

氏 名	大森 実知
(ふりがな)	(おおもり みち)
学位の種類	博士(医学)
学位授与番号	甲博医第6号
学位審査年月日	令和4年1月5日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題名	Characterization of salivary microbiota in elderly patients with type 2 diabetes mellitus: a matched case-control study (高齢者2型糖尿病患者の唾液細菌叢の特徴)
論文審査委員	(主) 教授 河田 了 教授 武内 徹 教授 樋口 和秀

学位論文内容の要旨

《目的》

2型糖尿病(以下:T2DM)の有病率は増加しており、世界的に高齢化が進む中、高齢のT2DM患者が急増することが予測されている。加齢とともにインスリン分泌不全やインスリン抵抗性が現れるが、特に日本人では、インスリン分泌能が低いことが知られている。超高齢社会を迎えている日本の高齢者におけるT2DMの予防および管理の重要性が注目されているが、T2DMにおける口腔内細菌叢についての検討は未だ十分になされておらず不明な点が多い。

近年、次世代シーケンサーと生命情報解析技術の急速な進歩により、口腔内の細菌の網羅的解析が可能となり、患者固有の細菌叢を明らかにすることができるようになった。この技術を用いることによって現在までに統一した見解がない高齢T2DM患者の口腔細菌

叢の特徴を解明することが可能である。本研究は日本人高齢者の T2DM に関連する口腔細菌叢の特徴を見出すことを目的とした。日本人高齢 T2DM 患者から採取した唾液の細菌叢 (salivary microbiota) を、年齢と性別をマッチさせた対照群と比較・解析した。さらに、T2DM 群の予測性について検証するため、salivary microbiota のデータについて統計学的機械学習による Random-Forest (RF) 解析を行った。

《方 法》

対象は、65～84 歳（平均 74 歳）の日本人高齢者 84 人とした。T2DM 群は、2018 年 3 月から 2019 年 1 月に大阪医科大学附属病院（現：大阪医科薬科大学病院）糖尿病代謝内分泌内科にて血糖コントロール目的で教育入院となった 42 人、対照群は、年齢および性別をマッチングした糖尿病のない高齢者 42 人とした（大阪医科大学研究倫理委員会承認 承認番号 2145）。Salivary microbiota 解析のため、唾液サンプルから DNA 抽出後、16S rRNA 遺伝子の V1-V2 領域を PCR で増幅し、次世代シーケンサー (Miseq®, Illumina) にて配列解析した。多様性解析、線形判別分析 (LDA) の効果量 (LEfSe) 解析によって、両群間で存在比率の異なる細菌を検出した。また、RF 解析を行い、T2DM 群を salivary microbiota によって予測するモデルを作成し、その予測性能を 5 回のクロスバリデーションテストで検証した。

《結 果》

T2DM 群と対照群を比較したところ、多様性の解析では、 α 多様性に違いはなかったが (operational taxonomic unit 指数, $p = 0.939$; Shannon 指数, $p = 0.879$)、 β 多様性には有意な違いがあった (unweighted UniFrac distances, $p = 0.001$; weighted UniFrac distances, $p = 0.001$)。LEfSe 解析の結果、T2DM 群は、門レベルでは Firmicutes などの比率が多く、Bacteroidetes が少なかった。RF 解析によって、T2DM 患者の判別に寄与する重要度の高い菌属 18 種を同定した。Salivary microbiota データに基づいた RF による T2DM 予測モデルの予測性能は高かった (曲線下面積 (AUC) = 0.938)。

《考 察》

Salivary microbiota は、健康な人でも人種や民族および年齢によって異なることが明らかにされていることから、salivary microbiota を検討するためには、これらの要因を考慮して解析する必要がある。そこで、今回の研究では、高齢 T2DM 群と年齢、性別をマッチさせた対照群の salivary microbiota を比較検討した。本研究は日本人高齢 T2DM の salivary microbiota の特徴を示す初めての研究であり、高齢 T2DM 患者と対照者の salivary microbiota が異なることを示した。

LEfSe 解析では、T2DM 群と対照群の間で、特定の分類群の存在率に顕著な違いがあることが明らかになった。門レベルでは、T2DM 群で Firmicutes が多く、Bacteroidetes が少なかった。先行研究では、高血糖患者では唾液中のグルコース濃度が高く、口腔内が酸性になっていることによって Firmicutes が多く、Bacteroidetes が少ないことが報告されている。したがって、高齢 T2DM 患者の高血糖の持続による口腔内環境の変化が salivary microbiota に影響を及ぼした可能性が考えられた。

また、RF 解析によって、salivary microbiota に基づいて T2DM 群と対照群を区別する予測モデルを作成した。この予測性能は、AUC 値 0.938 と高く、2 つの群を salivary microbiota から区別できることが示唆された。本研究で見出した高齢 T2DM 患者に基づく予測モデルが日本人に特有なものであるかどうかを明らかにするためには、今後他の人種、民族の salivary microbiota のデータと比較・検証する必要がある。

本研究は、日本人高齢者の T2DM 患者の salivary microbiota の特徴を見出した。これらの結果は、超高齢社会における T2DM 患者の口腔管理に役立つ新たな診断法や治療法の開発に関する今後の研究に貢献するものである。

論文審査結果の要旨

2型糖尿病（以下：T2DM）の有病率は増加しており、世界的に高齢化が進む中、高齢者の T2DM 患者が急増すると予測されている。多くの研究により、口腔の健康と T2DM との関連が明らかになっている。口腔内の感染症である歯周病は、T2DM の合併症の一つであり、T2DM の進行と歯周病の進行の間には双方向の関係があることが疫学的に示唆されていることから、申請者は、T2DM の予防と管理のためには、口腔内環境を理解することが重要であると考え、日本人の高齢者集団における T2DM に関連する唾液の細菌叢（salivary microbiota）の特徴を検討した。

本研究では、16S rRNA メタゲノム解析により、高齢者の T2DM 群と年齢、性別をマッチさせた対照群の salivary microbiota を比較した。多様性の解析、線形判別分析の効果量解析によって、T2DM 患者の salivary microbiota の特徴を見出した。また、Random-Forest 解析によって、salivary microbiota のデータに基づいて、T2DM 群と対照群を区別できることを明らかにした。T2DM 患者の口腔細菌叢については、現在までに統一した見解はなく、高齢の T2DM 患者の salivary microbiota の特徴を示す初めての研究である。

このように申請者は、本研究において日本人高齢 T2DM 患者の salivary microbiota の特徴を見出した。これらの結果は、超高齢社会における T2DM 患者の口腔管理に役立つ新たな診断法や治療法の開発に関する今後の研究に貢献するとともに、高齢 T2DM 患者に特有の予防と管理に繋がるものと考えられる。

以上により、本論文は本学大学院学則第 13 条第 1 項に定めるところの博士（医学）の学位を授与するに値するものと認める。

(主論文公表誌)

Clinical Oral Investigations 2021 Jun

doi: 10.1007/s00784-021-04027-y. Online ahead of print.