

令和元年6月12日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06662

研究課題名(和文)ホロゲノム解析から紐解く難治性複合感染症としての歯周炎とインプラント周囲炎

研究課題名(英文)Hologenome analyses of microbiota in periodontitis and peri-implantitis

研究代表者

芝 多佳彦 (Shiba, Takhiko)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・特任助教

研究者番号：90802306

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：同一口腔内のインプラント周囲炎、歯周炎罹患部位からプラークを採取し、細菌由来のゲノム情報を網羅的に解析し、臨床症状が類似する歯周炎とインプラント周囲炎の細菌叢解析結果を比較することで、両疾患の原因の解明をおこなった。罹患部位より採取したサンプルからDNAを抽出し、全ゲノム情報の解析を目的にメタゲノム解析、細菌種の特定を目的にメタ16S rDNAをおこない、それらの結果を統合しネットワーク解析をおこなった。類似する両疾患において細菌叢を構成する細菌種は類似していたが、ネットワーク構造の中心をなす細菌種、また細菌叢の保有する機能組成も両疾患で異なることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インプラント周囲炎は歯周炎と類似した臨床症状を呈するが、インプラント周囲炎は歯周炎に比べ罹患率が高い。加えて、歯周炎では有効な治療効果が得られた方法を駆使しても必ずしも良好な結果が得られないことが報告されている。歯周炎は様々な全身疾患との関連が考えられており、インプラント周囲炎に關与する細菌もまた全身の健康に影響を与えると推測される。本研究により疾患特異的な代謝状態、具体的な病原細菌叢の持つ機能を評価し、治療の標的となる細菌種、機能遺伝子を特定し新規予防・治療法の開発を行う。インプラント周囲炎原因の究明と新規治療法開発は喫緊の課題であり、本研究は国民の今後のQOL向上に寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Plaque samples were obtained from the site of peri-implantitis and periodontitis in the same oral cavity. Genomic information of the bacteria from the sites was comprehensively analyzed. These analysis results were compared and we clarified the causes of difference between the two diseases.

DNA was extracted from the samples. Metagenomic analysis was performed to analyze whole genome information and meta 16S rDNA analysis was performed to specify the bacterial species. The results were integrated and the network analysis was performed.

The profiles of bacterial species were similar in the two diseases. However, the core network structures, the bacterial species that form the core network structure, and the functional composition of the microbiome were different in both diseases.

研究分野：歯周病学

キーワード：歯周炎 インプラント周囲炎 メタゲノム解析 次世代シーケンサー ネットワーク解析 複合感染症  
Dysbiosis

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ヒトの感染症の約 8 割が特定の菌種が原因となる単一感染症ではなく、複数の細菌種や微生物が関与する複合感染症であると考えられている。歯周炎はプラーク中の複数の細菌により引き起こされる、口腔を代表する複合感染症といえることができる [Ref. 1]。歯科インプラント治療は歯を失った部位に行う治療方法として、現在広く用いられている。一方でインプラント周囲にも歯周病と類似した炎症性の組織破壊が生じることが知られている [Ref. 2]。歯周炎に関与する細菌群は糖尿病、循環器疾患、早産といった全身疾患の発症や重症化に密接な関連があると考えられており、インプラント周囲に関与する細菌もまた全身の健康に影響を与えると推測される。インプラント周囲疾患の罹患率はインプラント治療患者の約 80%と高く、疾患の原因究明と新規治療法の開発は喫緊の課題である。細菌学的視点では、両疾患で類似した細菌種が認められるという報告 [Ref. 3] がある一方で、インプラント周囲炎には特有の細菌種が関与するという報告もあり [Ref. 4]、未だ共通の見解が得られていない (図 1)。

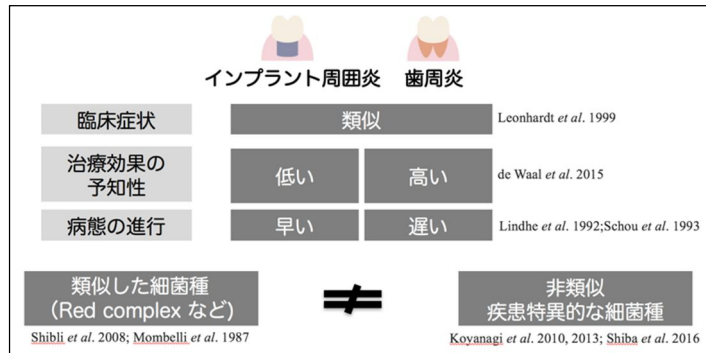


図 1: インプラント周囲炎と歯周炎の比較

2. 研究の目的

歯周炎とインプラント周囲炎は類似した臨床症状を呈する複合感染症とされている。インプラント周囲炎では歯周炎と同様の治療をおこなっても十分な治療効果が得られないことが知られている。それらの主な原因として、対象としている疾患が未培養な細菌も含めた複数の細菌が関与していること、加えてそれらの細菌が複雑に相互作用しているため、病原性の高い細菌叢に変化させる原因細菌種の同定に至っていないからと考えられる。私たちはこれまでに、次世代シーケンサーを用いて両疾患の細菌叢を網羅的に解析し、それぞれの疾患で活動性の高い細菌種が異なること、またそれらの共起関係が異なる可能性を報告した。本研究ではこれまでの研究を発展させ、臨床データと細菌叢との相関、治療介入前後での時系列なメタゲノム解析に加え、宿主—微生物全体を共生体として扱う“ホロバイオーム”の観点およびその総合的な解析により、両疾患における疾患関連因子の因果関係を明らかにし、新規診断・予防・治療法の足掛かりとする (図 2)。

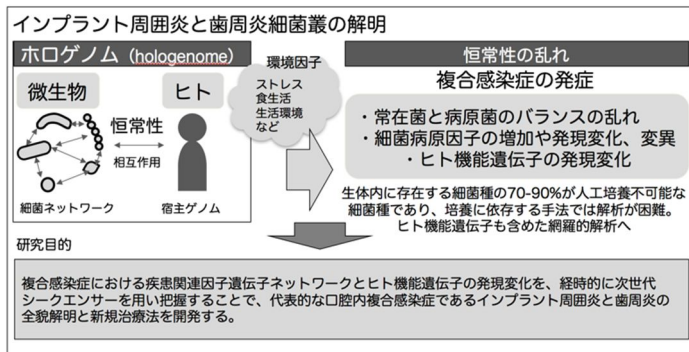
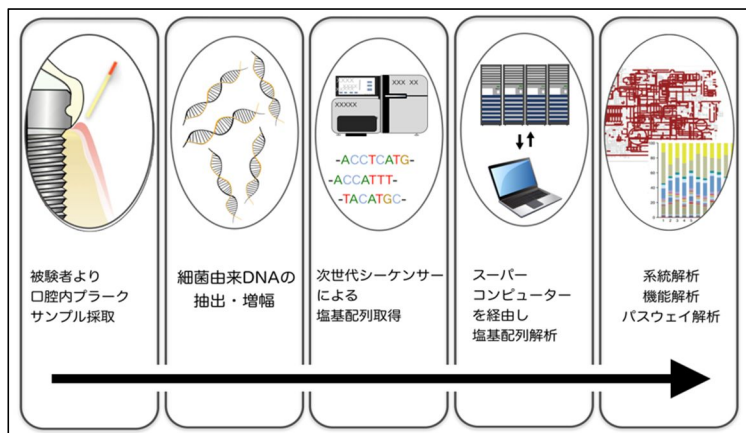


図 2: 研究の目的

3. 研究の方法

本研究は東京医科歯科大学歯周病外来に来院中の患者で、同意を得られた者のインプラント周囲炎、歯周炎部位 (同一口腔内に存在) を対象に行う。サンプル採取は滅菌されたペーパーポイントを疾患部位の歯肉溝に挿入し、周囲に付着したプラークを採取する。また、その患者の全身疾患の有無や臨床症状など様々な情報をメタデータとして同時に取得する。得られたサンプルから DNA を抽出・精製する。次世代シーケンサーを用いて解析に必要なデータを取得し、細菌叢と機能遺伝子 (細菌・ヒト) の情報基盤構築を目的にバイオインフォマティクス的手法によりデータ解析を行う。(図 3)。これらの解析によって得られたゲノム情報をデータベースに相同性検索をおこなうことで、環境中に存在する菌種の同定と機能遺伝子を調べる。そこから得られた情報を、遺伝子ネットワーク解析を用いて検討、各群に共通して存在する細菌種およびその特徴を



明らかにし、疾患関連細菌叢デ

図 3: 研究の流れ

データベースの作成・強化をおこなう。

#### 4. 研究成果

インプラント周囲炎、歯周炎の両疾患に罹患した被験者 23 名を対象とし、疾患罹患部位からプラークサンプルを採取し、歯周組織検査(歯周及びインプラント周囲ポケットの深さ、歯肉からの出血、X 線上での骨吸収度の測定)をおこなった。プラークサンプルから細菌由来の DNA を抽出後、次世代シーケンサーを用いてその塩基配列情報を取得した。塩基配列を既存のデータベースと照合することで、疾患環境中に存在する

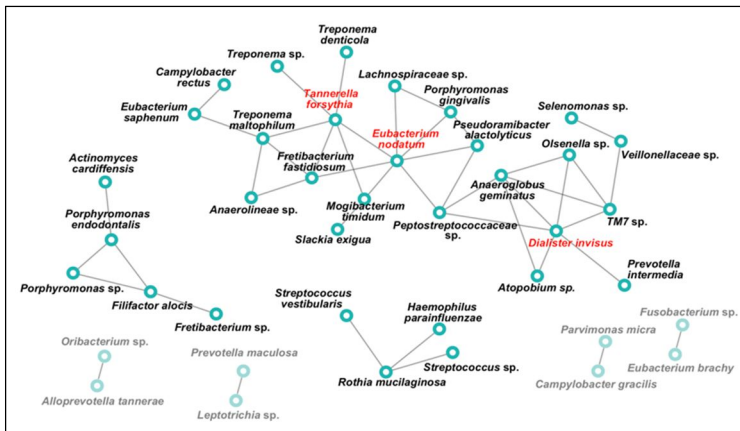


図 4 : インプラント周囲炎の細菌ネットワーク

細菌種と機能遺伝子、病原因子を同定した。

両疾患に存在する細菌種は共通するものが多く、疾患特異的な細菌種はわずかであり、統計学的に有意な差を認める細菌種は存在しなかった。

歯周病原細菌とされる Red complex(*P. gingivalis*、*T. denticola*、*T. forsythia*)は両疾患に共通して認められたが、歯周炎群でより高い割合で認められる結果となった。インプラント周囲炎と歯周炎の細菌叢を構成する細菌種に違いは認められなかったもの、細菌叢の保有する機能組成は異なることが明らかとなった。

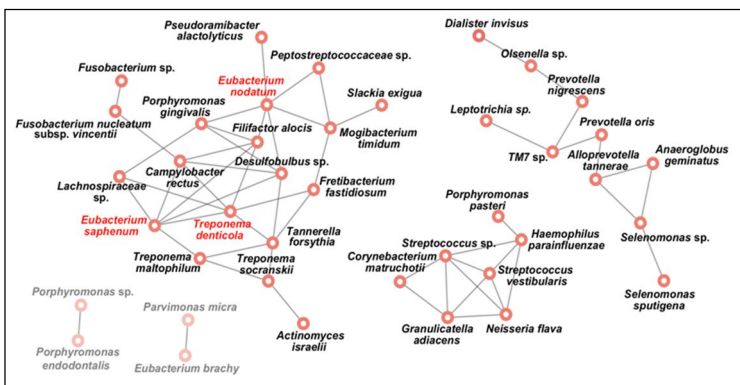


図 5 : 歯周炎の細菌ネットワーク

また、細菌間のネットワーク構造を解析したところ、歯周炎と比較してインプラント周囲炎の方がネットワーク構造の凝集性を示すクラスター係数が高く、ネットワーク構造が複雑であることが示された。ネットワーク構造の中心に存在する細菌種は、両疾患で異なることから疾患の中核を担う細菌種はインプラント周囲炎と歯周炎で異なることが明らかとなった(図 4,5)。

<引用文献>

1 Sakamoto et al. J Med Microbiol. 53(Pt 6), 563-71 (2014), 2 Lang et al. Clin Oral Implants Res. 3(1), 9-16 (1992), 3 Shibli et al. Clin. Oral. Implants. Res. 19, 975-82 (2008), 4 Salvi et al. Clin. Oral. Implants. Res. 19, 242-8 (2008)

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Ikeda E, Shiba T, Ikeda Y, Suda W, Nakasato A, Takeuchi Y, Azuma M, Hattori M, Izumi Y. Deep sequencing reveals specific bacterial signatures in the subgingival microbiota of healthy subjects. Clinical oral investigations. Clinical oral investigations. 査読あり、23 巻、2019、1489-1493、10.1007/s00784-019-02805-3

Funahashi K, Shiba T, Watanabe T, Muramoto K, Takeuchi Y, Ogawa T, Izumi Y, Sekizaki T, Nakagawa I, Moriyama K. Functional dysbiosis within dental plaque microbiota in cleft lip and palate patients. Progress in Orthodontics. 査読あり、20 巻、2019、10.1186/s40510-019-0265-1.

Ohtsu A, Takeuchi Y, Katagiri S, Suda W, Maekawa S, Shiba T, Komazaki R, Udagawa S, Sasaki N, Hattori M, Izumi Y. Influence of Porphyromonas gingivalis in gut microbiota of streptozotocin-induced diabetic mice. ORAL DISEASES. 査読あり、25 巻、2019、868-880、10.1111/odi.13044

Sasaki N, Katagiri S, Komazaki R, Watanabe K, Maekawa S, Shiba T, Udagawa S, Takeuchi Y, Ohtsu A, Kohda T, Tohara H, Miyasaka N, Hirota T, Tamari M, Izumi Y. Endotoxemia by Porphyromonas gingivalis injection aggravates non-alcoholic fatty liver disease, disrupts glucose/lipid metabolism, and alters gut microbiota in mice. FRONTIERS IN MICROBIOLOGY. 査読あり、9 巻、2018、10.3389/fmicb.2018.02470

Udagawa S, Katagiri S, Maekawa S, Takeuchi Y, Komazaki R, Ohtsu A, Sasaki N, Shiba T, Watanabe

K, Ishihara K, Sato N, Miyasaka N, Izumi Y. Effect of Porphyromonas gingivalis infection in the placenta and umbilical cord in pregnant mice with low birth weight. Acta Odontol Scand. 査読あり、76巻、2018、433-441、10.1080/00016357.2018.1426876.

Komazaki R, Katagiri S, Takahashi H, Maekawa S, Shiba T, Takeuchi Y, Kitajima Y, Ohtsu A, Udagawa S, Sasaki N, Sato N, Miyasaka N, Eguchi Y, Anzai K, Izumi Y. Periodontal pathogenic bacteria, Aggregatibacter actinomycetemcomitans affect non-alcoholic fatty liver disease by altering gut microbiota and glucose metabolism. Scientific Reports. 7巻 13950、2017、0.1038/s41598-017-14260-9

〔学会発表〕(計 8件)

Naoki Sasaki, Sayaka Katagiri, Rina Komazaki, Kazuki Watanabe, Shogo Maekawa, Takahiko Shiba, Yasuo Takeuchi, Anri Ohtsu, Yuichi Izumi. Endotoxemia by Porphyromonas gingivalis injection aggravates non-alcoholic fatty liver disease, disrupts glucose/lipid metabolism, and alters gut microbiota in mice. 日本歯科保存学会 2018 年秋季学術大会. 2018

船橋健太, 渡辺孝康, 芝多佳彦, 村本慶子, 小川卓也, 森山啓司 口唇口蓋裂患者における口腔内細菌叢 細菌ネットワーク構造に関する検討. 第 77 回日本矯正歯科学会学術大会. 2018

船橋健太, 芝多佳彦, 村本慶子, 小川卓也, 竹内康雄, 和泉雄一, 中川一路, 森山啓司. 口唇口蓋裂患者におけるデンタルプラーク細菌叢の dysbiosis に関する検討. 第 83 回 口腔病学会学術大会. 2018

芝多佳彦, 竹内康雄, 片桐さやか, 駒津匡二, 小柳達郎, 根本昂, 青木章. オミックス解析による口腔内複合感染症の病因および病態機序の解明. 第 83 回 口腔病学会学術大会. 2018

Naoki Sasaki, Sayaka Katagiri, Shogo Maekawa, Takahiko Shiba, Yasuo Takeuchi, Anri Ohtsu, Yuichi Izumi. Endotoxemia by Porphyromonas gingivalis injection aggravates non-alcoholic fatty liver disease, disrupts glucose/lipid metabolism, and alters gut microbiota in mice. 第 83 回 口腔病学会学術大会. 2018

Shiba T, Takagi T, Koyanagi T, et al. The clinical application of the novel diagnosis and treatment flowchart for peri-implantitis: Part 1 clinical application to mild case. EuroPerio9. 2018

Taniguchi Y, Koyanagi T, Shiba T, Izumi Y, et al. The clinical application of the novel diagnosis and treatment flowchart for peri-implantitis: Part 3 clinical application on severe case. EuroPerio9. 2018

Koyanagi T, Taniguchi Y, Shiba T, Izumi Y, et al. The clinical application of a novel diagnosis and treatment flowchart for peri-implantitis: Part 2 - application to moderate cases. EuroPerio9. 2018

〔図書〕(計 5件)

Marisa Roncati (原著), 青木章, 竹内康雄, 芝多佳彦 他. 2018 クインテッセンス出版株式会社. インプラント周囲炎:非外科的アプローチ 歯科衛生士の力でここまでできる 非外科的歯周治療. 2018(254-313)

小方頼昌, 芝多佳彦, 若林健史 他. デンタルダイヤモンド社. インプラント周囲疾患 聞くに聞けない歯周病治療 100. 2018(116-118)

Paul A. Levi(原著), 木下淳博, 長澤敏行, 青木章, 芝多佳彦 他. 医歯薬出版株式会社. 歯肉炎・歯周炎の診断や基本治療における器具の使用法 和泉雄一, 木下淳博, 長澤敏行, 青木章. 歯科 医師・歯科衛生士のための Clinical Handbook 非外科治療による歯周病コントロール. 2018(116-139)

和泉雄一, 青木章, 芝多佳彦 他. 医学情報社. デイスバイオーシスが歯周病の原因 和泉雄一 歯周病と全身の健康 Q&A 補訂版. 2017(29)

飯田昌樹, 芝多佳彦, 渡部功一 他. 医歯薬出版株式会社. 自家歯牙移植・再植 岩永 譲 編者代表/伊原木聡一郎, 築山鉄平, 丸尾勝一郎. すべての歯科医師のための臨床解剖学に基づいた Comprehensive Dental Surgery. 2017(118-133)

〔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:

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：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等  
[http://reins.tmd.ac.jp/html/100011966\\_ja.html](http://reins.tmd.ac.jp/html/100011966_ja.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：  
ローマ字氏名：  
所属研究機関名：  
部局名：  
職名：  
研究者番号（8桁）：

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：竹内 康雄  
ローマ字氏名：TAKEUCHI yasuo

研究協力者氏名：渡辺 孝康  
ローマ字氏名：WATANABE takayasu

研究協力者氏名：小柳 達郎  
ローマ字氏名：KOYANAGI tatsuro

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。