

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K19016

研究課題名（和文）代謝アダプテーションから紐解くインプラント周囲疾患

研究課題名（英文）Evaluation of metabolic adaptation in peri-implantitis

研究代表者

芝 多佳彦（Shiba, Takahiko）

東京医科歯科大学・歯学部・助教

研究者番号：90802306

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000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歯肉縁下プラークを採取し、細菌由来のゲノム情報を網羅的に解析することで両疾患の原因解明をおこなった。採取したサンプルからDNA及びRNAを抽出し、16S rRNAアンプリコン、メタゲノム、メタトランスクリプトーム解析を行なった。加えて、ネットワーク解析とLEfSe解析を行うことで、疾患に関連する細菌種の活動性および遺伝子転写活性をインプラント周囲炎と歯周炎で比較した。インプラント周囲炎ではコアとなる細菌種、ネットワーク構造、細菌叢の保有する遺伝子転写活性が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機能性を評価し、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）：Subgingival plaque samples were obtained from the site of peri-implantitis and periodontitis in the same oral cavity. In this study, genomic information of the bacteria from the sites was comprehensively analyzed for elucidating the causes of the two diseases. Firstly, DNA and RNA were extracted from the samples for 16S rDNA amplicon, metagenomic, and metatranscriptomic analyses. Additionally, network and LEfSe analyses were performed for comparing the differences of species and gene activities between peri-implantitis and periodontitis. These results showed that the core bacterial species, network structures, functional profiles of microbiome were different in both diseases.

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 メタゲノム解析 メタトランスクリプトーム解析 細菌叢 次世代シーケンサー オミクス解析 複合感染症

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

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。しかし、インプラントにおいても細菌感染により歯周炎と類似した炎症症状が生じ、最終的にはインプラントの脱落を引き起こすインプラント周囲炎が問題となっている。(図1)

シーケンス技術の向上により、難培養性の細菌を含め、細菌叢の網羅的な解析が可能となっている。歯周炎とインプラント周囲炎においてもシーケンス技術を用いた細菌学的研究がなされてきた。しかし、これらの報告の多くは16S rRNA遺伝子を対象としたメタ16S解析であるため、PCRによる増幅バイアスの問題

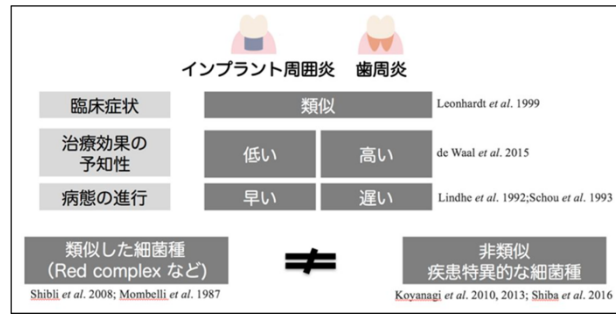


図1：インプラント周囲炎と歯周炎の比較

や、特定の領域のみでは細菌叢の保有する機能遺伝子組成が不明瞭なため機能的な解析が行えないなど、細菌叢の全貌解明は困難であった。近年は疾患の原因細菌叢に対し、遺伝子学的手法とタンパク質、代謝産物を用いたDNAから代謝産物へとまたがる網羅的な細菌叢解析が発展している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、インプラント周囲疾患を対象にトランスオミクス解析を行い、その結果を代謝アダプテーションの観点から疾患特異的な代謝状態を明らかにすることで、具体的な病原細菌叢のもつ機能を評価し、治療の標的となる細菌種、機能遺伝子を特定し、新規診断・予防・治療法の開発の足がかりとすることである。

3. 研究の方法

被験者はインプラント周囲炎と歯周炎の両疾患に罹患している者とし、両疾患の歯肉縁下プラークを採取後、DNAおよびRNAを抽出した。その後、シーケンサーを用いて塩基配列を取得しメタゲノムおよびメタトランスクリプトーム解析を行った。また、抽出されたDNAの一部を用いて16S rRNA遺伝子領域をPCRにて増幅し、メタ16S解析を併せて行った。本研究は東京医科歯科大学歯学部倫理審査委員会の承認を受けおこなわれた(D2015-535)。

メタ16S解析により取得されたリードはフィルタリングおよび代表配列に基づきクラスタリングされた後に、Human Oral Microbial Databaseに相同性検索され、97%以上の相同性を示したものを種レベルで特定した。同様にメタゲノム解析およびメタトランスクリプトーム解析により取得された塩基配列は、前処置の後、Non-Redundant Protein Database、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Database、Microbial Virulence Database、Virulence Factor Databaseに対してアノテーションし、機能遺伝子組成、由来細菌種、また病原因子の解析をおこなった。(図2)取得されたリードの全てはリード数や遺伝子長により補正した値を解析に用いた。各サンプルの類似性は主座標分析とAnalysis of similarities test (ANOSIM)を用いて検討した。メタゲノム解析とメタトランスクリプトーム解析間における機能遺伝子量の比較にはLinear discriminant analysis effect size解析(LEfSe解析)を用いた。メタ16S解、メタゲノム解析、メタトランスクリプトーム解析で共通に検出された細菌種のリードを基に共起相関係数を調べ、その値を用いてネットワーク構造をCytoscape v3.5.1により視覚化した。

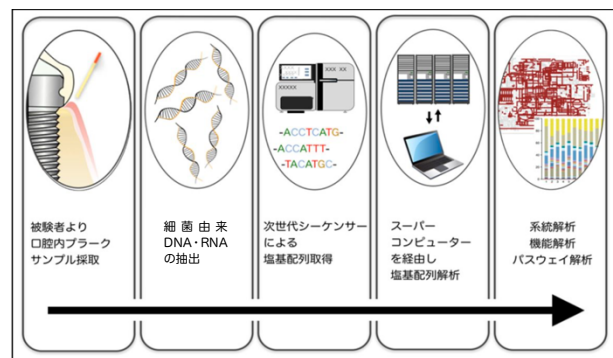


図2：研究の流れ

4. 研究成果

主座標分析とANOSIMの結果からメタ16S解析およびメタゲノム解析で検出された細菌種の組成は、インプラント周囲炎と歯周炎で類似傾向にあることが明らかとなった。同様にメタゲノム解析に基づくcoding sequence領域の機能遺伝子、病原因子組成も両疾患で類似傾向にあった。

メタ16S解析とメタゲノム解析の両方で検出された細菌種のうち、50%以上の被験者で認められた細菌種はインプラント周囲炎で72種、歯周炎で68種を認めた。一方、メタトランスクリプトーム解析に基づく16S rRNAとmRNA由来の細菌種を同様の条件で限定すると、インプラント周囲炎で27種、歯周炎で31種の細菌種が検出された。最終的にこれら細菌種の中からDNAおよびRNAの両解析に共通して認められた細菌種としてインプラント周囲炎で22菌種、歯周炎で

26 菌種を選択し、それらの細菌の活動比を RNA/DNA 比で算出したところ、インプラント周囲炎では *Peptostreptococcus stomatis*、歯周炎では *Fusobacterium nucleatum subsp. vincentii* が最も高い活動性を示した。

メタゲノム解析とメタトランスクリプトーム解析の結果に基づく細菌間ネットワーク構造をインプラント周囲炎と歯周炎で比較したところ、両疾患ともに DNA レベルでのネットワーク構造は RNA レベルでのネットワーク構造と比較して多くの細菌種で構成されていた。一方でネットワーク構造の緻密性(network density)は RNA レベルでより高い値を示したことから、疾患の違いに関わらず RNA レベルでのネットワーク構造は DNA と比較し高い緻密性を示すことが明らかとなった。*Solobacterium moorei* と *Prevotella denticola* はインプラント周囲炎の DNA および RNA のネットワーク構造に共通して認められ、有意な相関関係を示したことから、インプラント周囲炎における細菌叢の中心的な細菌種であることが示唆された。一方、歯周炎において DNA および RNA のネットワーク構造に共通して認められ、有意な共起相関関係を示す細菌種は存在しなかった。歯周炎のネットワーク構造において、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*) がそれぞれ共起相関関係を示していたのに対し、インプラント周囲炎のネットワーク構造では *T. forsythia* と *P. gingivalis* 間、*T. forsythia* と *T. denticola* 間のみ共起相関関係が認められた。(図 3)

メタゲノム解析の結果に基づき、機能遺伝子組成をインプラント周囲炎と歯周炎で比較したところ、両群間で各機能遺伝子のリード数に有意な差は認められず、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。これは過去に報告したメタトランスクリプトーム解析と同様の結果であり、両疾患の病原性は DNA レベルにおいても類似傾向にあることが示唆された。一方で、LefSe 解析を用いて各機能遺伝子の DNA および RNA のリード数を比較したところ、病原因子のプラスミン受容体/グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ遺伝子 (*plr/gapA*) がインプラント周囲炎群で RNA に有意に多く認められた。

インプラント周囲炎と歯周炎の細菌叢において、その細菌種間ネットワーク構造、活動性の高い細菌種および遺伝子が異なることが明らかとなった。これらの違いが両疾患における病態の違いを反映している可能性があり、疾患特異的な細菌種と遺伝子はインプラント周囲炎の診断と予防のための新しいバイオマーカーになりうると考えている。

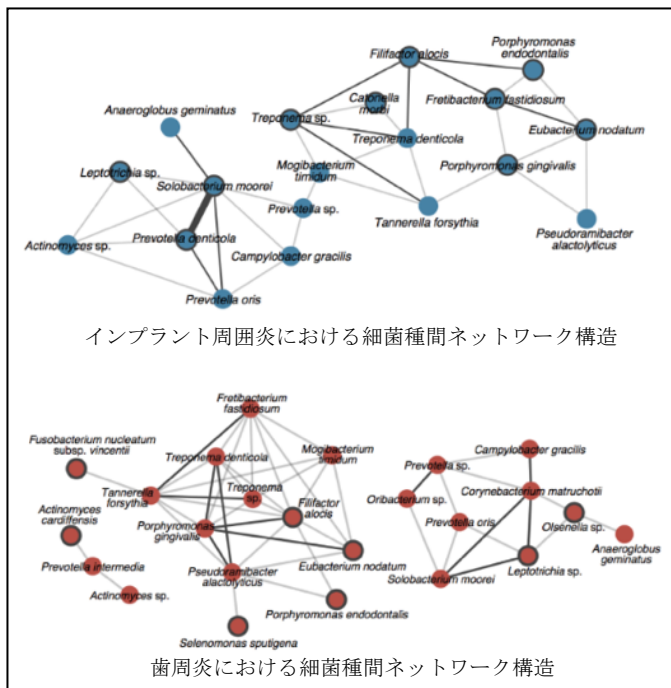


図 3：細菌種間ネットワーク

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Ohtsu Anri, Takeuchi Yasuo, Katagiri Sayaka, Suda Wataru, Maekawa Shogo, Shiba Takahiko, Komazaki Rina, Udagawa Sayuri, Sasaki Naoki, Hattori Masahira, Izumi Yuichi	4. 巻 25
2. 論文標題 Influence of Porphyromonas gingivalis in gut microbiota of streptozotocin induced diabetic mice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 868 ~ 880
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.13044	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 Katagiri Sayaka, Shiba Takahiko, Tohara Haruka, Yamaguchi Kohei, Hara Koji, Nakagawa Kazuharu, Komatsu Keiji, Watanabe Kazuki, Ohsugi Yujin, Maekawa Shogo, Iwata Takanori	4. 巻 9
2. 論文標題 Re-initiation of Oral Food Intake Following Enteral Nutrition Alters Oral and Gut Microbiota Communities	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 ePub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2019.00434	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 Hatasa M, Ohsugi Y, Katagiri S, Yoshida S, Niimi H, Morita K, Tsuchiya Y, Shimohira T, Sasaki N, Maekawa S, Shiba T, Hirota T, Tohara H, Takahashi H, Nitta H, Iwata T	4. 巻 10
2. 論文標題 Endotoxemia by Porphyromonas gingivalis Alters Endocrine Functions in Brown Adipose Tissue.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 ePub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.580577	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 Komatsu K, Shiba T, Takeuchi Y, Watanabe T, Koyanagi T, Nemoto T, Shimogishi M, Shibasaki M, Katagiri S, Kasugai S, Iwata T	4. 巻 10
2. 論文標題 Discriminating microbial community structure between peri-implantitis and periodontitis with integrated metagenomic, metatranscriptomic, and network Analysis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular and Infection Microbiology	6. 最初と最後の頁 ePub
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2020.596490	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 Ogawa M, Katagiri S, Koyanagi T, Maekawa S, Shiba T, Ohsugi Y, Takeuchi Y, Ikawa T, Takeuchi S, Sekiuchi T, Arai Y, Kazama R, Wakabayashi N, Izumi Y, Iwata T	4. 巻 47(4)
2. 論文標題 Accuracy of cone beam computed tomography in evaluation of palatal mucosal thickness.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Periodontology	6. 最初と最後の頁 479-488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jcpe.13254	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 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

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 2019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季学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Komatsu K, Takeuchi Y, Shiba T, Watanabe T, Shimogishi M, Shibasaki M, Nemoto T, Koyanagi T, Katagiri S, Iwata T
2. 発表標題 Omics analysis defines differences in microbial community structure between peri-implantitis and periodontitis.
3. 学会等名 The 68th Annual Meeting of Japan Dental Research 2020.11.07 Virtual
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 根本 昂, 芝 多佳彦, 渡辺 孝康, 小柳 達郎, 駒津 匡二, 片桐 さやか, 竹内 康雄, 岩田 隆紀
2. 発表標題 メタトランスクリプトーム解析を用いた歯周疾患ステージにおける細菌種間のネットワーク構造と機能組成の比較
3. 学会等名 第152回日本歯科保存学会度春季学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 和泉雄一, 芝多佳彦, 駒津匡二, 竹内康雄	4. 発行年 2019年
2. 出版社 デンタルダイヤモンド	5. 総ページ数 160
3. 書名 歯周病患者へのインプラント治療の実際	

〔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
研究協力者	竹内 康雄 (Takeuchi Yasuo) (60272522)	東京医科歯科大学	
研究協力者	片桐 さやか (Katagiri Sayaka) (60510352)	東京医科歯科大学 (12602)	
研究協力者	渡辺 孝康 (Watanabe Takayasu) (70725514)	日本大学 (32665)	

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
---------	---------