菌ゲノム DNA の抽出を行う。検体組織は、NucleoSpinTissue（タカラバイオ、Kusatsu）キットに添付のバッファーに懸濁し、ハイパワーホモジナイザー（アズワン、Osaka）にて破砕後、キットのプロトコールに従い、DNA 結合性カラムを用いた方法で、細菌ゲノム DNA を調製する。調製した細菌ゲノム DNA は Qubit dsDNA HS Assay Kit（ThermoFisher Scientific、Waltham、USA）で濃度測定を行い次の PCR 増幅解析に供した。

3. 細菌叢塩基配列ﾃﾞｰﾀ解析

抽出 DNA 試料からの 16SrRNA 遺伝子の PCR 増幅および塩基配列データ解析についてはレパトアジェネシス株式会社に委託し、MiSeq シークエンサーにて（Illumina、San Diego、USA）による塩基配列の解読、並びに菌種の同定を行った。16SrRNA 遺伝子領域のうち細菌種間で違いがみられる V3-V4 可変領域を挟む形で、逆に遺伝子配列保存性が高い領域に設計したユニバーサルプライマーペアを用いて PCR を行い、16SrRNA 遺伝子断片アンプリコンを調製した。調製した遺伝子断片アンプリコンは、一度に複数検体を解析できるよう、検体特異的なインデックス配列を PCR 付加し、不要なプライマーを除去するため、Ampure XP ビーズを用いて増幅産物を精製し、濃度を測定する。最終的には検体を等量混合し、アルカリ変性を行った後に、MiSeq Reagent Kit v3（Illumina、San Diego、USA）を用いて大量シーケンス解析を行う。本解析で 1 検体あたりおよそ 10 万リードの 16SrRNA 遺伝子シーケンス配列が得られるものと予測する。得られたシーケンス配列は、菌叢解析ソフトウエアである「フローラ・ジェネシス」を用いて、各リードにおいて菌種を同定する。まずアダプタ配列除去、ロークオリティー配列除外後、ペアリード結合などのプリプロセス解析を行い、一定の質を満たしたシーケンス配列群とする。次にそれら配列データをクエリーに細菌 16SrRNA 遺伝子データベースを参照データベースとして、ホモロージーサーチを行い、細菌種同定並びに出現数などの基礎菌叢データを得る。さらに 16SrRNA 遺伝子データベースを事前にクラスタリング解析（相同性 97%）して OTU（operational taxonomic unit）としてグループ化済みの系統分類データに割り振り、細菌系統分類データを得た。細菌の分類法では、上位の門（Phylum）から綱（Class）、目（Order）、科（Family）、属（Genus）、種（Species）ごとに発現頻度を解析した。

結　果

唾液中の菌叢解析結果

門レベルでは口腔がん患者と健常者ともに Firmicutes、Bacteroidetes、Proteobacteria、Actinobacteria の順での存在頻度は同一であったが、口腔がん患者では Fusobacteria、TM7、健常者では TM7、Fusobacteria の順であった（図 1，2）。その他の綱（Class）、目（Order）、科（Family）、属（Genus）レベルでは明らかな相違は認めなかった。

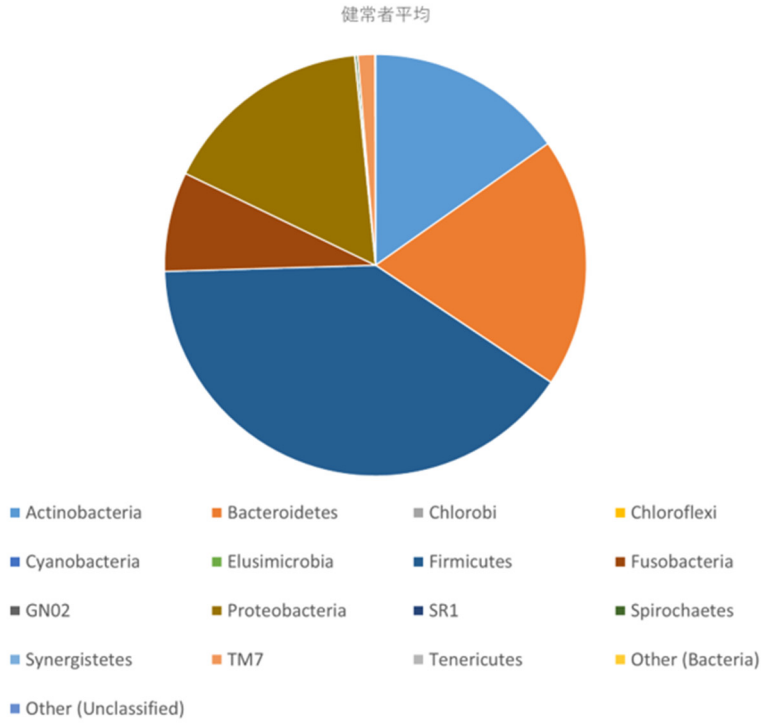


図 1. 健常者の唾液中の菌叢解析結果（門レベル）

健常者の唾液中に存在する菌種のうち、門レベルでは Firmicutes、Bacteroidetes、Proteobacteria、Actinobacteria、TM7、Fusobacteria の順であった。

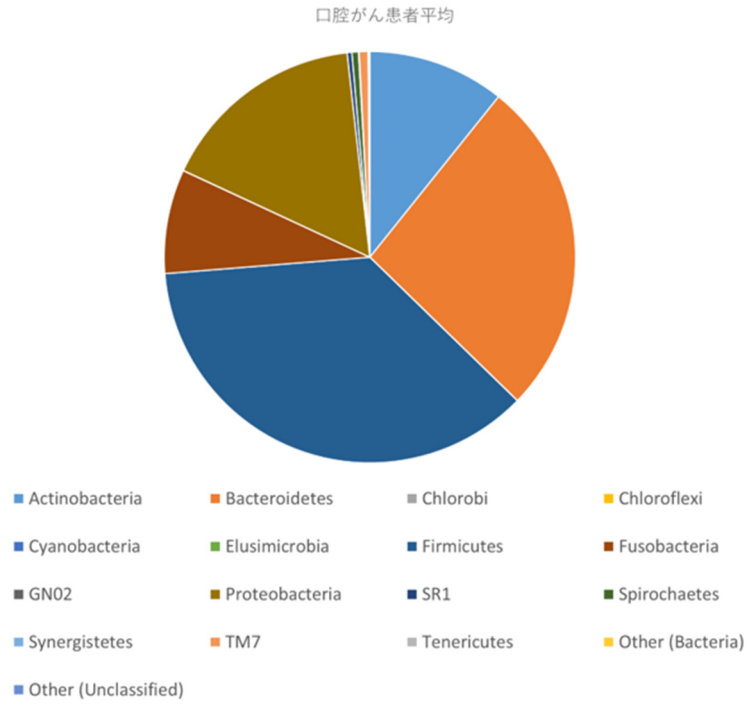


図 2. 口腔がん患者の唾液中の菌叢解析結果（門レベル）

口腔がん患者の唾液中に存在する菌種のうち、門レベルでは Firmicutes、Bacteroidetes、Proteobacteria、Actinobacteria、Fusobacteria、TM7 の順であった。

考　察

Fusobacteria は本来歯周病菌として知られており、発癌との関与については不明とされてきた。Fusobacteria の特徴としては、高濃度の酪酸を分泌することが知られており、潰瘍性大腸炎からの癌化への関与［4］、大腸がん患者の検体組織中で高頻度に検出されていることから［5］、大腸がんの癌化メカニズムへの関与が示唆されている。本研究結果より、門レベルでの Fusobacteria が口腔がん患者の唾液中に多く認められたことから、口腔がんでも発癌に関与している可能性が示唆された。

本研究の成果を基盤として、個人の唾液中のメタゲノム解析による口腔内細菌叢のプロファイリングによる口腔がんの罹患リスク評価等、広く臨床応用が期待されると考えられる。さらに唾液試料を用いて確立したメタゲノム解析のプラットホームをその他の生体内細菌叢（喀痰、胆汁、胃液、皮膚など）のメタゲノム解析に応用し、それぞれの臓器の腫瘍発生メカニズムの解明にも発展する可能性があると思われる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者である山形大学医学部歯科口腔・形成外科学講座の石川恵生先生、北畠健一朗先生、飯野光喜教授に、本研究遂行のための多大なるご支援ならびにご助言頂けましたことに深謝いたします。

文　献

1） Findley K, Oh J, Yang J, Conlan S, Deming C, et al. Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. Nature. 2013 Jun 20;498(7454):367-70. doi: 10.1038/nature12171.

2） Yoneyama T, Yoshida M, Matsui T, Sasaki H. Oral care and pneumonia. Lancet. 1999 Aug 7;354(9177):515. PMID:10465203.

3） Kawamoto S, Maruya M, Kato LM, Suda W, Atarashi K, Doi Y, Tsutsui Y, Qin H, Honda K, Okada T, Hattori M, Fagarasan S. Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. Immunity. 2014 Jul 17;41(1):152-65. doi: 10.1016/j.immuni.2014.05.016.

4） 大草 敏史：腸内細菌叢の消化管疾患への関与．モダンメディア 60; 325-330, 2014

5） Castellarin M et al：Fusobacterium nucleatum infection is prevalent in human colorectal carcinoma. Genome Res. 2012 Feb;22(2):299-306. doi: 10.1101/gr.126516.111.