

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19747

研究課題名(和文)大規模菌叢解析データを用いた歯周病治療法の最適化クリティカルパスの開発

研究課題名(英文) Establishment and development of metagenomics-based periodontitis diagnostic platform

研究代表者

前川 知樹 (Maekawa, Tomoki)

新潟大学・医歯学系・研究准教授

研究者番号：50625168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト歯周炎罹患患者を侵襲性歯周炎、歯肉膿瘍を伴う歯周炎、慢性歯周炎に分類し、正常な細菌構成バランスを持つ正常な歯周状態の患者からの計57名の歯肉縁下プラークサンプルを採取した。採取したサンプルはメタゲノム解析のためのサンプル調整をおこない、次世代シーケンサーにて全細菌のメタゲノム解析と中心となって機能すると予想される細菌の同定を行った。中心となって機能している候補細菌の一つであるP. gは、免疫機能を減弱させることで、歯周炎を引き起こしていることが明らかになった。そこで同様のアプローチを新たに同定された疾患ごとの中心となって機能する細菌に対し行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周炎が細菌感染によって引き起こされることが明らかでありながらも、細菌学の観点に立ったアプローチはこれまでに例が少ない。そのために、歯周炎には全て同様な物理的、もしくは化学的にプラークを除去する治療法しか存在せず、経験に頼った旧時代的な診療になりがちであった。本研究結果によって、歯周炎だけでなく他の混合感染症の成り立ちを理解するための、新たなアプローチ法に展開することが可能となる。さらに、歯周ポケットの細菌検査が、歯周炎の「進行程度」を示す新しい歯周炎の検査項目の開発にもなり得る。

研究成果の概要(英文)：We first conduct that classified of human periodontitis patients as invasive periodontitis, periodontitis with gingival abscess, chronic periodontitis. Then, a total of 57 subgingival plaque samples from normal periodontal patients with normal bacterial composition balance were collected. The collected samples were prepared for metagenome analysis, and metagenomic analysis of all bacteria was performed by the next-generation sequencer. P. g was found to cause periodontitis by reducing immune function. A similar approach is being performed on bacteria that are central to newly identified diseases.

研究分野：歯周病治療学

キーワード：歯周病治療 デジタルプラットフォーム 歯周炎 クリティカルパス ディープラーニング メタゲノム解析 菌叢解析 精密医療

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

ゲノム時代において、歯周炎形成後のプラーク構成細菌の解析は多数おこなわれているものの、形成期段階における全細菌の動静と中心として機能する細菌（中心機能細菌）の同定は未だ行われていない。申請者はこれまでに、慢性歯周炎の病態形成において中心機能細菌と考えられる候補細菌をいくつか同定してきた。しかしながら、中心となる細菌は全体の数%しか存在しないことを考慮すると、成長を助長する共生細菌の存在が考えられるが、菌の全体像が把握できないために有効的な判断が不可能であった。さらに、中心機能細菌が、歯周炎形成期のいかなる段階で増減し、機能しているのかはわかっていない。そのために、歯周炎の治療法は、物理的な細菌除去療法か、抗生物質をもちいた全細菌を対象とする画一的な治療法しかなかった。よって、抗生物質の乱用による耐性菌の出現や、歯周炎の急性悪化と、多数の歯周炎の再発が認められていた。また、歯周炎の診査・診断には、ポケット深さや歯の動揺などを指標として用いており、客観的な判断が可能である細菌学的要素が入っていないために、診断が曖昧であり、診査・診断・治療方針が術者の能力に依存することがある。つまり、歯周炎罹患患者が、常に高い医療を享受できない状況にある。本申請研究では、歯周炎の形成においての全細菌の動静と中心機能細菌の同定を行い、歯周炎形成初期の段階、もしくは歯周炎予防的に特定の細菌の抑制を可能にしたいと考えた。しかし、全細菌の動静を解析したメタゲノムデータの量は膨大であり、データのソースや種類の多様性もあることで、1段階目の比較クラスタ解析によって得たデータを利用した、2段階目のアナリティクス、すなわちデータの背後に潜むパターンを見出すことや、データの量を質へと転化し、3段階目の価値の創出につなげることは一般臨床医やバイオインフォマティクス分野外の研究者の力では困難である。本申請研究では、メタゲノム解析を専門とする奥田との共同研究により、一歩進んだデータの収集が可能である。そこで、メタゲノム解析によって得た細菌のデータを蓄積すると同時に、歯周炎の臨床パラメーターとのリンクを図り、デジタル情報プラットフォームを構築することを本申請研究の目的とする。構築されたデジタル情報プラットフォームからは、臨床医が細菌のデータを入力することで、歯周炎の病態に応じた診断と最適な治療法の選択に関し、プラットフォームから術者をサポートすることが可能になる。

2. 研究の目的

歯周病は、慢性炎症に伴う歯周結合組織と周囲骨組織の破壊を特徴とする疾患であり、人類史上最も感染者の多い疾患とされている。また、全身への増悪的な波及も示唆される炎症疾患であるが、病因細菌群や病態形成の複雑さから、有効な治療法は確立されていない。歯周病はこれまでに、培養可能な歯周病原細菌群によって引き起こされると考えられてきた。しかしポストゲノム時代に入り、歯周炎を引き起こす全細菌の同定が可能になってきた。申請者はこれまでに、歯周病の中でも骨吸収を伴う強い炎症に定義される「歯周炎」の細菌叢に関して研究をおこなってきた。歯周炎を引き起こす中心となって機能する細菌の一つである *P. g* は、歯槽骨吸収や炎症を引き起こすような強い病原因子は持っていないが、好中球に対して免疫機能を減弱させることで他の菌の生育を助け、歯周炎を引き起こすことを明らかにしてきた (Maekawa T. et al., *Cell Host Microbe*. 2014)。そこで *P. g* の特異的な免疫機構エスケープ機能を逆にとった補体拮抗薬を用いた *P. g* 選択的な除去法を開発し、マウス・サルにおいて証明した。しかしながら、歯周炎の完治には至らず、通常の慢性的な歯周炎の治療にしかならなかった。つまり、中心となる細菌の機能を助長する共生細菌の存在が考えられた。しかしながら、メタゲノム解析のデータ量は膨大なため、一般的な臨床医や専門外の研究者では有効的なデータを得ることが困難であった。また、ヒトの歯周炎には、若年に発症する重度な骨吸収を伴う侵襲性歯周炎や、急性症状を呈する歯周炎、膿瘍を形成する歯周炎など病状は様々である。だが、治療法は画一的であり、抗生物質の投薬による治療が試みられているが、症状別の選択的な治療法は未だ確立されていない。さらに、病態の診断法が、ポケット深さによる診査や歯の動揺、歯肉からの出血の度合いなど、あいまいな臨床的診査に頼っているがゆえに、それぞれの病態を分類することが難しいことがあった。

以上の問題を解決する方策として申請者は、次世代シーケンサーを用いた大規模菌叢解析による全細菌のメタゲノムデータを、バイオインフォマティクスに精通している奥田との共同研究により、歯周炎を引き起こす中心的な役割を果たしている細菌の同定を試みることで解決しようと考えた。比較クラスタ解析による、病態別の候補細菌の同定時に得たデータとメタゲノム解析で得た全細菌の基礎データを、歯周炎の病態別の臨床パラメーターと同期することで、歯周炎の正確な診断・最適な治療方針の選択を可能にするデジタル情報プラットフォームを構築することを本申請研究の目的とした。

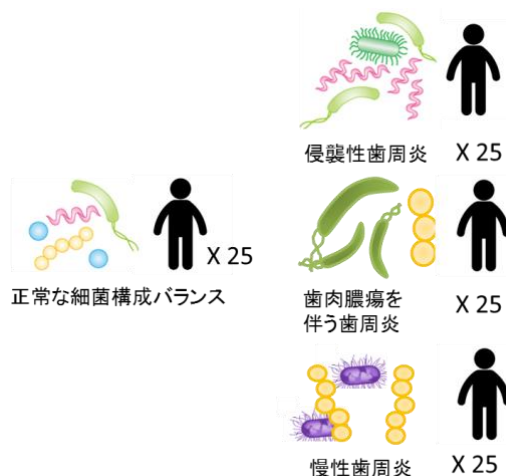
3. 研究の方法

本研究では、歯周炎形成期において段階的にプラークを採取し、段階ごとの歯周炎プラークを構成する全細菌を同定する。日本歯周病学会にて定義されている、慢性歯周炎、侵襲性歯周炎、歯周膿瘍を伴う歯周炎を罹患した患者を対象としてサンプルを採取する。以上の3つの病態は全て細菌が原因とされている（歯周病の診断と治療の指針 2007, 日本歯周病学会）。初期段階でのサンプル数は合計100名を目指す。病態に特徴的な細菌の同定にはメタゲノム解析を

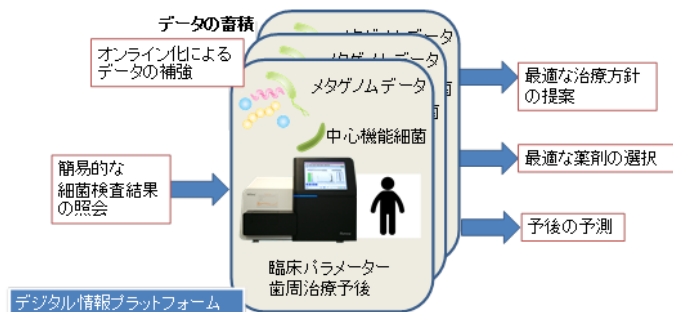
用い、大規模菌叢解析を行い、プラークを構成している全細菌のデータを蓄積する。次に共同研究者である奥田とともに、メタゲノムの比較クラスター解析により歯周炎形成における細菌の動静パターンを見出す。歯周炎形成の細菌の構成変化パターンを解析することで、全細菌の中心となって変動している細菌を予測することが可能であると考えられる。さらに、予測された候補細菌の分子生物学的解析をおこなう。候補細菌の特徴を理解し、候補細菌に特異的な薬剤の開発と効率的な治療法の開発につなげる。確立されたデジタル情報プラットフォームは、オンライン化し、全世界からのアクセスを可能にすることで、データベースの補強を行っていく。

4. 研究成果

ヒト歯周炎罹患患者を侵襲性歯周炎、歯肉膿瘍を伴う歯周炎、慢性歯周炎に分類し、正常な細菌構成バランスを持つ正常な歯周状態の患者からの計 57 名の歯肉縁下プラークサンプルを採取した。採取したサンプルはメタゲノム解析のためのサンプル調整をおこない、次世代シーケンサーにて全細菌のメタゲノム解析と中心となって機能すると予想される細菌の同定を行った。サンプルの採取と調整、メタゲノム解析においては、細菌学を専門とする寺尾・土門に研究協力を要請し、次世代シーケンサーによるビックデータの処理と中心となって機能する細菌の同定に関しては、バイオインフォマティクスに精通する奥田に研究協力してもらった。病態に応じた全細菌のメタゲノムデータを比較クラスター解析することで、病態特異的な中心機能細菌の同定が可能になった。



中心となって機能している候補細菌の一つである *P. g* は、免疫機能を減弱させることで、歯周炎を引き起こしていることを申請者はこれまでに明らかにしてきた。同様のアプローチを新たに同定された疾患ごとの中心となって機能する細菌に対しおこなっている最中である。すなわち、候補細菌の分子生物学的な解析をおこない、候補細菌がどのように生体内で生存していくのか等、網羅的に解析する予定である。また、それぞれの疾患にて同定された候補細菌がどのように病態を引き起こしているのか、マウス・サルに直接候補細菌を接種することで、対応する疾患が発症するのか等、詳細なメカニズムを解析する。最終的には上記のデジタル情報プラットフォームを形成し、広く世界に発信する。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 9 件)

- (1) Hajishengallis G, Kajikawa T, Hajishengallis E, **Maekawa T**, Reis ES, Lambris JD: Complement-Dependent Mechanisms and Interventions in Periodontal Disease. Front Immunol., Mar 12;10:406, 2019.
- (2) Tamura H, **Maekawa T**, **Domon H**, Hiyoshi T, **Yonezawa D**, Nagai K, Ochiai A, Taniguchi M, Tabeta K, Maeda T, **Terao Y**: Peptides from rice endosperm protein restrain periodontal bone loss in mouse model of periodontitis. Arch Oral Biol., Feb;98:132-139, 2019.
- (3) Nagai K, **Domon H**, **Maekawa T**, Hiyoshi T, Tamura H, **Yonezawa D**, Habuka R, Saitoh A, **Terao Y**: Immunization with pneumococcal elongation factor Tu enhances serotype-independent protection against Streptococcus pneumoniae infection. Vaccine., Jan

3;37(1):160-168, 2019.

(4) Nagai K, Kimura O, **Domon H**, **Maekawa T**, **Yonezawa D**, **Terao Y**: Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, and *Moraxella catarrhalis* clinical isolates from children with acute otitis media in Japan from 2014 to 2017. *J Infect Chemother*. Mar;25(3):229-232, 2019.

(5) **Domon H**, **Maekawa T**, **Yonezawa D**, Nagai K, Oda M, Yanagihara K, **Terao Y**: Mechanism of Macrolide-Induced Inhibition of Pneumolysin Release Involves Impairment of Autolysin Release in Macrolide-Resistant *Streptococcus pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother*. Oct 24;62(11), 2019.

(6) Bostanci N, Bao K, Li X, **Maekawa T**, Grossmann J, Panse C, Briones RA, Resuello RRG, Tuplano JV, Garcia CAG, Reis ES, Lambris JD, Hajishengallis G: Gingival Exudate Dynamics Implicate Inhibition of the Alternative Complement Pathway in the Protective Action of the C3 Inhibitor Cp40 in Nonhuman Primate Periodontitis. *J Proteome Res*. Sep 7;17(9):3153-3175, 2018.

(7) **Domon H**, Nagai K, **Maekawa T**, Oda M, **Yonezawa D**, Takeda W, Hiyoshi T, Tamura H, Yamaguchi M, Kawabata S, **Terao Y**: Neutrophil Elastase Subverts the Immune Response by Cleaving Toll-like Receptors and Cytokines in Pneumococcal Pneumonia. *Front Immunol*, Apr 25;9:732, 2018.

(8) Nagai K, **Domon H**, **Maekawa T**, Oda M, Hiyoshi T, Tamura H, **Yonezawa D**, Arai Y, Yokoji M, Tabeta K, Habuka R, Saitoh A, Yamaguchi M, Kawabata S, **Terao Y**: Pneumococcal DNA-binding proteins released through autolysis induce the production of proinflammatory cytokines via toll-like receptor 4. *Cell Immunol*. Mar;325:14-22, 2018.

(9) Mitroulis I, Chen LS, Singh RP, Kourtzelis I, Economopoulou M, Kajikawa T, Troullinaki M, Ziogas A, Ruppova K, Hosur K, **Maekawa T**, Wang B, Subramanian P, Tonn T, Verginis P, von Bonin M, Wobus M, Bornhäuser M, Grinenko T, Di Scala M, Hidalgo A, Wielockx B, Hajishengallis G, Chavakis T: Secreted protein Del-1 regulates myelopoiesis in the hematopoietic stem cell niche. *J. Clin. Invest.*, Oct 2;127(10):3624-3639, 2017.

〔学会発表〕（計 4 件）

(1) **Maekawa T**, Genetic and Intervention Studies Implicating Keystone Pathogens and Del-1 as Major Targets for the Treatment of Periodontitis, International Collaborative Symposium on Development of Human Resources in Practical Oral Health and Treatment, Phuket, Thailand, 2019.

(2) **Maekawa T**, **Domon H**, Kobayashi Y, Nagai K, **Yonezawa D**, **Terao Y**, Maeda T, Hajishengallis G. Local regulator Del1 inhibits bone-resorption via suppression of Wnt5a-Ror2 signaling. 96th General Session & Exhibition of the IADR, London, England, 2018.

(3) **Maekawa T**, Inhibition of pre-existing natural periodontal inflammation in non-human primates by a locally administered peptide inhibitor of complement C3. 7th TIMNAS and 4th JSMiD, 2017.

(4) **Maekawa T**, Genetic and intervention studies implicating keystone pathogens as a major target for the treatment of periodontitis. The 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research, 2017.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.caos-niigata-univ.net/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：奥田 修二郎

ローマ字氏名：Okuda Shujiro

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：准教授

研究者番号（8桁）：00512310

(2) 研究分担者

研究分担者氏名：土門 久哲

ローマ字氏名：Domon Hisanori

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：助教

研究者番号（8桁）：00594350

(3) 研究分担者

研究分担者氏名：寺尾 豊

ローマ字氏名：Terao Yutaka

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：教授

研究者番号（8桁）：50397717

(4) 研究分担者

研究分担者氏名：米澤 大輔

ローマ字氏名：Yonezawa Daisuke

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：助教

研究者番号（8桁）：90711896

※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。