

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09934

研究課題名（和文）歯周病進行の契機となる細菌ネットワークの病原性とその形成機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenicity and formation process of bacterial network triggered periodontal diseases

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：細菌のRNA情報に基づいた菌叢の網羅的解析により、歯周病の進行度に応じて菌叢の組成や発現している遺伝子の機能組成が異なることが明らかとなった。特に歯肉炎では、細菌間の共起ネットワーク構造が歯周炎よりも複雑であった。また歯周治療により臨床症状が改善しても、病的な細菌叢は必ずしも健全な状態にまで戻っていなかった。この事実は、歯周病が再発リスクの高い疾患であることを裏付けている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

バランスを乱した病的な細菌叢が治療後も容易に元の細菌組成に戻らないことは、バイオフィルムを形成する細菌の相互作用の強固さや複雑さを我々に再認識させた。本結果は歯周病予防の重要性のほか、現行の治療法の限界を示している。一方で、ある数種の細菌は病状の進行に伴い明らかに細菌の割合が増えるといった傾向が認められたことから、新たな歯周病予防・早期治療のための細菌学的マーカーとして臨床応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：A comprehensive analysis of the periodontal microbiome based on bacterial RNA revealed the differences in bacterial composition and functional activities of the microbiome according to the progression of periodontal disease. Especially in gingivitis, the co-occurrence bacterial network structure was more complex than in periodontitis. Furthermore, the dysbiotic microbiome did not necessarily recover to a healthy state even when clinical symptoms improved with periodontal treatment. This may support the fact that periodontitis is a disease with a high risk of recurrence.

研究分野：歯学

キーワード：歯周炎 Dysbiosis 歯肉炎 メタトランスクリプトーム解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯周病はプラーク中の細菌叢のバランスが乱れる (Dysbiosis) ことで、歯周組織に炎症性の破壊が生じる疾患である。歯肉に限局した病変である歯肉炎は、若年者の約半数で既にみられるが、これが進行して歯槽骨が吸収し、歯の喪失の原因となる歯周炎は主に中年以降にみられる。歯肉炎から歯周炎へ進行する契機となる細菌叢の特徴やその他要因については、いまだ不明な点も多い。これを解明することができれば、歯周病の進行抑制にも大きなメリットがあり、口腔や全身の健康にも大きく寄与すると思われる。

細菌叢の解析には、細菌由来の DNA を対象としたターゲットシーケンスや全ゲノムシーケンスがよく用いられてきた。DNA を試料とした場合、生菌と死菌を区別することができないため、細菌叢の組成やその特性を誤って判断する可能性があった。この問題を解消するため、細菌 RNA を用いた解析が注目されるようになったが、その報告はまだ限られている。また、これまでの研究では、個体差による細菌叢の違いについて考慮されていないものも多かった。

2. 研究の目的

臨床データと共に歯肉縁下プラークを採取し、メタトランスクリプトーム解析による細菌叢の網羅的解析を行い、疾患特異的な細菌叢や機能の特徴を明らかにする。さらに治療介入後の細菌叢の変化について、臨床データや宿主因子・環境因子も加味した統合的な細菌ネットワーク解析を行い、歯周炎進行の契機となる **Keystone** 種や関連する細菌叢の特徴を明らかにする。また、過去の文献データに基づいて細菌間の共生関係について考察を加えるとともに、病的な細菌ネットワーク改変にむけた細菌学的な方略についても検討する。

3. 研究の方法

(1) サンプル採取および処理

同一被験者内に存在する歯周炎部位、歯肉炎部位、健常歯部位を対象に、臨床データを記録するとともに、歯肉縁下プラークサンプル採取のため、被験部位にペーパーポイント 10 本を挿入する。回収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、細菌 RNA を抽出・精製し、次世代シーケンサーによりこの塩基配列を取得した。

(2) 疾患関連細菌叢の特徴比較

16S rRNA 領域のリードデータを用いて、Human Oral Microbiome Database により相同性検索を行い、種レベルまでの特定を行った。細菌間の関連性を明らかにするために、少なくとも 25%以上の被験者から認められた細菌種のリード数に基づき共起相関係数を調べ、各群ごとに細菌ネットワークを視覚化した。さらに Non-Redundant Protein Database、SEED subsystems、Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Database を用いて mRNA の情報から細菌叢の持つ遺伝子機能組成や代謝パスウェイを調べ、各群の特徴を調べた。

(3) 治療介入が細菌叢に与える影響と臨床症状およびその他宿主因子との関連検討

歯周基本治療介入後、再びプラークサンプル採取と臨床評価を行い、(1) (2) と同様に細菌叢の解析を行った。治療後の治癒が良好な場合と不良な場合にわけ、細菌組成、細菌叢ネットワーク構造の違いなどに注目し、歯周病の進行に関わる細菌叢の特徴について検討した。

4. 研究成果

(1) 各病態における細菌組成および機能の特徴

歯周炎、歯肉炎、健常部位において、3 群間で検出された種の多様性に有意な差は認められなかったが、主成分分析により 3 群間で細菌叢の組成が異なることが示された。個々の細菌種の検出割合では、特に健常部位と歯周炎部位との間に有意に違いが認められた。歯周炎部位では、歯周病と関連が深いとされる Red complex (*Porphyromonas gingivalis*、*Treponema denticola*) や、*Eubacterium nodatum* などが高い割合で認められた。但し、これらの細菌種は健常部位や歯肉炎部位からも検出された。そこで、mRNA 領域から Non-Redundant Protein Database を用いて由来細菌種を推定し、mRNA/16S rRNA リード量に基づいて各細菌種の活動性を評価した。その結果、Red complex は疾患の進行に伴いこれらの活動性が高くなっており、さらに *E. nodatum* などは Red complex と比較しても活動性が高いことが明らかとなった (図 1)。以上の結果は、これらの細菌が歯周病の進行過程において重要な役割を果たしていることを裏付けていた。

また、各群における特徴的な細菌ネットワークを調べたところ、健常部位と比較して歯肉炎部位のネットワークは構成細菌種数が多く、クラスター化係数が高いことから、歯肉炎が成立する際にはより細菌種間の複雑な相互作用が働いていることが推測された。一方、歯周炎部位のネットワークでは構成細菌種が絞られており、多様性の低い細菌叢となっていた (図 2)。

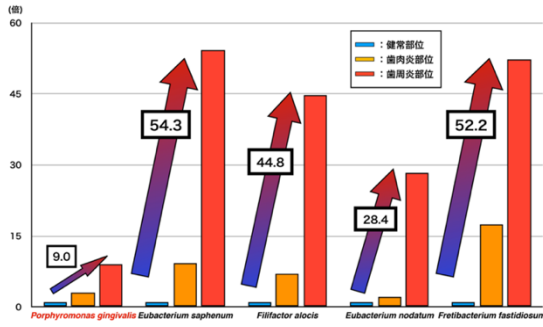


図1 病態進行に伴う各細菌の活動変化 (上図) (健康部位における活動性を1として算出) 既知の歯周病原細菌 (*P. gingivalis*) よりも歯周炎部位で活動性が高い細菌が存在していた。

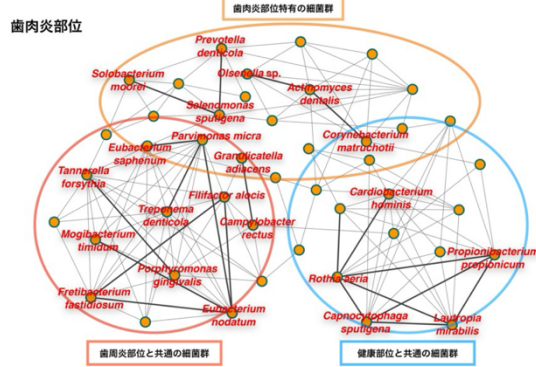
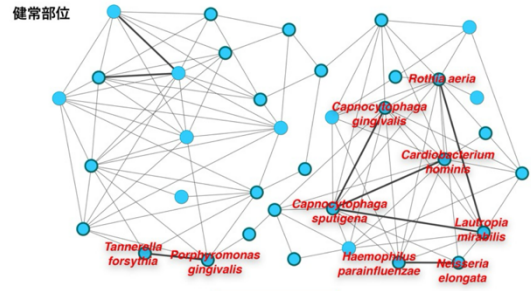
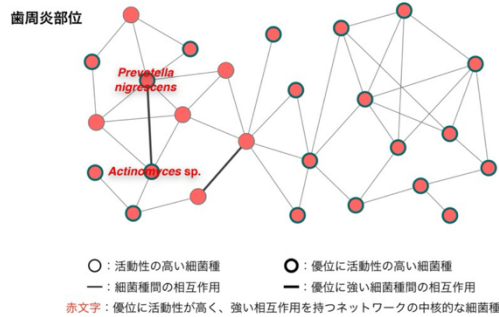


図2 病態ごとの細菌ネットワーク (右図) 健康部位と歯周炎部位では異なる種類の細菌によりネットワーク構造が形成され、歯肉炎ではこれら2つ特徴を含む、より多様で複雑なネットワークが形成されていた。

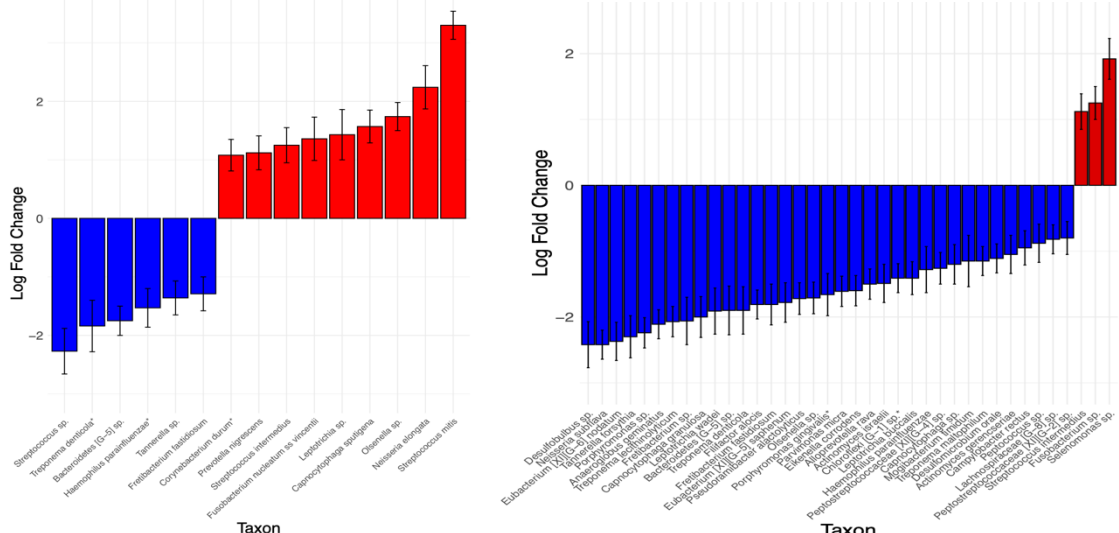


(2) 治療介入が細菌叢に与える影響

歯周炎部位に歯周基本治療 (ブラークや歯石、外傷性咬合など原因因子の除去) を実施した後の細菌叢では、治療後に良好な改善が認められた部位と変化が乏しかった部位とに分け解析したところ、いずれも種多様性は増加する傾向にあった。但し、*P. gingivalis* およびその他歯周病との関連が報告されている多くの偏性嫌気性菌の減少は、治療後でも改善が乏しかった群においてむしろ確認された (図3)。また治療前後において発現変動の大きい遺伝子に着目した場合、改善が乏しかった群では、特に細菌のバイオフィーム形成促進や酪酸形成時に産生に関与する機能の上昇が確認された。これらの現象は、歯周局所環境の変化に合わせて細菌叢が変化し、pathobionts (共生菌から病原菌に変化する細菌) の交代が生じたことにより起こった可能性が考えられた。さらに、臨床症状の改善が良好であった群においても、病的な細菌叢が必ずしも健康な状態にまでは近いていないことが主成分分析やネットワーク解析から明らかとなった。この事実は、歯周病が再発リスクの高い疾患である一因と考えられた。

図3 歯周治療後の歯周炎部位における細菌組成の変化 (下図)

歯周基本治療後のその割合が増加した細菌種 (赤) と減少した細菌種 (青) 臨床症状の良好な改善が認められた部位 (左図) と比較し、改善が乏しい部位 (右図) でも多くの歯周病原細菌が減少する傾向が認められた。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Nemoto Takashi, Shiba Takahiko, Komatsu Keiji, Watanabe Takayasu, Shimogishi Masahiro, Shibasaki Masaki, Koyanagi Tatsuro, Nagai Takahiko, Katagiri Sayaka, Takeuchi Yasuo, Iwata Takanori	4. 巻 6
2. 論文標題 Discrimination of Bacterial Community Structures among Healthy, Gingivitis, and Periodontitis Statuses through Integrated Metatranscriptomic and Network Analyses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 mSystems	6. 最初と最後の頁 e0088621
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1128/mSystems.00886-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Komatsu Keiji, Shiba Takahiko, Takeuchi Yasuo, Watanabe Takayasu, Koyanagi Tatsuro, Nemoto Takashi, Shimogishi Masahiro, Shibasaki Masaki, Katagiri Sayaka, Kasugai Shohei, Iwata Takanori	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 596490
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Chigasaki Otofumi, Aoyama Norio, Sasaki Yoshiyuki, Takeuchi Yasuo, Mizutani Koji, Ikeda Yuichi, Gokyu Misa, Umeda Makoto, Izumi Yuichi, Iwata Takanori, Aoki Akira	4. 巻 92
2. 論文標題 Porphyromonas gingivalis, the most influential pathogen in red complex bacteria: A cross sectional study on the relationship between bacterial count and clinical periodontal status in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Periodontology	6. 最初と最後の頁 1719 ~ 1729
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/JPER.21-0011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Shiba Takahiko, Katagiri Sayaka, Komatsu Keiji, Nemoto Takashi, Takeuchi Yasuo, Chen Bo, Zhou Yongsheng, Iwata Takanori	4. 巻 42
2. 論文標題 Treatment of Peri-implantitis Caused by Malpositioning and an Extra Implant: A Case Report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry	6. 最初と最後の頁 e15 ~ e20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11607/prd.4800	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Ikeda Yuichi, Chigasaki Otofumi, Mizutani Koji, Sasaki Yoshiyuki, Aoyama Norio, Mikami Risako, Gokyu Misa, Umeda Makoto, Izumi Yuichi, Aoki Akira, Takeuchi Yasuo	4. 巻 11
2. 論文標題 The Potential of a Saliva Test for Screening of Alveolar Bone Resorption	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Healthcare	6. 最初と最後の頁 1822 ~ 1822
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/healthcare11131822	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

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春期学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Nagai T, Shiba T, Komatsu K, Takashi N, Kobayashi R, Takeuchi Y, Iwata T
2. 発表標題 Determining the best approach for sequencing analysis of oral microbiota
3. 学会等名 The 108th Annual Meeting of the American Academy of Periodontology
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 池田 恵莉、竹内康雄、東みゆき	4. 発行年 2020年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 549
3. 書名 ヒトマイクロバイオーーム (Vol.2)	

1. 著者名 和泉雄一、駒津匡二、小柳達郎、竹内康雄、芝 多佳彦	4. 発行年 2021年
2. 出版社 インターアクション	5. 総ページ数 132
3. 書名 歯科医師・研究者チームによる歯周治療のコンセンサス 4	

〔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	渡辺 孝康 (Watanabe Takayasu) (70725514)	日本大学・歯学部・講師 (32665)	

	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	芝 多佳彦 (SHIBA Takahiko)		
研究協力者	小柳 達郎 (KOYANAGI Tatsuro)		
研究協力者	駒津 匡二 (KOMATSU Keiji)		
研究協力者	根本 昂 (NEMOTO Takashi)		

6. 研究組織（つづき）

	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	長井 貴彦 (NAGAI Takahiko)		
研究協力者	小林 龍太 (KOBAYASHI Ryota)		
研究協力者	石原 和幸 (ISHIHARA Kazuyuki)		

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