

令和 6 年 9 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10112

研究課題名(和文)顎骨骨髓炎の慢性化に関わる細菌病原因子の同定

研究課題名(英文) Clarification of virulence factor involved in the chronicity of osteomyelitis of the jaw

研究代表者

道 泰之 (Michi, Yasuyuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授

研究者番号：70376755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：慢性顎骨骨髓炎(COMJ)とは、顎骨の炎症であり、硬化から挫滅へと進行する。我々は以前、暴露を伴わないsequestrumをステージIIとして3つのステージに分類した。本研究では、活性の高い細菌を同定するために、COMJにおける細菌のRNA:DNA比を調べた。各ステージで8つの門が優勢であったが、その構成はサンプルによって多様であった。属レベルでも多様な組成が観察された。しかし、アクチノミセス属とフソバクテリウム属のRNA:DNA比は、ステージIIでは極めて高かったが、ステージIとIIIではほぼ0であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、難治性を示す顎骨骨髓炎において、病気の発症や進行に関連し得る細菌種を同定した。さらに、16S rDNA, rRNAを用いた模擬的なメタトランスクリプトームを行うことで病変に存在する細菌種の活動性を評価する解析プロトコルを利用した。本プロトコルは、細菌腫の保有する病原因子の同定はできないものの、メタトランスクリプトームと比較して簡便に細菌種活動性を評価できる利点を有しており、口腔内における他の複合感染症にも応用できると考える。

研究成果の概要(英文)：Chronic osteomyelitis of the jaw (COMJ) is an inflammation of the jaw bone that progresses from sclerosis to frustration. We previously classified sequestrum into three stages, with no exposure designated as stage II. In this study, we examined the RNA:DNA ratio of bacteria in COMJ to identify active bacteria. Eight phyla were predominant in each stage, but their composition varied from sample to sample. Diverse compositions were also observed at the genus level. However, the RNA:DNA ratios of Actinomyces and Fusobacterium spp. were extremely high in Stage II, but almost zero in Stages I and III.

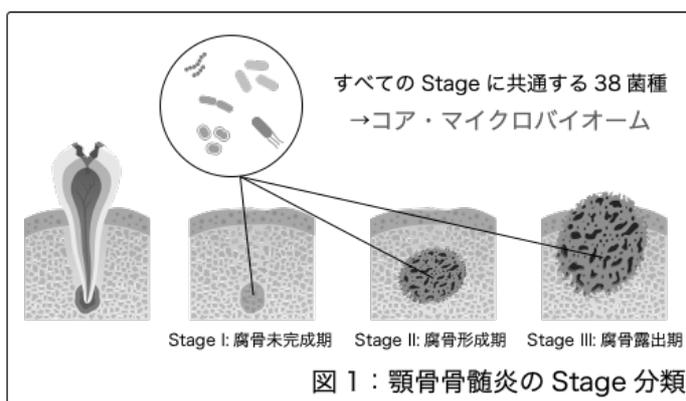
研究分野：口腔感染症

キーワード：複合感染症 顎骨骨髓炎 メタ16S解析 メタトランスクリプトーム解析

### 1. 研究開始当初の背景

口腔内には 700 種類を超える細菌種が共生しており、その一部は口腔内で複合感染症を惹起すると考えられている。ヒトに関連する感染症の 80%以上はバイオフィーム形成を伴う複合感染症である (NIH, 1999) と報告されているが、口腔内の細菌の 32%は依然として難培養性細菌であり (Zhao, et al., 2017), 培養に依存した解析手法では複合感染症における構成細菌を網羅することができない。顎骨骨髓炎も複合感染症の一つであり、口腔衛生状態の向上・抗菌薬の発達により、軽症な症例の治療成績は向上しているものの、従来の抗菌薬・外科治療が奏効せず、慢性化・重傷化する症例も依然認める。従来の治療に抵抗性を示し難治化する顎骨骨髓炎の病態の解明と有効な治療法の提案が求められており (Kim et al., Lancet, 2005), そのためには基盤となる細菌学的病因を明らかにすることが不可欠である。

先行研究では顎骨骨髓炎を、Stage I: 腐骨未形成期, Stage II: 腐骨形成期, Stage III: 腐骨露出期と病変の進行度で再分類してメタ 16S 解析を実施し、各 Stage における細菌叢構成を比較した。その結果、いずれの Stage にも共通して存在する 38 細菌種を同定し、それらを顎骨骨髓炎のコア・マイクロバイームと定義した (Goda A, et al., Clin Microbiol Infect, 2014) (図 1)。しかし、上記解析は、16S rDNA のみに着目しており、細菌種ごとに数千を超える遺伝子



子全ての発現を調べたわけではない。すなわち、そこに誰がいるかは明らかにしたが、そこで何をしているかは明らかにできていない。さらに応募者は、顎骨骨髓炎のメタゲノム解析・メタトランスクリプトーム解析を試みているが、死菌の保有していた機能遺伝子なども含まれている可能性があり、顎骨骨髓炎の病変で高い活動性を示す細菌がどのような機能遺伝子を発現しているか、どの機能遺伝子が病原因子となり得るかを、膨大なデータから選定することが困難である。

### 2. 研究の目的

そこで、本研究では、まず 16S rDNA および 16S rRNA の存在比に着目して細菌種の活動性の指標とすることで、模擬的にメタトランスクリプトーム解析を行なうことで、顎骨骨髓炎に関与する細菌種のなかで、さらに病変で活動性の高い細菌種を同定することを目的とした。

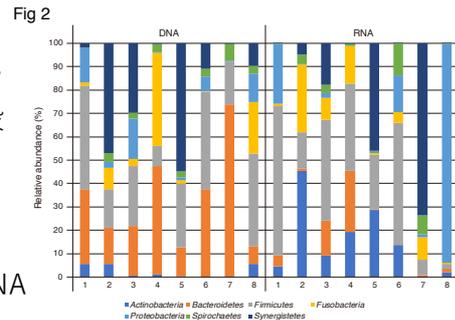
### 3. 研究の方法

顎骨骨髓炎を呈する患者のうち、外科療法が適用となった患者を対象とし、顎骨骨髓炎の

細菌叢検体を採取し、検体中に含まれる全ての細菌の DNA、RNA を抽出できる試薬キットを使って抽出を行う。抽出した DNA、RNA を調製したのちに次世代高速シーケンサーにかけて塩基配列データを取得。再構築した 16S rDNA、16S rRNA 配列を用いて顎骨骨髄炎病変に含まれる細菌種を列挙。さらには、細菌活動性指標（16S rRNA/16S rDNA 比）から慢性期の病変において高い活動性を保有する細菌種の同定することにより先行研究で同定したコア・マイクロバイオームを再評価するとともに、先行研究では 16S rDNA 量が少なかった細菌種も再評価することで、顎骨骨髄炎に寄与する活動性の高い細菌種を同定した。

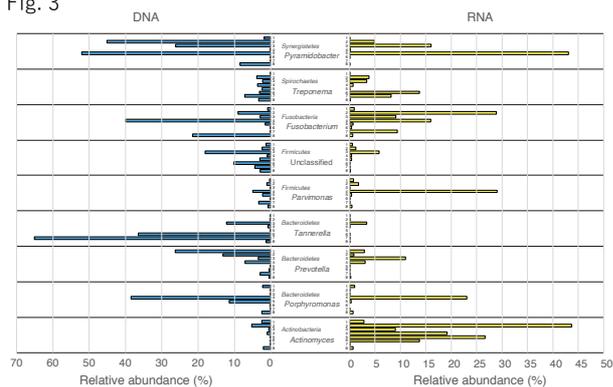
#### 4. 研究成果

本研究では、活性の高い細菌を同定するために、顎骨骨髄炎における細菌の RNA : DNA 比を調べた。腐骨が形成されているが口腔内に露出していない段階（ステージ II）のサンプル 6 個と腐骨形成前（ステージ I）のサンプル 1 個、口腔内に腐骨が露出した状態（ステージ III）のサンプル 1 個から DNA と RNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子に基づく細菌組成を求めた。



全ての検体で 8 つの門が優勢であったが、その構成はサンプルによって多様であった（図 2）。属レベルでも多様な組成が観察された。しかし、アクチノミセス属とフソバクテリウム属の RNA:DNA 比は、ステージ II では極めて高かったが、ステージ I と III ではほぼ 0 であった（図

Fig. 3



3)。これらの属はこれまで顎骨骨髄炎の主要な病原体とは考えられていなかったが、今回の結果は顎骨骨髄炎の病因にこれらの属が関与している可能性を示唆している。

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
研究分担者	中川 一路  (Nakagawa Ichiro)  (70294113)	京都大学・医学研究科・教授    (14301)	
研究分担者	渡辺 孝康  (Watanabe Takayasu)  (70725514)	日本大学・歯学部・講師    (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関