

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K11842

研究課題名(和文) red complex細菌の網羅的な遺伝子解析による歯周病診断マーカーの検索

研究課題名(英文) A study of the diagnostic markers for periodontal disease by the comprehensive gene expression analyses of red complex bacteria

研究代表者

平塚 浩一 (HIRATSUKA, Koichi)

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：80246917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は将来的に歯周疾患が重篤化するか否かを予測する診断法の開発を試みた。

重度の歯周病と特に関連性の高いRed complexに属する3菌種と侵襲性歯周炎の原因菌を加えた4種を対象に、カスタムメイド遺伝子発現マイクロアレイを用いて、病原性の指標となるバイオマーカーの検索を行った。また、翻訳される遺伝子に加えnon-coding RNAを解析対象とした。

各種ストレスを与え病原性を変化させた研究株と、異なる歯周病病態から得られた臨床サンプルを解析試料として用いた結果、病原性の違いが明らかな研究株間の結果と、病態の異なる歯周疾患患者の結果では相似したパターンが一部見いだされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PCR法による検査法は、特定の細菌の検出量を調査するものであり、病原性を多角的に捕らえる事は難しい。菌種は同一であっても個人の口腔に生息する菌株は異なる。また、菌株が異なれば病原性も異なることが知られている。さらに、個人の健康状態で、その病原性すら変化する。従って、歯周病の進行予測にはホスト側の因子に加え、パラサイト側の病原性を遺伝子発現パターンから解析する必要がある。本研究結果により、病原性の違いが明らかな研究株間の結果と、病態の異なる歯周疾患患者の結果では相似したパターンが一部見いだされた。これは、将来的にチェアサイドでの簡易キットの開発につながるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was a development of the diagnostic procedure to predict whether a periodontal disease became severe in the future. Using custom-made gene expression microarrays, we investigated the pathogenic biomarkers for 3 strains belonged to Red complex associated with severe periodontal disease and 1 strain associated with aggressive periodontitis. Also, we analyzed non-coding RNAs in addition to a translated genes as targets. The laboratory strains under various stress and clinical isolated samples obtained from the periodontal disease were used for analysis. As a result, it was found the similar patterns of their results between the laboratory strains with different pathogenicities and clinical strains isolated from patients with different periodontal conditions.

研究分野：口腔内細菌の遺伝子発現解析

キーワード：遺伝子発現 マイクロアレイ 病原性 歯周病 診断 細菌 Red complex マーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、口腔内には 800 を超える細菌種が生息しているとの報告がある。一人の口腔内に生息する同一菌種の菌株の種類は数株程度と考えられており、我々の口腔内には個々に別々の株が生息している。当然のことながら、それら株によって病原性が異なる。

歯肉縁下プラークの細菌は他の細菌と microbial complex を形成し、集合体としてのフローラを構成している。この共生集団は歯周病疾患との関連性により 3 階層に区分され、最も最上層に居るのが Red Complex と称され、*Porphyromonas gingivalis* (*P. gingivalis*), *Tannerella forsythia* (*T. forsythia*), *Treponema denticola* (*T. denticola*) が属する (J Clin Periodontol, 29: 260-268, 2002)。これらは概ね、重篤な歯周病に関連して検出され、歯周病診断での細菌検査のターゲットとなっている。Red Complex 3 菌種は、互いの病原性を高め合う特徴をもち、互いの存在が個々の病原遺伝子の発現を促し、相乗効果を発揮していると考えられているが、そのメカニズムは未だ良く分かっていない。また別に、歯肉の発赤、腫脹は軽度であるものの、急速な歯周組織の破壊を伴う侵襲性歯周炎患者には、*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (*A. actinomycetemcomitans*) の総菌数に対する検出比率が健常者よりも高い。さらに長期間の静止期から短期間で急激な組織破壊を惹起する活動期への周期的な反復により重篤化する。

従来から、歯周病診断の細菌学的観点からのアプローチの 1 つに、特定の細菌の菌種が臨床的に分離されるか否かという観点から、各菌種独自の 16S rRNA 保存領域をターゲットとした PCR 法による検査法が主流となっている。ところが、これまでの数々の研究報告から、病原性の強さを決定づける要因は、菌種よりむしろ菌株であり、菌体がもつ蛋白質分解酵素活性、細胞付着能、および侵入能力など様々な病原性は菌株間で大きな差異があることが知られている (FEMS Microbiol Lett. 15: 187:139-144, 2000.)。従って、これまでの菌種レベルでの同定法では、同一細菌のもつ病原性の強さを正確に捕らえる事は難しく、むしろ口腔内に生息する菌株の病原性遺伝子の発現解析を基とするアプローチが将来的に必要不可欠となると思われる。

近年、多くの生物種のゲノム解析が進み、細菌のゲノム解析も例外ではない。その塩基配列を基に作成された probe をスポットした細菌の遺伝子発現アレイを用いた解析は、非常に有用なツールと考えられるが市販はされていない。また近年、真核生物において non-coding RNA (ncRNA) が様々な疾患に関与することが知られており、原核生物においても同様に ncRNA が相当数が予測されており、多くが病原性や環境ストレスに関与する mRNA の翻訳や安定性を調整する鍵となるエフェクターとして作用するという報告がある (Cell Host Microbe. 2: 116-127, 2010)。なお、口腔細菌に関する ncRNA は、Los Alamos National Laboratory が、遺伝子間配列で非常に良く保存された領域から、潜在的な ncRNAs を *in silico* で予測し既に公表されている (<http://www.oralgen.lanl.gov>)。

報告者は、細菌の菌種の同定・検出を中心とした研究では、患者の口腔内に生息する菌株の病原性を十分に考慮に入れることは難しく、今後、病原性遺伝子の発現を多角的に捕らえた検査法が必要であると考えのもと長らく研究を進めている。その過程において、市販されていない口腔細菌のカスタムアレイの作成やアレイ解析方法の確立、極微量の臨床サンプルから細菌 RNA を増幅する方法、さらに、次世代シーケンサーを用いた新規の non-coding RNA に努めてきた。

2. 研究の目的

個々の口腔内には同じ菌種であっても病原性の異なる様々な株が生息している。本研究の目的は、現行の歯周病が未治療のまま放置されると将来的に歯周疾患が重篤化する可能性があるか否かを予測する診断法の開発である。重度の歯周病と特に関連性の高い Red complex に属する *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* の 3 菌種に加え、侵襲性歯周炎の原因菌である *A. actinomycetemcomitans* の 4 種を対象に、遺伝子発現マイクロアレイを行い、病原性の指標となるバイオマーカーの候補プローブの検索を行った。また、バイオマーカーとしては、タンパク質に翻訳される遺伝子のみならず ncRNA をマーカー対象に加えた。従来から行っている研究結果から、臨床サンプルから得られる細菌 RNA の分解状態は個体差が大きく、著しく分解が認められる場合が多々あるのが ncRNA を加えた理由である。ncRNA はサイズが mRNA より小さいため、一般に分解を受けにくいと考えられている。本研究は、これまでの研究で得られた、全ての遺伝子および ncRNA 情報からカスタムメイドアレイを作成し、歯周病の様々な病態サンプルの解析を進めることにより、病態関連バイオマーカーを検索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 細菌用遺伝子発現カスタムマイクロアレイの作成

Red complex に属する *P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola* の 3 菌種に加え、侵襲性歯周炎の原因菌である *A. actinomycetemcomitans* の 4 種を対象とした RNAseq 解析結果を詳細に分析し得られた、新規の ncRNAs 候補と *in silico* で予測・公開されてる ncRNAs に加え、全遺伝子の約 60 mer のプローブを設計し、そのすべてを 2 回スポットしたカスタムアレイ (8 x 15K, Agilent) を作成した。また、human 由来の GAPDH, β actin (ACTB), Transferrin receptor (TFR2) を外部標準としてプローブに追加した。

(2) 試料の作成

Red complex に属する *P. gingivalis* W83 株, *T. forsythia* ATCC43037 株, *T. denticola* ATCC

35405 株の 3 菌種に加え、侵襲性歯周炎の原因菌である *A. actinomycetemcomitans* ATCC700685 株の 4 種を対象とし、各種菌体を通常培養後、遠心分離し、得られた菌体ペレットを再懸濁し Stress 負荷を行った。pH ストレスに関しては、37°C で温置した 0.1M NaCl 含有の 0.1M potassium acetate buffer (pH5.5) および 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.5, および pH 9.0) で再懸濁し、37 度で 15 分, 30 分, 60 分間嫌気培養装置内で暴露した。酸化ストレスに関しては、三角フラスコに培養液を移した後、嫌気培養装置から取り出し、攪拌機にて 37°C で 15 分, 30 分, 60 分, 120 分間震盪させた。温度ストレスに関しては、cold shock として 16°C, heat shock として 45°C, コントロールとして 37°C で温置した培養液に再懸濁し、嫌気装置内のインキュベーターにて、それぞれの温度コントロール下にて 15 分, 30 分, 60 分間暴露した。

すべての菌体はストレス負荷終了後に 2 倍量の RNAprotect® Bacteria Reagent (Qiagen) を加え RNA を安定化させた。(連携研究者; 栗原)

(3) 試料の調製

全 RNA の抽出は、Trizol Reagent (Thermo Fisher) を加え、FastPrep 24 Instrument (MP-Biomedicals) で細菌を破碎したのち、PureLink RNA micro kit (Thermo Fisher) で精製した (Fig.1A)。mRNA-rich 試料の調整は、全 RNA から MICROBExpress (Thermo Fisher) を用いて 95% 以上の rRNA の除去 (Fig.1B) し、MEGAclear (Thermo Fisher) を用いて 5S rRNA や tRNA を除去 (Fig.1C) した。

全 RNA 試料または mRNA-rich 試料は、Input Quick Amp WT Labeling Kit, (one-color, Agilent) を使用し、Random hexamer を用いて cDNA 化した後、In vitro transcription により Cy3 蛍光標識した cRNA を断片化した。すべての段階において RNA 試料は、Agilent RNA Nano Assay kit と Bioanalyzer (Agilent) を用いて、RIN 比を測定し分解の有無を確認した。

(4) ハイブリダイゼーションとマイクロアレイ解析

Gene Expression Hybridization Kit (Agilent) に断片化試料を添加し、マイクロアレイとハイブリオープン内にて 37 度で 16 時間反応させた。Gene Expression Wash Buffer (Agilent) で洗浄を施した後、Agilent 蛍光スキャナーにて蛍光強度を調査した。なお、外部標準である GAPDH cRNA, ACTB cRNA, TFR2 cRNA を同様に標識を行い、ハイブリ溶液に添加した。アレイ上の各 probe に対するシグナル強度のデータを遺伝子発現ソフト (Gene Spring) に移行し、各 probe におけるシグナル強度が、試料間で統計学的に有意な差異を示す遺伝子や non-coding RNA をマーカー候補とした。アレイ間の標準化は 75% タイルで行った。

(5) 臨床試料の採取と保存

健常者 (コントロール), 慢性歯周炎 (軽度・中等度・重度), 侵襲性歯周炎患者から歯肉溝滲出液を臨床サンプルとして採取した (連携研究者; 多田・遠藤・続橋)。RNA 抽出を行い、アレイ実験に使用するまで -80 度で保存した。(連携研究者; 栗原)

(6) 臨床試料のマイクロアレイ解析

報告者の考案した極微量 RNA サンプルを増幅させ、cDNA 化後、蛍光標識し、アレイ解析を行った。

(7) リアルタイム PCR

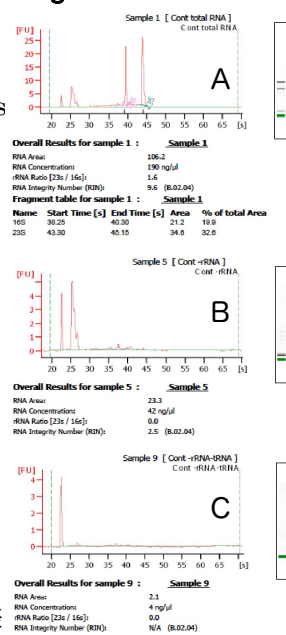
リアルタイム PCR は Rotor-Gene SYBR Green PCR Kit (Qiagen) と PCR 機器として Rotor-Gene™ Q (Qiagen, 東京) を用い、プロトコールに従って行った。

4. 研究成果

(1) 歯周病に深い関わり合いを持つとされる Red complex 細菌, および *A. actinomycetemcomitans* に対して病原性遺伝子の発現と深い関係のある ncRNAs をバイオマーカーの候補としての目的で、既にデータとしてある RNAseq の解析を進め、本研究のアレイ用プローブとして追加した (Table 1)。その後、菌種別に ncRNA を含む遺伝子プローブの設計後、カスタムマイクロアレイを作成した。

(2) マイクロアレイ解析の一連のプロトコールの見直しを行った。細菌用アレイはユーザーがプローブを設計し、Agilent 社においてカスタムメイドアレイを受注している。長らく細菌用のプロトコールは発表されていなかったが、細菌用アレイ実験プロトコールがリリースされたためである。RNA の逆転写反応から蛍光標識には同社の Input Quick Amp WT Labeling Kit (one-color, Agilent) を使用している。そのプロトコールには 100ng の細菌全 RNA の使用が提唱され

Fig.1



ているが、報告者のこれまでのアレイ研究から、全 RNA よりも mRNA-rich 試料を使用した方が概ね良好な結果が得られているため、この点について再度検証を試みた。

A. actinomycetemcomitans に対する温度ストレス (37, 42°C) の RNA サンプルを使用し、全 RNA および mRNA-rich 試料を共に 100ng 使用しマイクロアレイ解析を施した。それぞれの解析結果から遺伝子発現量が 37°C (コントロール) と比較し 42°C で 2 倍以上の増加、または減少が認められた遺伝子群をリスト化し、それぞれランダムに複数個遺伝子を選択し、リアルタイム PCR との遺伝子変動の検証を行なった。その結果、mRNA-rich 試料で解析した結果は、アレイ解析とリアルタイム PCR 解析とでの 37°C (コントロール) に対する 42°C の遺伝子発現の増減の結果が全て一致 (増加した遺伝子 4 つ、減少した遺伝子 4 つ) した。一方で、全 RNA を試料としてそのまま使用した場合には、アレイ解析で発現が増加した 3 遺伝子の全てが PCR 解析では逆に減少した。加えてアレイ解析で減少が認められた 4 遺伝子のうちの 3 遺伝子は同様に PCR 解析で減少が認められるものの、残りの 1 遺伝子は増減が全く認められない結果 (比率 1.0) であった。以上の結果を考慮し、以後マイクロアレイ実験にはすべて mRNA-rich 試料を用いて行うこととした。

(3) 細菌にストレスをかけた一例として、*P. gingivalis* に対する 15°C, 45°C, または 50°C の温度ストレスで 15 分後に 2 倍以上の遺伝子発現変動を Fig. 2 に示す。15°C, 45°C, および 50°C の温度ストレスでそれぞれ、517 遺伝子, 1,202 遺伝子, および 1,122 遺伝子が確認された。さらにこれら Cold Shock および Heat Shock の温度ストレス全てで共通する遺伝子は 248 遺伝子が確認された。主な遺伝子のアノテーションは、ABC transporter, abortive infection protein family, alkyl hydroperoxide reductase, ATP-dependent Clp protease, ATPase, cationic outer membrane protein OmpH, cell division protein FtsQ, chaperonin, clpB protein, dnaJ protein, grpE protein, heat shock protein HtpG, htrA protein, kinase, outer membrane efflux protein, thiol peroxidase, thioredoxin, TonB-dependent receptor と、シャペロンや細胞の増殖・分裂に関わる遺伝子をはじめ、peroxidase, thioredoxin のような酸化還元関連遺伝子も含まれていた。

また、*P. gingivalis* に対する酸化ストレスでの経時的な遺伝子発現変動のスキッタープロットを Fig. 3 に示す。酸素暴露 15 分後の遺伝子変動は大きく、2 倍以上の遺伝子発現変動が認められる遺伝子は 1,577 認められた (639 遺伝子発現増加, 938 遺伝子発現低下)。15~30 分では遺伝子発現の変動が落ち着きつき、30~60 分では大きな変動はほぼ認められない。しかし、120 分後は 60 分後と比較し、再び遺伝子発現変動が大きくなっていった。すなわち、急な酸化ストレスが加わったことで、細菌は早急にその環境改善に必要な遺伝子を動かすことを暴露 15 分以内に行い、少なくともそれにより 1 時間程度は対応するが、環境改善が見込めないと、細菌自身の生死に関わる可能性が大きくなるため、あたりに別の遺伝子を動かす、あるいはさらなる遺伝子発現の上昇を起こし、本格的に酸化ストレスに耐えるべき行動が行われるものと推測した。

(4) 歯周病の病態マーカーを取得するために、健常者 (コントロール), 慢性歯周炎 (軽度・中等度・重度), から歯肉溝滲出液臨床サンプルを各 10 ずつ採取, RNA 抽出し濃度を測定したが予想通り検出が困難なほど非常にごく微量であったため、患者試料に関しては、mRNA-rich 試料の精製は行わず、全 RNA をそのまま試料とし、報告者が考案した RNA サンプル増幅法にて、RNA を 1~2µg 相当まで増幅させたのち、これまでと同様にカスタムアレイ解析をした。各 probe におけるシグナル強度が、病態間で統計学的に有意な差異を示す遺伝子および ncRNA を調査し、病態マーカーの検出を試みたが、同グループ試料間での遺伝子発現の違いも大きく、期待していた病態マーカーの検出には到らなかった。その中で、各種プロテアーゼをコードする遺伝子やストレスタンパク質をコードする遺伝子発現などに病態間で相似したパターンが一部見いだされた。今後、臨床サンプルの数を増すことや、歯肉溝浸出液の生化学的なデータを同時に分析することで、より遺伝子発現パターンと病態の関連性が明らかになるものと推定された。

(5) 以上の結果より、結語として、個々の口腔内には同じ菌種であっても病原性の異なる様々な株が生息している。本研究の目的は将来的に歯周疾患が重篤化するかどうかを予測する診断法の開発を試みた。重度の歯周病と特に関連性の高い Red complex に属する 3 菌種に加え、侵襲性歯周炎の原因菌を加えた 4 種を対象にし、遺伝子発現マイクロアレイをカスタムメイドし、病原性の指標となるバイオマーカーの検索を行った。また、検索対象は翻訳される遺伝子に加え、non-coding RNA を用いた。各種ストレスを与え病原性を変化させた研究株と、異なる歯周病病態から得られた臨床サンプルを解析試料として用いた結果、病原性の違いが明らかな研究株間の結果と、病態の異なる歯周疾患患者の結果では相似したパターンが一部見いだされた。

<引用文献>

- ① Socransky SS, Smith C, Haffajee AD., Subgingival Microbial Profiles in Refractory Periodontal Disease, J Clin Periodontol, 29: 260-268, 2002.
- ② Dorn BR, Burks JN, Seifert KN, Progulske-Fox A., Invasion of Endothelial and Epithelial Cells by Strains of Porphyromonas Gingivalis, FEMS Microbiol Lett, 15: 187:139-144, 2000.

- ③ Papenfort K, Vogel J, Regulatory RNA in Bacterial Pathogens, Cell Host Microbe, 2: 116-127, 2010.

Table 1 *P. gingivalis* array デザイン (一部抜粋)

TargetID	BPStart	Sequence	Probe Length	End Distance	Tm	TmScore	X-Hyb Potential	PercentG	PercentC	PercentA	PercentT	percentGC	PolyX	X-HybTarget	Notes
PG_1992	1661	GCTATATCAAAGAGAAAGAGCCTTGGCCGA CAAGATCAACAGACTCGAAAGTATCCGAC	60	218	80	0.01	0	21.67	23.33	40	15	45	4	PG_0434	1_BC
PG_1992	1385	AATTGCTCCGAGAAAAGCAAGTATTTGGCGA TAAGCTGATCGACTTTACGCACAAGTTTT	60	494	80	0.02	0	20	20	31.67	28.33	40	4	PG_0317	1_BC
PG_1630	39	GAAGAACAGCCGTCATGATTGGTTTATAGCC GGTCAGGCAGTCTTCTTATAAAAAACAA	60	253	80	0.01	0	23.33	18.33	30	28.33	41.67	5	PG_1963	1_BC

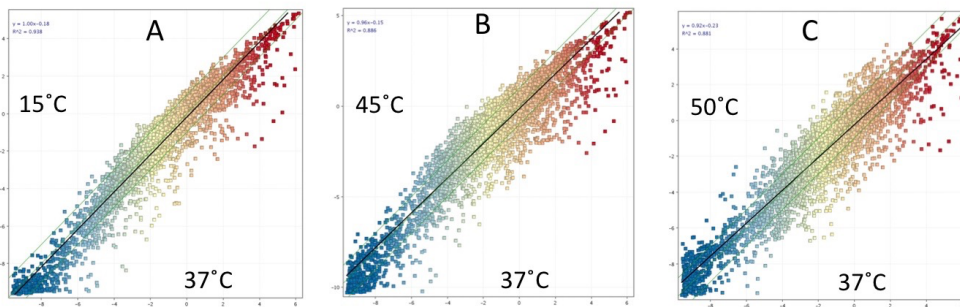


Fig.2 Temp. Stress

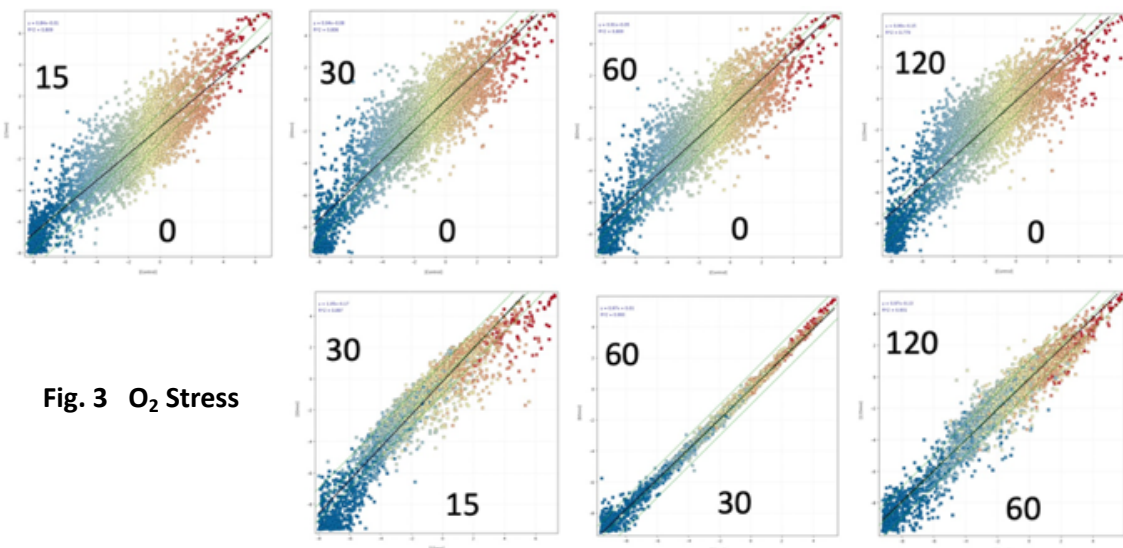
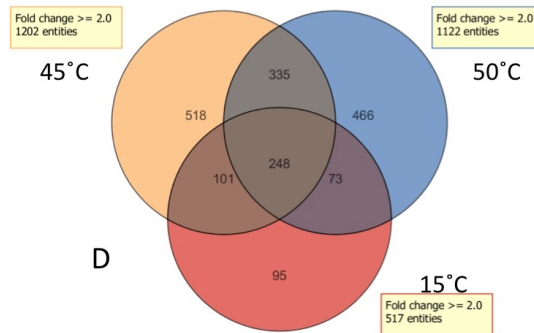


Fig. 3 O₂ Stress

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	桑原 紀子 (KUWAHARA Noriko) (90287665)	日本大学・松戸歯学部・講師 (32665)	
連携研究者	多田 充裕 (OHTA Mitsuhiro) (30260970)	日本大学・松戸歯学部・准教授 (32665)	
連携研究者	遠藤 弘康 (ENDO Hiroyasu) (90246918)	日本大学・松戸歯学部・講師 (32665)	
連携研究者	續橋 治 (TSUZUKIBASHI Osamu) (80333110)	日本大学・松戸歯学部・講師 (32665)	