

機関番号：33902

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2010

課題番号：20249082

研究課題名（和文） 口腔・歯周病フローラのメタゲノム解析

研究課題名（英文） Metagenomic Analysis of Oral Microbiota from Normal Subjects and Patients with Periodontal Disease

研究代表者

野口 俊英 (NOGUCHI TOSHIHIDE)

愛知学院大学・歯学部・教授

研究者番号：50014262

研究成果の概要（和文）：歯周組織健常者および歯周病患者のプラーク細菌叢についてメタゲノム解析を行った。合計7サンプルのメタゲノム DNA シークエンスデータをもとに細菌叢の系統解析を行ったところ、合計で 996 菌種を検出し、従来の報告よりも複雑なプラーク細菌叢の多様性が示唆された。また、機能プロファイル解析では、腸内細菌叢など他の環境細菌叢との比較で、防御機構に関する遺伝子、糖代謝に関する遺伝子が多いなど、プラークに特徴的な機能特性が観察された。

研究成果の概要（英文）：A metagenomic analysis of dental plaque microbiota obtained from periodontal healthy subjects and periodontitis patients was performed. The deep sequencing of the seven DNA samples detected total of 996 species and revealed substantially greater microbial diversity in the dental plaque than previously known. The functional binning profiles of these samples were compared with other environmental metagenome datasets such as human gut microbiota. Enrichments of genes in the categories of 'Defense mechanism' and 'carbon hydrate transport and metabolism' were observed in plaque samples.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	18,400,000	5,520,000	23,920,000
2009 年度	12,200,000	3,660,000	15,860,000
2010 年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
年度			
年度			
総計	37,200,000	11,160,000	48,360,000

研究分野：歯周病学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：メタゲノム解析、口腔細菌叢、歯周病関連細菌、歯周炎

## 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、口腔常在菌の作用により、歯周組織における宿主側の生体応答が惹起され、慢性的な炎症状態が持続的に維持されることで、歯周組織の破壊が進行していく疾患である。歯周炎の進行は、歯周ポケット内部の嫌気的な環境下で起こるため、歯肉縁下プラーク中の嫌気性細菌が強く関与していると考えられている。これ

までに *Porphyromonas gingivalis* や *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* などをはじめとして、歯周病の発症に関わるとされる細菌が同定され、保有する病原因子なども明らかにされてきた。

しかしながら、実際には歯周病は、それらの細菌の単独の作用によるものではなく、複数の細菌の混合感染により成立するため、細菌叢の菌種構成が問題となる。16S rDNA の遺伝子配列

をもとに細菌叢の違いを研究した数々の報告によると、口腔内の細菌は 600 種類以上と推察されるが、これらの約半数は、培養が困難な細菌であり、口腔の細菌叢には不明な点が多い。Socransky らは、チェッカーボード法を用いて細菌叢における各細菌の役割を検討し、歯周病の発症にかかわりの深い3菌種を Red complex 菌群として分類したが、対象として調査した菌種が少ないため、それら以外にも歯周病に強く関わる細菌が存在している可能性がある。

難培養性細菌を含む環境細菌叢の全体像を解明する方法として、培養工程を経ないで細菌叢の DNA の配列情報を直接かつ網羅的に獲得するメタゲノム解析が注目を集めている。最近では、ヒトやマウスの腸内細菌叢のメタゲノム解析による成果も報告され、様々な細菌叢のメタゲノム解析が世界的に進行しつつある。本研究では、菌種の系統解析、遺伝子群の機能プロファイル解析により、歯周病と細菌叢の関係について調査した。

## 2. 研究の目的

歯周病細菌叢全体のメタゲノム情報を解析することにより、難培養性細菌や細菌叢の機能など、従来の解析方法では入手できなかった知見を得ることを目指す。

- (1) ヒトのプラークサンプルのメタゲノム解析により、口腔細菌叢の細菌構成、機能特性、代謝反応について調査する。
- (2) 他の環境のメタゲノム解析データと比較し、口腔細菌叢の特徴を明らかにする。
- (3) 歯周組織健全者と歯周病患者のサンプルを比較することにより、歯周病細菌叢に特有な菌種構成、機能特性、代謝反応について調査する

## 3. 研究の方法

### (1) 被験者の選択及び

インフォームドコンセント

愛知学院大学歯学部附属病院歯周病科を受診し、特記すべき全身疾患を有さず、本研究の主旨に同意のあった慢性歯周炎患者と、歯周組織健全者を対象とした。

インフォームド・コンセントは説明用の文書を用い、口頭による説明を行う。同意は文書で得る。

### (2) サンプリング

歯垢の採取は、治療による細菌の変化をさけるため、初診時に行う。歯周病患者からは歯肉縁上プラークと歯肉縁下プラークを採

取する。健康者からは、歯肉縁上プラークのみを採取。採取には、刃部を鈍化させたグレーシータイプキュレットを用いる。採取量は、1 サンプル当たり 30m g 以上を予定している。採取したプラークは、冷蔵 (4°C) で輸送、24 時間以内に液体窒素による急速凍結を行い、その後は-80°C以下で凍結保存する。

### (3) ゲノム DNA 抽出

プラークをグリセロール/液体窒素法で凍結保存し、その後、氷上で融解したサンプルから、腸内フローラのメタゲノム解析用の DNA 精製法<sup>19)</sup>を応用し、口腔内細菌フローラ DNA の精製を行った。真核細胞の除去にはポアサイズ 100µm のナイロンメッシュフィルターを用い、細菌細胞はその濾液を遠心分離することによって得た。細菌細胞の溶解には、リゾチームとアクロモペプチダーゼを併用した。この溶菌段階で、位相差顕微鏡によって 99.9%以上の溶菌を確認している。溶菌後の DNA 精製は常法に従って、フェノール/クロロホルム法により行い、その後、RNase 処理とポリエチレングリコール沈殿を行った。

### (4) 全ゲノム増幅

φ29DNA ポリメラーゼを応用した Multiple Displacement Amplification (MDA) 法のゲノム DNA 増幅キットを使用して全ゲノム増幅を行った。

### (5) メタゲノムシーケンシング及び

リードのフィルタリング

歯周組織健全者の歯肉縁上プラーク 3 サンプル、慢性歯周炎患者 1 名、侵襲性歯周炎患者 1 名の歯肉縁上プラーク及び歯肉縁下プラークそれぞれ 1 サンプル、合計 7 サンプルをロッシュ社製シーケンサー (454Genome SequencerFLX) にて、Titanium amplicon kit を用いて Pyrosequencing を行った。得られたリードの内、90bp よりも短いもの、ヒトゲノムと相溶性が高いものは解析から除外した。また、重複するリードも除外した。

### (6) 系統解析

各リード内の遺伝子の予測には MetaGene Annotator を使用した。予測された遺伝子は、NCBI のデータベースにて相溶性検索を行い、30 アミノ酸以上、70%相溶性以上で最もマッチした配列を有する菌をその遺伝子の由来菌とした。系統解析は、MEGAN プログラムにて行った。種から門まで様々なレベルで各系統カテゴリーに分類し、各カテゴリーに分布するリード数を元に解析を行った。

### (7) 機能特性解析

予測された遺伝子について BLAT プログラ

ムにて COG データベース（機能的に類似した遺伝子についてその情報を付与したアミノ酸配列を収集したデータベース）上で相同性検索を行った（30 アミノ酸以上、25% 相同性以上で、ビットスコアが 40 以上の配列を対象とした）。それぞれの遺伝子について最もマッチした配列を選択し、20 の機能カテゴリーそれぞれに該当する遺伝子数を計算した。

#### 4. 研究成果

##### (1) プラークにおける細菌の多様性

それぞれのサンプルから合計で 996 菌種を検出した。個々のサンプルでは 645 から 799 菌種を検出した。これらの数字は従来の報告よりも多い。口腔細菌の 16SrRNA 解析の結果を集計したデータベースでは 1179 のタクソンが同定されているが、名前が明らかになっているのはそのうちの 24% に過ぎない。

##### (2) 他の環境のメタゲノムデータのとの多様性比較

細菌叢の多様性について、それぞれのプラークサンプルと、ヒト腸内細菌叢および海洋細菌叢のメタゲノムデータとを門レベルで比較すると、プラークサンプルでは主要な 7 門が 96 から 99% を占めているのに対し、腸内細菌叢では Firmicutes 門と Bacteroides 門の 2 門、海洋細菌叢では Preteobacteria 門と Bacteroides 門の 2 門で 90% を占めていた。このことから、口腔内の細菌叢は腸内細菌叢、海洋細菌叢に比べ、門レベルでの複雑性を有していることが明らかとなった。

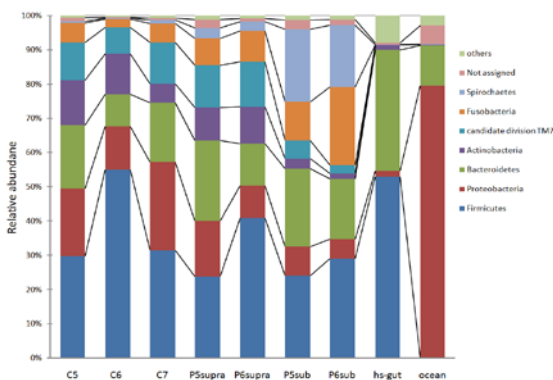


図1 各サンプルにおける細菌構成(門レベル)

##### (図1)

##### (3) 歯周病患者の歯肉縁上、縁下プラークにおける、門レベルでの細菌構成の特徴

TM7 は歯肉縁下 (2.5-5.3%) よりも歯肉縁上 (12.3-13.1) で多く検出されたが、Spirochaete 門及び Fusobacteria 門は歯肉縁下でより優勢であった (歯肉縁下でそれぞれ 18.0-21.2%、11.2%-22.8%)。また、門不明のタクソンが歯肉縁下で多かった。これは、歯

肉縁下では、嫌気的環境を好む細菌が多いため、未同定の難培養性細菌が多く含まれていることに起因するのかもしれない。

疾患のタイプでの比較では、歯肉縁上における Firmicutes 門は慢性歯周炎サンプル (23.8%) よりも、侵襲性歯周炎サンプル (40.9%) で多く検出された。Fusobacteria 門は歯肉縁下において、侵襲性歯周炎サンプルで多く検出された (侵襲性歯周炎 22.8% VS 慢性歯周炎 11.2%)。

##### (4) プラークサンプル間における、主要な網、属、種の比較

口腔の細菌叢における 4 つの主要な網 (Streptococcaceae 網、TM7、Neisseriaceae 網、Corynebacteriaceae 網) は 7 つの全てのサンプルで優勢であった。種レベルでは、歯周病原性細菌とされる、いわゆる Red Complex 菌種 (Porphyromonas gingivalis、Tannerella forsythia、Treponema denticola) が、歯周炎患者の歯肉縁下プラークに多く観察された。

一方、初期定着菌と Red Complex 菌種を結び付けることから病原性細菌の一つとされる Prevotella intermedia は、今回のサンプルからはあまり検出されなかった。

慢性歯周炎サンプルと侵襲性歯周炎サンプルの比較では、Fusobacteriaceae 網が侵襲性歯周炎で多く検出された。しかし、侵襲性歯周炎に関連が強いとされる Aggregatibacter 属の菌種は疾患サンプルではあまり検出されず、むしろ健常者サンプルの方が多かった。16SrRNA 解析の報告で侵襲性歯周炎との関連が示唆されている Selenomonas 属の菌種については、今回のサンプルでは、侵襲性歯周炎サンプルに多いという結果には至らなかった。

##### (5) プラーク細菌叢の機能特性解析

機能プロファイルについては、サンプル間において強い類似性がみられた。これはプラークの状態に関わらず、口腔の環境に適応するための必須な機能が維持されていると思われる。プラーク細菌は環境への適応を最適化するため、細胞間の情報伝達や代謝の応答、遺伝子交換等により、互いに協力している。これらの細胞間のコミュニケーションは、必須遺伝子機能の維持に利用されているのかもしれない。

また、今回のメタゲノムデータセットにおいて予測された遺伝子の 60% 以上が機能不明であったことも、この類似性に影響していると考えられる。この機能不明な遺伝子群の中に、プラーク間の機能特性の違いをもたらす遺伝子が存在している可能性がある。

##### (6) 異なる環境由来の細菌叢との機能特性比較

ヒト腸内細菌叢、海洋細菌叢との機能特性比較を行ったところ、明確な違いが確認された。アミノ酸代謝の関する遺伝子はプラーク細菌叢で少なかった。このカテゴリーの遺伝子は、海洋細菌叢で多かったが、多くの海洋細菌が海洋生物の死骸から拡散する有機物を炭素源として利用していることに起因すると思われる。一方、糖代謝に関する遺伝子については、腸内、プラーク細菌叢に多く観察された。口腔においては、Firmicutes 門に属する Streptococcus などが、主要な炭素源として糖を利用することが知られている。また Firmicutes 門の菌種が多いと、それらの遺伝子の占める割合が、多くなると知られている。プラーク細菌叢よりも腸内細菌叢で糖代謝に関する遺伝子が多かったのは、Firmicutes 門の存在比率の違いによると考えられる。また、抗菌薬などを菌体外に排出する防御機構に関する遺伝子も、腸内、口腔細菌叢に多かった。遺伝子の水平伝播などにより抗菌薬の分解や排出などの機能が增強している可能性が高い。

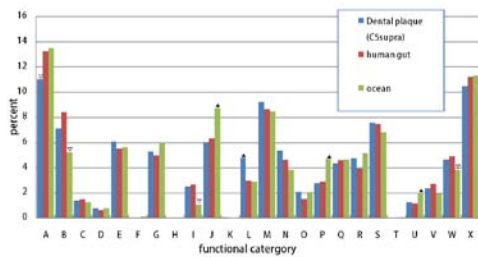


図2 プラーク、腸内、海洋細菌叢における機能特性の違い

▲は遺伝子の増加傾向、▼は減少傾向がみられる機能カテゴリーを示す。  
機能カテゴリーは以下の通り: A: Amino acid transport and metabolism, B: Carbohydrate transport and metabolism, C: Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning, D: Cell motility, E: Cell wall/membrane/envelope biogenesis, F: Chromatin structure and dynamics, G: Coenzyme transport and metabolism, H: Cytoskeleton, I: Defense mechanism, J: Energy production and conversion, K: Extracellular structures, L: Function unknown, M: General function prediction only, N: Inorganic ion transport and metabolism, O: Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport, P: Lipid transport and metabolism, Q: Nucleotide transport and metabolism, R: Posttranslational modification, protein turnover, chaperones, S: Replication, recombination and repair, T: RNA processing and modification, U: Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism, V: Signal transduction mechanism, W: Transcription, X: Translation, ribosomal structure and biogenesis

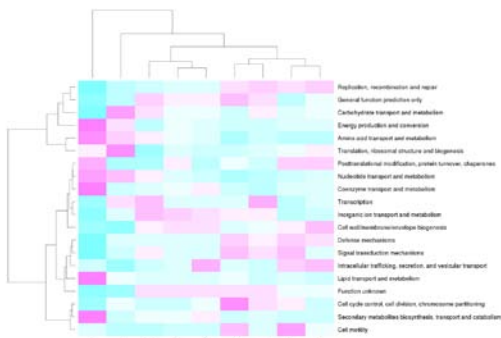


図3 各サンプルの機能プロファイルにおける2wayクラスタリング解析

## (7) 結果まとめ

本課題の結果により、プラーク細菌叢の特徴的な特性が明らかとなった。腸内細菌叢のメタゲノム解析は国内外で数多くの報告があ

り、肥満との関係など、新たな事実があきらかになっている。口腔細菌叢におけるメタゲノム解析は、これまでに、健康者プラーク 1 サンプルの解析を行った報告が一編あるのみで、本研究は疾患サンプルを含む複数の DNA サンプルを扱った初めての研究である。近日中に論文として投稿する予定である。また、今回の研究を足がかりに綿密な研究ストラテジーを策定し、サンプル数を増加して、より詳細な解析を行っていく計画である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

① Morita H, Nakano A, Onoda H, Toh H, Oshima K, Takami H, Murakami M, Fukuda S, Takizawa T, Kuwahara T, Ohno H, Tanabe S and Hattori M. Bifidobacterium kashiwanohense sp. nov., isolated from healthy infant faeces. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 電子版 2010 査読有

② Hishikawa T, Izumi M, Naitoh M, Furukawa M, Yoshinari N, Kawase H, Matsuoka M, Noguchi T, Arijii E. The effect of horizontal X-ray beam angulation on the detection of furcation defects of mandibular first molars in intraoral radiology. Dentomaxillofac Radiol. 39, 85-90, 2010 査読有

③ Fujita Y, Kojima K, Ohhashi R, Hamada N, Nozawa Y, Kitamoto A, Sato A, Kondo S, Kojima T, Deguchi T, Ito M. MiR-148a attenuates paclitaxel-resistance of hormone-refractory, drug-resistant prostate cancer PC3 cells by regulating MSK1 expression. J. Biol. Chem. 285, 19076-84, 2010 査読有

④ Morita H, Shimazu M, Shiono H, Toh H, Nakajima F, Akita H, Takagi M, Takami, H, Murakami M, Masaoka T, Tanabe S. and Hattori M. Lactobacillus equicursoris sp. nov. isolated from the faeces of a thoroughbred racehorse. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60, 109-112, 2010 査読有

⑤ Morita H, Toh H, Oshima K, Murakami M, Taylor TD, Igimi S, Hattori M. Complete genome sequence of probiotic Lactobacillus rhamnosus ATCC 53103. J. Bacteriol. 有 191 2009 7630-7631

⑥ Adati N, Huang MC, Suzuki T, Suzuki H, Kojima T. High-resolution analysis of aberrant regions in autosomal chromosomes in human

leukemia THP-1 cell line. BMC research notes 2, 153-159, 2009 査読有

⑦ Inomata M, Ishihara Y, Matsuyama T, Murayama I, Noguchi T, Matsushita K. Degradation of vascular endothelial thrombomodulin by arginine- and lysin- specific cysteine proteases from Porphyromonas gingivalis. J. Periodontol. 8, 1511-1517, 2009 査読有

〔学会発表〕(計3件)

①林潤一郎、近藤伸二、亀井英彦、森田英利、足立直樹、福田光男、Todd D Taylor、石原裕二、小島俊男、野口俊英 ヒト歯周病細菌叢のメタゲノム解析 第5回日本ゲノム微生物学会 2011年3月14日 仙台

②Hayashi J, Kondo S, Morita H, Kamei H, Fukuda M, Ishihara Y, Kojima T, Noguchi T Metagenomic analysis of the dental plaque 96<sup>th</sup> American Academy of Periodontology Annual Meeting 2010 Nov. 2 Honolulu, USA

③上野真理子、菊池真美、森田英利、服部正平 他 腸内細菌叢のメタゲノム解析における細菌DNA抽出法の確立 第2回日本ゲノム微生物学会 2008年3月 大阪

〔図書〕(計1件)

林潤一郎、近藤伸二、森田英利、小島俊男、野口俊英 シーエムシー出版 メタゲノム解析技術の最前線 2010 213 (187-197)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野口 俊英 (NOGUCHI TOSHIHIDE)  
愛知学院大学・歯学部・教授  
研究者番号：50014262

### (2) 研究分担者

小島 俊男 (KOJIMA TOSHIO)  
浜松医科大学・実験実習器機センター・  
准教授  
研究者番号：00311340  
森田 英利 (MORITA HIDETOSHI)  
麻布大学・獣医学部・准教授  
研究者番号：70257294  
林 潤一郎 (HAYASHI JUNICHIRO)  
愛知学院大学・歯学部・講師  
研究者番号：30350937

### (3) 連携研究者

福田 光男 (FUKUDA MITSUO)  
愛知学院大学・歯学部・教授  
研究者番号：40156790  
石原 裕一 (ISHIHARA YUICHI)  
愛知学院大学・歯学部・准教授  
研究者番号：50261011  
亀井 英彦 (KAMEI HIDEHIKO)  
愛知学院大学・歯学部・助教  
研究者番号：50421243  
服部 正平 (HATTORI MASAHIRA)  
東京大学・新領域創成科学研究科・教授  
研究者番号：70175537  
藤 英博 (TOH HIDEHIRO)  
理化学研究所・計算生命科学センター・  
研究員  
研究者番号：10353468