

歯周病の発症要因の特定に向けた 口腔内細菌叢解析

伊澤 和輝^{1,a)} 山澤 まりな^{1,2} 大上 雅史¹ 石田 貴士^{1,2} 秋山 泰^{1,2,b)}

概要: 歯周病は口腔内に存在する多様な細菌種が関わる複合感染症である。これまでに、歯周病の原因菌とされる細菌が数種単離培養されているものの、これら原因菌の存在は健常者にも認められるため、原因菌を含む口腔内細菌叢の変化が歯周病の発症要因であると考えられている。本研究では、健常者と歯周病罹患者のそれぞれの口腔内細菌叢を特徴づける細菌種を特定するため、これまでに公表されている健常者・罹患者由来の口腔内メタゲノムデータを用い、口腔内細菌叢について PCA や CDA などの多変量解析を行った。その結果、CDA により健常者、歯周病罹患者の疾患進行部位、疾患停滞部位を判別する平面が得られ、各平面に対し判別係数の大きい細菌属が示された。

キーワード: メタゲノム解析, ヒト口腔内, 歯周病, 細菌叢解析, PCA, CDA

Human oral microbiota analysis toward the elucidation of periodontal disease factors

KAZUKI IZAWA^{1,a)} MARINA YAMASAWA^{1,2} MASAHITO OHUE¹ TAKASHI ISHIDA^{1,2}
YUTAKA AKIYAMA^{1,2,b)}

Abstract: Periodontal disease is a complex infection involving many bacterial taxa present in the oral cavity. Several species of bacteria considered as causative bacteria of periodontal disease have been isolated. However, these bacteria also exist in oral cavity of healthy individuals. Therefore, it is considered that the transition of the bacterial composition, including causative bacteria, are the key factor of periodontal disease. In this study, we aim to identifying the bacterial species that characterize healthy individuals and patient oral microbiota respectively. We analyzed published oral metagenomic data from healthy individuals and patients, and conducted multivariate analysis such as PCA and CDA. The CDA analysis indicates some bacterial genus that has high coefficients to the discriminant planes that divide the healthy individuals, progressive sites and stable sites of patients.

Keywords: Metagenomic analysis, Human oral cavity, Periodontal disease, Microbiome, PCA, CDA

1. はじめに

1.1 未培養細菌と疾病

微生物の 99 % は現代の技術では培養不能である [1]。そのため、それらの培養できない微生物の種類や生態の研究は、微生物がもつ核酸塩基配列に依らざるを得ない。

医学的な分野においては、これまで様々な病原性の疾患に関して、その患者や患部から細菌が単離培養され、原因

¹ 東京工業大学 情報理工学院 情報工学系,
Department of Computer Science, School of Computing,
Tokyo Institute of Technology

² 東京工業大学 情報生命博士教育院,
Education Academy of Computational Life Sciences, Tokyo
Institute of Technology

a) izawa@bi.c.titech.ac.jp

b) akiyama@c.titech.ac.jp

菌とされてきた。一方で、近年の核酸配列による細菌の網羅的な解析から、これらの細菌の一部は、その存在比率は少ないものの、健常者も保持する常在菌であることが判明し、常在菌の存在比率の変化が発症の引き金となると考えられるようになってきた [2]。

1.2 16S ribosomal RNA 遺伝子

ある環境に存在する未培養細菌を含めた細菌の存在や、それらの系統を解析する場合によく用いられるのが 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 遺伝子の配列である。16S rRNA 遺伝子はすべての原核生物のゲノム上に存在し、転写された 16S rRNA はリボソームタンパク質と複合体を形成し、タンパク質合成に関わる。生命機能に深くかかわる遺伝子配列であることから、タンパク質との複合体形成に重要な部分は保存性が高く、また遺伝子自体も長さが 1.6 kb 程度であることから、PCR により容易に増幅・検出できるため、頻繁に利用されるマーカー遺伝子の 1 つとなっている。次世代シーケンサーの普及した近年においては、16S rRNA を標的としたメタゲノム (メタ 16S) 解析を行うことにより、通常の PCR などでは検出できなかった、数多くの未培養かつ希少な細菌種が報告されてきている。

1.3 歯周病

歯周病はう蝕 (虫歯) とともに二大口腔感染症とされる疾病である。これまでにヒトの口腔内からは 600 種以上の細菌種が報告されているが [3, 4]、これらの細菌が複雑かつ高度に組織化されたバイオフィルムを形成することにより、これらの感染症の原因となる。

歯周病とその原因細菌についての研究は Socransky らの研究 [5, 6] がよく知られている。Socransky らは DNA マイクロアレイによる歯周病罹患者の口腔内細菌叢解析結果から、各細菌種を歯周病との関連度により分類している (図 1)。特にピラミッドの頂点に赤色で分類された *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* の 3 種については特に歯周病との関連性が高いとされている。また我が国で平成 23 年度に行われた歯科疾患実態調査においては [7]、平成 17 年度の調査と比較すると、歯周病と考えられる人の割合が 30~60 歳代では概ね低下しているものの、依然、人口の 3 割程度に歯周病の疑いが認められる結果となっている。さらに、歯周病は心疾患や肺疾患、糖尿病などとの関連性が指摘されており [8-10]、歯周病の早期発見法やリスク評価法を開発する必要性は高い。

1.4 本研究の目的

Socransky らの研究 [6] において用いられた DNA マイクロアレイは、単離培養された細菌種の情報を基に作成されていた。近年においては、メタゲノム解析による未培養細菌種を含めた口腔内細菌の網羅的な解析が行われてお

り [11, 12]、これらの先行研究においては、歯周病罹患者と健常者のグループ間を比較することで、歯周病罹患者に特徴的な細菌種等を報告している。

一方で、細菌の網羅的な解析による歯周病の早期発見やリスク評価法の確立を目標とする場合には、より簡便な手法の下、サンプルごとの差異を鑑みた解析が必要であると考えられる。

そこで本研究では、16S rRNA を用いた細菌叢解析を行うことで、個人差も含めた健常者と歯周病罹患者および、罹患者の疾患進行部位と停滞部位の細菌叢の差異を把握することを目的とした。

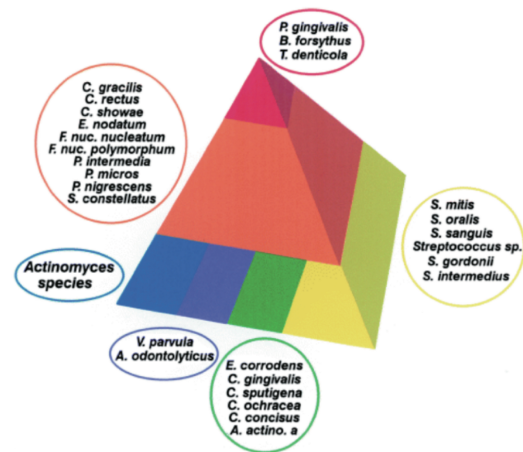


図 1 Socransky's pyramid (Socransky et al., 2002 より抜粋)

2. 手法

2.1 メタゲノムデータ取得

本研究では、これまでに報告されている歯周病関連のメタゲノムデータのうち、Illumina MiSeq プラットフォームによるシーケンシングが行われた 2 つの研究において得られたリードを使用した。

2.1.1 Duran-Pinedo et al. (2014) データ

Duran-Pinedo らの研究 [11] において、健常者 6 名、歯周病罹患者 7 名の歯周ポケットから採取された歯垢由来のメタゲノムデータを使用した。本研究では、この研究において得られていたサンプルのうち、健常者 (healthy) 由来の 6 サンプルを H01~H06、歯周病罹患者 (patient) 由来の 7 サンプルを P01~P07 とした。

2.1.2 Yost et al. (2015) データ

Yost らの研究 [12] において、歯周病罹患者の歯周ポケットから採取された歯垢由来のメタゲノムデータを使用した。この研究においては、2 ヶ月間のうちに、歯周ポケットの底部から計測して歯根の露出が 2 mm 以上増加した患部を疾患進行部位 (progressive site)、変化のなかった患部を疾患停滞部位 (stable site) として区別し、サンプル採取を行っている。本研究では、進行部位由来の 15 サンプル

を P08~P22, 停滞部位由来の 13 サンプルを PS01~PS13 とした。

2.2 リードクオリティコントロール

Duran-Pinedo らの研究 [12] により公開されていたリードデータは既にクオリティコントロール済みのものであった。そこで、この研究において行われていたリードクオリティコントロールと同様の閾値により、Yost らの研究 [12] のリードデータについてもクオリティコントロールを行った。具体的には、FASTX-Toolkit [13] により、quality score が 20 未満の部分がリード長の 20 % 以上存在するリードを除去した。

2.3 各サンプルリードの分類

NCBI が提供する 16S rRNA のデータベース (2017/4/16 取得) を用い、各サンプルのリードを BLASTn [14] によりアライメントし、最もスコアの高いアライメントを採用した。アライメントされたリードのうち、E-value が 1×10^{-5} 以下のものを抽出し、MEGAN6 [15] を用いて、各細菌属ごとのリード数を算出した。

2.4 多変量解析

MEGAN6 により算出されたリード数から、各サンプルにおける各細菌属の相対存在比率を算出した。この時、全サンプルにおいて相対存在比率が 1 % 未満のものは Others としてまとめた。各細菌属の存在比率を全サンプル間で正規化し、R の `prcomp()` 関数を用い主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) を、R の MASS ライブラリの `lda()` 関数を用いて正準判別分析 (Canonical Discriminant Analysis, CDA) を行った。

3. 結果

3.1 16S rRNA 配列を用いた細菌叢解析

16S rRNA 配列を用い、各サンプルの細菌叢を属レベルで解析した結果を図 2 に示す。歯周病罹患者の疾患進行部位、疾患停滞部位、健常者の各グループ内においてサンプル間での差異が大きく、各グループにおける共通性・特異性を見出すことは困難であった。

3.2 主成分分析 (PCA)

本研究で解析した各サンプルの細菌叢を細菌属ごとの存在比率のベクトルに変換し、各サンプルを多次元空間上の点列として把握するため、主成分分析 (PCA) を行った。141 の細菌属の存在比率に対応する特徴量を用い、PCA を行った結果を図 3 に示す。この解析においては 41 本の PC 軸が得られた。PCA のプロットから、歯周病罹患者疾患進行部位由来サンプルの P02 と P21 の細菌叢が他のサンプルの細菌叢と傾向が異なることが示された。PC1, PC2

のそれぞれの軸に対し大きな寄与率を持つ細菌属は、これらのサンプルに特異的な細菌属であり、PCA による解析においてはサンプル間での差に注目してしまうような結果となった。他の PC 軸 (図 4, 図 5) についても同様の結果となり、今回の PCA プロットからは、健常者と歯周病罹患者、あるいは疾患進行部位と疾患停滞部位に特徴的な細菌属を特定することはできなかった。

3.3 正準判別分析 (CDA)

多次元空間上の点列として表現されている各サンプルについて、歯周病罹患者の疾患進行部位、疾患停滞部位、健常者のラベルを考慮した上で、歯周病罹患者の疾患進行部位と疾患停滞部位、罹患者と健常者の 3 群に分割するような平面を探索するため、正準判別分析 (CDA) による解析を行った。PCA と同様に、141 の細菌属の存在比率に対応する特徴量を用い、CDA を行った結果を図 6 に示す。歯周病罹患者の疾患進行部位、疾患停滞部位、健常者のグループにおいて、一部他グループに誤分類されるサンプルが見られたが、疾患進行部位と疾患停滞部位、罹患者と健常者を判別するような 2 平面が得られた。

疾患進行部位、疾患停滞部位を大きく分割する LD1 平面に関しては *Tetragenococcus* 属が正方向に、*Carnobacterium* 属が負方向に係数が大きかった。健常者と歯周病罹患者を大きく分割する LD2 平面に関しては *Lachnoanaerobaculum* 属が正方向に、*Corynebacterium* 属が負方向に係数が大きかった。

4. 考察

4.1 細菌叢のサンプル間差異

属レベルでの細菌叢解析および PCA から、ヒト口腔内の細菌叢は健常者、歯周病罹患者の疾患進行部位、疾患停滞部位等での差異よりも、個人差の方が大きいことが示唆された。今後の解析においては、各サンプル間での差異が大きいものに関しては解析から除く必要があるかもしれない。また Socransky らの研究 [5, 6] において歯周病罹患者に特徴的とされていた *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella forsythia*, *Treponema denticola* の 3 種については、一部の罹患者サンプルで多く検出されたものの、サンプル毎に精査した場合には、健常者にも罹患者にも存在しており、それらの存在比率の傾向が各グループで異なるということもなかった。

4.2 CDA おいて係数の大きかった細菌属

CDA による解析 (図 6) から、疾患進行部位、疾患停滞部位を大きく分割する LD1 平面に関しては正方向に *Tetragenococcus* 属、負方向に *Carnobacterium* 属の係数が大きかった。*Tetragenococcus* 属は塩耐性の運動性のない細菌群であり、一部は糖を分解し乳酸を生成する生態をも

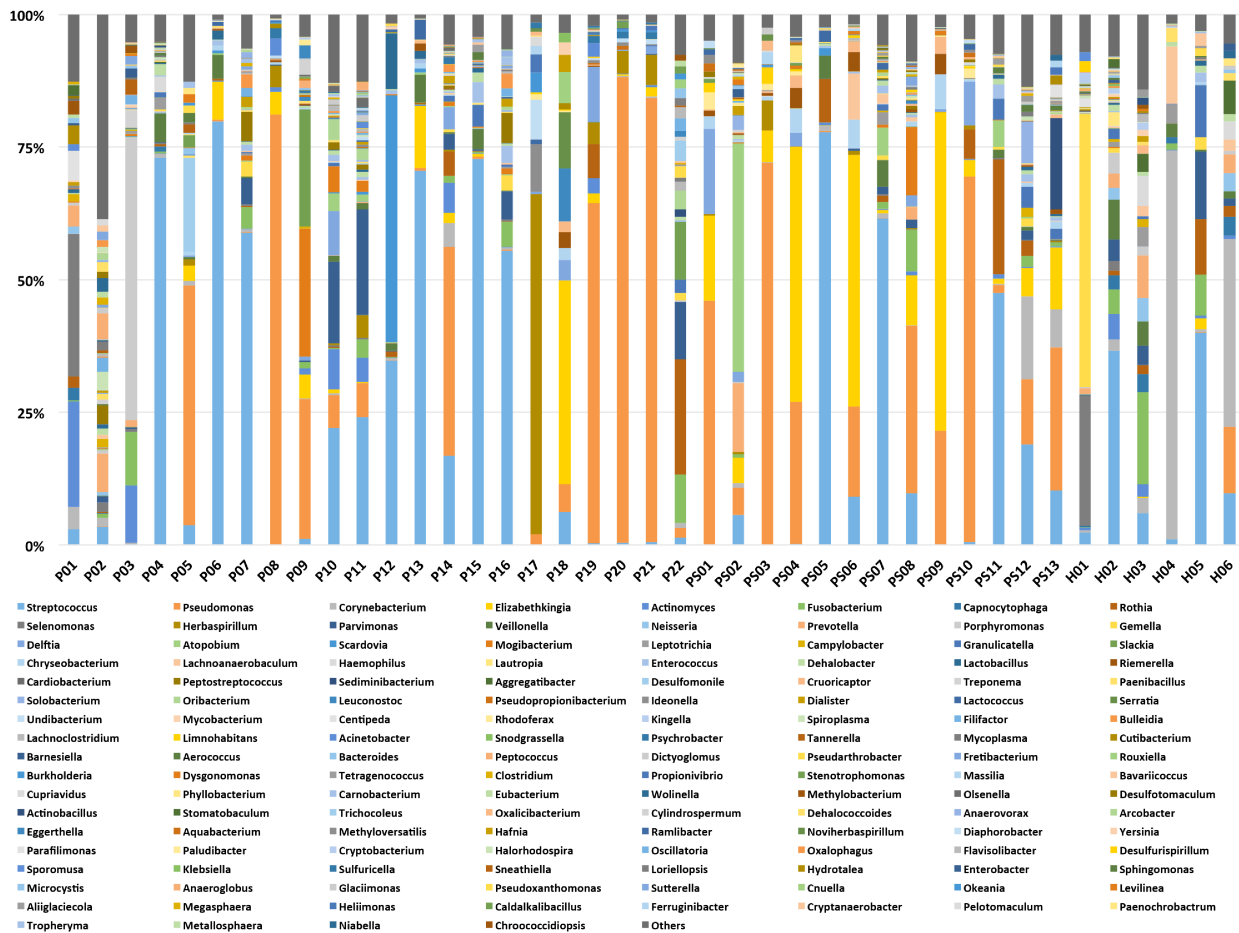


図 2 各サンプルの属レベルでの細菌叢解析結果。

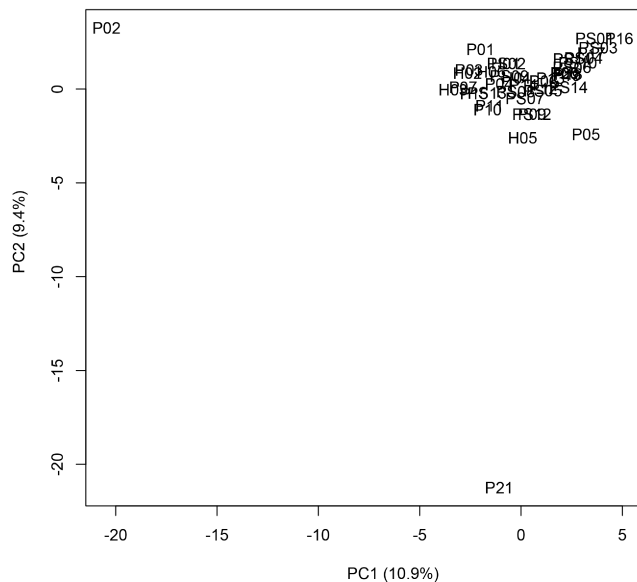


図 3 属レベルでの細菌叢解析結果から描画した PC1 軸, PC2 軸についての PCA プロット。() 内は寄与率を表す。

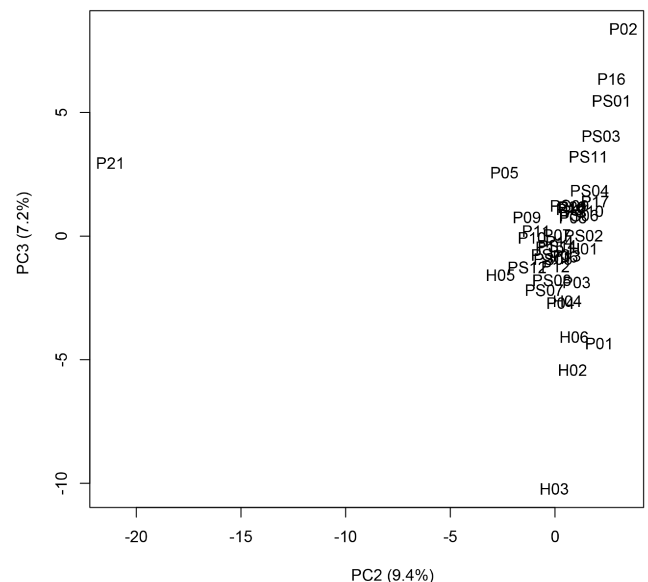


図 4 属レベルでの細菌叢解析結果から描画した PC2 軸, PC3 軸についての PCA プロット。() 内は寄与率を表す。

つ細菌属である [16]. 一方, *Carnobacterium* 属はアミノ酸を分解し食肉を腐敗させる細菌として知られている [17]. LD1 平面の結果は, 疾患停滞部においては, 歯肉からの出

血による塩濃度の変化に耐えながら, 食物の糖を分解する細菌が特徴的となる一方で, 疾患進行部位においては, 歯肉や血液を養分とする細菌が特徴的となることを示唆して

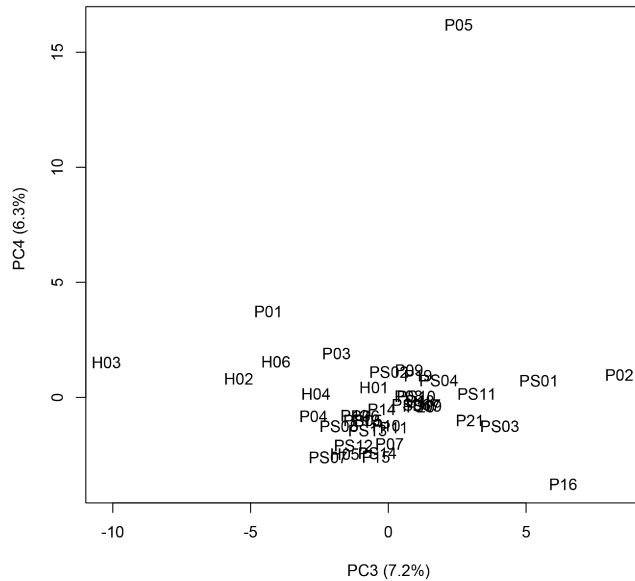


図 5 属レベルでの細菌叢解析結果から描画した PC3 軸, PC4 軸についての PCA プロット。() 内は寄与率を表す。

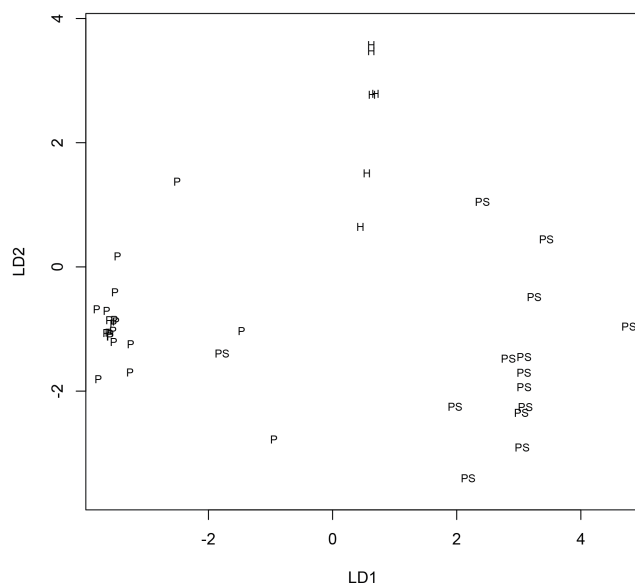


図 6 歯周病罹患者の疾患進行部位由来サンプルを P, 疾患停滞部位由来サンプルを PS, 健常者由来サンプルを S としてラベルし, CDA により 3 群を分類する平面を探索した。

いるのかもしれない。

さらに, 健常者と歯周病罹患者を大きく分割する LD2 平面に関しては正方向に *Lachnoanaerobaculum* 属, 負方向に *Corynebacterium* 属の係数が大きかった。 *Lachnoanaerobaculum* 属の細菌は糖を分解し酪酸や酢酸を生成することが知られている細菌である [18]。また *Corynebacterium* 属は糸状菌であり, 歯垢の骨組みとなることが知られている [19]。LD2 平面の結果は, 健常者においては発酵により酸を生成する細菌が存在することで, バイオフィームであ

る歯垢の形成が抑えられている一方で, 罹患者においては, *Corynebacterium* によって 高度に組織化された歯垢が形成されていることを示唆しているのかもしれない。

また興味深いことに, データを利用した 2 つの先行研究においては, これらの細菌属については注目されていない。先行研究においては, 各グループを 1 サンプルとして比較解析を行っている一方で, 本研究においては, 各サンプルを比較解析しており, その結果これらの細菌属が顕在化したのかもしれない。

5. 結論

健常者および歯周病罹患者の疾患進行部位と疾患停滞部位の歯垢由来のメタゲノムサンプルについて, 16S rRNA 配列に着目し, 細菌叢解析と PCA を行った結果, 口腔内細菌叢は健常者と罹患者, 疾患進行部位と疾患停滞部位の差異よりも, 個人差の方が大きいことが明らかとなった。

一方 CDA からは, 健常者と罹患者, 疾患進行部位と疾患停滞部位を分割する平面が得られ, 係数の高い細菌が 3 群の特徴を反映していると思われた。

6. 今後の課題

16S rRNA 配列を用いた細菌叢解析と PCA からは各グループでの共通性や特異性を見出すことはできなかった。CDA からは, 疾患進行部位と疾患停滞部位, 罹患者と健常者を判別する平面と, 各平面に対し判別係数の大きい細菌属が示された。今後は, 得られた平面が他のサンプルも判別可能であるか, また判別係数の大きかった細菌属が他のサンプルを用いても同様の結果となるかを確認したい。さらに, これらの解析により示された結果が合理的であることを歯学の専門家と議論したい。

一方で, ヒト腸内細菌の研究においては, 細菌叢は個人差があるものの, 遺伝子に着目した場合には, 共通した挙動を示すとの例も報告されていることから [20], 今後は遺伝子に着目し, 各グループを特徴づけるような代謝経路を調査する必要があると考えられる。

謝辞 本研究の一部は JST CREST 「EBD: 次世代の年ヨッタバイト処理に向けたエクストリームビッグデータの基盤技術」(課題番号 JPMJCR1303) の支援を受けて行われた。

参考文献

- [1] Whitman WB., Coleman DC., Wiebe WJ. (1998) Prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95(12):6578-83.
- [2] Honda K., Littman DR. (2012) The microbiome in infectious disease and inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 30:759-95.

- [3] Paster BJ., Boches SK., Galvin JL., Ericson RE., Lau CN., Levanos VA., Sahasrabudhe A., Dewhirst FE. (2001) Bacterial diversity in human subgingival plaque. *J. Bacteriol.* 183(12):3770–83.
- [4] Dewhirst FE., Chen T., Izard J., Paster BJ., Tanner AC., Yu WH., Lakshmanan A., Wade WG. (2010) The human oral microbiome. *J. Bacteriol.* 192(19):5002–17
- [5] Socransky SS1, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL Jr. (1998) Microbial complexes in subgingival plaque. *J. Clin. Periodontol.* 25(2):134–44.
- [6] Socransky SS., Haffajee AD. (2002) Dental biofilms: difficult therapeutic targets. *Periodontol.* 2000 28:12–55.
- [7] 厚生労働省 平成 23 年 歯科疾患実態調査, <http://www.mhlw.go.jp/toukei/list/62-23.html>
- [8] Teles R., Wang CY. (2011) Mechanisms involved in the association between periodontal diseases and cardiovascular disease. *Oral. Dis.* 17(5):450–61.
- [9] Ali J., Pramod K., Tahir MA., Ansari SH. (2011) Autoimmune responses in periodontal diseases. *Autoimmun. Rev.* 10(7):426–31.
- [10] Bascones-Martinez A., Matesanz-Perez P., Escribano-Bermejo M., Gonzalez-Moles M., Bascones-Ilundain J., Meurman JH. (2011) Periodontal disease and diabetes-Review of the Literature. *Med. Oral. Patol. Oral. Cir. Bucal.* 16(6):e722–9.
- [11] Duran-Pinedo AE., Chen T., Teles R., Starr JR., Wang X., Krishnan K., Frias-Lopez J. (2014) Community-wide transcriptome of the oral microbiome in subjects with and without periodontitis. *ISME J.* 8(8):1659–72.
- [12] Yost S., Duran-Pinedo AE., Teles R., Krishnan K., Frias-Lopez J. (2015) Functional signatures of oral dysbiosis during periodontitis progression revealed by microbial metatranscriptome analysis. *Genome Med.* 7(1):27.
- [13] FASTX-Toolkit, http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/
- [14] Altschul SF., Gish W., Miller W., Myers EW., Lipman DJ. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215(3):403–10.
- [15] Huson DH., Beier S., Flade I., Grska A., El-Hadidi M., Mitra S., Ruscheweyh HJ., Tappu R. (2016) MEGAN Community Edition - Interactive Exploration and Analysis of Large-Scale Microbiome Sequencing Data. *PLoS Comput. Biol.* 12(6):e1004957.
- [16] Just A., Lievens B., Frans I., Marsh TL., Klingenberg M., Michiels CW., Willems KA. (2008) Genetic and physiological diversity of *Tetragenococcus halophilus* strains isolated from sugar- and salt-rich environments. *Microbiology* 154(Pt 9):2600–10.
- [17] Leisner JJ., Laursen BG., Prvost H., Drider D., Dalgaard P. (2007) *Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods *FEMS Microbiol. Rev.* 31(5): 592–613.
- [18] Hedberg ME., Moore ER., Svensson-Stadler L., Hrstedt P., Baranov V., Hernell O., Wai SN., Hammarström S., Hammarström ML. (2012) *Lachnoanaerobaculum* gen. nov., a new genus in the *Lachnospiraceae*: characterization of *Lachnoanaerobaculum umeaense* gen. nov., sp. nov., isolated from the human small intestine, and *Lachnoanaerobaculum orale* sp. nov., isolated from saliva, and reclassification of *Eubacterium saburreum* (Prevot 1966) Holdeman and Moore 1970 as *Lachnoanaerobaculum saburreum* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62(Pt 11):2685–90.
- [19] Mark Welch JL., Rossetti BJ., Rieken CW., Dewhirst FE., Borisy GG. (2016) Biogeography of a human oral microbiome at the micron scale. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113(6):E791–800.
- [20] Kurokawa K., Itoh T., Kuwahara T., Oshima K., Toh H., Toyoda A., Takami H., Morita H., Sharma VK., Srivastava TP., Taylor TD., Noguchi H., Mori H., Ogura Y., Ehrlich DS., Itoh K., Takagi T., Sakaki Y., Hayashi T., Hattori M. (2007) Comparative metagenomics revealed commonly enriched gene sets in human gut microbiomes. *DNA Res.* 14(4):169–81.