

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K18567

研究課題名（和文）インプラント周囲炎の発症の起因となる細菌叢活動プロファイルの解明

研究課題名（英文）Investigation of transcriptional activity of microbiota for causing peri-implantitis

研究代表者

渡辺 孝康（WATANABE, Takayasu）

日本大学・歯学部・講師

研究者番号：70725514

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：歯科インプラントを埋入した後のインプラント周囲に形成される細菌叢では、特定の細菌遺伝子の転写発現割合が明瞭に高かったが、その時系列的变化は顕著ではなかった。また、遺伝子発現を主として担う細菌は、検出割合や時系列的变化のパターンが検体により一様ではなかった。このことから、インプラント周囲細菌叢では、細菌の遺伝子発現組成が週単位で時系列的に変化していく一方で、遺伝子発現を担う細菌の種類の時系列的な変化は患者ごとに多様であることが推察された。また、機械学習の適用によって、口腔内の疾患局所の細菌叢検体を属性によって識別し得る応用可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インプラント周囲に生じる複合感染症であるインプラント周囲炎については、インプラント体を埋入した時点で炎症が生じていなくても、細菌叢において何らかの病的な変化を経ることによって炎症の発症につながることを示唆される。本研究で明らかにした、インプラント周囲細菌叢における細菌の遺伝子転写発現やそれを主体的に担う細菌の種類の時系列的な変化は、細菌叢が将来的に病的変化するとすればそのもととなる状態と位置づけることができ、インプラント周囲炎の発症・進行をコントロールする上での基礎的情報となり得る。

研究成果の概要（英文）：Within microbiota around a dental implant, certain types of bacterial genes were highly expressed at the transcription level, whereas their expressional changes were not apparent during the passage of several weeks. On the other hand, bacterial taxa responsible for gene expression showed diversity among patients with respect to their proportions and changing patterns. These observations suggest that the bacterial gene expression changes with time passage within the peri-implant microbiota, whereas changes of bacterial taxa responsible for gene expression with time passage are diverse. In addition, samples of microbiota at oral disease lesions could be distinguished by applying machine learning.

研究分野：口腔細菌学

キーワード：インプラント周囲炎 細菌叢 メタトランスクリプトーム 機械学習 ディープラーニング

## 1. 研究開始当初の背景

歯科インプラントは、歯の欠損が生じた部位の機能を回復するため、広く普及している治療技術である。しかし、普及と同時にトラブルもみられ、埋入したインプラントがやがて脱落する例が散発している。この原因の一つとして、インプラント体の周囲に細菌が定着し炎症が生じた状態であるインプラント周囲炎が挙げられる。

インプラント周囲炎は、歯の周囲に生じる歯周炎と同様に、多種多様な細菌が複合的に定着した細菌叢によって生じると考えられている。これまでの報告では、炎症の生じたインプラント周囲の細菌叢は、炎症のないインプラント周囲の細菌叢とは細菌の構成が異なっているとされている。一方、インプラント周囲炎における細菌叢は、歯周炎の細菌叢とは細菌の構成や細菌の遺伝子発現のパターンが異なっていることが報告されている。

以上から、インプラントの埋入後に形成される細菌叢では、歯の周囲に存在する細菌叢とは細菌の構成や活動状況が異なっているものと推察される。しかし、そのような観点でインプラント周囲の細菌叢を調べた研究は研究開始時点で報告がない状況であった。

## 2. 研究の目的

本研究では前述の背景を受け、インプラント埋入後のインプラント周囲細菌叢における細菌構成と遺伝子発現の変化を、メタトランスクリプトームを調べることによって明らかにすることを目的とした。細菌叢を一つの集団として捉え、その活動態様を解明することによって、複合感染症であるインプラント周囲炎の発症・進行をコントロールするうえでの手がかりとなる知見を得ることを期待して本研究を計画した。

## 3. 研究の方法

インプラント体を埋入する予定があり全身疾患を有しない患者 10 名について、インプラント周囲細菌叢検体を経時的に採取した。検体採取のタイムポイントは、埋入後 1、2、4、6 週間とした。検体から細菌 RNA を抽出したのち、ライブラリ調製を経て高速シーケンサーにて塩基配列情報を取得した。このデータを、遺伝子機能と分類学的組成を収載したデータベースに対して類似性検索にかけ、検体ごとの遺伝子発現組成およびそれを担う細菌の組成を推定した。また、検体間の組成類似性を判断する目的においての機械学習の応用可能性を調べた。

## 4. 研究成果

(1) RNA に基づく塩基配列データを得るにあたって、細菌 RNA を市販の抽出キットによって抽出する際、細菌の遺伝子転写発現を示す mRNA 以外にも種々の核酸分子が混入するおそれがある。そこで、転写発現の高精度な比較の妨げとなるようなデータ混入を可及的に避けるため、まず RNA 抽出時の条件検討を行った。RNA を化学的・機械的に抽出したのち、真核生物由来の核酸除去、ならびに細菌由来の DNA など不要分子の除去を行うよう市販の抽出キットを組み合わせ、その抽出条件も細かに変更を加え、最適な抽出条件を調べた。その結果、高速シーケンサーから得られた塩基配列データの時点で、不要な塩基配列の混入割合を可及的に低減する抽出条件の設定に至り、本研究における検体の種類や採取方法に即して高精度なデータを得るための実験手順を整理した。

(2) 塩基配列に関する公共データベースに収載されたデータのうち、インプラント周囲炎 4 名および歯周炎 6 名から採取した病変局所の細菌叢検体に由来する塩基配列データを取得し、機械学習による疾患の識別可能性を検証した。まず、各データの中から細菌の獲得免疫機能を担う遺伝因子 clustered regularly interspaced short palindromic repeat に相当する塩基配列を抽出し、これを構成するリピート配列とスペーサー配列を整理した。次いで、スペーサーの種類が検体間でどの程度異なるかを、階層クラスタリングおよび主成分分析にて調べた。この結果、スペーサーの種類によって検体を記述しても、それによって 2 種類の疾患という属性を明瞭に識別することは困難であった。一方、スペーサーの種類に対して機械学習を適用したところ、高い正解率のもとで検体を 2 種類の疾患に識別することが可能であった。このことから、細菌叢に由来する塩基配列データに対して従来の解析方法を適用して、口腔内の類似した 2 種類の炎症性疾患という属性の識別が困難であったとしても、機械学習を適用することによって高精度に識別し得ることが示唆された。

(3) 上記(1)の予備検討を受けて、インプラント体を埋入予定の 10 名から採取した検体について塩基配列データを取得したところ、いずれの検体からも質・量ともに良好なデータが得られた。これをもとに、遺伝子の機能分類に特化した公共データベースに対して塩基配列とその翻訳によるアミノ酸配列の類似性検索を行い、検体ごとの細菌遺伝子の発現組成を推定した。その結果、いずれの検体においても特定の代謝機能を担う遺伝子群の発現割合が共通して明瞭に高かったが、その時系列的な変化は顕著ではなく、高い割合のまま経時的に推移していた。一方、発現割

合が低い遺伝子群は複数確認されたが、その中には時系列的に発現割合が単調増加ないし単調減少する遺伝子群があった。これに加えて、遺伝子機能と分類学的位置の双方を収載した公共データベースに対して、同様に類似性検索を行い、検体ごとに遺伝子発現を担う細菌組成を推定した。その結果、これまでの報告で歯周炎やインプラント周囲炎において検出割合が高いとされる代表的な細菌門が主として検出され、その検出割合は高かったが、検体や被験者によって割合の高さはバリエーションがあり、時系列的な変化のパターンも様ではなかった。以上から、埋入されたインプラント体の周囲に形成される細菌叢では、特定の遺伝子群が高い発現割合を示しつつも遺伝子発現の様相が時系列的に変化していくが、それを主体的に担う細菌の種類は患者ごとに多様であることが推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimogishi Masahiro, Watanabe Takayasu, Shibasaki Masaki, Shiba Takahiko, Komatsu Keiji, Nemoto Takashi, Ishihara Kazuyuki, Nakano Yoshio, Iwata Takanori, Kasugai Shohei, Nakagawa Ichiro	4. 巻 56
2. 論文標題 Patient specific establishment of bacterial composition within the peri implant microbiota during the earliest weeks after implant uncovering	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Periodontal Res	6. 最初と最後の頁 964 ~ 971
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jre.12898	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nemoto Takashi, Shiba Takahiko, Komatsu Keiji, Watanabe Takayasu, Shimogishi Masahiro, Shibasaki Masaki, Koyanagi Tatsuuro, Nagai Takahiko, Katagiri Sayaka, Takeuchi Yasuo, Iwata Takanori	4. 巻 6
2. 論文標題 Discrimination of bacterial community structures among healthy, gingivitis, and periodontitis statuses through integrated metatranscriptomic and network analyses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSystems	6. 最初と最後の頁 e00886-21
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSystems.00886-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Komatsu K, Shiba T, Takeuchi Y, Watanabe T, Koyanagi T, Nemoto T, Shimogishi M, Shibasaki M, Katagiri S, Kasugai S, Iwata T	4. 巻 10
2. 論文標題 Discriminating microbial community structure between peri-implantitis and periodontitis with integrated metagenomic, metatranscriptomic, and network analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Front Cell Infect Microbiol	6. 最初と最後の頁 596490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcimb.2020.596490	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 下岸将博、渡辺孝康、柴崎真樹、丸川恵理子
2. 発表標題 インプラント周囲細菌叢を規定するリスク因子の検討
3. 学会等名 第26回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 須藤毅顕、芝多佳彦、駒津匡二、澤藤りかい、佐宗亜衣子、植田信太郎、渡辺孝康、根本昂、加納千博、長井貴彦、大杉勇人、片桐さやか、竹内康雄、小林宏明、岩田隆紀
2. 発表標題 古代人の歯石DNAを用いた江戸時代と現代の網羅的口腔内細菌叢解析
3. 学会等名 第76回日本人類学会大会・第38回日本霊長類学会大会連合大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐竹和久、下岸将博、渡辺孝康、渡辺聡、興地隆史
2. 発表標題 メタゲノム16S解析法を用いた難治性根尖性歯周炎症例における摘出検体の細菌叢解析
3. 学会等名 第156回日本歯科保存学会学術大会（春季）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 渡辺孝康、芝多佳彦、中野善夫
2. 発表標題 深層学習による歯周炎・インプラント周囲炎の識別方法の検討
3. 学会等名 第63回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴崎真樹、下岸将博、渡辺孝康、丸川恵理子
2. 発表標題 インプラント周囲粘膜における遊離歯肉移植術が及ぼす細菌叢の変化
3. 学会等名 第25回日本顎顔面インプラント学会総会・学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 根本昂, 芝多佳彦, 渡辺孝康, 小柳達郎, 駒津匡二, 片桐さやか, 竹内康雄, 岩田隆紀
2. 発表標題 メタトランスクリプトーム解析を用いた歯周疾患ステージにおける細菌種間のネットワーク構造と機能組成の比較
3. 学会等名 第152回日本歯科保存学会学術大会(春季)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Komatsu K, Shiba T, Watanabe T, Nemoto T, Koyanagi T, Takeuchi Y, Iwata T
2. 発表標題 Non-surgical treatment and microbiome of periodontitis and peri-implantitis: seven-year follow-up
3. 学会等名 106th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology in collaboration with the Japanese Society of Periodontology, and the Japanese Academy of Clinical Periodontology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Komatsu K, Takeuchi Y, Shiba T, Watanabe T, Shimogishi M, Shibasaki M, Nemoto T, Koyanagi T, Katagiri S, Iwata T
2. 発表標題 Omics analysis defines differences in microbial community structure between peri-implantitis and periodontitis
3. 学会等名 68th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Gopinath D, Menon RK, Hussein H, Tansirichaiya S, Reynolds LJ, Roberts AP, Kabwe M, Brown T, Ku H, Dashper S, Tucci J, Adami GR, Ang MJ, Kim EM, Marotz C, Zuniga C, Zaramela L, Knight R, Zengler K, Moore NE, Weyrich LS, Speicher DJ, Nasir JA, Zhou P, Anderson DE, Goh CE, Bohn B, Demmer RT, Watanabe T et al.	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 295
3. 書名 The Oral Microbiome	

1. 著者名 Shiba T, Watanabe T	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 120
3. 書名 Polymicrobial Peri-Implant Infection (in Ogata Y [Ed.] "Risk Factors for Peri-implant Diseases")	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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