

研究者：植原 治

(所属：北海道医療大学歯学部口腔構造・機能発育学系保健衛生学分野)

研究題目：口腔細菌によるベーチェット病発症の解明

目的：

ベーチェット病は、1937年トルコのベーチェットによって提唱された疾患で、多臓器侵襲性の難治性の病気である。口腔粘膜のアフタ性潰瘍、眼のぶどう膜炎、皮膚症状、外陰部潰瘍を主症状とし、急性炎症性発作を繰り返すことを特徴とする。地域的な分布を見てみると、世界的にはシルクロードに沿った帯状の地域に分布を示す。本症での失明率の高いことや、20歳代後半から40歳代にかけての働き盛りに発病が多いこと、腸管型や血管型、神経型などの特殊型ベーチェット病の死亡が少なからずみられる。

病因は未だ不明であるが、疾患の発症には遺伝要因と環境要因（外因）の双方が重要であると考えられている。ベーチェット病ではHLA-B51の陽性率が高く、発病にHLA-B51そのもの、あるいはこれに連鎖する素因の役割が重視されている。2010年、日本およびトルコ・米国共同研究チームが全ゲノム解析（GWAS）により *IL23R/IL12RB2*, *IL10* が疾患感受性遺伝子であることを報告し、また、*IL-10* の産生不全による炎症制御低下がベーチェット病の炎症増幅につながっている可能性を示している。その後、さらに詳細な解析が加わり、*ERAPI*, *CCR1*, *STAT4*, *KLRC4*, *TLR4*, *NOD2*, *MEFV* などの疾患感受性遺伝子が次々と同定され、いずれも免疫応答や炎症に関わる分子をコードしていることが確認されている。

一方、発症には外因も重要で、遺伝要因に病原微生物をはじめとした外因が関わり、自己免疫異常や好中球機能過剰をはじめとした自然免疫系の異常を引き起こし、発症にいたると考えられている。微生物の認識に関わる *TLR4*, *NOD2* やNK細胞受容体である *KLRC4* が疾患感受性遺伝子として同定されたことも、疾患への微生物の関与を指示する所見である。抜歯や扁桃炎があるとしばしば症状の増悪をみることがあることから、口腔細菌の状態が病気に関わっているのではないかと考えられ、特にプラークの初期付着に関与している連鎖球菌 *Streptococcus sanguinis* の役割が注目されてきたが、調査対象数や口腔細菌の培養方法などに問題点があり、特定の原因の同定にはいたっていない (Kaneko F et al. Eur J Dermatol 2008; Kurauchi K et al. FEMS Immunol Med Microbiol 2005)。単純な遺伝疾患や感染症ではなく、遺伝要因と環境要因の両者の相互作用が病気の成り立ちに重要と考えられる。

近年、口腔細菌の形成するバイオフィーム（プラーク）によって肺炎、心疾患、糖尿病、高血圧など種々の基礎疾患が増悪することが報告されている (de Melo Neto JP et al., 2013; Flores MF et al., 2013; Pralhad S et al., 2013)。口腔細菌による基礎疾病の増悪についての報告がある一方で、ベーチェット病などの眼疾患に係る報告は非常に少ない。

本研究ではベーチェット病発症に先行し、ほぼ全例で口腔粘膜のアフタ性潰瘍が発症することに注目し、その環境要因解明のため次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析によって口腔細菌叢を調査し、疾患の原因解明、将来的には予防および適切な治療法開発に結びつけることを目的とする。

対象および方法：

ベーチェット病発症に先行し、ほぼ全例で口腔粘膜のアфта性潰瘍が発症することに注目し、その環境要因解明のため倫理委員会の承認後、患者に本研究の概要を説明し、書面による同意を得てから下記を行った。

1) 健常者とベーチェット病患者の唾液採取

OMNIgene・ORAL 唾液用を用いて、唾液を採取した。

2) 唾液から細菌 DNA の抽出

採取したサンプルから DNA 抽出キットを用い DNA を精製した。

3) シーケンス領域の増幅 16SrRNA (V3-4 領域)

16S Amplicon PCR Primer (Klindworth A et al, 2013) を用いて、PCR 増幅を行った。

4) ライブラリの調整

AMpure XP ビーズを使用して 16S V3-V4 領域由来のアンプリコンを精製した後、サンプル DNA に illumina シーケンサー用アダプター、およびインデックス配列を付加した。

5) シーケンス (Mi-Seq, illumina) の実施

6) 口腔細菌叢のメタゲノム解析

結果および考察：

1)~4) まで終了し、60 人の唾液から DNA の抽出を行い、16S Amplicon PCR Primer を用いて、PCR 増幅を行った結果、16SrRNA 領域の増幅を確認できた (図)。5) および 6) はサンプル数をさらに増やしてから行う。

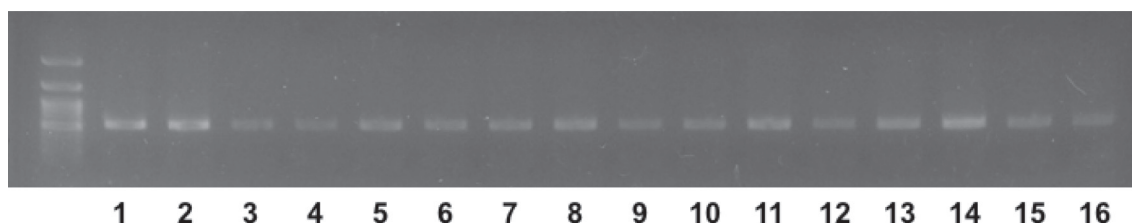


図 16S Amplicon PCR Primer で PCR 増幅後 (ベーチェット病患者の一部)

今後、ベーチェット病における外因としての口腔細菌の具体的な関与について解明する必要があり、その解明は治療のみならず、予防にもつながる可能性がある。そのため口腔ケアによって症状のコントロールに大いに貢献できるものと考えられる。解析結果によっては疾患の環境的発症要因があきらかになり、ベーチェット病高リスク患者においては発症前から事前介入あるいは疾患予防に貢献できる可能性がある。国民の健康にも医療経済的にも大きな意義を持つ重要なプロジェクトになると思われる。

成果発表：(予定を含めて口頭発表、学術雑誌など)

方法 5) および 6) の終了後、投稿論文作成予定。