

## 鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

## 内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 高橋靖治(大分県)  
博士の専攻分野 博士(歯学)  
学位記番号 甲第500号  
学位授与年月日 平成31年3月31日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科  
(博士課程) 歯学専攻  
学位論文題目 Analysis of oral microbiota in Japanese oral cancer patients using 16S rRNA sequencing  
(16S rRNA解析法を用いた, 日本人口腔癌患者の細菌叢解析研究)  
Journal of Oral Bioscience 第61巻 第2号 120頁~128頁掲載 令和元年5月16日発行  
論文審査委員 主査教授 花田信弘  
副査教授 鶴本明久 副査教授 里村一人

## 内容の要旨

近年, 日本国内において口腔癌の発生率や死亡率は増加の傾向にある。アメリカをはじめとする先進諸国では, 早期発見, 早期治療を徹底する事で罹患率が高いものの死亡率は減少傾向にあるが, 日本では口腔癌の認知が低く十分な予防が行き届いていないのが現状である。日本人の口腔領域に発生する悪性腫瘍は他の臓器を含めた全体の約2~3%といわれ, 舌の発生頻度が高くと高く男女比は2:1と男性に多い。約90%は病理学的には扁平上皮癌であり, 治療には外科手術, 化学療法, 放射線療法が行われている。口腔癌の5年生存率は60~80%と言われているが, 早期発見例に関していえば90%程となっている。口腔癌の発症原因には様々な要因があり喫煙, 飲酒といった化学的的刺激, 不適合な義歯や補綴部が引き起こす機械的刺激, ヒトパピローマウイルスなどのウイルス感染がある。また, 歯周病関連菌もリスク因子の一つと言われている。

消化器領域においては *Helicobacter pylori* と胃癌, *Salmonella typhi* による胆嚢癌, *Fusobacterium* による大腸癌など細菌叢と腫瘍発症との関連が次々と報告されている。一方, 口腔癌では細菌叢や真菌叢が腫瘍発生と関連しているという報告がある。口腔内微生物叢は細菌種が約700種, 真菌種では *Candida* 属のみが約10種類程度とされているが, 口腔領域での腫瘍発症との関連については不明な点が多い。これまでもいくつかの研究が次世代シーケンサー (next-generation sequencing: NGS) を用いて口腔細菌叢と口腔癌との関連を評価してきたが, 対象数が少ないものや, 比較対象が同一口腔内の腫瘍組織と健常組織のものであり, 信憑性に不透明な部分があった。また報告の多くは, アメリカや他のアジア圏で多く進められてきたが, 菌叢構造には各国間でも地域差があることが知られている。これまで日本国内において, 口腔癌罹患者と非罹患患者での口腔細菌叢を比較した報告は確認できなかった。そこで, 日本人における口腔内細菌叢と口腔癌発生との関係性を検証するため, 癌罹患患者と非罹患患者を対象に唾液サンプルを用いた16S rRNA解析による口腔内微生物叢を行った。

一般財団法人脳神経疾患研究所附属総合南東北病院の歯科・口腔外科を受診している患者から参加者を募り2016~2018年の期間で140人(60名の口腔癌罹患群と80名の癌罹患のない対象群)の唾液サンプルを採取した。参加者全員からは十分な説明のもと同意を得てからサンプル採取を行った。対象群は40歳以上で粘膜疾患や他の癌罹患既往のない者とした。サンプル採取時に指示に従えない者や, 唾液分泌量が低下している者は除外した。また, 化学療法, 放射線療法を受けた者や28日以内に抗菌薬の服用のある者も対象から除外とした。参加者には5分間パラフィンガムを噛んでもらい, 刺激唾液を採取した。集めた唾液は解析までの間-80℃で保管した。また参加者からは性別, 年齢, 飲酒, 喫煙, 義歯に関する情報を聴取した。

採取したサンプル唾液からDNAを抽出後, 16S rRNAアンプリコンシーケンスを行い, operation taxonomic unit

(OTU)を得た。本菌叢解析には多様性と細菌構成の比較を用いて行った。多様性には $\alpha$ -多様性と $\beta$ -多様性が知られており前者は個人間での多様性を、後者は群間内での多様性を評価する。 $\alpha$ -多様性はいくつかの多様性指数を用いて、 $\beta$ -多様性はOTUをもとにした細菌群衆構造の距離から分析される。またOTUをデータベースと照合し細菌の同定を行った。 $\alpha$ -多様性に関して、相対的な菌数と菌種数から多様性を評価する Observed, Chao 1 指数で癌罹患において有意な豊富さを認めた ( $p < 0.05$ )。一方、細菌の存在数の均等度から評価する Shannon, Simpson 指数では有意差を認めなかった。癌罹患群ではより多くの菌種を認めたが数的に少数で稀な細菌であったと考えられる。また、 $\beta$ -多様性では系統学的な類似度に有意差を認め、癌罹患群の口腔環境はより複雑である事が推察された。

癌罹患群と非癌罹患群の菌叢構造比較では上位を占める細菌は *Veillonella* 属, *Neisseria* 属, *Streptococcus* 属であり優勢な細菌の種類に差はなかった。また *Peptostreptococaceae* 科, *Fusobacterium* 属, *Alloprevotella* 属, *Capnocytophaga* 属は癌罹患群で多く、*Rothia* 属, *Haemophilus* 属は少ない結果となった。

これまでにも *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* は口腔癌罹患サンプルで多く認められた報告があり、本研究でも同様の結果を得た。*Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* は偏性嫌気性菌であり、根尖性歯周炎や歯周病と関連するとされている。また *Fusobacterium* は癌の進行にも関与しているという報告がある。コロニー形成時にバイオフィームによる架橋構造を形成し、他の菌と共存を図ることが知られており、それゆえに *Fusobacterium* の働きで癌罹患群での多様性が増加した可能性は考えられる。*Capnocytophaga* が口腔癌バイオマーカーになりうると示唆した報告もある。

腫瘍の進行を評価する TNM (tumor-node-metastasis) 分類との菌叢比較では、腫瘍の大きさと浸潤程度を評価する T 因子において、進行に伴い多様性が減少する結果を得た ( $r = -0.329$ )。癌罹患群全体では非癌罹患群と比較して多様性は増加していたことから、腫瘍の増大に伴う酸素暴露状態の変化や壊死組織からの滲出液、免疫状態の変化が菌叢に影響した可能性が考えられる。また、リンパ節転移を評価する N 因子では進行程度に関して菌叢への影響は確認出来なかった。菌叢変化に影響を与えるのが腫瘍組織の表面性状、つまり細菌叢の関連によるものであれば T 因子が菌叢変化に関与し、N 因子が関与していない結果も矛盾しないと考えられる。

また、*Rothia* 属は T 因子の増加に伴い減少するという逆相関関係 ( $r = -0.323$ ) を認め、既出の研究からも癌罹患群で顕著に減少するという報告がある。このことから本菌属は健康人に多いと考えられた。

被験者から聴取した年齢、性別、喫煙、飲酒、義歯に関してこれらの因子と癌罹患状態で有意差を認めた菌で比較を行った結果、*Peptostreptococcus* は女性に多く、*Haemophilus* は男性、また飲酒者に多く認められた。

癌罹患に関しての影響因子を検討するためにロジステック回帰分析を行った結果では性別、Chao1 指数が有意な変数である事が確認され、オッズ比は性別: 10.85 (97.5%信頼区間: 32.79)、Chao1 指数: 1.006 (97.5%信頼区間: 1.010) となった。癌のリスク因子にはこれまで性別、喫煙、飲酒が報告されてきたが、今回は性別に関して同様の結果を得た。また、オッズ比は 1.006 ではあるが多様性指数が癌罹患の影響因子であることを示す結果を得ることができた。

本研究で得られた結果より癌罹患の有無と細菌叢には多様性の違いや、特定のマイナーな細菌種が関与している事がわかった。それらの影響は強いものではないがう蝕や歯周病に関連のある細菌もいることから、口腔衛生状態を良好な状態に保つことで、癌罹患リスクを回避できる可能性も示唆された。また、今回は比率により細菌叢を評価したが、疾患の発症には菌叢における割合だけでなく菌数も関与しているという報告がある。したがって菌数を比較することで新たに発症の原因菌を特定できる可能性がある。細菌だけでなく真菌も口腔微生物叢の形成には関与している。高齢者や HIV といった免疫状態の低下した口腔内には *Candida* をはじめとする真菌が高い割合で検出されることが知られている。これらの真菌種も口腔癌やその他の癌に深く関与している事は示唆されるが詳細は明らかにはなっていない。近年、NGS 解析による細菌叢解析が急速に進められてきたが、癌罹患患者における真菌叢の特徴や細菌叢との関連も今後研究が必要と考えられる。

## 審査の結果の要旨

南東北病院の歯科・口腔外科を受診している患者から参加者を募り、2016～2018年の期間で140名(60名の口腔癌罹患群と80名の癌罹患のない対照群)の唾液サンプルを採取した。採取した唾液サンプルからDNAを抽出後、16S rRNA 遺伝子 V3-V4 領域のアンプリコンについて次世代シーケンシングを行い得られた OTU をデータベースと照合し細菌の同定を行った。その結果、 $\alpha$ -多様性に関して Observed, Chao1 指数で癌罹患において有意な豊富さを認めた。 $\beta$ -多様性では系統的な類似度に有意差を認め、癌罹患群の口腔細菌叢は多様性にとみ、癌罹患のない対照群より複雑であることが推察された。

癌罹患群と癌罹患のない対照群の菌叢構造比較では上位を占める細菌は *Veillonella* 属, *Neisseria* 属, *Streptococcus* 属であり優勢な細菌の種類に差はなかった。また *Peptostreptocaceae* 科, *Fusobacterium* 属, *Alloprevotella* 属, *Capnocytophaga* 属は癌罹患群で多く, *Rothia* 属, *Haemophilus* 属は少ない結果となった。先行研究において *Peptostreptococcus*, *Fusobacterium* は口腔癌患者で多く認められており, 本研究でも同様の結果を得た。*Fusobacterium* はコロニー形成時にバイオフィームによる架橋構造を形成し, 他の菌と共存を図ることが知られており, それゆえに *Fusobacterium* の働きで癌罹患群での多様性が増加した可能性が考えられる。腫瘍の進行を評価する TNM 分類との菌叢比較では, 腫瘍の大きさと浸潤程度を評価する T 因子において, 進行に伴い多様性が減少する結果を得た。

癌罹患に関する影響因子を検討するためにロジステック回帰分析を行った結果では性別, Chao1 指数が有意な変数である事が確認された。

以上, 本研究で得られた結果より口腔癌罹患の有無と口腔細菌叢の多様性に関連がある事がわかった。また, 口腔衛生状態を良好な状態に保つことで癌罹患リスクを回避できる可能性も示唆された。

本研究は, 口腔癌の予防手段の解明に寄与する臨床的価値のある研究と考えられた。よって, 本論文は博士(歯学)の学位請求論文としての価値を有するものと判定した。