

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301  
 研究種目：若手研究  
 研究期間：2020～2023  
 課題番号：20K18799  
 研究課題名（和文）メタゲノム解析による口腔疾患の家族内集積の解明

研究課題名（英文）hi000;

研究代表者

後藤 まき（Goto, Maki）

東北大学・東北メディカル・メガバンク機構・助教

研究者番号：20771108

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000 円

研究成果の概要（和文）：唾液・歯垢サンプルにおけるDNA抽出の条件検討では、これまで報告されているいずれの方法を用いても唾液サンプル中から十分な量のヒトゲノムを除去することはできなかった。しかし、歯垢サンプルでは元々のヒトゲノムの混入率が低く（40%ほど）ショットガン解析で十分な量の細菌ゲノムのデータを得られると考えられたため当初の予定を変更して歯垢サンプルのみを用いてショットガン解析を行うこととした。ヘプタファミリー20家族とヘプタファミリーではないが三世代は揃っている（祖父母のいずれかが欠けている）40サンプル、合計180人分の歯垢サンプルからDNAを抽出し、ライブラリ作製およびショットガンシーケンシングを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって明らかになる口腔内細菌の垂直感染に関する解析により、う蝕や歯周病が家族内集積を引き起こすメカニズムの一端が明らかになる。細菌叢の遺伝子構造が後の世代のう蝕および歯周病の診断マーカーとして応用されることが期待されるため、早期から将来的な病態や予後を把握することが可能になる。また、口腔内細菌を標的とした口腔内疾患の治療法や予防法の開発にもつながることが期待される。この分野における研究および医療が大いに前進することとなり、本研究が与える科学的インパクトは非常に大きい。

研究成果の概要（英文）：In examining the conditions for DNA extraction from saliva and dental plaque samples, it was impossible to remove a sufficient amount of human genome from saliva samples using any of the previously reported methods. However, since the contamination rate of the original human genome in the dental plaque samples was low (about 40%), and it was thought that a sufficient amount of bacterial genome data could be obtained by shotgun analysis, we decided to change our original plan and perform a shotgun analysis using only the dental plaque samples. DNA was extracted from a total of 180 dental plaque samples from 20 heptafamily families and 40 samples that were not heptafamily but had three complete generations (one of the grandparents was missing), and libraries were prepared and shotgun sequencing was performed.

研究分野：生化学

キーワード：メタゲノム 歯科 う蝕 歯周病

## 1. 研究開始当初の背景

う蝕および歯周病は有病率が非常に高く、歯の喪失による QOL 低下の主たる原因であるため、口腔内ケアによるその改善が強く求められている。一方、家族内に集積するう蝕や歯周病が存在し、通常の口腔内ケアでは改善できない重篤な症状を呈することも分かっている。近年、口腔内細菌叢がう蝕および歯周病発症に関与する可能性が注目を浴びていることから、申請者は、家族内で集積しているう蝕や歯周病では、家族内で共有している口腔内細菌叢がその病態に影響している可能性を考えた。そこで本研究では、東北大学東北メディカル・メガバンク機構のコホート事業の一環として収集してある三世代家族(祖父母、父母、子)の口腔内検体(唾液および歯垢)にメタゲノム解析を行い、口腔内所見との関連を検討する。この解析により家族内で水平または垂直に伝播する口腔内疾患に関連する細菌を同定する。さらには、同定した細菌の分子生物学的解析を行い、口腔内疾患に関わる分子機構を解析する。本研究により、口腔内疾患の早期予測が可能となり、また、口腔内細菌を標的とした口腔内疾患予防法の開発につながることを期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究によって明らかになる口腔内細菌の垂直感染に関する解析により、う蝕や歯周病が家族内集積を引き起こすメカニズムの一端が明らかになる。細菌叢の遺伝子構造が後の世代のう蝕および歯周病の診断マーカーとして応用されることが期待されるため、早期から将来的な病態や予後を把握することが可能になる。また、口腔内細菌を標的とした口腔内疾患の治療法や予防法の開発にもつながることが期待される。

## 3. 研究の方法

(1) 東北大学東北メディカル・メガバンク機構にて収集した口腔内サンプルを解析に適用するために条件検討を行う。

唾液および歯垢サンプルの DNA 抽出の条件検討

ヒト検体での全ゲノムショットガンシーケンス解析では、宿主であるヒトのゲノムが大量にコンタミしていることで、含まれている細菌ゲノムのリードが十分に得られないことがある。Nelson ら (Cell Rep. 2019) の報告を元に、効率的にヒトゲノムをあらかじめ除去する条件を検討する。また、採取された DNA の純度・濃度がシーケンスの基準に合うことを確認する。

DNA 濃度測定およびシーケンスの条件検討 東北大学東北メディカル・メガバンク機構では NovaSeq のシーケンサーが常備されている。得られた DNA 量と機器とを考慮に入れて、シーケンスのプロトコルを設定する。

(2) ヘプタファミリーにおける細菌叢の解明

ヘプタファミリーのサンプル(20 家族×7 人)から DNA を抽出し、ライブラリー調製した後にシーケンスを行う。

シーケンスデータの解析

データのクオリティチェックを行い、クオリティ値の低いリード、Duplicated リード、ヒトゲノム由来リードを除去する。そこで得られた高クオリティのリードをアセンブリし、遺伝子配列を情報学的に予測することでゲノム配列にコードされている 遺伝子配列を得る。お互いに高い配列相同性(塩基配列:通常 95%以上)をもつ遺伝子群を同一遺伝子として定義し、予測された全遺伝子をクラスタリングする。その後 KEGG などのデータベースを使用して、機能のアノテーションを行う。特に本研究では 病原因子などの特定の遺伝子群に着目するため、遺伝子群専用のデータベースを使用することも考慮に入れる。また、家族内集積を解析するため、同居の有無も重要な要素として考慮に入れる。

## 4. 研究成果

唾液および歯垢サンプルにおける DNA 抽出の条件検討では、これまで報告されているいずれの方法を用いても唾液サンプル中から十分な量の人のゲノムを除去することはできなかった。一方で、歯垢サンプルでは元々のヒトゲノムの混入率が低く(40%ほど)ショットガン解析で十分な量の細菌ゲノムのデータが得られると考えられたため、当初の予定を変更して歯垢サンプルのみを用いて全ゲノムショットガン解析を行うこととした。

ヘプタファミリー20 家族とヘプタファミリーではないが三世代は揃っている(7 人のうち祖父

母のいずれかが欠けている ) サンプル合計 180 人分の歯垢サンプルから DNA を抽出し、ライブラリ作製およびクオリティチェックの後にショットガンシーケンスを行った。その中からサンプルあたり 1,000 万リードのデータ量を得られたサンプルで歯科検診データと合わせて今後解析を進める予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1 . 発表者名 Maki Goto
2 . 発表標題 Optimization for the Method of Metagenomic Analysis of Saliva and Plaque Samples.
3 . 学会等名 The 9th International Orthodontic Congress ( 国際学会 )
4 . 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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