

令和 4 年 6 月 22 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K11827

研究課題名(和文)顎骨骨髓炎細菌叢の保有する病原因子の解明と新規治療戦略の提案

研究課題名(英文)Elucidation of pathogenic factors possessed by bacterial flora of Osteomyelitis of the jaw, and proposal of novel therapeutic strategies.

研究代表者

道 泰之(Michi, Yasuyuki)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師

研究者番号：70376755

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：顎骨骨髓炎の病変において高い活動性を保有する細菌を特定するため、細菌のRNA:DNA比を解析した。骨試料からDNAとRNAを抽出し、16S rRNA遺伝子に基づく細菌組成を求めた。8つの門が優勢であったが、その構成は試料によって多様であった。また、属レベルでも多様な組成が観察された。ActinomycesとFusobacteriumのRNA:DNA比は、腐骨形成は認めないものの口腔内には露出していない病気において極めて高いことがわかった。これらの属はこれまで顎骨骨髓炎の主要な病原体として考えられてこなかったが、今回の結果は顎骨骨髓炎の病因にこれらの属が関与している可能性を示唆するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、複合感染症の一つである顎骨骨髓炎の病変に存在する細菌種を同定し、さらに病変で高い活動性を保有すると考えられる細菌種を絞り込むことで、骨髓炎の病態を悪化させる原因となり得る細菌種のリストを作成することができた。本解析手法では、難培養性細菌を含めた細菌の解析が可能となっている。細菌群が保有する機能遺伝子に関しては依然として予測までしかできないが、メタゲノム解析・メタトランスクリプトーム解析と比較して作業が簡便な点もあり、他の複合感染症の解析にも応用可能と考える。

研究成果の概要(英文)：The RNA:DNA ratio of bacteria was analyzed to identify bacteria possessing high activity in lesions of osteomyelitis of the jaw. DNA and RNA were extracted from bone samples and bacterial composition based on 16S rRNA genes was obtained. 8 phylum were predominant, but their composition varied from sample to sample. Diverse compositions were also observed at the genus level: the RNA:DNA ratios of Actinomyces and Fusobacterium were found to be extremely high in diseases that did not show osteogenesis but were not exposed to the oral cavity. Although these genera have not previously been considered as major pathogens of osteomyelitis of the jaw, our results suggest that they may be involved in the etiology of osteomyelitis of the jaw.

研究分野：複合感染症

キーワード：顎骨骨髓炎 複合感染症 細菌叢解析 メタ16S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、バイオフィーム形成を伴う複合感染症である (NIH, 1999)。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 700 種類を超える細菌種が共生しているが、その一部が口腔内における複合感染症を惹起すると考えられている。しかし、口腔内の細菌の 68% は難培養性細菌であると報告されており (Dewhirst et al, J Bacteriol., 2010)、培養を介した古典的な解析手法ではその構成細菌を網羅することすら困難である。顎骨骨髓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、その炎症は皮質骨・骨膜を含む骨全体に波及する。口腔衛生状態の向上・抗菌薬の発達により、軽症な症例の治療成績は向上しているものの、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。従来の治療に抵抗性を示して重症化する顎骨骨髓炎の発症機序・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。

2. 研究の目的

本研究は、口腔内における難治性複合感染症のひとつである顎骨骨髓炎に關与する細菌叢について、遺伝子情報から疾患発症および難治化に關与する機能遺伝子群を解析するとともに、疾患の鍵となる Keystone 種が形成する細菌ネットワークを解析することで、疾患特異的細菌ネットワークの破壊に基づく新規治療法の開発を情報学的に検討するものである。このことにより、抗菌薬の乱用による耐性菌の出現の予防および増大する医療費の抑制にも効果があると考えられる。

3. 研究の方法

本研究目的を達成するため、以下の項目について解析を行う。

1. メタゲノムデータによる細菌種の再評価
2. 上記微生物同士の共起関係 (相関) に基づく共起ネットワーク解析
3. 上記データをまとめた顎骨骨髓炎関連微生物データベースの構築

顎骨骨髓炎を呈する患者のうち、外科療法が適用となった患者を対象とし、顎骨骨髓炎の細菌叢検体を採取した。採取した検体は超低温フリーザーに保存し、全ての細菌の DNA、RNA を抽出できる試薬キットを使って抽出を行う。抽出した DNA、RNA をライブラリ調製した後、次世代高速シーケンサーにかけて塩基配列データを取得した。

再構築した 16S rDNA、16S rRNA 配列を用いて既出の顎骨骨髓炎コア・マイクロバイームを再評価した。さらには、細菌活動性指標 (16S rRNA/16S rDNA 比) から慢性期の病変において高い活動性を保有しているコア・マイクロバイームと強い共起関係を保有する細菌種をリストアップした。また、解析ソフト SparCC (Friedman et al, PLoS Biol, 2012) を用いて細菌種同士の共起関係を解析し、Cytoscape (Shannon et al, Genome Res., 2003) で共起ネットワークを作成、解析した。

4. 研究成果

慢性顎骨骨髓炎 (COMJ) は、顎骨の炎症で、硬化から腐骨形成へと進行する。我々はこれまで、骨硬化のみの病態を COMJ Stage I、口腔内に露出していない腐骨を伴う病態を COMJ Stage II、口腔内に露出した腐骨を伴う病態を COMJ Stage III として、新たに COMJ を分類した。Stage II の COMJ は細菌組成の多様性が低いことが示され、COMJ 発症の過渡期における微生物相の重要性が示唆された。しかし、COMJ における微生物相内の細菌活動については、ほとんど知られていない。本研究では、高い活性を持つ細菌を特定するために、COMJ における細菌の RNA : DNA 10 比を調査した。II 期の COMJ の骨試料 6 個 (I 期 1 個、III 期 1 個) から DNA と RNA を抽出し、16S rRNA 遺伝子に基づく細菌組成を求めた。8 つの系統が優勢であったが、その構成は試料によって多様であった。また、属レベルでも多様な組成が観察された。しかし、Stage I と III では、Stage II と同様に多様な組成が観察されたものの、活動性に着目するとこれらの細菌は活動性が低いことが示された。これらの属はこれまで COMJ の主要な病原体として考えられてこなかったが、本研究の結果、COMJ における腐骨の形成に関与する可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	中川 一路 (Nakagawa Ichiro) (70294113)	京都大学・医学研究科・教授 (14301)	

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