

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11981

研究課題名(和文) ネットワーク解析に基づく歯・インプラント周囲細菌叢の情報基盤構築と新規治療法開発

研究課題名(英文) Network analysis of tooth/implant microbiome and development of 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・講師

研究者番号：60396968

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)：インプラント周囲炎および歯周炎に関連するプラーク中の細菌ゲノム情報から菌叢を網羅的に調べ、両疾患に関連する細菌種や発現遺伝子の違いを調べた。歯周炎における細菌構成および機能組成は健康部位と比較して明らかに異なり、偏性嫌気性菌の割合の増加と共に短鎖脂肪酸やアルギニンやグルタミン酸などのアミノ酸代謝に係る遺伝子が特徴的に認められた。一方、歯周炎とインプラント周囲炎の比較では菌叢組成は類似しているものの、活動性の高い細菌種に違いが認められた。またインプラント周囲炎ではGAPDH関連遺伝子の発現が顕著であった。これらの特徴の違いが両疾患の病態の違いに反映されると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周炎やインプラント周囲炎の罹患率は高く、中高年以降の口腔トラブルの中でも高い割合を占めている。両疾患は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進行が早く、通常の歯周治療に準じた治療に対しては反応性が悪いことも報告されている。適切な口腔ケアや治療がなされずにこれらの疾患が放置されれば、咀嚼機能の低下だけでなく、全身の健康にも悪影響が及び患者のQOLが著しく低下することが懸念される。特にインプラント周囲炎についてはその原因究明と治療法確立は急務であり、本研究結果はこれに寄与するところは大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Differences in bacterial compositions and gene expressions in microbiome associated with periodontitis and peri-implantitis were investigated based on the comprehensive bacterial genomic analyses in dental plaques. The composition and function of the microbiome in periodontitis were different compared to those in healthy periodontium. The increase of obligate anaerobic bacteria and high abundance of genes related to the metabolism of short-chain fatty acids and amino acids (arginine and glutamic acid, etc.) were observed in periodontitis. The microbial composition was similar between periodontitis and peri-implantitis, while there were differences in highly active taxa and bacterial gene profiles of each disease. Interestingly, GAPDH-related genes significantly enriched in peri-implantitis. This dissimilarity of microbiome would cause a difference in the pathological conditions of two 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 複合菌感染症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周炎やインプラント周囲炎は炎症性の組織破壊により歯やインプラントの喪失を招くことで、患者の口腔機能を著しく低下させる要因となる。両疾患はともにプラークが主因となり発症し、臨床症状も非常に似ている。しかし、インプラント周囲炎は歯周炎と比較し疾患の進行が早く、治療に対する反応性が悪いことが報告されており、プラークを構成する細菌種について注目がされていた。申請者らは両疾患に関連する細菌叢の網羅的な解析を行い、それぞれの疾患において *P. gingivalis* に代表される既知の歯周病原菌だけでなく、病原性が注目されなかった複数種の菌がコア・マイクロバイオームを形成していることを報告した(文献①~③)。一方で、国内外で同様の研究解析を行った報告が少なく結果の比較検討ができないことから、サンプル数を増やし、得られた情報をより信頼性の高いものにするために解析を進める必要があった。

2. 研究の目的

次世代シーケンサーを用いて歯周炎とインプラント周囲炎における細菌叢の組成および機能を調べる。これに宿主・環境因子といった臨床データを加え、統合的な細菌ネットワーク解析を行う。ここで得られた情報から、両疾患の発症や進行の鍵となる菌種や病原性の原因を推測するとともに、細菌の代謝系やネットワーク構造の破壊手順に着目した治療のターゲットを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) サンプル採取および処理

歯周炎、インプラント周囲炎、健常歯の歯肉縁下プラークを解析対象とした。本研究では、歯周炎はポケット深さ(PPD)が4 mm以上・プロービング時の出血(BOP)あり・エックス線写真上で骨吸収が確認されるもの、インプラント周囲炎はPPDが4mm以上・BOPもしくは排膿(SUP)あり・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、健常歯はPPDが3mm以下・BOPおよびSUPなし・エックス線写真上で骨吸収が認められないものとした。サンプル採取部位にペーパーポイント10本を挿入し、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Saidらの方法(文献)または市販のDNA精製キットを用いてDNAを抽出、次世代シーケンサーを用いて塩基配列を取得した。

(2) 疾患関連細菌叢における組成検討

細菌組成は16S rRNA遺伝子領域をPCR法により増幅後、配列に対して複数のデータベース(Human Oral Microbiome Database、Ribosomal Database Project、CORE等)を用いて相同性検索を行い、種レベルまでの特定を行った(メタ16S解析)。これらのデータより各サンプルの多様性、細菌構成(Abundance比較)、細菌の共起関係に基づく細菌ネットワークの比較を行った。

(3) 疾患関連細菌叢の機能検討(メタゲノム・バーチャルメタゲノム解析)

細菌叢の持つ遺伝子機能組成は、mRNAの塩基配列を対象にMG-RASTを用いてSEED、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes(KEGG)の2つのデータベースに対して相同性検索を行うことで調べた。さらに細菌叢の持つ病原因子解析のために、MvirDBおよびvirulence factor database(VFDB)に対しても相同性検索を行なった。健常歯のサンプルについては、メタ16S解析の菌種データに基づき種および細菌叢全体のゲノム組成を予測、これをKEGG databaseにあてることによって細菌叢のもつ機能組成や代謝パスウェイの機能予測解析を行った。

(4) 疾患病原性のコアとなる細菌種・機能の予想

申請者らがこれまでに行った歯周炎およびインプラント周囲炎における細菌叢のメタトランスクリプトーム解析(文献)と本研究のメタゲノム解析の2つのデータから、菌叢の類似度および細菌ネットワークの比較を行った。またメタトランスクリプトーム解析とメタゲノム解析の両方で検出された細菌種を対象にRNA/DNAを算出し、各疾患における高活動種の特定を行った。KEGG、MvirDB、VFDBに基づく細菌叢の代謝パスウェイと病原因子についてもどの遺伝子がRNAおよびDNAで多く認められるかを調べた。

4. 研究成果

(1) 歯周炎とインプラント周囲炎の菌叢組成

メタ16S解析により得られた歯周炎部位と健常部位のデータを比較すると、両群においてOTU数に差はなく、種多様性を示すShannon indexやChao1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歯周炎と健常部でそれぞれに分けられ、菌叢組成が明確に異なっていた(図1A、B)。歯周炎部位では既知の歯周病原細菌である*P. gingivalis*や*T. forsythia*のほか、*P. endodontalis*、*F. alocis*といった細菌が有意に認められた(図2)。一方、歯周炎とインプラント周囲炎では主座標分析でその差異が認められず、菌叢組成が類似していた。

(2) 歯周炎とインプラント周囲炎細菌叢の機能解析

歯周炎と健常部では細菌叢の示す代謝機能にも差異が認められ、KEGGによる代謝パスウェイ

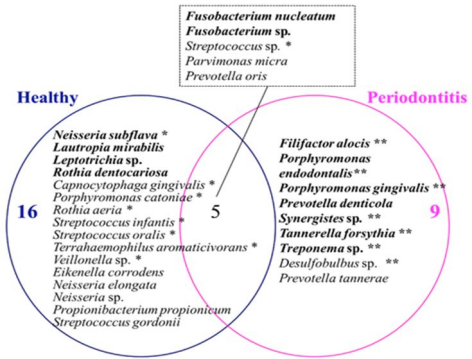
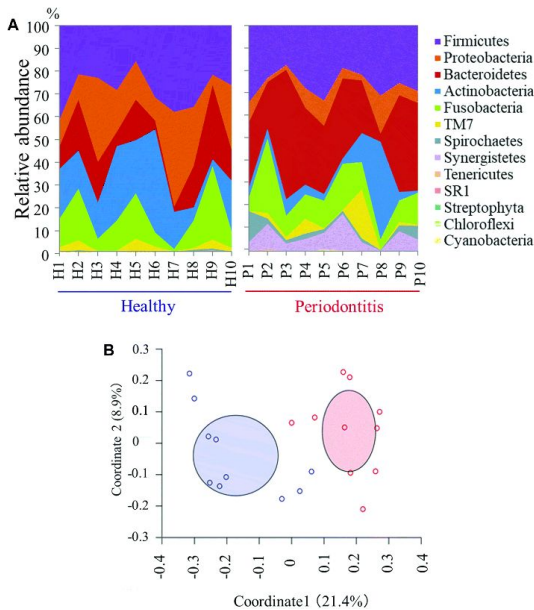


図1 健康部位と歯周炎部位における細菌叢組成（門レベル；左上図）。主座標分析により菌叢が異なることが示された（左図）。
 図2 健康部位と歯周炎部位において主となる細菌種。被験者の8割以上から相対量1%以上検出された細菌種から決定（上図）。

解析により、歯周炎では脂肪酸やアルギニンやグルタミン酸といったアミノ酸の代謝に係る遺伝子が多く認められた。これまでの報告で、口腔粘膜や唾液の脂肪酸は粘膜の保護に働くことが知られている。またアルギニンは T 細胞の増加および活性化といった免疫機能の活性化に関与すること、グルタミンは粘膜上皮細胞や免疫担当細胞のエネルギーとして利用され、粘膜における免疫機能と密接に係ることが知られている。病原性の高い細菌叢がこれら物質の代謝を促進させることで、宿主の恒常性維持に影響を与え、組織破壊を引き起こしている可能性が考えられた。一方、歯周炎とインプラント周囲炎を比較した場合には、両疾患で代謝パスウェイの大部分は一致していた。また MvirDB、VFDB に基づく病原因子組成に類似傾向があることが示された。

(3) 歯周炎とインプラント周囲炎の病原性に深く関わる細菌種および機能の検討
 メタ 16S・メタゲノム解析は菌叢の多様性を観測できるものの、細菌由来の DNA に基づいた解析であることから死菌の情報が混在する。この死菌の情報が正確な理解を妨げている可能性があると考えられたため、両疾患のメタトランスクリプトームデータとも比較検討した。両疾患における細菌叢の共起ネットワークを調べると、メタトランスクリプトーム（RNA）データに基づき描かれたネットワークはメタゲノム（DNA）データに基づき描かれたネットワークと比較してより少ない種から構成され、疾患の進行部位において、実際に活動している細菌が絞られる傾向が見てとれた（図 3）。また両疾患においてより活動性が高い細菌を明らかにするため、RNA/DNA 比を計算すると、歯周炎では *F. nucleatum* subsp. *Vincentii*、*Peptostreptococcus stomatis* などが高い値を示したが、インプラント周囲炎では *P. stomatis* が最も高く、*Solobacterium moorei* などがこれに続いた。また細菌叢の持つ代謝経路と病原因子プロファイルの比較を Linear discriminant analysis effect size により行ったところ、インプラント周囲炎特異的に発現の上昇している RNA の多くは GAPDH 関連遺伝子であった。GAPDH は一般的に解糖系酵素として知られているが、本タンパクは細菌の付着因子として *P. gingivalis* の付着・凝集を促進するほか、宿主からの免疫回避能に係るとの報告もある。GAPDH は口腔細菌だけでなく宿主細胞でも発現しているため、今後 in vitro 等での検討が必要であるが、インプラント周囲炎の病態形成に重要な役割を担い、これが本疾患を治療する上で重要なターゲットである可能性が示唆された。

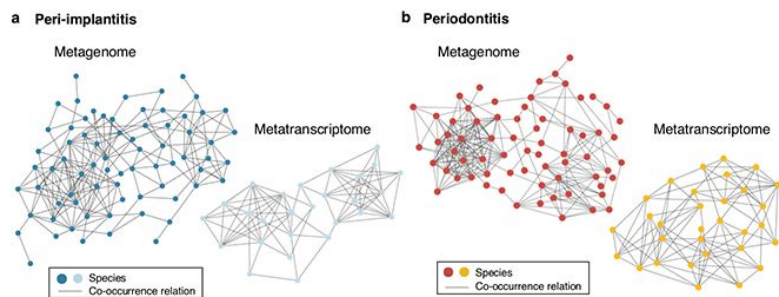


図3 インプラント周囲炎および歯周炎における細菌の共起ネットワーク。細菌叢に存在していたとしても、活動性が異なる可能性が異なる可能性が示唆された。

< 引用文献 >

Koyanagi et al. J Clin Periodontol. 2013;40(3):218-26. Maruyama et al. Sci Rep. 2014;4:6602. Shibata et al. Sci Rep. 2016;6:30997. Said et al. DNA Res. 2014;21(1):15-25.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 0件）

1. 著者名 Ikeda Eri, Shiba Takahiko, Ikeda Yuichi, Suda Wataru, Nakasato Akinori, Takeuchi Yasuo, Azuma Miyuki, Hattori Masahira, Izumi Yuichi	4. 巻 108
2. 論文標題 Japanese subgingival microbiota in health vs disease and their roles in predicted functions associated with periodontitis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Odontology	6. 最初と最後の頁 280 ~ 291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10266-019-00452-4	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 Funahashi Kenta, Shiba Takahiko, Watanabe Takayasu, Muramoto Keiko, Takeuchi Yasuo, Ogawa Takuya, Izumi Yuichi, Sekizaki Tsutomu, Nakagawa Ichiro, Moriyama Keiji	4. 巻 20
2. 論文標題 Functional dysbiosis within dental plaque microbiota in cleft lip and palate patients	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Progress in Orthodontics	6. 最初と最後の頁 11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40510-019-0265-1	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 Ikeda Eri, Shiba Takahiko, Ikeda Yuichi, Suda Wataru, Nakasato Akinori, Takeuchi Yasuo, Azuma Miyuki, Hattori Masahira, Izumi Yuichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Deep sequencing reveals specific bacterial signatures in the subgingival microbiota of healthy subjects	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Clinical Oral Investigations	6. 最初と最後の頁 1489 ~ 1493
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00784-019-02805-3	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 芝 多佳彦、竹内康雄、和泉雄一	4. 巻 70
2. 論文標題 インプラント周囲炎と歯周炎の原因菌をめぐって	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 日本歯科医学会雑誌	6. 最初と最後の頁 649 ~ 658
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 和泉雄一、芝 多佳彦、竹内康雄	4. 巻 35
2. 論文標題 インプラント周囲炎は歯周炎と同じか? 細菌学的検討	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 日本臨床歯周病学会誌	6. 最初と最後の頁 9~17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 芝 多佳彦、藤吉 奏、須藤毅顕、竹内康雄、丸山史人	4. 巻 73
2. 論文標題 口腔内における複合微生物感染症のホロゲノム動態を時空間的に理解する	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 最新医学	6. 最初と最後の頁 509~522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 船橋健太、渡辺孝康、芝 多佳彦、村本慶子、小川卓也、竹内康雄、和泉雄一、森山啓司
2. 発表標題 口唇口蓋裂におけるデンタルプラーク細菌叢のメタトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 第59回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第83回口腔病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 第83回口腔病学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 駒津匡二、芝 多佳彦、渡辺孝康、小柳達郎、根本 昂、佐藤博紀、前川祥吾、片桐さやか、竹内康雄、岩田隆紀
2. 発表標題 網羅的な細菌叢解析による歯周炎とインプラント周囲炎の菌叢構造比較
3. 学会等名 第150回日本歯科保存学会春期学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 駒津匡二、芝 多佳彦、根本 昂、下岸将博、柴崎真樹、竹内康雄、春日井 昇平、岩田隆紀
2. 発表標題 メタゲノム解析によるインプラント周囲微生物構造の解明と疾患進行との関連性
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会第39回関東・甲信越支部学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹内康雄
2. 発表標題 歯周炎とインプラント周囲炎関連細菌叢の網羅的解析から見えてくること
3. 学会等名 第48回日本嫌気性菌感染症学会総会・学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内康雄
2. 発表標題 インプラント治療の長期成功 - 細菌学的視点 -
3. 学会等名 日本口腔インプラント学会第37回関東・甲信越支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 竹内康雄
2. 発表標題 インプラント周囲炎の病因と予防
3. 学会等名 バイオインテグレーション学会 第9回学術大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔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	丸山 史人 (Fumito Maruyama) (30423122)	広島大学・学術・社会連携室・教授 (15401)	
研究 協力者	芝 多佳彦 (SHIBA Takahiko)		
研究 協力者	渡辺 孝康 (WATANABE Takayasu)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	駒津 匡二 (KOMATSU Keiji)		
研究協力者	根本 昂 (NEMOTO Takashi)		
研究協力者	小柳 達郎 (KOYANAGI Tatsuro)		