

平成30年6月6日現在

機関番号：33602

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05297

研究課題名(和文)モロッコ王国における侵襲性歯周炎の発症を制御する因子の細菌・免疫学的解析

研究課題名(英文) Bacteriological and immunological analysis for the regulatory factors of aggressive periodontitis in Morocco

研究代表者

吉田 明弘 (YOSHIDA, Akihiro)

松本歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：20364151

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,300,000円

研究成果の概要(和文)：侵襲性歯周炎は思春期前後のアフリカ系の若者に特異的にみられ、特にモロッコ王国において多発的に発症することが知られている。今回我々は 侵襲性歯周炎患者固有な細菌プロファイルの解析、末梢血を用いたミトコンドリアDNAの解析による侵襲性歯周炎の疾患感受性と人種特異性の解析を行った。本解析により、侵襲性歯周炎に特異的な細菌叢プロファイルが明らかになった。疾患感受性と分子遺伝学的分類による人種との関連については明確な相関は見られなかった。

研究成果の概要(英文)：Aggressive periodontitis (AgP) is particular form of periodontitis which affects adolescent. However, oral microbiota of AgP has not been studied. In this study, salivary microbiota of the AgP and healthy subjects in Moroccan peoples were analyzed. This study includes 130 (AgP and Healthy, 65 each) university students in Morocco. Multiplex 16S rRNA (V3-V4) sequencing of bacterial DNA was performed. The significantly higher levels of Fimicutes, Bacillales, Streptococcaceae, Staphyrococcaceae families were detected in saliva from AgP subjects ($P < 0.05$). On the contrary, Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Lactobacillaceae families were dominant in saliva from non-AgP subjects ($P < 0.05$). In genera levels, Bacilli, Streptococcus, Staphyrococcus are dominant in patients with AgP, while Lactobacillus, Porphyromonas are dominant in non-AgP subjects ($P < 0.05$, respectively). HOMD NGS analysis of saliva revealed the characteristic bacterial families/genera in patients with AgP.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：侵襲性歯周炎 口腔細菌叢 疾患感受性 モロッコ王国

1. 研究開始当初の背景

侵襲性歯周炎(AgP)は思春期前後の若年者に発症し、歯周組織の破壊が急速であること、前歯および第一大臼歯に局限した骨吸収を示すこと、特定の細菌が関与すること、罹患者はアフリカ系人種に限られていることが明らかとなっている。本疾患の罹患者の歯周ポケットからグラム陰性桿菌 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa)が多く単離され、さらに西アフリカおよび北アフリカにおける AgP 患者においては Aa の中でも JP2 クローンの感染の有無が非常に強く関与していることがこれまでの臨床疫学的研究から明らかにされてきた。このように AgP は歯周炎の中でも思春期の口腔内で限局的かつ急速進行的に病状が進行する非常に特徴的な病態を呈し、モロッコ王国においては青年期の罹患率が 7.5%と深刻な社会問題となっている。

2. 研究の目的

侵襲性歯周炎は思春期前後のアフリカ系の若者に特異的にみられ、特にモロッコ王国において多発的に発症することが知られている。これまで我々はモロッコで頻発する侵襲性歯周炎との関連が強く疑われている Aa JP2 株の定量系を開発し、同菌と侵襲性歯周炎の重篤度との関連を解析してきた。今回我々は本疾患罹患者の生体試料を用いて患者サンプル中における侵襲性歯周炎患者固有な細菌プロファイルの解析、末梢血を用いたミトコンドリア DNA の D ループ解析による侵襲性歯周炎の疾患感受性における人種特異性の解析を行い、健常者のデータと比較することにより、本疾患の発症に重要な因子を同定し、これらの因子の病因論的役割を解析する。

3. 研究の方法

(1) 口腔診査および臨床サンプルの採取

モロッコ王国 Mohammed V 大学の大学生約 1000 名を対象に口腔内を診査し、歯周病の病態について解析した。得られたデータより、患者・健常者に分類した。患者については歯周病の重篤度についても患者から歯肉溝浸出液、唾液、末梢血等の生体サンプルを採取した。

(2) 唾液、歯肉溝浸出液の細菌叢解析

AgP と診断された対象者および健常者コントロール各々65名から、唾液、歯肉溝浸出液より DNA を精製した。次に次世代シーケンサーを用いて唾液、歯肉溝浸出液について患者ごとの 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域の塩基配列を決定し、細菌叢解析を行った。

(3) ミトコンドリア DNA 解析による、人種と疾患感受性の相関の解析

得られた血液サンプルより、ミトコンドリア DNA をターゲットとして、D ループ領域の塩基配列を基にクラスター解析を行った。得られたクラスターと疾患感受性との関連

について解析を行い、疾患感受性と人種の関連を分子遺伝学的に解析することにより、AgP の人種特異性について解析した。

4. 研究成果

(1) 患者-健常者間における唾液細菌叢の相違

モロッコ王国 Mohammed V 大学の大学生 1000 名の中から、年齢・性別を合わせた患者、健常者をそれぞれ 65 名選び、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を基に唾液細菌叢の解析を行ったところ、侵襲性歯周炎に特異的な細菌種、健常者に特異的な細菌種が有意差をもって認められた(図 1、表 1)。

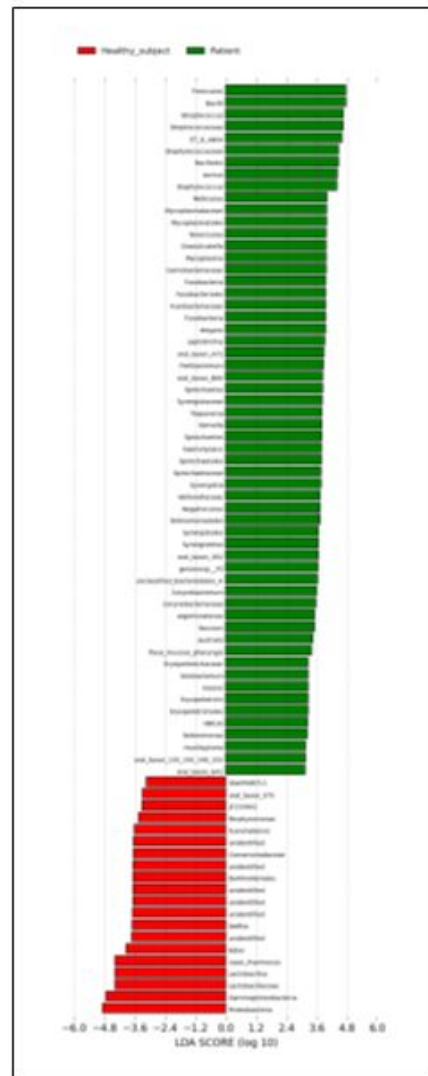


図 1 AgP 患者(上段)および健常者(下段)に特異的な細菌種・属

表 1 AgP 患者および健常者に特異的な細菌種・属

AgP に有意に多く見られるもの
Firmicutes
Bacilli/Bacillales
Streptococcus/Streptococaceae
Staphyrococcaceae
Mollicutes

Mycoplasmataceae/Mycoplasmatales/
Mycoplasma
Tenericutes
Granulicatella
Carnobacteriaceae
Fusobacteria/Fusobacteriaceae
Leptotrichia
Fretibacterium
Spirochaetes
Synergistaceae
Treponema
Gemella
Spirochaetes/Spirochaetales
Synergistales/Synergistetes
Corynebacterium/Corynebacteriaceae
Erysipelotrichaceae/Erysipelotrichi
Erysipelotrichales
Solobacterium
Selenomonas

健康者に多く見られるもの

Porphyromonas
Comamonadaceae
Burkholderiales
Delftia
Lactobacillus/Lactobacillaceae
Gammaproteobacteria
Proteobacteria

また、Shannon diversity index では患者菌叢と健康者菌叢を明瞭に分けることはできなかったが、これら患者 - 健康者における構成細菌の結果を基にクラスター分類を行ったところ7つの異なるクラスターに分けられ、患者と健康者が異なるクラスターに所属していることが明らかになった(図2)。

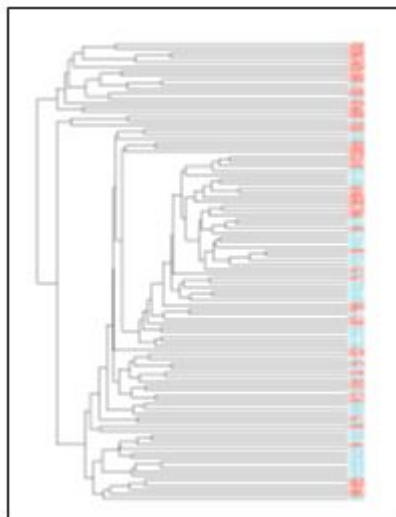


図2 患者 - 健康者のクラスター分類

さらに、Cladglam で詳細に解析すると、AgP 特異的な細菌叢と患者特異的な細菌叢が明瞭に区別され、AgP に特異的な細菌叢と健康者に特異的な細菌叢が明確に存在することが明らかになった(図3)。

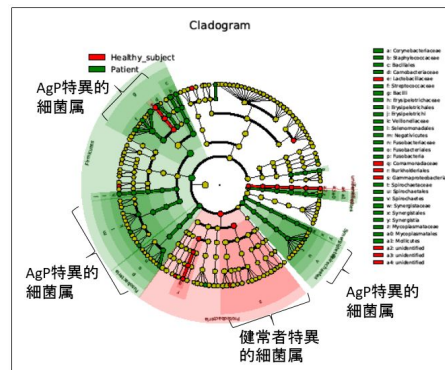


図3 Cladogram による細菌叢の解析

歯肉溝浸出液に関しては、現在次世代シーケンス解析を終了しており、統計解析を継続中である。

(2) AgP 疾患感受性と人種特異性に関するミトコンドリア DNA を基にした分子人類遺伝学的解析

AgP はアフリカ系人種のみには発症することから、本疾患の発症と人類遺伝的要因の関連を解明する目的でミトコンドリア DNA の D ループの塩基配列と疾患発症の関連性について解析した(図4)。

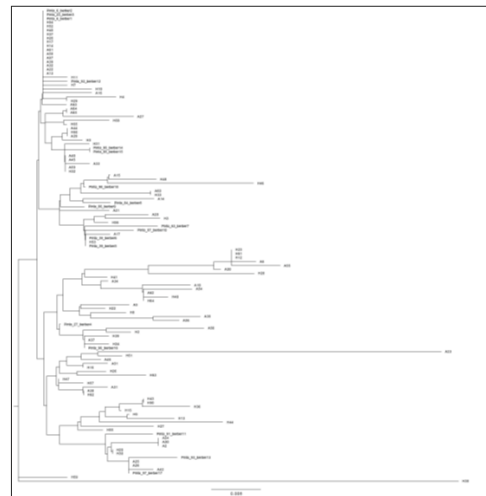


図4 ミトコンドリア DNA の塩基配列を基にしたクラスター解析

塩基配列間の p-distance を遺伝距離とし、近隣結合法で系統樹を得た。上記の系統樹からは、モロッコ侵襲性歯周炎患者集団と健康者集団、Berber 集団はそれぞれ独自のクラスターを形成しなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

Nakamura S, Shioya K, Hiraoaka BY,
Suzuki N, Hoshino T, Fujiwara T,
Yoshinari N, Ansai T, Yoshida A.

(2018) *Porphyromonas gingivalis* hydrogen sulfide enhances methyl mercaptan-induced pathogenicity in mouse abscess formation. *Microbiology*. 164: 529-539. 査読有

Iwasaki M, Taylor GW, Awano S, Yoshida A, Kataoka S, Ansai T, Nakamura H. (2018) Periodontal disease and pneumonia mortality in hemodialysis patients: A 7-year cohort study. *J Clin Periodontol*. **45**: 38-45. 査読有

吉田明弘 (2017) デンタルプラーク. *Membrane*. **42**: 46-53. 査読有 (Review article)

Iwasaki M, Borgnakke WS, Awano S, Yoshida A, Hamasaki T, Teratani G, Kataoka S, Kakuta S, Soh I, Ansai T, Nakamura H (2017) Periodontitis and health-related quality of life in hemodialysis patients. *Clin and Exp Dent Res*. **3**: 13-18. 査読有

Yoshida A, Niki M, Yamamoto Y, Yasunaga A, Ansai T. (2015) Proteome analysis identifies the Dpr protein of *Streptococcus mutans* as an important factor in the presence of early streptococcal colonizers of tooth surfaces. *PLoS one* **10**: e0121176. 査読有

Kiso A, Matsuo K, Shibata Y, Hasegawa H, Yoshida A, Fujimura S (2015) Supplementary studies on an extracellular proteinase of *Prevotella intermedia*: formation and some

enzymatic properties. *松本歯学* **41**: 1-6. 査読有

Matsuo K, Kiso A, Shibata Y, Hasegawa H, Yoshida A, Fujimura S (2015) Characterization of dipeptidyl peptidase-IV of *Porphyromonas gingivalis*. *松本歯学* **41**: 26-32. 査読有

[学会発表] (計 20 件)

日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会 (第 12 回) 2017 年 11 月
口腔マイクロバイオーームと歯周病: 吉田明弘 (特別講演)

松本歯科大学学会 (第 85 回) 2017 年 11 月
Porphyromonas gingivalis の硫化水素産生酵素の同定およびマウス生体反応の解析: 中村卓、塩屋幸樹、平岡行博、谷口奈央、吉成伸夫、安細敏弘、吉田明弘

日本歯周病学会中部地区大学・日本臨床歯周病学会中部支部合同研究会 (第 12 回) 2017 年 11 月
Porphyromonas gingivalis の硫化水素産生酵素の同定およびマウス生体反応の解析: 中村卓、塩屋幸樹、平岡行博、谷口奈央、吉成伸夫、吉田明弘

日本細菌学会関東支部総会 (第 100 回) 2017 年 9 月
Porphyromonas gingivalis の硫化水素産生酵素の同定およびマウス生体反応の解析: 中村卓、塩屋幸樹、平岡行博、谷口奈央、吉成伸夫、安細敏弘、吉田明弘

五大学微生物研究会 (第 5 回) 2017 年 9 月

Aggregatibacter

actinomycetemcomitans LtxA のヒト破骨細胞への作用:高橋晋平, 三好智博, 山下照仁, 村上康平, 小林泰浩, 宇田川信之, 吉成伸夫, 吉田明弘

歯科基礎医学会学術大会(第59回)2017年9月

Porphyromonas gingivalis の硫化水素産生によるマウス生体反応の解析:塩屋幸樹, 平岡行博, 谷口奈央, 吉田明弘

細菌学若手コロッセウム(第11回)2017年8月

Porphyromonas gingivalis の産生する硫化水素によるマウス生体反応の解析:塩屋幸樹, 中村卓, 平岡行博, 谷口奈央, 吉成伸夫, 吉田明弘

春季日本歯周病学会学術大会(第60回)2017年5月

日本とパキスタンにおける妊娠期の歯周状態と低体重児出産に関する調査:池上昭彦, 吉田明弘, 香山不二雄

IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition(95回)2017年3月 Iwasaki M, Taylor G, Awano S, Yoshida A, Hamasaki T, Soh I, Ansai T, Nakamura H. Pneumonia Mortality is Associated with Periodontitis in Patients Undergoing Hemodialysis.

日本骨免疫学会ウインターセミナー(第2回)2017年1月

Porphyromonas gingivalis が産生する硫化水素のマウス生体への影響:塩屋幸樹, 吉田明弘

歯科基礎医学会学術大会(第58回)2016

年8月

マウスにおける *Porphyromonas gingivalis* の硫化水素産生酵素による生体反応解析:塩屋幸樹, 平岡行博, 吉田明弘

細菌学若手コロッセウム(第10回)2016年7月 *Porphyromonas gingivalis* の硫化水素産生酵素の同定およびマウス生体反応の解析:塩屋幸樹, 中村卓, 平岡行博, 吉成伸夫, 吉田明弘

松本歯科大学学会(第82回)2016年7月

Porphyromonas gingivalis の硫化水素産生酵素の同定およびマウス生体反応の解析:塩屋幸樹, 中村卓, 平岡行博, 吉成伸夫, 吉田明弘

バイオフィーム研究者若手ワークショップ(第1回)2016年7月

非ムコイド型緑膿菌における ECF シグマ因子 AlgU の機能解析:塩屋幸樹, 吉田明弘

日本口腔衛生学会・総会(第65回)2016年5月

峰岡哲郎, 徳富順子, 角田聡子, 邵仁浩, 岩崎正則, 吉田明弘, 栗野秀慈, 安細敏弘. 歯科診療所における子ども参加型職業体験を通じた受診への動機づけの試み.

日本口腔衛生学会・総会(第65回)2016年5月

岩崎正則, 栗野秀慈, 有永靖, 片岡正太, 角田聡子, 邵仁浩, 濱寄朋子, 吉田明弘, 安細敏弘. 透析患者における歯周病と健康関連 Quality of Life の関連.

日本骨免疫学会ウインターセミナー(第1回)2016年1月

非ムコイド型緑膿菌における

extracytoplasmic function (ECF) シグマ因子 AlgU の機能解析: 塩屋幸樹, 吉田明弘

第 98 回日本細菌学会関東支部総会 (東京) 2015 年 10 月

口腔初期定着レンサ球菌と競合時に *Streptococcus mutans* に発現するタンパク質の解析: 吉田明弘

第 1 回日本骨免疫学会 (沖縄) 2015 年 6 月

う蝕細菌 *Streptococcus mutans* の歯面における競合機構の解析: 吉田明弘

The 3rd Meeting for Osteoclast Biology (長野) 2015 年 2 月

Proteome Analysis identifies the Dpr Protein of *Streptococcus mutans* as an Important Factor in the Colonization of Tooth Surfaces in the Presence of Early Streptococcal Colonizers: Yoshida A

〔図書〕(計 3 件)

吉田明弘 (2017) 食と微生物の事典, 第 1 版, 北本勝ひこ他、編, 第 4 章 4-2 食生活と口腔微生物, 322-323, 朝倉書店, 東京.

吉田明弘 (2017) 口腔保健・予防歯科学, 第 1 版, 安井利一他、編, 第 3 章 口腔バイオフィルムの形成と病原性, 15-32, 医歯薬出版株式会社, 東京.

吉田明弘 (2016) 口腔微生物学・免疫学, 第 4 版, 川端重忠、小松澤均、大原直也、寺尾豊、浜田茂幸、編, 第 4 章 口腔の感染症, VII う蝕 C. う蝕の免疫学, D. 病因論に基づいたう蝕の予防, 242-251, 医歯薬出版株式会社, 東京

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

www.mdu.ac.jp/faculty/course/expert-basis/saikin.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 明弘 (YOSHIDA, Akihiro)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 20364151

(2) 研究分担者

宇田川 信之 (UDAGAWA, Nobuyuki)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 70245801

田口 明 (TAGUCHI, Akira)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 70243582

吉成 伸夫 (YOSHINARI, Nobuo)
松本歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 20231699

宮崎 秀夫 (MIYAZAKI, Hideo)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 00157629

安細 敏弘 (ANSAI, Toshihiro)
九州歯科大学・歯学部・教授
研究者番号: 80244789

岩崎 正則 (IWASAKI, Masanori)
九州歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号: 80584614

(3) 連携研究者

()
研究者番号: