

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463129

研究課題名(和文)インプラント周囲疾患細菌叢の機能解析と新たな治療方略策定への展開

研究課題名(英文)Functional analysis of microbiota associated with peri-implantitis and design the new treatment strategy

研究代表者

竹内 康雄 (Takeuchi, Yasuo)

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：60396968

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)：インプラント周囲炎と歯周炎部位において、メタトランスクリプトーム解析により両疾患に関連する細菌種や機能遺伝子発現について比較した。16S rRNAを基にしたインプラント周囲炎と歯周炎の細菌組成には類似性が認められなかったものの、mRNAをもとにした機能遺伝子組成には類似性が認められた。病原性因子組成についても両疾患で類似性が認められ、これは健康部位の組成とは明らかに異なっていた。またmRNAの発現のデータをもとに由来細菌種の共起関係を調べネットワーク解析を行った結果、その特徴は両疾患で異なっていた。両疾患における細菌学的特徴は一部の共通性とともに明らかに異なる部分が存在していた。

研究成果の概要(英文)：Metatranscriptomic analyses were performed to compare microbial species and functional genes in situ between peri-implantitis and periodontitis. Although the two diseases differed in terms of 16S rRNA-based taxonomic profiles, they showed similarities with respect to functional genes and taxonomic and virulence factor mRNA profiles. The latter, that was defined as microbial virulence types, differed from those of healthy periodontal sites. Networks based on co-occurrence relationships of taxonomic mRNA abundance (co-occurrence networks) were dissimilar between the two diseases. Peri-implantitis and periodontitis have shared as well as distinct microbiological characteristics.

研究分野：歯周病学

キーワード：インプラント周囲炎 歯周炎 歯周病原細菌 トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

インプラント周囲炎は、歯科インプラント埋入患者の 28~77.4%で認められるトラブル (Zitzmann, 2008) であり、オッセオインテグレーションを獲得した後のインプラント周囲組織に炎症性の破壊が生じるものである。本疾患は歯周炎と類似した病態をとることが知られているものの、その進行は歯周炎と比較して早く、また歯周治療に準じた治療法では治療効果が限定的であることが報告されている。インプラント周囲炎と歯周炎を引き起こす主因となるのは共に細菌学的因子であるが、両疾患で原因細菌種が同じなのか否かについては未だ議論が続いている。申請者らが以前行った研究では、インプラント周囲炎で認められる細菌叢は歯周炎で認められるそれと異なり、またインプラント周囲炎における既知の歯周病原細菌の検出率は必ずしも高くなかった (Koyanagi, Takeuchi et al. 2010)。インプラント周囲炎に対する治療法はいまだ確立されていない。本疾患を複合菌感染症ととらえ、その病原因子である細菌叢の特徴を明らかにすることは、予防法や治療法を考える上で助けとなり、意義のあることと考えられた。

2. 研究の目的

インプラント周囲疾患に関連する細菌叢について、次世代シーケンサーを用いた分子生物学的手法により、組成だけでなくその機能を調べ、バイオフィルムとして病原性がどの様に発揮されているかを考察する。またインプラント周囲疾患に関わる細菌・機能遺伝子を選定することで、細菌学的データに基づく新たな診断法の開発にむけて、その基盤となる研究を行う。

3. 研究の方法

(1) サンプル採取および処理

被験者は同一口腔内にインプラント周囲炎罹患部位、歯周炎罹患部位を有する者12名 (平均 64.5歳) とした。採取予定部位において、臨床的評価 [歯周ポケット深さ (PPD)、プロービング時の出血 (BOP)、排膿 (SUP)] およびデンタルエックス線写真による骨吸収状態の評価を行った。インプラント周囲炎は PPD が 4mm 以上で、BOP もしくは SUP を伴い、エックス線写真上で 1 スレッド以上の骨吸収が確認されるものとした。歯周炎は PPD が 4 mm 以上・BOP あり・エックス線写真上で骨吸収が確認されるものとした。

サンプル採取部位の歯肉縁上プラークはキュレットスケーラーと綿球により注意深く取り除いた。その後、ペーパーポイント 10本をポケット最深部まで挿入し、30秒静置したものを回収することで歯肉縁下プラークサンプルを採取した。ペーパーポイントを

緩衝液に入れ、攪拌して懸濁液を作製した後、市販のキットを用いて RNA を抽出した。polyA 付加後、cDNA 合成をおこなった。その後、ライブラリー調整を行い、次世代シーケンサー (illumina Miseq) を用いて塩基配列を取得後、プライマー、アダプター、低いクオリティの配列、真核生物由来のリードの除去を行った。

(2) インプラント周囲炎構成細菌種の検討
EMIRGE pipeline を用いて 16S rRNA の配列抽出後、再構築をおこなった。その後、Human Oral Microbiome Database (HOMD) に対し BLASTN で塩基配列類似性検索を行い、種レベルでのアサイメントをおこなった。各サンプルの多様性は、dendrogram-heatmap と主座標分析により視覚化し、評価した。

(3) インプラント周囲炎細菌叢の機能解析
および細菌由来病原性因子に着目した細菌種組成の検討

MG-RAST pipeline を用いて mRNA 配列を SEED subsystems と Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) database に対して BLAT でアノテーションし、機能遺伝子組成や代謝パスウェイの解析を行った。また各機能遺伝子だけでなく、機能遺伝子の由来細菌種の解析を行うため、NCBI nr (病原性因子に関しては加えて VFDB と MvirDB) に対し BLASTX を用いてアノテーションし、機能遺伝子組成、またそれらの由来細菌種の同定、また病原性因子の解析を行った。dendrogram-heatmap と主座標分析による解析は 16S rRNA と同様に行った。

(4) インプラント周囲炎細菌叢のネットワーク構造解析

16S rRNA と mRNA の細菌種比較のため、各リード数を RPKM にて補正をおこなった。その後、16S rRNA と mRNA の両方で検出された細菌は、スピアマンの順位相関係数で 16S rRNA と mRNA のリード数を比較した。主座標分析は 1 とスピアマンの順位相関係数の差分を距離として視覚化した。mRNA のリード数の相対量が 0.1% 以下の細菌種は除外し、SparCC を用いて共起関係を調べ、ネットワーク解析を Cytoscape にて行った。

4. 研究成果

(1) インプラント周囲炎構成細菌種の検討
細菌検査には様々な手法があるが、近年では細菌由来の DNA を基にその種を同定する手法が主流である。この場合、既に死んでしまっている菌を含めて検出する可能性が高く、その結果がサンプルの保管や処理の状態などに影響を受けやすいと推測された。また、実際の細菌叢全体の活動性を必ずしも正確に把握できない可能性も否定できなかった。そ

ここで本研究では細菌の RNA を用いてメタトランスクリプトーム解析を行うこととした。RNA は DNA と比較し分解されやすい特徴を持つが、それゆえ今ある炎症状態に対する細菌叢を反映すると考えたからである。

サンプルを採取したインプラント周囲炎部位と歯周炎部位では、PPD、CAL、骨吸収程度といった臨床的パラメーター値に差は認められなかった。

構成細菌種の検索に、前処置後の 25,681,189 本の配列 (平均 1,070,050 本) を用いた。その結果、インプラント周囲炎群からは 150 菌種、歯周炎群からは 164 菌種が検出された。両群における種多様性について Shannon 指数、operational taxonomic units (OUT) 数を基に比較したところ、両群間で構成細菌種の豊富さや均等性に差は認められなかった。しかし主座標分析ではクラスターは両疾患でそれぞれに分けられ、細菌叢の組成が明確に異なることが示唆された。われわれは細菌 DNA を用いた細菌叢解析も行い、Core となる細菌種が異なる事を見出してはいたが (Maruyama et al. 2014)、細菌 RNA を用いて検索したことでその違いがより明らかとなった。

(2) インプラント周囲炎細菌叢の機能解析
次に mRNA 配列を用い細菌叢の機能組成解析を行い、両疾患における細菌叢間の違いをより詳細に把握することを試みた。SEED subsystems の結果から、インプラント周囲炎では 2,461 個、歯周炎では 2,379 個の機能遺伝子が検出された。両疾患で共通の機能遺伝子は 2,006 個あり、両群で有意差のある機能遺伝子の発現は認められなかった。Level-1 SEED subsystems のカテゴリーで比較したところ、炭水化物やタンパク質の合成・分解をコードする機能遺伝子が両疾患で主に見つかるなど、その組成の類似性が確認された。KEGG を用いた結果でも同様の結果が得られた。すなわち、インプラント周囲炎では 1,380 個、歯周炎では 1,291 個の機能遺伝子が検出されたが、そのうち 1,134 個は両群で共通しており、両疾患に認められる細菌叢の代謝パスウェイはその大部分が一致していた。

さらに、NCBI non-redundant protein database (NCBI nr) を用いた機能遺伝子の検索を行うとともに、これら遺伝子の由来細菌種の同定を試みた。NCBI nr では合計で 30,923 個の機能遺伝子 (インプラント周囲炎で 22,613 個、歯周炎で 21,187 個) が検出され、またこれら遺伝子の由来細菌種はインプラント周囲炎で 2,936 菌種、歯周炎では 2,820 菌種であることがわかった。ここでも両群間で各機能遺伝子の発現に有意差は検出されず、主座標分析からも両疾患で細菌叢の機能遺伝子組成が類似していることが示された。

(3) 細菌由来病原性因子に着目した細菌種組成

両疾患にみられる病原性因子に着目し、それらの組成を microbial virulence (MV) type と定義した上で、インプラント周囲炎と歯周炎、また健常部位が MV type により区別できるか否かを検討した。本解析のために Virulence Factors Database (VFDB) および MvirDB を用いた。病原性因子は VFDB の結果ではインプラント周囲炎で 1,579 個、歯周炎では 1,537 個、MvirDB の結果ではインプラント周囲炎では 2722 個、歯周炎では 2622 個が検出された。両群間で有意差のある病原性因子の発現は認められず、主座標分析からも両群での MV type の類似が示された。一方、Duran pinedo (2014) らの報告にあった、歯周疾患の認められない健常部位のデータを用いて、今回の我々のインプラント周囲炎および歯周炎部位との比較を行ったところ、健常部位とインプラント周囲炎および歯周炎部位では、MV type が明らかに異なることが確認された。以上のことから、インプラント周囲炎と歯周炎における細菌叢を構成する種は異なっているものの、それらがバイオフィームとして果たしている機能は両疾患で似ていることが明らかとなった。われわれは、この機能組成の類似性が、インプラント周囲炎と歯周炎で類似した臨床症状を呈する理由である、と推察している。

また、16S rRNA 配列と mRNA 配列から得られた細菌種組成をインプラント周囲炎と歯周炎で比較したところ、両疾患でともに 16S rRNA 配列と mRNA 配列から得られた細菌種組成は大きく異なっていた。16S rRNA と mRNA の両方から検出された細菌種 (viable taxa with in situ function: VTiFs) は、インプラント周囲炎では 146 種、歯周炎では 133 種であった。16S rRNA のリード数に対し、mRNA のリード数が有意に多い (mRNA-to-rRNA ratio が高い) 菌は (active taxa)、インプラント周囲炎では 93 種、歯周炎では 70 種存在し、その中で、mRNA-to-rRNA ratio が 7 以上の菌種はインプラント周囲炎では *Slackia exigua*, *Eubacterium saphenum*、歯周炎では *Porphyromonas* sp., *Prevotella oralis*, *Campylobacter concisus*, *Treponema soerensii*, *Veillonella* sp. であった。これらの細菌は、各細菌叢の中でより活動的に働いている細菌と推測することができ、細菌叢内において "Keystone" の役割を果たしている可能性もあると考えられる。

(4) インプラント周囲炎細菌叢のネットワーク構造解析

ネットワーク解析は、細菌種間の相互関係を把握するに適していると考えられる。各細菌はバイオフィームの中で微妙なバランスの基にネットワーク構造を構成し共存しており、お互いに影響し合っていると推測される。そこでわれわれも、VTiFs の mRNA リード数をもとに細菌種間の相関解析をおこない、

強い正の相関を示した細菌種間に絞り、共起ネットワーク解析をおこなった。その結果、主要なネットワーク構造はインプラント周囲炎では1つ、歯周炎では2つ認められた。インプラント周囲炎ではノード数は79、平均結合次数は1.75、クラスター係数は0.221、一方で歯周炎はそれぞれ71、1.21、0.165であった。ネットワーク構造内において、インプラント周囲炎では歯周病原細菌として知られている Red complex の3菌種 (*Porphyromonas gingivalis*、*Treponema denticola*、*Tannerella forsythia*) がそれぞれ相関を示していたが、歯周炎では *P. gingivalis* と *T. denticola* のみ相関を示すなど、構造の違いが認められた。またネットワーク構造内は active taxa で主に構成されていた。有意に正の相関を細菌種間で認めたほとんどのノードは active taxa であり、これらの細菌種は interacting core taxa と考えられた。interacting core taxa はインプラント周囲炎では23種、歯周炎では10種が見出された。これらのうち両群で共通した菌種は3種のみであり、この差が両疾患の治療効果に差を生じさせている可能性が示唆された。今後、これらネットワークに改変を与えるとといった視点から新たな治療法の開発につなげることができればと考えている。

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 4件)

- ① Kachi H, Maruyama N, Maruyama F, Shiba T, Watanabe T, Goda A, Murase K, Michi Y, Takeuchi Y, Izumi Y, Harada K, Nakagawa I, Active microbiota show specific correlations in peri-implantitis and periodontitis, 口病誌, 査読有, Vol. 84, No. 1, 2017, pp. 25-36, <http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=ee3kouku/2017/008401/004&name=0025-0036u&UserID=202.242.187.101>
 - ② 竹内 康雄,インプラント周囲炎に関連する全身的リスクファクター、日口腔インプラント誌,査読有,Vol. 29,No. 4,2016, pp. 219-225
DOI: 10.11237/jsoi.29.219
 - ③ Shiba T, Watanabe T, Kachi H, Koyanagi T, Maruyama N, Murase K, Takeuchi Y, Maruyama F, Izumi Y, Nakagawa I, Distinct interacting core taxa in co-occurrence networks enable discrimination of polymicrobial oral diseases with similar symptoms , Scientific reports, 査読有, Vol. 6, 2016, pp. 30997
DOI: 10.1038/srep30997
 - ④ Maruyama N, Maruyama F, Takeuchi Y, Aikawa C, Izumi Y, Nakagawa I, Intraindividual variation in core microbiota in peri-implantitis and periodontitis, Scientific reports, 査読有, Vol. 4, 2016, pp. 6602
DOI: 10.1038/srep06602
- [学会発表] (計 8件)
- ①渡辺孝康、芝 多佳彦、加地博一、村瀬一典、竹内康雄、丸山史人、和泉雄一、中川一路、細菌叢遺伝子発現解析によるインプラント周囲炎および歯周炎の疾患特異的な細菌ネットワーク、第90回日本細菌学会総会、平成29年3月19日、仙台国際センター展示棟(宮城県・仙台市)
 - ②Shiba T, Watanabe T, Koyanagi T, Maruyama N, Takeuchi Y, Maruyama F, Izumi Y, Functional keystone species enable discrimination of peri-implantitis and periodontitis, The 102nd Annual Meeting of the American Academy of Periodontology, 平成28年9月10日, San Diego (USA)
 - ③渡辺孝康、芝 多佳彦、加地博一、竹内康雄、丸山史人、和泉雄一、中川一路、インプラント周囲炎と歯周炎における細菌叢メタトランスクリプトーム解析、第58回歯科基礎医学会学術大会、平成28年8月25日、札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)
 - ④芝 多佳彦、渡辺孝康、小柳達郎、丸山緑子、竹内康雄、丸山史人、中川一路、和泉雄一、類似した臨床症状を呈する複合感染症から紐解く恒常性維持機構、第59回日本歯周病学会春季学術大会、平成28年5月21日、宝山ホール(鹿児島県・鹿児島市)
 - ⑤Ikeda E, Takeuchi Y, Suda W, Ikeda Y, Nakasato A, Hattori M, Izumi Y, Pyrosequencing analysis of subgingival microbiota in chronic periodontitis, 45th Annual Meeting and Exhibition of the American Association for Dental Research, 平成28年3月18日, Los angeles (USA)
 - ⑥竹内康雄、インプラント周囲炎に関わる全身のリスクファクターとは、第45回日本口腔インプラント学会学術大会、平成27年9月23日、岡山シティーミュージアム(岡山県・岡山市)
 - ⑦Shiba T, Watanabe T, Maruyama F, Takeuchi Y, Koyanagi T, Maruyama N, Nakagawa I,

Izumi Y, Inconsistency between abundance of 16S rRNA and mRNA in bacterial community of periodontitis and peri-implantitis, Europerio 8、平成 27 年 6 月 3 日、London (UK)

- ⑧ Maruyama N、Goda A、Takeuchi Y、Shiba T、Koyanagi T、Izumi Y、Maruyama F、Nakagawa I、Bacterial activity in peri-implantitis and periodontitis、Europerio 8、平成 27 年 6 月 3 日、London (UK)

[その他]

プレスリリース「インプラント周囲炎の原因となる細菌群集構造を解明」

http://www.tmd.ac.jp/archive-tmd/kouhou/20160817_1.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹内 康雄 (TAKEUCHI Yasuo)
東京医科歯科大学・医歯（薬）学総合研究科・助教
研究者番号：60396968

(2) 研究分担者

丸山 史人 (MARUYAMA Fumito)
京都大学・医学（系）研究科（研究院）・准教授
研究者番号：30423122

片桐 さやか (KATAGIRI Sayaka)
東京医科歯科大学・医歯（薬）学総合研究科・助教
研究者番号：60510352

(3) 連携研究者

小柳 達郎 (KOYANAGI Tatsuro)
東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：70632173

(4) 研究協力者

丸山 緑子 (MARUYAMA Noriko)
東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

芝 多佳彦 (SHIBA Takahiko)
東京医科歯科大学大学院・医歯（薬）学総合研究科・大学院生