

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09543

研究課題名(和文) 菌叢解析に基づく唾液の腸管免疫応答への関与の解明

研究課題名(英文) Investigation of saliva effect on intestinal immune response based on intestinal flora analysis

研究代表者

川口 浩司 (Kawaguchi, Kouji)

鶴見大学・歯学部・准教授

研究者番号：50277951

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大唾液腺(顎下腺・舌下腺・耳下腺)摘出マウスを用いて、腸管粘膜の組織学的変化、腸管免疫応答関連因子の発現、腸内細菌叢を経時的に検証した。研究期間中、体重の変化は有意な差は認められなかったが、唾液分泌量は、3群の全てで経時的に増加はしたものの、唾液腺摘出群では有意に分泌量が少なく、増加率も低かった。腸管の組織学的変化としては、術後1か月目に唾液腺摘出群では空腸絨毛ならびに回腸絨毛が有意に短縮し、術後6か月目にもあまり回復は認められなかった。菌叢解析の結果、術後6か月目のシャムオペ群では有意に多様性が高かった。また多様性は、3か月目では摘出群が、6か月目ではシャムオペ群が高かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果、唾液腺摘出によって唾液分泌量が低下するだけでなく、空腸・回腸の絨毛長が短縮し、摘出術後6か月経過しても回復しないこと、更に腸内細菌叢にも変化があることが分かった。従って、唾液の作用は従来考えられていた、咀嚼や嚥下・会話を円滑にすることや、自浄作用によるカリエスや歯周病の予防、口腔粘膜の保護だけではなく、遠隔臓器である消化管にも影響があることが示唆され、唾液分泌量低下を来たす疾患や病態の解明が進むと期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study examined histological changes in the intestinal mucosa, expression level of factors related to intestinal immune response, and intestinal microbiome using mice with sialoadenectomy (submandibular, sublingual, and parotid glands). There was no significant difference in body weight changes during the experimental. However, the volume of saliva secretion in sialoadenectomy group was significantly decreased and depending time increase was also significantly suppressed. In addition, histopathological changes were observed in the villi of jejunum and ileum with significantly shortness in sialoadenectomy group one month after surgical treatment. They did not recover in the sixth postoperative month.

The results of gut microbiome analysis showed that alpha diversity was significantly higher in the sham-operated group at six months postoperatively. Beta diversity was higher in the explanted group at three months and in the sham-operated group at six months.

研究分野：口腔外科

キーワード：唾液腺摘出 菌叢解析 組織学的変化 絨毛

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、本学歯学部附属病院顎顔面外科・口腔外科において、口腔がん治療に携わると同時に、化学療法や放射線療法後の口内炎や口腔乾燥などの合併症の治療も行っている。口内炎のコントロールは比較的容易だが、口腔乾燥は長期化することが多く、唾液減少による嚥下障害に加えて、吐気・心窩部痛・消化不良(便秘・下痢)などを訴えるものが少なくない。同様の症状は、シェーグレン症候群の患者でも認められるが、いずれも QOL の著しい低下を来す。

口腔乾燥を伴うこれらの病態において消化管症状を引き起こすメカニズムは未だに解明されていないが、唾液腺摘出マウスでは小腸切除後の治癒が低下するものの、唾液由来の血管新生因子(VEGF) 投与によって治癒が回復し、VEGF の腸絨毛の活性への関与が示唆された(Parvadia JK et al, Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 293:G591-8, 2007)。従って、唾液の分泌によって口腔粘膜の健康を保つだけでなく、その分泌量の低下によって消化管の機能低下に影響するなど、消化管粘膜の恒常性維持にも関与することが示唆される。しかし、この報告では小腸切除後の治癒について検証されているものの、唾液腺摘出による直接的な腸粘膜の変化については考察されていない。更に我々が涉猟し得た範囲では、その他にも唾液ならびに唾液腺と消化管症状(免疫組織学的変化)との直接的な関連について調べた報告はなく、大唾液腺を摘出したラットにおける消化管の DNA 量や RNA 量の変化を調べた報告が数篇あるのみであった(Skinner KA et al, J Physiol 351:1-12, 1985, 平松ら Jpn J Oral Biol 29:215-220, 1987)。

従来、唾液の作用は咀嚼や嚥下・会話を円滑にすることや、自浄作用によるカリエスや歯周病の予防、口腔粘膜の保護などであり、唾液腺はその唾液の供給臓器として認識されてきた。しかし、唾液分泌能の遠隔臓器への影響については、歯科界でも医科界でもあまり着目されることはなく、その研究は殆どなされていないのが実情である。従って、唾液分泌能の消化管症状への作用についての基礎研究は、その生体内の役割を知る上での意外な盲点であるのではないかと思いついたのが、研究開始当初の背景であった。

2. 研究の目的

本研究では、「唾液分泌能は腸内細菌叢ならびに腸管免疫応答に関与する」と仮説を立て、大唾液腺(顎下腺・舌下腺・耳下腺)摘出マウスを用いて、①腸管粘膜の組織学的変化、②腸管免疫応答関連因子の発現、③腸内細菌叢の変化、④口腔内細菌叢の変化、ならびにこれらの相互関係を検証することを目的とした。最終的には得られた知見を腸管免疫応答の制御に応用し、様々な疾患の発展に向けた新規創薬開発の一助となることを目指した。

更に本研究により得られる、唾液分泌能と腸内環境の関連性、特に腸内細菌叢が影響を受ける要因や、腸管免疫応答への関与に関する知見は、その生体内での役割を解明するだけでなく、腸管免疫応答の破綻によって発症するクローン病や潰瘍性大腸炎などの難病に加えて、近年腸管免疫応答の関与が報告されている糖尿病や関節リウマチの病因解明にも大きく貢献し、新規創薬開発の一助となることが期待される。

3. 研究の方法

4年間の研究期間で以下のことを検証した。

- (1) 唾液量・体重の経時的推移の比較検証
- (2) 腸管粘膜の組織学的変化・腸管免疫応答関連因子の発現の経時的解析
- (3) 腸内細菌叢の比較検証

以下に具体的な方法を示す。

- (1) 体重・唾液分泌量の経時的推移の比較検証

マウスは C57BL/6 (6週令、オス)を用いた。無作為に①唾液腺摘出群、②シャムオペ群、③コントロール群の3群に分け、全身麻酔下(塩酸メドミジン 0.3mg/kg + ミダゾラム 4mg/kg + 酒石酸ブトルファンール 5mg/kg の腹腔内投与)で唾液腺摘出ならびにシャムオペを行った。体重測定は、研究期間中毎週計測、唾液分泌量の測定は4週間毎に行った。

体重は通法通り、動物用電子天秤(夏目製作所)の体重計を用いた。

唾液分泌量は、酒石酸ピロカルピンを 0.1 mg/kg 腹腔内投与し、一定時間濾紙に吸収させて計測した。

- (2) 腸管粘膜の組織学的変化・腸管免疫応答関連因子の発現の経時的解析

① 検体採取

作製した摘出群とシャムオペ群のマウスは、術後 3・6・12 か月目にそれぞれ屠殺し、組織学的解析用検体と腸内細菌叢解析用検体を採取した。組織学的解析の対象臓器は、空腸/回腸/大腸/舌の4種、菌叢解析の対象は糞便とした。空腸・回腸・大腸・糞便の検体採取は、Ogataらの方法に則り(*Cell Tissue Res* 361, 799-810, 2015) 以下のように行った。まず、(1)空腸は幽門より遠位 3cm から小腸中央まで、(2)回腸は小腸中央から盲腸近位まで、(3)大腸は盲腸遠位から直腸近位までと定義し、切断した。空腸・回腸・大腸それぞれの長さを計測し、リン酸緩衝生理食塩水を用いて内容を洗浄、採取した糞便は直径と長さを計測し、1.5ml チューブに入れ、直ちにマイナス

80°Cで保管した。次に空腸・回腸・大腸それぞれの近位 3cm の位置から、組織学解析用の検体を採取し、それぞれ通法通りに処置を行い、プレパラートの作製を行った。

②消化管組織の組織学的評価・腸管免疫応答関連因子の発現の経時的解析

上記のように作製したプレパラートを用いてヘマトキシリンエオジン染色を行い、経時的な組織学的変化を評価した。また、抗 EGF 抗体ならびに抗 VEGF 抗体を用いて、組織再生の局在を比較検証した。

(3)腸内細菌叢の比較検証

①細菌 DNA の抽出:細菌ゲノム DNA の抽出は、NucleoSpin Tissue kit (Takara)を用いて、プロトコール通りに細菌ゲノム DNA を抽出し、濃度を測定した。

②細菌叢塩基配列データ解析:次に、抽出 DNA 試料から 16SrRNA 遺伝子の PCR 増幅を行う。16SrRNA 遺伝子領域のうち、細菌種間で違いがみられる V3-V4 可変領域をはさみ、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、更に複数検体を同時に解析できるように、検体特異的なインデックス配列を付加し、Ampure XP ビーズを用いて増幅産物を精製した。次に大量シーケンス解析を行い、得られたシーケンス配列は相同性検索を行い、細菌系統分類データを得た。

③データの比較検証:腸内細菌叢の経時的変化を、唾液腺摘出群とシャムオペ群で比較検証した。検証した項目は、 α 多様性・ β 多様性・ドメインレベルの菌叢解析である。

4. 研究成果

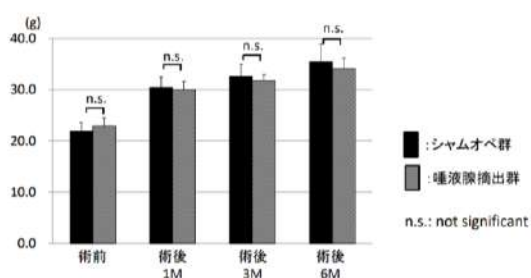
(1) 体重の変化について

唾液腺摘出群ならびにシャムオペ群マウスともに、経時的に体重が増加した。術前の体重は、唾液腺摘出群では平均 23.2 g (20.9 - 25.1 g)であったのに対し、シャムオペ群では平均 22.8 g (20.8 - 24.7 g)で、両群間に統計学的な有意差は認められなかった。更に術後 1 か月目、3 か月目、6 か月目それぞれの時点における経時的な体重の変化についても、両群間で統計学的な有意差は認められなかった。

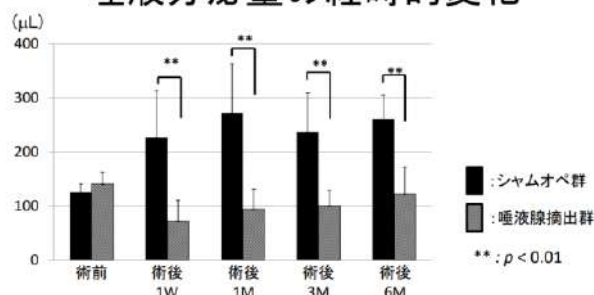
(2) 唾液分泌量の変化について

手術 1 週間前の唾液流出量は、唾液腺摘出群では平均 141 μ l (103 - 170 μ l)、シャムオペ群では平均 125 μ l (102 - 148 μ l)で、統計学的に有意差は認められなかった。一方、シャムオペ群では術後、経時的に唾液流出量が増加したのに対し、唾液腺摘出群では唾液流出量が有意に低下した。術後 1 週間目では、唾液腺摘出群では平均 66 μ l (40 - 93 μ l)、シャムオペ群では平均 260 μ l (187 - 340 μ l)、術後 1 か月目では、唾液腺摘出群では平均 79 μ l (55 - 156 μ l)、シャムオペ群では平均 270 μ l (192 - 370 μ l)、術後 3 か月目では、唾液腺摘出群では平均 90 μ l (66 - 114 μ l)、シャムオペ群では平均 270 μ l (228 - 325 μ l)、術後 6 か月目では、唾液腺摘出群では平均 111 μ l (68 - 158 μ l)、シャムオペ群では平均 282 μ l (261 - 312 μ l)であった (すべて $p < 0.01$)。唾液腺摘出群においては、経時的に唾液流出量が回復し、術後 6 か月目ではシャムオペ群と比較して有意に低かったが ($p < 0.01$)、同じ群の術前の唾液流出量と比較すると、有意差は認められないレベルまで回復した。

体重の経時的变化



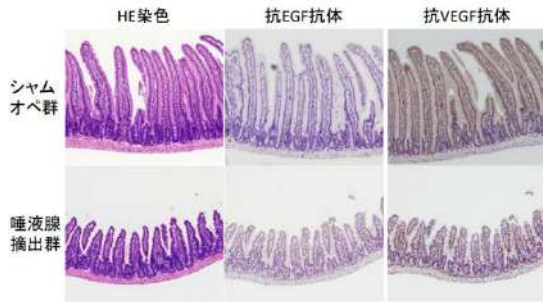
唾液分泌量の経時的变化



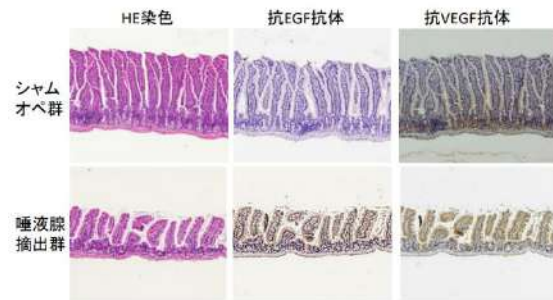
(3) 空腸絨毛の組織学的解析について

シャムオペ群の空腸絨毛では、術後 1 か月ならびに 6 か月目それぞれにおいて、明らかな組織学的変化は認められなかった。一方、唾液腺摘出群では、術後 1 か月目において、明らかな腸絨毛長の短縮が認められた。また、免疫組織学的検査の結果、術後 1 か月目では両群ともに抗 EGF 抗体陰性・抗 VEGF 抗体陽性であったが、唾液腺摘出 6 か月目では、シャムオペ群では抗 EGF 抗体陰性のままであったのに対して、唾液腺摘出群では抗 EGF 抗体陽性となった。

術後1か月目の空腸

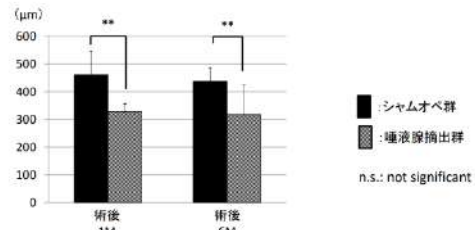


術後6か月目の空腸



絨毛長を計測したところ、術前では平均 $377 \mu\text{m}$ ($287 - 477 \mu\text{m}$)であったのに対し、シャムオペ群では、術後 1 か月目では平均 $462 \mu\text{m}$ ($295 - 597 \mu\text{m}$)、術後 6 か月目では平均 $438 \mu\text{m}$ ($318 - 552 \mu\text{m}$)、唾液腺摘出群では術後 1 か月目では平均 $329 \mu\text{m}$ ($187 - 487 \mu\text{m}$)、術後 6 か月目では平均 $318 \mu\text{m}$ ($210 - 444 \mu\text{m}$)であった。シャムオペ群ならびに唾液腺摘出群それぞれの絨毛長は、術後 1 か月目と 6 か月目との間に有意な経時的変化は認められなかったが、術後 1 か月目ならびに 6 か月目の時点で両群をそれぞれ比較すると、唾液腺摘出群ではシャムオペ群と比較して有意な絨毛長の短縮が認められた ($p < 0.01$)。

空腸絨毛長の比較

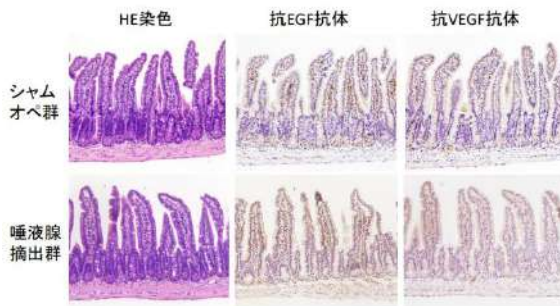


シャムオペ群に対して唾液腺摘出群では空腸絨毛が有意に短縮していた。

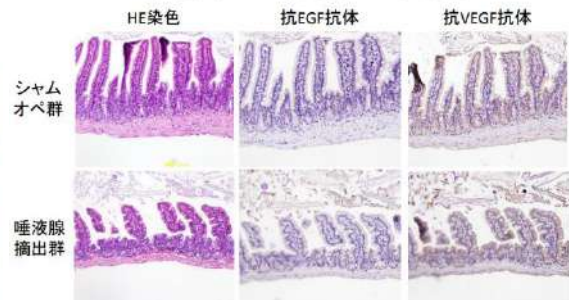
(4) 回腸絨毛の組織学的解析について

シャムオペ群では、回腸絨毛においても同様に、術後 1 か月目ならびに 6 か月目のそれぞれにおいて、明らかな組織学的変化は認められなかった。一方唾液腺摘出群では、術後 1 か月目において腸絨毛は軽度に疎となったのに加えて、術後 6 か月目において回腸絨毛長の短縮が認められた。免疫組織学的検査の結果、術後 1 か月目では両群ともに抗 EGF 抗体ならびに抗 VEGF 抗体に対して陽性であったが、術後 6 か月目では、両群とも抗 EGF 抗体が陰性化したのに対して、抗 VEGF 抗体は陽性のままであった。

術後1か月目の回腸

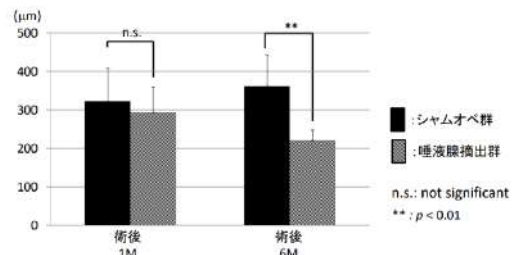


術後6か月目の回腸



絨毛長を計測したところ、術前では平均 $234 \mu\text{m}$ ($172 - 280 \mu\text{m}$)であったのに対し、シャムオペ群では、術後 1 か月目では平均 $323 \mu\text{m}$ ($252 - 377 \mu\text{m}$)、術後 6 か月目では平均 $362 \mu\text{m}$ ($207 - 532 \mu\text{m}$)、唾液腺摘出群では、術後 1 か月目では平均 $295 \mu\text{m}$ ($180 - 532 \mu\text{m}$)、術後 6 か月目では平均 $222 \mu\text{m}$ ($157 - 262 \mu\text{m}$)であった。シャムオペ群ならびに唾液腺摘出群のそれぞれの回腸絨毛長は、術後 1 か月目と 6 か月目との間に有意な経時的な変化は認められなかった。しかし、術後 1 か月目ならびに 6 か月目の時点で両群を比較したところ、術後 1 か月目では両群間に有意差は認められなかったが、術後 6 か月目では唾液腺摘出群において有意な絨毛長の短縮が認められた ($p < 0.01$)。

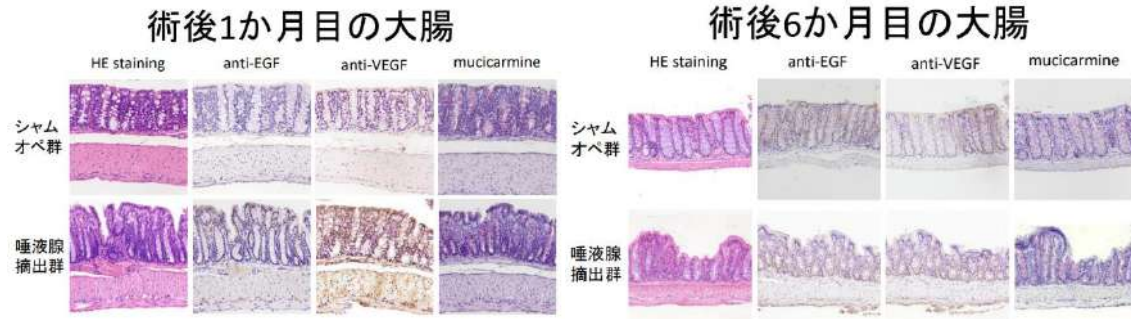
回腸絨毛長の比較



回腸絨毛長の経時的比較。術後 1 か月後では有意な絨毛長の変化は認められなかったが、シャムオペ群に対して唾液腺摘出群では回腸絨毛が有意に短縮していた。

(5) 大腸の組織学的解析について

シャムオペ群の大腸では、術後1か月目ならびに6か月目において、大腸絨毛に明らかな組織学的な形態変化は認められなかった。一方、唾液腺摘出群では、術後1か月目では明らかではなかったが、術後6か月目では大腸絨毛長の不均一化が認められた。免疫組織学的検査の結果、術後1か月目では両群ともに抗EGF抗体は陰性であったが、唾液腺摘出群では抗VEGF抗体が陽性であった。術後6か月目において、両群ともに、抗EGF抗体ならびに抗VEGF抗体に対して軽度陽性であり、両群間で明らかな差は認められなかった。またムチカルミン染色を行ったところ、術後1か月目ならびに6か月目の両時点において、両群間に有意な違いは認められなかった。

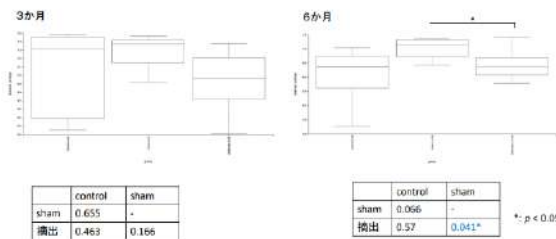


(6) 菌叢解析について

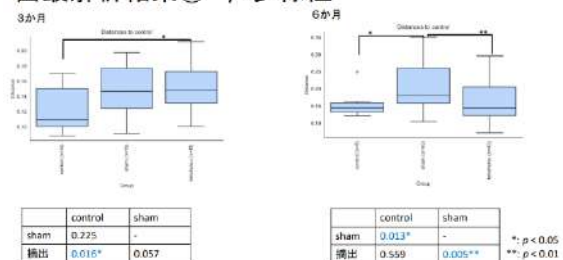
唾液腺摘出群・シャムオペ群・コントロール群の3群におけるα多様性を調べたところ、術後3か月目には有意な差は認められなかったが、術後6か月目には、摘出群とシャムオペ群の間に有意差が認められ、シャムオペ群では有意に菌叢の多様性が高いことが示唆された。

またβ多様性については、3か月目においては摘出群がコントロール群ならびにシャム群に対して有意に高かったが、6か月目においてはシャム群がコントロール群ならびに摘出群に対して有意に高かった。従って、2群間の菌叢の相違度は3か月目では摘出群が、6か月目ではシャムオペ群が高いことが示唆された。

菌叢解析結果① α多様性

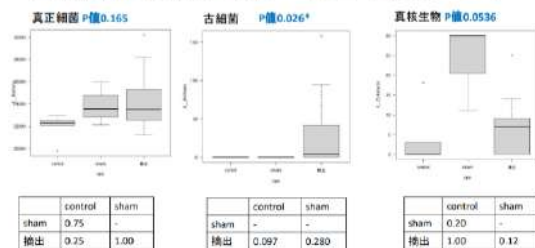


菌叢解析結果② β多様性

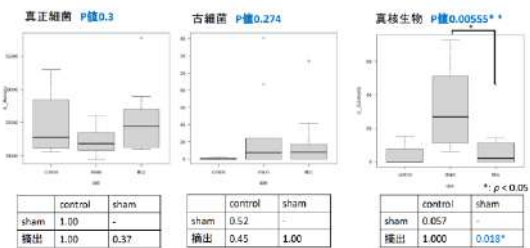


またドメインレベルでの菌叢解析の結果、術後3か月目では摘出群では古細菌の有意に割合が高く、シャムオペ群では真核生物の割合が有意に高いことが分かった。さらに6か月目になると、シャムオペ群における真核生物の割合が有意に高いことが分かった。

菌叢解析結果③ 術後3か月目の菌叢(ドメイン)



菌叢解析結果④ 術後6か月目の菌叢(ドメイン)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Eguchi Takanori, Basugi Akihiko, Kanai Ikuyo, Miyata Yukinaga, Suzuki Takamasa, Hamada Yoshiki	4. 巻 98
2. 論文標題 Adenosquamous carcinoma development as a recurrence of squamous cell carcinoma in the oral floor	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Medicine	6. 最初と最後の頁 e17688 ~ e17688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MD.0000000000017688	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 Hisako Fujihara, Tadashige Nozaki, Masahiro Tsutsumi, Mayu Isumi, Shinji Shimoda, Yoshiki Hamada, Mitsuko Masutani	4. 巻 27
2. 論文標題 Spontaneous Development of Dental Dysplasia in Aged Parp-1 Knockout Mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 1157
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells8101157	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 Takuya Kihara, Tomoko Ikawa, Yuko Shigeta, Shuji Shigemoto, Kazutoshi Nakaoka, Yoshiki Hamada, Takumi Ogawa	4. 巻 128
2. 論文標題 Mandibular 3-dimensional Finite Element Analysis for a Patient With an Aggressive Form of Craniofacial Fibrous Dysplasia	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol .	6. 最初と最後の頁 e214-e222.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.oooo.2019.06.009	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 馬杉亮彦, 江口貴紀, 宮田幸長, 熊谷賢一, 雨宮剛志, 重松宏昭, 中島敏文, 齋藤知之, 濱田良樹	4. 巻 33
2. 論文標題 下顎骨に発生したFocal osteoporotic bone marrow defectの1例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本口腔診断学会雑誌	6. 最初と最後の頁 15-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15214/jsodom.33.15	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 山田秀典, 中岡一敏, 長谷部充彦, 雨宮剛志, 堀内俊克, 濱田良樹	4. 巻 65
2. 論文標題 自家脛骨骨髓海綿骨細片とカスタムメイド・チタンメッシュトレーを用いて下顎骨再建を行った1例	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本口腔外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 545-550
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5794/jjoms.65.545	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 Nakasone Y, Kumagai K, Matsubara R, Shigematsu H, Kitaura K, Suzuki S, Satoh M, Hamada Y, Suzuki R	4. 巻 13
2. 論文標題 Characterization of T cell receptors in a novel murine model of nickel-induced intraoral metal contact allergy.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0209248
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0209248	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 川口浩司	4. 巻 2
2. 論文標題 DH Eye 歯科衛生士が気づく「舌の異常」(解説)	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 デンタルハイジーン	6. 最初と最後の頁 202-206
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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5件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 雨宮剛志, 中村那々美, 長谷部充彦, 川口浩司, 濱田良樹
2. 発表標題 Stage I-II舌扁平上皮癌における後発頸部リンパ節転移に関する病理組織学的検討
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村那々美, 川口浩司, 藤原久子, 長谷部充彦, 岸悠太, 安川仁章, 熊谷賢一, 雨宮剛志, 濱田良樹
2. 発表標題 輝度比を用いた客観的蛍光観察法による上皮性異形成の検出精度
3. 学会等名 第43回日本頭頸部癌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 熊谷賢一, 大橋祥浩, 中村那々美, 仲宗根 康成, 市川はるの, 川口浩司, 堀江彰久, 鈴木隆二, 濱田良樹
2. 発表標題 ErbB4は口腔扁平上皮癌における頸部リンパ節転移の危険因子である
3. 学会等名 第63回日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 川口浩司
2. 発表標題 口腔がん検査の最前線
3. 学会等名 ジャパンオーラルヘルス学会第21回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村那々美, 川口浩司, 藤原久子, 長谷部充彦, 熊谷賢一, 濱田良樹
2. 発表標題 輝度比を用いた客観的蛍光観察法による上皮性異形成の検出精度
3. 学会等名 第72回NPO法人日本口腔科学会学術集会
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	藤原 久子 (Fujihara Hisako) (80396746)	鶴見大学短期大学部・歯科衛生科・教授 (42723)	
研究 分担者	熊谷 賢一 (Kumagai Kenichi) (10518129)	東京大学・医学部附属病院・助教 (12601)	
研究 分担者	濱田 良樹 (Hamada Yoshiki) (70247336)	鶴見大学・歯学部・教授 (32710)	

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