

厚生労働行政推進調査事業費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
口腔内細菌叢とがん，糖尿病など全身疾患との関わりとその予防戦略
分担研究報告書

口腔内細菌が膵臓に与える影響に関する研究

研究分担者 小林正伸 北海道医療大学 看護福祉学部 教授
研究分担者 古市保志 北海道医療大学 歯学部 教授
研究分担者 安彦善裕 北海道医療大学 歯学部 教授
研究分担者 高橋伸彦 北海道医療大学 歯学部 准教授
研究分担者 藏満保宏 北海道医療大学 がん予防研究所 教授
研究分担者 濱田淳一 北海道医療大学 看護福祉学部 教授
研究分担者 寺崎 将 北海道医療大学 薬学部 講師

研究要旨：

口腔内感染症である歯周病とがん，糖尿病などの全身の様々な疾患や状態との相関について多くの疫学研究結果が報告されるようになってきた。しかしながら，歯周病に伴う口腔内細菌叢の変化と全身疾患および全身の健康との関連性についての詳細は明らかではない。本研究の最終目標は，膵癌を有する患者から採取した検体のDNAに対して，次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析によって網羅的に細菌，細菌種および細菌叢の検索を行い，膵臓組織中の細菌叢を明らかにし，口腔衛生状態の適切な維持方法を提案し，口腔内細菌によって引き起こされる全身疾患の予防につなげることである。

本研究では，マウスに歯周病原性細菌のLPSを投与し，膵臓がんに関わる遺伝子の探索を行い，膵癌を有する患者から採取した検体のDNAに対して，次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を行った。

で，膵臓がんに特異的に増加するReg3gの増加がマイクロアレイ認められたこと，で膵臓がんの検体から歯周病原細菌が認められたことから新たな知見が得られる可能性が高いと考えられる。

A．研究目的

口腔内感染症である歯周病とがん，糖尿病などの全身の様々な疾患や状態との相関について多くの疫学研究結果が報告されている。しかしながら，歯周病に伴う口腔内細菌叢の変化と全身疾患および全身の健康との関連性についての詳細は明らかではない。本研究の目的は，歯周病原細菌である*P. gingivalis*のLPS (PG-LPS) を全身投与するモデルを用いて，膵臓の遺伝子発現を網羅的に探索すること，膵臓がんを有する患者から採取した検体のDNAに対して，次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析によって網羅的に細菌，細菌種および

細菌叢の検索を行い、膵臓組織中の細菌叢を明らかにすることである。

B．研究方法

【研究1】

6～8週齢のマウス（C57BL/J，三協ラボ）に生理食塩水で調製したPG-LPSを5 mg/kgになるよう腹腔内投与し3日毎（84h）に1回，1ヶ月間（10回）投与した．各群5匹飼育し，LPS溶液と同量の生理食塩水を投与した群を対照群（Control）とした．最終投与より3日後にマウスを屠殺し，膵臓を摘出した．摘出した膵臓よりTotal RNAを抽出し，cDNAを合成し，SurePrint G3 Rat GE 8x60K Ver.2.0（Agilent）によるmRNA発現の変化の網羅的解析を行った．その後，発現が上位であった遺伝子発現の再現性をreal-time RT-PCRにて観察した．また，薄切標本を作製し組織像の観察，発現が上位であった遺伝子産物の免疫染色を行った．

【研究2】

膵臓への口腔内細菌の感染を明らかにするため，膵がんを有する患者から採取した検体のDNAに対して，次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を行った．膵がんDNA検体は，札幌東徳洲会病院臨床研究センター（現，医学研究所）が代表機関となり倫理委員会の承認を得たプロトコールに基づいて（承認番号TGE00369-012，承認書添付），北海道大学医学部腫瘍病理学，旭川医科大学内科学および手稲溪仁会病院が保有する検体を用いた．これらの検体の二次利用はプロトコール上，許容されており，本学倫理委員会の承認も得た（北海道医療大学予防医療科学センター倫理委員会承認 第2017-011号）．

膵がんDNA検体を16s rRNAのV3-V4領域をPCRにて増幅し，そのアンプリコンをもとに次世代シーケンサーMiSeq（Illumina）を用い細菌叢解析を行った．

C．研究結果

【研究1】

1. 網羅的解析の結果，Control群と比較しPG-LPS投与群ではRegenerating islet-derived 3g（Reg3g）の発現が73倍であった（図1）．
2. Real-time RT-PCRで遺伝子発現の解析においても再現性が認められた（図2，* $p < 0.05$ ）．
3. 免疫染色においてもLPS投与群では，ランゲルハンス島周辺部の細胞相当部にReg3g陽性細胞が確認された。（図3）

【研究2】

細菌叢解析の結果，膵がんDNA検体に*Fusobacterium nucleatum*，*Porphyromonas gingivalis* および*Prevotella intermedia*などの歯周病原細菌が検出された（図4）．

マイクロアレイ解析 表1 発現比の大きかった上位10種の遺伝子リスト*

1) 発現増加		2) 発現減少	
Exp Fold Change up-regulated		Exp Fold Change down-regulated	
Molecules	Exp. Value	Molecules	Exp. Value
Ighg3*	↑ 4123.958	Mup1 (includes others)*	↓ -223.764
S100A8	↑ 523.053	Mup-ps16*	↓ -210.653
S100A9	↑ 336.474	Mup-ps12*	↓ -134.820
LOC102642252	↑ 263.940	ALB	↓ -132.366
Igk*	↑ 241.758	FGG	↓ -84.304
Iglv1*	↑ 112.254	AHSG	↓ -70.595
REG3G	↑ 73.305	Mug1/Mug2	↓ -70.014
Igkv4-53*	↑ 66.337	HPX	↓ -58.280
Ighv10-3	↑ 51.897	Pzp*	↓ -57.446
Chil3/Chil4	↑ 48.847	CES3	↓ -54.789

図1 マウス脾臓mRNAのマイクロアレイ解析

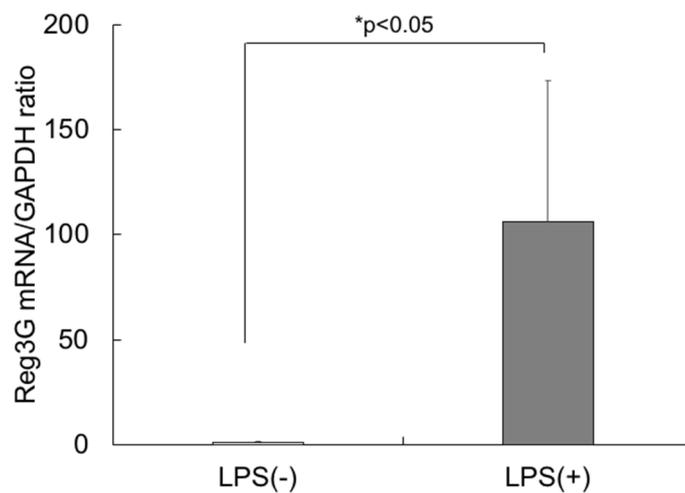
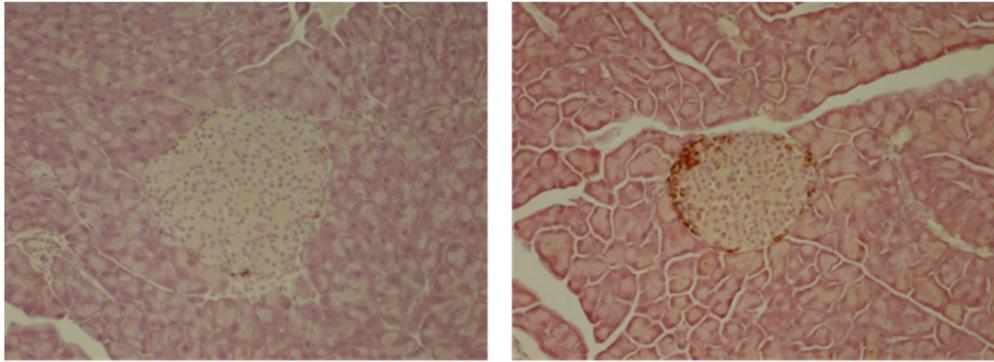


図2 Reg3g mRNAの発現



LPS(-)

LPS(+)

図3 Reg3gの免疫染色

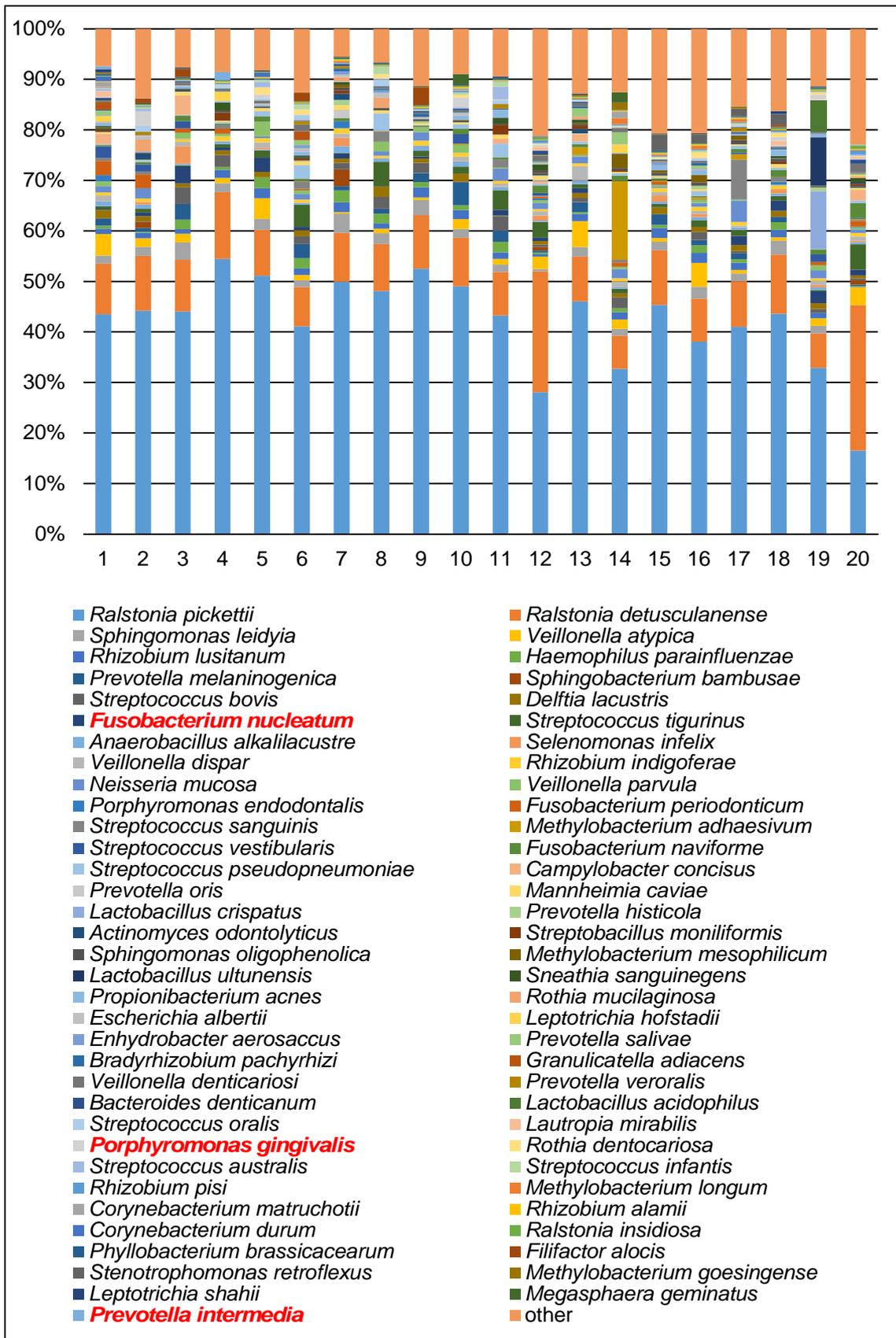


図4 膵癌を有する患者から採取した膵臓の細菌叢

D．考察

Reg3gは、膵臓腫瘍マーカーの転写の増強、抗腫瘍免疫の抑制および膵臓腫瘍マーカーの抑制を含む複数の機序を介してマウスの炎症関連がん進行を促進することが報告されている（Yin G et al., 2015）。また、Reg3gは、膵臓がんの特異的に増加が認められることが分かっている（<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000143954-REG3G/pathology>）。PG-LPS投与によりReg3g発現が増強され、炎症関連がん進行に関与する可能性が考えられる。

膵臓DNA検体に*Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*および*Prevotella intermedia*などの歯周病原細菌が検出されたが、今後、健常者の膵臓DNAの細菌叢との比較を行い、さらなる検討が必要である。

E．結論

歯周病原細菌は、膵臓がん組織でReg3g発現を増強し、炎症関連癌進行に関与する可能性が示唆された。

F．健康危険情報

（総括研究報告書において記載）

G．研究発表

（総括研究報告書において記載）

H．知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし