

令和 5 年 5 月 9 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K10247

研究課題名(和文) プラーク内ゲノムDNAと歯周病との関連—ショットガンメタゲノムによる解析—

研究課題名(英文) Relationships between genome DNA in dental plaque and periodontitis-analysis of shotgun meta genome

研究代表者

江草 正彦 (Egusa, Masahiko)

岡山大学・大学病院・教授

研究者番号：90243485

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：歯周ポケット内のプラークを構成する主な細菌については解析が進んでいますが、解析が困難な細菌についてはほとんど解析されていません。そこで、この研究では次世代シーケンサーを使って、今まで解析が困難であった細菌の歯周病への関わりを調べることを目的としています。対象は、歯周病が進んだ成人の方、ダウン症候群で歯周病が進んだ方としています。この研究によって今まで調べることができなかったダウン症候群患者のプラークの細菌構成を明らかにすることができます。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫機能の低下を伴うダウン症候群患者を対象として、歯周病の評価とNGSによる解析結果との関係を調べた本研究ではNGSを用いたショットガンメタゲノム(SGM)とメタ16S解析により、従来解析の対象とすることが困難であった細菌を含めて、プラークを解析することが可能となった。Campylobacteriales目はプラーク中に占める割合は最大6.1%と多くはなかったが、ダウン症候群患者で比較的高い割合で存在していた。本研究により、NGS解析では16S rRNA解析よりも精度よく細菌叢の構成を調べることができた。

研究成果の概要(英文)：Although there is continued progress in the analysis of the main bacterial components that make up periodontal pocket plaque, most bacterial components have not been analyzed until now. Therefore, the purpose of this research is to use next-generation sequencers (NGS) to investigate the bacteria involved in periodontal disease which have previously been difficult to analyze. The target population is adults with advanced periodontal disease and those with advanced periodontal disease due to Down syndrome. This study will reveal the previously unexplored bacterial composition of plaque in patients with Down syndrome

研究分野：社会系歯学

キーワード：ダウン症候群 歯周病 次世代シーケンス メタゲノム解析

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

障害の中でも知的能力障害は、口腔衛生についての情報を理解し実行することをしばしば困難にし、歯科疾患に罹患するリスクが高くなる。特に歯周病に対しては長期にわたる管理が必要になるため、現在でも解決されていない問題である。Down Syndrome(DS)患者は知的能力障害者の中でも大きな割合を占めるが、遺伝子疾患という点で、自閉スペクトラム症を伴った知的能力障害とは異なる要因を有する。DS患者では歯周病が早期に発症し進行することを、日々の診療において実感するが、疫学的研究によってそのような傾向にあることが広く知られている一方で、歯周病に関わる直接的で特徴的な要因は明らかにされていない。そこで本研究ではその要因の1つとして、近年有用性が多方面で報告されている次世代シーケンサー(NGS)を用いたショットガンメタゲノム(SGM)によって、従来の方法では調べることができなかった領域の研究を行う。DS患者で歯周病のリスクが高いことは、1970年代から報告されており、不正咬合、唾液腺機能低下、ブラキシズム、短い歯根、不完全な咀嚼機能、免疫機能の低下などの要因が考えられている。しかし直接的な原因はプラーク中の細菌であり、細菌叢の構成は病態との関わりが深いことは知られている。NGSによって微量のサンプルから網羅的にDNAの構成を調べることができるので、少量であっても重要な役割を担う細菌、ウイルス、および真菌などの同定が可能になる。現在では腸内細菌叢の解析を始め、NGSを応用することによって、様々な病態の解明や新たな治療法の開発に用いられている。歯周病の感染源としてのプラークの細菌叢の解析は従来から行われており、それに対するNGSの応用も行われているが、現在までにDS患者の歯周病において、プラークの解析にNGSを用いた研究はなく、さらにSGMによるプラークの解析は全く行われていない。また、歯周病に関連する可能性のあるウイルスが特定され、SGMを歯周病研究に用いる意義が高まっている。

2. 研究の目的

歯周病の研究としてプラークを構成する菌叢の解析として、構成比が小さい細菌や培養が困難な細菌、また細菌ではないウイルスなどは解析の対象とすることは困難であった。近年次世代シーケンサー(NGS)が普及するにつれ、腸内細菌叢の解析などに目覚ましい成果を上げており、本研究ではNGSを用いたショットガンメタゲノム(SGM)とメタ16S解析により、従来解析の対象とすることが困難であった細菌やウイルスを含めて、プラークを解析することが可能となった。そこで本研究では、全身疾患のない歯周病患者、免疫機能の低下を伴うDS患者を対象として、歯周病の評価とNGSによる解析結果との関係を調べることを目的とする。

3. 研究の方法

岡山大学病院予防歯科でメンテナンスを受けている健常者と、岡山大学病院スペシャル

ニーズ歯科センターを受診している DS 患者を対象として、それぞれ 5 名を対象として、P 群、DS 群とした。歯周病の評価として pocket depth (PD) を NGS 解析のサンプルとして、歯周ポケットが最も深い場所からスクレーピングにより採られたプラークを用いた。サンプルは生理食塩水に浮遊させ、岡山大学病院バイオバンクにおいて -80 度で保存した。解析では、メタゲノム DNA からショット ガンライブラリーを作製後、16S rRNA の V3-V4 領域を PCR により増幅しコピー数を調べた。

DS 患者 5 名 (20 ~ 50 歳) に対して行った半年間の歯周病治療の効果を評価した。歯周組織検査では、Probing Pocket Depth 以下 PPD、と Bleeding On Probing 以下 BOP は 6 点法で測定した。各計測値の合計を被検歯における計測部位数で除して評価した。採取したプラークをサンプルとして 16s rRNA をターゲットとして次世代シーケンサー (MiSeq システムと MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina)) によりプラークの構成細菌の割合を調べた。細菌種・治療前後・菌数の影響は t 検定により解析した。

4. 研究成果

P 群 3 名と、DS 群 5 名の診療によって得られた臼歯部の歯肉縁下プラークをサンプルとした。対象となったサンプルを保持していた患者は、すべて軽症以上の歯周病を認めた。解析の結果、DS 患者と予防歯科の患者で明らかな差異は認められなかった。全体の傾向として、目のレベルで分類したところ、Clostridiales 目、Fusobacteriales 目、Bacteroidales 目、Actinomycetales 目において、プラーク中に比較的高い割合で存在していた。その中では Actinomycetales 目が、予防歯科患者に比較的高い割合で存在していた。また、Clostridiales 目と Bacteroidales 目は、それぞれのプラーク内の相対的な存在割合が、非常に類似していた。Campylobacteriales 目はプラーク中に占める割合は最大 6.1% と多くはなかったが、DS 患者で比較的高い割合で存在していた。本研究により、NGS 解析では 16S rRNA 解析よりも精度よく細菌叢の構成を調べることができた。

歯周組織の状態は、治療前後で有意な差は認められなかったが、改善傾向にあった。

目 (order) のレベルで半年間の治療後の細菌構成の変化を調べたところ、半年後に Spirochaetales の割合は有意ではないが治療後の割合が高い傾向にあった。

科 (family) のレベルで半年間の治療後の細菌構成の変化を調べたところ、Spirochaetaceae は有意ではないが治療後の割合が高い傾向にある。また Peptococcaceae は治療後の割合が有意に高かった。Spirochaetaceae、Peptococcaceae は Down 症候群患者において、歯周病の進行と関連する可能性があると考えられる。

DS 患者において半年後に Spirochaetaceae、Peptococcaceae の割合が高くなったことの原因は明らかでないが、Down 症候群の免疫機能異常の影響の可能性はある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Masahiko EGUSA , Shigeru MAEDA , Mitsuhiro TAKAMORI , Khaled M HABBAB , Takayuki MORI , Masanao YAMAMOT , Yasuko NOJIMA , Aiko SEKI , Nina WAKIMOTO , Wakana NISHIZAKI
2. 発表標題 Association Between Plaque Genomic DNA and Periodontal Disease in Down Syndrome by Shotgun Metagenome Analysis
3. 学会等名 The29th Congress of the International Association for Disability and Oral Health (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高盛 充仁・前田 茂・江草正彦・森 貴幸・野島 靖子・東 倫子・山本 昌直・関 愛子・脇本 仁奈・沢 有紀・西崎 和佳奈・劉 法相・山瀬 裕子・三谷 裕子・半井 桜子
2. 発表標題 ダウン症候群患者の歯周病リスクに関する構成細菌の変化 - 初診時と半年後の比較検討 -
3. 学会等名 第39回 日本障害者歯科学会総会および学術大会
4. 発表年 2022年

〔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	前田 茂 (Maeda Shigeru) (50253000)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授 (12602)	
研究分担者	江國 大輔 (Ekuni Daisuke) (70346443)	岡山大学・医歯薬学域・准教授 (15301)	

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
---------	---------