

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K11550

研究課題名(和文) 口腔マイクロバイームとヒトの相互作用による疾患の発症機序の解析

研究課題名(英文) Elucidating the pathogenic mechanisms of systemic diseases associated with oral microbiome

研究代表者

齋藤 さかえ (Saito, Sakae)

東北大学・未来型医療創成センター・講師

研究者番号：20335491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：口腔マイクロバイームは宿主の代謝や免疫などに影響し、健康や全身性疾患の発症および進行と密接に関連している。本研究では、口腔マイクロバイームが糖尿病および動脈硬化症の発症にどのように関連しているのかを明らかにすることを目的とし、東北メディカル・メガバンク計画のコホート調査で収集された口腔検体を用いて解析を行った。健常群、高血糖群、高コレステロール群、高血糖/高コレステロール群の4群で16SリボソームRNA遺伝子解析および細菌数の定量を行い、唾液の微生物叢の組成の違いを明らかにした。また、高血糖および高コレステロールで存在量が変化する微生物種をそれぞれ9種類および6種類見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトマイクロバイームは地域や生活習慣によって構成が異なることが報告されており、日本人集団のマイクロバイームの特徴を明らかにすることは、疾患の地域差の理解や個別化予防へつながる有用な取り組みである。本研究の成果として、唾液から高血糖および高コレステロールに関連するバイオマーカー候補が明らかになったことにより、マイクロバイームを標的としたリスク因子の同定や、新しい治療法および予防法の開発につながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：The oral microbiome is closely linked to the triggering, development, and progression of systemic diseases by affecting host metabolism and immunity. The aim of this study was to elucidate the mechanisms of the pathogenic interaction between host and oral microbiome in diabetes and arteriosclerosis. We approached the oral microbiome profiling by using saliva biospecimens collected in the Tohoku Medical Megabank (TMM) cohort studies. Through 16S rRNA gene sequencing analysis and 16S absolute quantification of 200 participants, we showed differences in the microbial composition of saliva between hyperglycemia and healthy groups, and between hypercholesterolemia and healthy groups. We also found that 9 and 6 microbial taxa indicated significant change of abundance in hyperglycemia group and hypercholesterolemia group, respectively.

研究分野：分子生物学

キーワード：マイクロバイーム

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ヒトの体には数百兆個の微生物（主に細菌）が生息しているといわれ、その数は体を構成しているヒト細胞の数を一桁も上回る。近年の大量並列シーケンス技術の普及によって、微生物の集団（微生物叢）から抽出したゲノム DNA の配列を大量に解読することが可能になり、ゲノム配列からどのような微生物がどのくらい存在するのかを網羅的に同定するマイクロバイーム解析が盛んに行われるようになった。その結果、体内の微生物が炎症や免疫系など人体の仕組みと密接に相互作用していることが明らかになり、これまでの研究で自己免疫性疾患（アレルギー、1 型糖尿病、関節リウマチ）、2 型糖尿病、動脈硬化症、脂肪肝・肝がん、神経系疾患（自閉症、パーキンソン病）、呼吸器疾患（慢性閉塞性疾患）など数多くの疾患にマイクロバイームが関与していることが報告されている。

(2) 東北メディカル・メガバンク（TMM）計画は、宮城県と岩手県をあわせて 15 万人の国内最大級のゲノムコホートを構築しており、健康調査と同時にコホート参加者から提供された生体試料を用いて大規模なゲノム・オミックス解析を遂行している。健康調査の基本内容は、血液・尿の検体検査および生活習慣、食習慣、メンタルヘルス等についての質問票であり、これに加えて、県内に設置された地域支援センターにおいて詳細な検査を行う。東北大学では、詳細調査の項目のひとつとして、歯科医師による歯科検診と口腔マイクロバイーム解析のための検体の採取を実施してきた。これらの歯科データは、健康調査やゲノム・オミックス解析の情報と紐づいており、口腔マイクロバイームと全身状態との相関を多角的に解析することのできる重要な研究基盤である。

### 2. 研究の目的

(1) ヒトマイクロバイームは様々な全身性疾患との関連から、新しいバイオマーカーや治療標的として注目されている。ヒトと微生物はそれぞれの遺伝的要因と環境要因が互いに影響し合う複雑な関係にあり、マイクロバイームを標的とした治療開発のためには、微生物叢と宿主との相互作用や疾患発症のメカニズムを明らかにすることが重要な課題となっている。

(2) 本研究では、口腔マイクロバイームの糖尿病および動脈硬化症の発症への影響を明らかにすることを目的とし、TMM コホートの参加者より選択した健常群、高血糖群、高コレステロール群、高血糖/コレステロール群の 4 群について唾液マイクロバイーム解析および細菌数の定量を行い、日本人の口腔内微生物叢のプロファイルを明らかにした。また、健康調査やゲノム・オミックス解析の情報を参照し、相関解析により疾患に関連する因子の探索を行った。

### 3. 研究の方法

(1) TMM コホートのベースライン調査では、2013 年 10 月から 2016 年 5 月の間に参加者約 2 万 5 千人から同意を得て口腔検体（唾液、歯垢、舌苔）を採取し、バイオバンクに保管している。唾液を採取したコホート参加者のうち 50~75 才の男女で、ヒトゲノム配列情報（末梢血由来 DNA を用いた全ゲノムシーケンスもしくはマイクロアレイ解析のデータ）および血漿メタボローム情報が提供されている参加者を解析の対象とした。生理学検査情報をもとに、検査値が基準値（血中グルコース濃度；空腹時 109 mg/dL 以下、総コレステロール；219 mg/dL 以下）の範囲内にある参加者を健常群とし、高血糖群、高コレステロール群、高血糖/コレステロール群の 4 群についてそれぞれ 50 人ずつ、計 200 人を選択した。

(2) 200 人の唾液検体から DNA を抽出し、マイクロバイーム解析を行った。マイクロバイーム解析についてはショットガンシーケンスを検討したが、唾液由来 DNA にヒトゲノム DNA の混入率が高かったため、16S リボソーム RNA 遺伝子解析（V3-V4 領域）によって微生物の種類および割合など構成を明らかにした。

(3) 疾患と微生物叢との相互作用には、微生物種の相対存在量比の変化だけでなく絶対数の増加が影響を及ぼす例が報告されている。唾液中に存在する細菌の絶対数の変化を明らかにするため、16S リボソーム RNA 遺伝子の可変領域（V4 領域および V6 領域）の配列を用いたデジタル PCR によるコピー数測定の手法を新たに構築した。

### 4. 研究成果

(1) TMM コホートのベースライン調査において歯科検診および口腔検体の採取を行った参加者のべ 25,101 人（男性 33.6%、女性 66.4%、平均年齢 54.9±15.1）のうち、50~75 才の参加者は 15,548 人（男性 31.7%、女性 68.3%）であり、この中から健常群、高血糖群、高コレステロール群、高血糖/コレステロール群を各 50 人ずつ選択した。検体の選択には、検体採取時の生理学検査のデータを用いるとともに、2017 年 6 月から 2021 年 3 月に行った詳細二次調査（追跡調査）

のデータを参照し、2回の調査で共通して血中グルコースもしくは総コレステロールの高い/低い参加者を優先的に選択し、解析の対象とした。

(2) 唾液検体より抽出したDNAから16S rRNA遺伝子の可変領域(V3-V4領域)をPCR増幅し、次世代シーケンサーMiSeqを用いて配列を解析した。クオリティフィルタリング後に1万リード以上のデータが得られた検体を用いて151種類のASV (amplicon sequence variant)を同定し、16S rRNA遺伝子データベースGreengenesを用いてそれぞれのASVについて微生物種の推定を行った。解析の結果、唾液では口腔内の常在菌として知られる*Neisseria*属、*Fusobacterium*属および*Prevotella*属が優勢であり、相対存在量比が平均10%以上あることがわかった。微生物叢の $\alpha$ 多様性は、健常群、高血糖群、高コレステロール群、高血糖/コレステロール群を比較して有意な差は見られなかった。

(3) 唾液マイクロバイオームのデータを用いた相関解析を行い、血中グルコース濃度および総コレステロール量と関連のある微生物を同定した。

*Lachnospiraceae*科の細菌属、*Desulfovibrio*属は血中グルコース濃度の高い参加者の唾液において相対存在量比が高く、*Granulicatella*属はグルコース濃度が低い参加者で高くなる傾向が見られた(図1)。16SリボソームRNA遺伝子解析は、シーケンスにより得られる配列情報が短く、属、種レベルの分類階級の推定が困難なASVが見られる。これらの分類種については、一部の検体で実施したショットガンシーケンスのデータを用いて詳細解析を進めている。総コレステロール量との関連では、*Fusobacterium*属および*Leptotrichiaceae*科の細菌属が総コレステロールの高い参加者の唾液で相対存在量比が高く、GN02/BD1-5 (*Candidatus Gracilibacteria*)が総コレステロールの低い参加者で高くなることが示された(図2)。

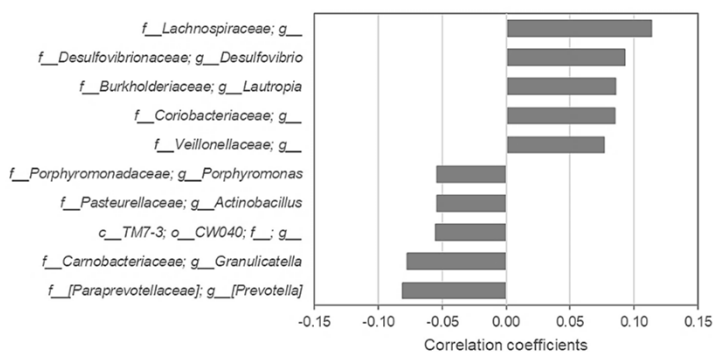


図1. 血中グルコース濃度と相関する唾液中の微生物分類種

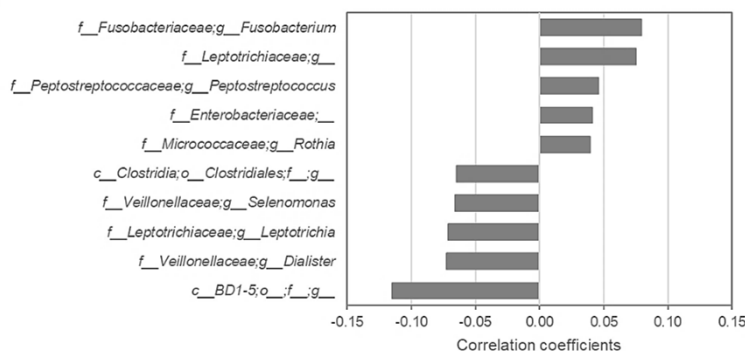


図2. 総コレステロール値と相関する唾液中の微生物分類種

(4) 微生物叢における細菌の絶対数の変化を明らかにするため、デジタルPCRにより16SリボソームRNA遺伝子コピー数を測定した。154検体を測定し、唾液由来DNA 2 pg中に最大約3000コピーの遺伝子を検出することができた。コピー数について、健常群、高血糖群、高コレステロール群、高血糖/コレステロール群の4群を比較して有意な差は見られなかった。

(5) 解析の対象とした200人について、東北メディカル・メガバンク機構より分譲されているデータを参照し、HbA1c、LDLコレステロール、BMI(肥満指数)、血圧、歯科所見等の検査値および既報のある疾患リスク変異の有無を確認した。これらのデータをもとに、高血糖群から糖尿病およびその疑いのある8人、高コレステロール群から高コレステロール血症およびその疑いのある13人を選択し、16SリボソームRNA遺伝子コピー数を考慮した微生物叢プロファイルを健常群と比較した。解析の結果、糖尿病で存在量が変化する微生物を9種見出し、その中には肥満や高血糖との関連が示唆されている*Lachnospiraceae*科の細菌種や、硫酸還元菌として知られる*Desulfomicrobium*属の*D. orale*などがあつた。また、高コレステロール血症で存在量が変化する微生物を6種見出し、*Fusobacterium*属や*Dialister*属の細菌種などが含まれていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 齋藤さかえ、清水律子	4. 発行年 2023年
2. 出版社 先端学術社	5. 総ページ数 6
3. 書名 Microbiome Science Vol.2 No.2 口腔内細菌叢の破綻と全身疾患のかかわりを捉える「大規模ゲノムコホート調査でマイクロバイオームを標的とした疾患研究の基盤を築く」	

〔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
---------	---------