

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26462997

研究課題名(和文)顎骨骨髓炎細菌叢のネットワーク解析に基づく病態解明と新規治療戦略の提案

研究課題名(英文) Clarification of pathological condition of osteomyelitis of the jaw based on the analysis of microbiome network, and proposal of the optimal therapeutic strategy

研究代表者

道 泰之 (MICH, Yasuyuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70376755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：口腔内未露出の腐骨形成を認める病期Stage II顎骨骨髓炎患者、インプラント周囲炎・歯周炎を同一口腔内に有する患者から試料を採取後、16S rDNA、16S rRNAの配列情報を取得・解析した。インプラント周囲炎・歯周炎の解析で、細菌種の組成比は疾患間で大きく異なるが、細菌叢全体が保有する機能遺伝子組成は類似する。細菌の存在量が必ずしも細菌の活動性と相関しないことが明らかとなり、高い活動性を保有する細菌種同士が構成する共起ネットワークは両疾患間で大きく異なり、病態の違いに關与することが示唆された。本解析手法を顎骨骨髓炎サンプルにも適応することで病態解明および新規治療法の提案が期待される。

研究成果の概要(英文)：Both 16S rDNA and 16S rRNA sequence data was obtained from the patients with osteomyelitis of the jaw in stage II (sequestrum was formed but not exposed in the oral cavity). Furthermore, sequence data was obtained from the patients with both peri-implantitis and periodontitis. In the analysis of peri-implantitis and periodontitis, it was revealed that the community structure of core bacteria with high activity differed from that of the core microbiome determined by only 16S rDNA. Moreover, there was no correlation between relative abundance and the bacterial activity. Furthermore, despite the conspicuous difference in bacterial composition, the predicted functional profiles of the 2 diseases were quite similar. Finally, we revealed that the bacterial species forming the core connection of the co-occurrence network and its structures were quite different between the 2 diseases. These data may provide a possible explanation for the differing tractability of these diseases.

研究分野：外科系歯学

キーワード：複合感染症 顎骨骨髓炎 メタ16s解析 メタゲノム解析

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトに関連する感染症の80%以上は、バイオフィルム形成を伴う複合感染症である(NIH, 1999)。バイオフィルムは、種々の細菌に定着の場を与える上、抗菌薬および宿主側の生体防御に対して抵抗性を示すため、疾患が難治性となる傾向にある。近年、複合感染症を考慮に入れた、従来の感染症治療の改善または新規の治療の開発が求められている(Kim et al, Lancet, 2005)。口腔内には約700種の細菌が存在しており、その68%は培養困難であることが報告されている(Dewhirst et al, J Bacteriol. 2010)。その一部の細菌が顎顔面・口腔領域で様々な感染症を惹起する。

顎骨骨髄炎も口腔内細菌が原因で発症すると考えられている感染症の一つであり、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られる。また、骨粗鬆症治療薬に関連した骨髄炎Bone-modifying Agent-related Osteonecrosis of the jaw (BRONJ: 骨関連薬剤による顎骨壊死の総称)患者が近年増加傾向にある(Baltensperger et al, "Osteomyelitis of the jaws", Springer. 2009)。BRONJでも発症と細菌感染との関与が示唆されてはいるが(Anavi-Lev et al, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol, 2013)、その詳細は解明されていない。従来の治療に抵抗性を示して重症化する慢性顎骨骨髄炎の発症機序・病態の解明と有効な治療法の提案のためには、その基盤となる細菌学的病因を明らかにする必要がある。すなわち、「どのような機能を有する細菌が、代謝や遺伝子発現においてどのように相互作用して生存しているか」を明らかにする必要がある。

### 2. 研究の目的

申請者は、細菌種、薬剤耐性遺伝子、病原性遺伝子代謝関連遺伝子の情報を統合した顎骨骨髄炎細菌叢に関するデータベースを作成し、そのデータベースをもとに顎骨骨髄炎に対す

る効果的な診断法・治療法を開発することを最終目的とする。さらに、これらの機能遺伝子を保有する活性の高いキーストーン種(疾患の発症・維持の鍵となる種)と古細菌、キーストーン種と同等の機能を有することで、キーストーン種が抗菌薬等で除去された後もネットワークを維持すると考える菌種を同定し、微生物間ネットワークのレジリエンス(復元力)を明らかにすることで、顎骨骨髄炎の慢性化の機序を解明する。

### 3. 研究の方法

40症例を目標とし、東京医科歯科大学歯学部倫理委員会第732号に則り、同意を得た患者で、骨病変が存在し、外科療法が適用となった患者の中で、糖尿病・ステロイドの長期投与経験がある者を除いた患者より検体採取を引き続き行う。DNA/RNAの抽出は、上記先行研究を応用して実施する。

また、東京医科歯科大学倫理委員会第661号に則り、本学歯周病科に受診している患者で、インプラント周囲炎と歯周炎との両疾患に罹患している11名を被験者として検体採取を行い、細菌叢解析を行い、解析プロトコルを確立した。インプラント周囲炎・歯周炎の検体採取、解析は下記の手法で行った。

罹患部位の歯肉縁上プラークを除去後、ポケット最深部にペーパーポイントを挿入して縁下プラークを採取した。サンプルからDNAおよびRNAを抽出し、抽出したRNAからはcDNAを合成した。ユニバーサルプライマーを用い、PCR方で16S rDNAおよび16S rRNAのV3-4領域を増幅した。増幅産物は電気泳動法で視覚化し、抽出・精製した。ライブラリー調整後、MiSeqを用いて塩基配列取得した。

獲得した塩基配列は解析ソフトウェアUSEARCHを用いてキメラ配列除去およびクオリティの低いリード数の除去した後、97%の配列の相同性でOperational taxonomic

units (OTU) を作製した。その後、BLASTN および GREENGENES database を用いて塩基配列類似性検索して種レベルでのアサインメントを行い、系統解析した。各サンプルの種多様性は、OTU 数、Shannon 指数で調べた。また、サンプル間でコミュニティ構造を比較するために主座標分析を行った。さらに、16S rDNA および 16S rRNA の存在比(16S rRNA/16S rDNA 比)を計算して細菌の活動性指標とし、各細菌種の活動性を評価して生菌を選定した。本研究では、上記活動性指標の値が平均で1以上の細菌を高い活動性を保有する細菌種と定義した。

次に、メタゲノム予測ソフトウェア PICRUSt および機能遺伝子解析パイプライン HUMAnN を用い、各疾患の細菌群が保有する機能遺伝子を比較解析した。さらに、活動性の高い細菌同士の共起関係を解析するために、スピアマンの順位相関係数を算出しヒートマップを作成した。また、上記スピアマンの順位相関係数を用い、優位に共起関係を保有する活動性の高い細菌同士の共起ネットワークを Cytoscape にて解析した。

#### 4. 研究成果

前処理後の 7,493,910 本 (27,277 ~ 628,962 本: 平均 170,316 本) のリードを用いて以下の解析に使用した。

16S rDNA、16S rRNA 配列から細菌種数を種レベルでみたところ、合計で 524 菌種(インプラント周囲炎では 16S rDNA 配列で平均 243.5 菌種、16S rRNA 配列で平均 267.7 菌種、歯周炎では 16S rDNA 配列で平均 240.2 菌種、16S rRNA 配列で平均 260.9 菌種) が同定された。両疾患で種多様性に有意な差は認めなかった。一方で、細菌種の組成比は、疾患間だけでなく、同一の疾患内の被験者間でも大きく異なることが明らかになった。このことから、両疾患の細菌叢は、同一の疾患であっても抗菌薬等による口腔内の環境変化に応じて

細菌叢の組成比が変化する可能性がある。



Fig. 1

次に細菌の活動性に着目し、慢性期におけるインプラント周囲炎および歯周炎の罹患部位で直接的に疾患に関与している細菌種を特定した。その結果、インプラント周囲炎では 58 菌種、歯周炎では 51 菌種が活動性の高いコア・マイクロバイオーームとして選定された。従来、Red complex に属し歯周炎の発症、進行に関与すると報告されている *Porphyromonas gingivalis* は、両疾患において存在比は 5%以上であったが、その活動性はいずれの疾患でも低かった(16S rRNA / 16S rDNA 比: 約 0.6)。細菌の存在量および活動性に関しスピアマンの順位相関係数を計算したが、細菌の存在量と活動性の間には有意な正の相関を認めなかった。上記活動性の高いコア・マイクロバイオーームのうち、20 菌種および 13 菌種はインプラント周囲炎および歯周炎でのみ選定されており、疾患の進行速度または治療効果の差異に生み出す要因になっている可能性が示唆された。

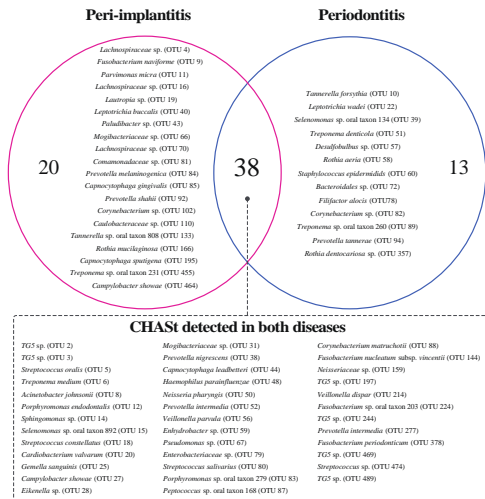


Fig. 2

次に、解析ソフトウェア PICRUST および HUMAnN を使用して予測されたメタゲノムから両疾患の細菌叢の機能組成を解析した。その結果、インプラント周囲炎および歯周炎の細菌叢から KEGG orthology で 145 のオーソログが検出され、両疾患で機能組成は類似していることが明らかとなり、ANOSIM の値 ( $R=0.1029$ ,  $p=0.069$ ) から類似性が示された。同一疾患のサンプル間で細菌種の組成比が異なるにも関わらず機能組成が類似していることから、口腔環境の変化等によって細菌種組成が変化しても細菌叢全体の機能は維持できる頑強性を両疾患の細菌叢が保有する可能性があると考えられる。一方で、活動性の高い群と低い群とで機能を比較すると、両群で保有する機能が異なることが PCoA から示された。そこで、各疾患で活動性の高いコア・マイクロバイオーム群に着目し、保有する機能を比較した。その結果、Bacterial chemotaxis と Flagellar assembly に関与する機能遺伝子が歯周炎において有意に発現されていることが示された。上記機能は細菌の可動性または定着に関与する機能であり、歯科インプラントおよび歯根の形態的複雑さの違いから発現量の差が生じている可能性があると考えられる。

さらに、活動性の高い細菌種同士の共起関係を解析した。その結果、両疾患で共起パタ

ーンに明らかな違いはなく、両疾患とも同一の門に属する細菌種は正の相関を有する傾向があった。この傾向は、特に Firmicutes 門および Synergistetes 門で顕著であった。インプラント周囲炎では *TE5* sp. 同士が最も強い相関を示し、歯周炎では *Streptococcus salivarius* と *Streptococcus* sp. が最も強い相関を示した。また、歯周炎群では、Red complex に属し、当該疾患の進行に大きく関与すると報告されている *Tannerella forsythia* と *Treponema denticola* とは有意に正の相関をしていなかった。

さらに、有意に強い正の相関を示す細菌種同士が構築する共起ネットワークの解析を行った。その結果、インプラント周囲炎からは4つ、歯周炎からは5つの共起サブネットワークが抽出された。インプラント周囲炎では、主要なサブネットワークは8個のノードから構成され、クラスタリング係数は 0.358 であった。一方で、歯周炎の主要なサブネットワークは 16 個のノードで構成され、クラスタリング係数は 0.573 であり、インプラント周囲炎の主要なサブネットワークに比べてより複雑な構造を有することが明らかになった。インプラント周囲炎の主要なサブネットワークでは、*Capnocytophaga gingivalis* がネットワークのハブとなっており、*C. gingivalis* を除去するとサブネットワークは構造が維持できないことが示唆された。歯周炎では、*T. forsythia* および *T. denticola* が、有意な共起関係を有していないにもかかわらず同一の主要なサブネットワークに存在していることが明らかになった。*T. forsythia* と *T. denticola* とが同一の共起ネットワークに存在するためには、*Treponema* sp. oral taxon 260, *Campylobacter showae*, *TE5* sp. または *Desulfobulbus* sp. が媒介として存在する必要がある可能性が示唆された。このような共起ネットワークの構造の違いが、両疾患の病態の差を生み出している可

能性が示された。

本研究では、細菌叢が異なる細菌種組成を有するにも関わらず、類似した機能を維持する頑強性の可能性が示唆された。また、細菌の活動性に注目することで、高い活動性を持つ細菌群の違い、それらが形成する共起ネットワークの構造の差異が明らかとなった。このような差異がインプラント周囲炎および歯周炎の進行速度や治療効果の違いに寄与していると考えられる。本解析の手法および結果と、メタゲノム、メタトランスクリプトーム解析から得られるビッグデータを併せて解析していくことで、インプラント周囲炎だけでなく、顎骨骨髓炎を含む口腔内複合感染症の病態解明に役立つことが期待される。

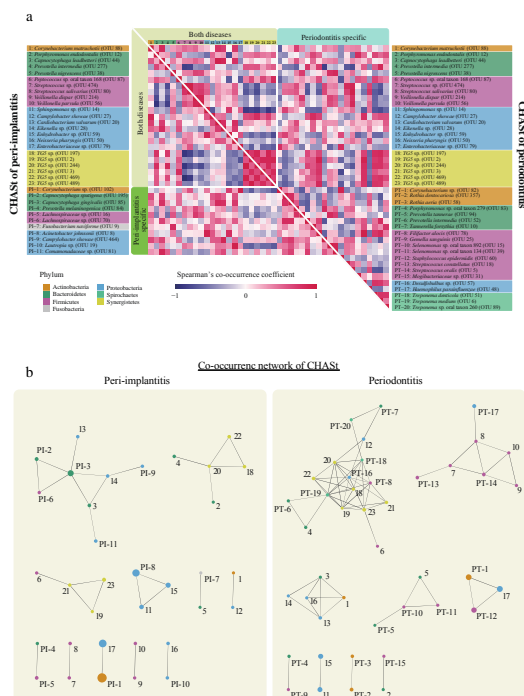


Fig. 3

## 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 1 件)

Kachi H, Maruyama N, \*Maruyama F, Shiba T, Watanabe T, Goda A, Murase K, Michi Y, Takeuchi Y, Izumi Y, Yamaguchi S, Nakagawa I. Active Microbiota Show Specific Correlations in Peri-implantitis and Periodontitis, 口腔病学会雑誌、査読有、84 巻 1 号、2017、25-36.  
<https://mol.medicalonline.jp/archive/search?jo=ee3kouku&vo=84&nu=1>

〔学会発表〕(計 4 件)

加地博一、細菌性複合感染症の慢性化を惹起する機能因子の解明、第 88 回細菌学会、2015

加地博一、複合感染症恒常性をもたらす Keystone functions と microbial dark matter、第 8 回細菌学若手コロッセウム、2014

加地博一、細菌性複合感染症のフラジリティ解明を目指したマトリックス解析、第 56 回歯科基礎医学会学術大会・総会、2014

加地博一、細菌叢に安定性をもたらすキーストーン機能、第 3 回マトリョーシカ型生物学研究会、2014

〔図書〕(計 0 件)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

道 泰之 (MACHI, Yasuyuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：70376755

### (2) 研究分担者

中川 一路 (NAKAGAWA, Ichiro)

京都大学医学研究科・  
微生物感染症学・教授  
研究者番号：70294113

丸山 史人 (MARUYAMA, Fumito)

京都大学医学研究科・  
微生物感染症学・教授  
研究者番号：30423122

### (3) 研究協力者

加地 博一 (KACHI, Hirokazu)