

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 626 号		学位申請者	内野 祥徳
審査委員	主査	中村 典史	学位	博士 (歯学)
	副査	中田 匡宣	副査	西村 正宏
	副査	笹平 智則	副査	白方 良典

主査および副査の5名は、令和3年11月2日、学位申請者内野 祥徳 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

### 【背景】

**質問1) 共同研究者の原が示した「腸内細菌叢が肝がんの一因となっている」具体的な機序について**

(回答) 高脂肪食摂取で増えたグラム陽性菌が産生するデオキシコール酸と細胞壁成分のリポタイコ酸が肝臓に流れ込み、協調的に肝星状細胞に作用し、炎症性および腫瘍抑制因子が分泌され、肝がんの発生を促進的する微小環境を形成する。

### 【対象と方法】

**質問2) サンプル数の決め方について**

(回答) 当初サンプル数が集まらなく25症例ほどで解析を行おうとしたが、共同研究者の原らと検討し、50症例を超えるまで回収を続けた。事後検定としてGPowerアプリケーションを用いて菌種の相対存在量と平均値から検出力を算出した結果、52対51のサンプル数は比較研究として許容できるものであった。

### 【結果】

**質問3) 早期群 (Stage I,II) と進行群 (Stage III,IV) で分けているが、Stage IIIとIVでは有意差はないのか。**

(回答) Stage IIIとIVの比較では、サンプル数が不足しており統計学的に有意な結果が得られないことが考えられる。また、それぞれのサンプル数が17対9と差があるため、これらの比較を行うにはより多くのサンプルが必要となる。サンプルを増やしStage IIIとIVで比較を行い、同定した菌種がStage IVで増加していれば、大腸がん進行に関わる可能性をさらに強くするものと考えている。

**質問4) 今回同定した4菌種の過去の報告とのマッチ率はどうか。**

(回答) *Peptostreptococcus stomatis* と *Solobacterium moorei* に関しては、大腸がん患者の便サンプルで濃縮していたという報告はあるが、4菌種とも今回のように唾液、便とともに健常者に比べ大腸がん患者において相対存在量が高くなっていたという報告はない。

**質問5) 逆に大腸がん患者で減っていて大腸がんを抑制している菌種はないか。**

(回答) 今回のLEfSe解析の結果において、赤のラベルの健常者群で増えていた菌種が大腸がん患者で減っていた菌種と考えられる。今回は検討を行っていないが、これらの菌種を調べてみると、大腸がん抑制に働いている菌種が存在する可能性はある。

**質問6) LEfSe解析において *F. nucleatum subsp. vincentii* は大腸がん患者の便サンプルで多くみられているが、唾液サンプルではみられなかったということか。**

(回答) LEfSe解析では片方の群に比べ有意に多くみられた菌種が抽出されている。*F. nucleatum subsp. vincentii* は大腸がん患者の唾液サンプルでみられなかったのではなく、そもそも唾液には多くみられ、健常者と大腸がん患者の間で差がみられなかったため抽出されなかった。

### 【考察】

**質問7) 実際に口腔からの菌種の何%ぐらいが生き残り腸内に定着しているのか。**

(回答) 過去の報告でヒト唾液マイクロバイオームを無菌マウスに移植した場合、マウス腸内に定着可能であった唾液細菌種は約30%であった。宿主の種類にかかわらず、唾液マイクロバイオームの一部は本来腸内に安定的に定着可能であると考えられる。

## 最終試験の結果の要旨

**質問 8)** 今回同定した 4 菌種は腸に到達するために、酸に強いなどの特徴があるのか。

(回答) 歯周病菌を様々な pH の人工胃液に曝露した後の生存率を調べた研究では、pH1, 3, 5 でそれぞれ 0%, 0.01%, 1%程度しか生存できなかったが、菌をバイオフィーム状にして同様の実験を行うと、pH1 では 1%以下であったが、pH3 になると約 70%の生存率を示した。口腔内での細菌はバイオフィームを形成しており、今回の 4 菌種においてもバイオフィーム状を呈し、胃を通過して腸にまで到達している可能性が考えられる。

**質問 9)** これら 4 菌種が大腸がん悪化に影響する理由は何か。

(回答) 4 菌種のうち *Streptococcus anginosus* は食道がん病変から検出され、発癌過程において炎症性サイトカインの産生を誘発し発癌を促進することが報告されている。また *Solobacterium moorei* 菌血症の患者では悪性腫瘍などの衰弱した状態と関連しているとの報告例もある。これらの菌種が大腸粘膜に感染することで、炎症性の環境を形成し、発癌過程を促進しているという可能性が考えられる。

**質問 10)** これら 4 菌種は口腔内がどのような状態になると増えやすいのか。

(回答) 4 菌種は全て口腔常在菌と言われているが、歯内感染に関連する、また歯周炎病巣の歯肉縁下プラークからも分離されることがあるとの報告もあることから、清掃不良やカリエス、歯周病など、口腔衛生状態が悪化するとこれらの菌種も増加することが予想される。

**質問 11)** 16S rRNA 領域を用いた理由。またそれ以外の方法で解析は行うことはできるのか。

(回答) 原核生物の分類学において完全に統一された方法は確立されていないが、細菌叢解析において最も一般的に用いられる方法である。16S rRNA 領域は保存性の高い定常領域と菌種ごとに配列の特異性の高い可変領域が交互に並んでいる構造を示す。全ての種で保存された配列があるためプライマーを設計しやすいこと、可変領域があるため近縁種であっても様々な生物間の比較が可能であること、系統解析を行ううえで十分な長さがあること、などいくつか理由としては挙げられる。16S rRNA 解析が細菌群集の構造を明らかにし、どのような細菌が環境サンプルに存在するか確認する方法であるのに対し、例えばショットガンメタゲノム解析では菌叢中の細菌ゲノム全体の情報を獲得できるため、菌叢のもつ機能遺伝子の種類と量を明らかにすることができる。

**質問 12)** 癌化に関わるような代謝産物を出すなどのような特徴はあるか。

(回答) 今回はメタボローム解析のようなサンプル中の代謝産物を計測する解析は行っていないが、共同研究者の原らの最新の研究では大腸がん患者の糞便で濃縮していた菌種のうち *Porphyromonas* 属は代謝産物である酪酸の分泌を介して、がんのストレス応答である細胞老化を誘導する能力を有しており、これらの細菌が組織に侵入すると、酪酸による細胞老化に伴う炎症表現型がみられるようになり、大腸がんの促進に影響するというを示した。今回の 4 菌種においても何らかの代謝産物が発癌に影響している可能性があり、今後検討を行う必要があると考える。

**質問 13)** 除菌を行えば大腸がん予防になるか。

(回答) *H. pylori* の除菌が胃がんの予防として扱われているように、今回同定した菌種が発癌に影響していると考えられるならば、除菌を行うことで大腸がん予防につながる可能性が考えられる。しかし、これを証明するには大腸がん患者におけるこれらの菌種の定量化や、非大腸がん患者に除菌を行い、その後追跡調査を行うなどの追加の研究が必要と考えられる。

**質問 14)** 今回の研究の新規性について

(回答) 今回同定した 4 菌種のうち *P. stomatis* や *S. moorei* に関しては過去の文献でも便サンプルにおいては腸がん患者で多く見られることが示されていたが、唾液と便で共通してこの 4 菌種が多くみられたという点においては新しい知見と言える。また *S. moorei* が発癌だけでなく進行にも関わる可能性を示唆したのも、渉猟し得た限りでは過去の文献ではない。*F. nucleatum* の全てが大腸がんの発癌および進行に関わるという報告が多かったが、亜型によって影響するもの、しないものが存在する可能性があるという点も新たな知見と考える。

**質問 15)** 将来的な展望について

(回答) PCR による検証を行い各サンプルにおける目的の細菌種の存在を確認し、将来的には唾液を用いた大腸がんのリスク診断を可能にする。また歯科介入を行い介入前後での細菌叢の変化を観察し、大腸がん予防や既存の大腸がん進行抑制につながるかどうか検討を行う。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(歯学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。