

令和 6 年 6 月 24 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16985

研究課題名（和文）歯周病原株の全遺伝子解読とヒト遺伝要因の統合解析 シングルセルとエクソーム解析ー

研究課題名（英文）Whole Genome Sequencing of Periodontal Pathogenic Strains and Integrated Analysis of Human Genetic Factors: Single-Cell and Exome Analysis

研究代表者

須藤 毅顕（Sudo, Takeaki）

東京医科歯科大学・統合教育機構・特任講師

研究者番号：10821168

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、微生物シングルセルゲノム解析で歯周炎患者と健常者の遺伝子の違いを比較し、歯周炎特異的な細菌を特定することを目的とした。16S rRNA解析で、歯周炎患者からred complexが高頻度で検出された。次世代シーケンサーで取得した384 SAGsのうち、健常者サンプルは低品質なデータが多く、歯周炎患者に絞った追加解析で高品質なドラフトゲノムを得た。同一株由来のSAGsを統合したccSAG解析も実施し、結果を論文として報告予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、シングルセルゲノム解析を用いて歯周病特異的な細菌を特定するものであり、口腔内細菌、特に歯周病原細菌に対するシングルセル解析が少ない中で貴重なデータを提供する。健常者と比較して歯周炎患者のサンプルから高品質なドラフトゲノムを得ることで、歯周病の理解と治療に新たな知見をもたらした。特に、red complexの検出頻度の差や高品質なSAGsの取得は、今後の研究や治療法開発に重要な基盤を築いた。本研究は、歯周病の早期診断や治療法開発における基盤を築き、個別化医療の推進に寄与する。これにより、歯周病の発症メカニズムの解明や新しい治療戦略の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to identify periodontitis-specific bacteria by comparing the genetic differences between periodontitis patients and healthy individuals through single-cell genome analysis of microorganisms. 16S rRNA analysis revealed a high frequency of the red complex in periodontitis patients. Among the 384 SAGs obtained with next-generation sequencing, many low-quality data were found in the samples from healthy individuals. Additional analysis focusing on periodontitis patients yielded high-quality draft genomes. ccSAG analysis, which integrates SAGs derived from the same strain, was also conducted. The results will be reported in a forthcoming paper.

研究分野：歯科データにおける機械学習

キーワード：シングルセルゲノム解析 メタゲノム解析 歯周炎

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

歯周病は、細菌に対する免疫炎症反応により歯周組織破壊が引き起こされる慢性炎症疾患である。申請者はこれまで、疾患の原因遺伝子に着目し、エクソーム解析により NOD2 遺伝子内に侵襲性歯周炎の新規遺伝子変異を同定し、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) の大規模コンソーシアムに参画し歯周病感受性遺伝子を報告した。しかし、歯周疾患進行の個体差を把握するには、個体の遺伝子に加えて口腔内細菌解析の必要性が生じた。近年、微生物シングルセルゲノム解析 (SAG-gel) が開発され、細菌一つ一つの全長遺伝子を個別に解析できるようになった。本研究では、口腔内細菌に対し微生物シングルセルゲノム解析を用いた細菌個別解読を行い、宿主の遺伝的背景と関連した原因細菌の遺伝情報を明らかにすることで、歯周炎発症メカニズムの本質的解明を目指す。

歯周病は口腔内細菌による炎症性疾患であり、宿主の遺伝因子と細菌環境因子の集積によって生じる多因子疾患である。申請者はこれまで、侵襲性歯周炎の低罹患率と家族集積性に着目し、次世代シーケンサーを用いた全エクソーム解析で原因候補遺伝子 (NOD2) を絞り込むことに成功した。また、国際共同研究プロジェクト GRIDE コンソーシアムにおける大規模 GWAS により、歯周病原因遺伝子 (SIGLEC5) を同定した。しかし、NOD2 変異はすべての侵襲性歯周炎患者に認められるわけではなく、GWAS で同定された遺伝子多型 (SNP) も発症要因の一部しか説明できないため、歯周病の進行には遺伝要因だけでなく環境要因である口腔内細菌との統合的理解が必要であると考えた。

現在、細菌叢解析では 16S アンプリコン解析やショットガンメタゲノム解析が主流であるが、口腔内における歯周病特異的細菌叢の報告は少ない。その背景には、既存の解析手法ではデータベースに存在しない細菌を同定できないことや、近縁種や個別の細菌の役割が全体像に隠れてしまい解析できないことがある。疾患や原因遺伝子の有無と相関のある細菌学的特徴を見出すためには、種レベルよりも深い株レベルでの詳細な細菌解析が必要である。近年開発された SAG-gel を用いることで、細菌一つ一つの全長遺伝子を個別に解析し、細菌の個体差を遺伝子レベルで解析することが可能となった。本研究は、こうした手法を活用して歯周病のメカニズムを解明するものである。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、口腔内細菌の微生物シングルセルゲノム解析とヒト遺伝子のエクソーム解析を用いて、歯周病に関与する個々の微生物が持つ遺伝子を株レベルで明らかにし、疾患進行を決定づける細菌因子とヒト遺伝的要因を解明することである。また、細菌全遺伝子の解析から、その個別の機能メカニズム解明も目指す。

従来のシングルセル解析は宿主細胞の RNA シークエンス報告がほとんどであり、微生物シングルセル解析では細菌の塊から細菌一つ一つにばらし、個々の細菌ごとに全ゲノムを解析できる。本研究では、共同研究先の bitBiome 社が開発した世界唯一の解析手法である微生物シングルセルゲノム解析を用いる。

歯周病罹患者の口腔内から数多く検出される Red Complex (*P. gingivalis*, *T. forsythia*, *T. denticola*) は疾患発症と関係していると考えられてきたが、*P. gingivalis* は健康な口腔内からも検出され、機能差異が存在する可能性が示唆されている。微生物シングルセル解析により、細菌の正確な全長 DNA 配列を決定し、株レベルでの細菌の個体差を見出すことで、未知の新規歯周病源細菌を発見する可能性も高い。

さらに、歯周病に罹患した同一部位における 16S アンプリコン解析と微生物シングルセル解析を行い、全体像の把握と個別の細菌機能を統合した解析を行う。ヒトエクソーム解析も併用し、宿主の遺伝的要因と細菌叢との関連も探索する。

本研究の創造性は、ヒトのゲノム配列の相違を疾患の有無との相関ではなく、細菌叢の微細な相違との相関で解析する点にある。また、新規解析技術であるシングルセルゲノム解析を口腔内細菌に応用することで、株レベルの微細なゲノム解析を実現し、歯周病が進行しやすい菌株の早期発見のバイオマーカーとして期待できる。新規細菌の同定は公共データベースの拡充につながり、今後の細菌叢解析の発展にも寄与することを目指す。

### 3. 研究の方法

**口腔内細菌およびヒト DNA のサンプリング**

初年度には慢性歯周炎患者および侵襲性歯周炎患者の重症部位と健常者の健常部位の 6 サンプルずつの細菌解析、およびエクソーム解析を行う予定である。倫理審査委員会の許可のもと、東京医科歯科大学歯学部附属病院に通院中で書面にて同意を得た患者より、歯肉溝内の口腔内細菌をペーパーポイントにて採取する。末梢血採血からヒト DNA 抽出を行う。

#### ヒト DNA の全エクソーム解析

1) ライブラリ作成、シーケンスによる塩基配列の取得

次世代シーケンサーは Ion Chef、シーケンスは Ion Proton を用いる。塩基配列データを取得した後、Torrent Suite ソフトウェアによる変異検出を行う。

2) バイオインフォマティクス解析による罹患者共通の変異の絞り込み

得られた 1 サンプル当たり数万の変異を統合し、下記のフィルタリングを行う。( 1 ) 低 depth 変異の除去、( 2 ) Insertion/deletion の除去、( 3 ) 罹患者に共通した変異以外の除去、( 4 ) 同義置換の除去、( 5 ) 公共データベース (Human Genetic Variation Browser、1000-genome database、NHLBI Exome Sequence Project ) に登録され頻度 1%以上のコモンバリエーションの除去。絞り込まれた変異の確認をサンガーシーケンス法にて行う。

#### 微生物 DNA のマイクロバイオーム解析

マイクロバイオーム解析のライブラリ調整、シーケンスは、bitBiome 社の機材を用いる。

16S アンプリコン解析の流れ

菌種数の推定を OTU(Operational taxonomic units)解析、群内多様性( 多様性)を Shannon Index、群間多様性( 多様性)を主座標分析により行う。16S アンプリコン解析にて細菌叢の構成が異質でないことを既知のデータベースにて評価する。

( データ解析用ツール : QIIME2、R )

ペアエンドリードのマージ、リードのクオリティフィルタリング、アダプター・プライマー配列の除去、キメラ配列の除去、配列クラスタリング、データベースに対する配列相同性検索および系統アノテーション

シングルセル解析の流れ ( 以下、()は使用するソフトウェア名 )

de novo アセンブリでゲノム再構築し、公共データベースを用いて構造および機能のアノテーション、オーソログ分類を行い個々のサンプルに含まれる細菌株の全ゲノムの解読および新規細菌株の有無を評価する。

de novo アセンブリ (SPAdes)、アノテーション付与・系統分類 (GTDB)、完全性と冗長性の確認 (CheckM)、contig 精度の解析 (QUAST)、ドラフトゲノムの quality 評価 (GSC)

#### 統合解析

エクソーム解析、マイクロバイオーム解析と臨床情報を統合し相関の有無を解析する。

1) 歯周炎と健常者の同一菌種の構造および機能遺伝子の違いを株レベルで比較解析する。

2) エクソーム解析で同定した遺伝子変異有無による細菌の遺伝子組成の評価を行う。

## 4 . 研究成果

研究開始当初は、歯周炎患者 4 名の重症部位と健常者 2 名の健常部位から計 6 サンプルのブランク由来の口腔内細菌を次世代シーケンサーで塩基配列を取得した。16S rRNA 解析では HOMD と SILVA のデータベースを使用し、種レベルまでの微生物系統を調べた。その結果、重度の歯周病に最も関与するとされる red complex の 3 菌種 (Porphyromonas gingivitis、Tannerella forsythia、Toreponema denticola ) はほぼ歯周炎患者でしか検出されなかった。

SAG (Single-cell Amplified Genome) 基本解析では、各サンプルから 384 SAGs を取得し、平均 total Reads は 177.5Mreads、平均 total Length は 26800MbP であった。また、各サンプル 384 SAGs のうち、High Novelty (>50%) は平均 31.3 SAGs、Low Novelty (<=50%) は平均 109.3 SAGs であった。歯周炎患者と健常者の計 6 名の SAG 解析によりユニークな細菌種が 152 種類得られ、そのうち、歯周炎患者 4 名が共有し健常者にはない細菌は 3 種類、歯周炎患者 3 名が共有し健常者にはない細菌は 8 種類、歯周炎患者になく健常者のみが共有する細菌は 10 種類、また 6 名全員が共有する細菌は 1 種類であった。

当初の計画では、歯周炎患者由来の SAG と健常者由来の SAG で同一菌種の株レベルの違いを比較する予定であったが、健常者由来のサンプルでは red complex がほとんど検出されなかった。その原因として、健常者では red complex を含む歯周病原細菌の存在量が少なく、比較可能なほどの細菌 DNA の取得が困難である可能性が考えられた。また、サンプリング手法が確立されていなかったため、サンプル DNA の品質が悪かったことも要因とされた。SAG の品質は完全性や冗長性などから high-quality、medium-quality、low-quality、contaminated の水準に区分されるが、今回の計 6 サンプルのうち 1 サンプルのみ約半分の SAGs が high もしくは medium-quality であり、残りの 5 サンプルは多くが low-quality であった。

そのため、解析データ量を増やすために研究計画を変更し、サンプリング手法を見直した上で歯周炎患者に解析対象を絞り追加のサンプリングを行うこととした。さらに、コロナ禍により本学のバイオリソースセンターによるバイオバンク事業が中断していたことや、侵襲性歯周炎患者の来院患者数が年数名と少ない状況から、当初予定していたヒトゲノムの解析と統合する研究デザインも変更し、歯周炎患者の微生物ゲノム解析に絞った計画とし、倫理審査の修正を行った。

最終年度には、サンプリング方法を改善し、より高品質な SAGs が多く得られるように歯周炎患者に絞って追加で 3 名のサンプリング、シーケンスを実施したところ、前回よりも高品質なドラフトゲノムの取得に成功した。さらに同一患者に対して 16S rRNA 解析とメタゲノムショットガン解析を実施し、従来の細菌叢解析よりもより網羅的なデータの取得と MAG 解析を行った。さらに同一株由来と考えられる SAGs を統合した ccSAG、また SAG と MAG を統合した SAG・メタゲノム統合解析も実施した。

期間内に最終解析まで至らなかったが、今後結果をまとめて論文として報告する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Mikami R, Sudo T, Fukuba S, Takeda K, Matsuura T, Kariya T, Takeuchi S, Ochiai A, Kawamoto S, Toyoshima K, Mizutani K, Arakawa S, Aoki A, Iwata T	4. 巻 21
2. 論文標題 Prognostic factors affecting periodontal regenerative therapy using recombinant human fibroblast growth factor-2: A 3-year cohort study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Regenerative therapy	6. 最初と最後の頁 271-276
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.reth.2022.07.006	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 須藤毅顕, 木下淳博	4. 巻 17
2. 論文標題 歯科衛生士のためのAI・データサイエンス	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本歯科衛生学雑誌	6. 最初と最後の頁 18-23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Divaris K, Haworth S, et al.	4. 巻 10
2. 論文標題 Phenotype Harmonization in the GLIDE2 Oral Health Genomics Consortium	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JOURNAL OF DENTAL RESEARCH	6. 最初と最後の頁 1408-1416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/00220345221109775	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 該当する

1. 著者名 Nagata Y, Watanabe R, et al.	4. 巻 17
2. 論文標題 Targeted deep sequencing analyses of long QT syndrome in a Japanese population	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0277242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0277242	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 須藤毅頭	4. 巻 38
2. 論文標題 回帰分析と傾向スコア解析	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 JOHNS	6. 最初と最後の頁 628-632
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Shiba Takahiko, Komatsu Keiji, Sudo Takeaki, Sawafuji Rikai, Saso Aiko, Ueda Shintaroh, Watanabe Takayasu, Nemoto Takashi, Kano Chihiro, Nagai Takahiko, Ohsugi Yujin, Katagiri Sayaka, Takeuchi Yasuo, Kobayashi Hiroaki, Iwata Takanori	4. 巻 11
2. 論文標題 Comparison of Periodontal Bacteria of Edo and Modern Periods Using Novel Diagnostic Approach for Periodontitis With Micro-CT	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 FRONTIERS IN CELLULAR AND INFECTION MICROBIOLOGY	6. 最初と最後の頁 723821
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcimb.2021.723821	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 須藤毅頭, 芝多佳彦, 駒津匡二, 澤藤りかい, 佐宗亜衣子, 植田信太郎, 渡辺孝康, 根本昂, 加納千博, 長井貴彦, 大杉勇人, 片桐さやか, 竹内康雄, 小林宏明, 岩田隆紀
2. 発表標題 古代人の歯石DNAを用いた江戸時代と現代の網羅的口腔内細菌叢解析
3. 学会等名 第76回日本人類学会大会・第38回日本霊長類学会大会連合大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 太田絵理, 須藤毅頭, 徳永伸一, 中林潤, Heewon Park, 平川晃弘, 木下淳博, 角勇樹
2. 発表標題 臨床検査技師AI教育のためのクラウドコンピューター環境構築
3. 学会等名 第16回日本臨床検査学教育学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 沼沢 益行, 那波 伸敏, 須藤 毅顕, 須永 昌代, 中口 悦史, 中林 潤, 中川 美奈, 木下 淳博
2. 発表標題 全国の医療系大学のIRを支援するデータ分析システムを開発するためのアンケート調査結果
3. 学会等名 第54回日本医学教育学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 刈屋友彰, 須藤毅顕, 三上理沙子, 武田浩平, 福場駿介, 竹内俊介, 落合茜, 川本櫻子, 豊嶋啓汰, 水谷幸嗣, 青木章, 岩田隆紀
2. 発表標題 FGF-2製剤を用いた歯周組織再生療法の臨床的評価 3年後ろ向きコホート研究
3. 学会等名 第65回春季日本歯周病学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 和泉 雄一, 須藤 毅顕, 小林 宏明, 田中 敏博	4. 発行年 2021年
2. 出版社 医歯薬出版株式会社	5. 総ページ数 7
3. 書名 【生活習慣病の克服に向けたゲノム医療-ゲノム医学の進展と精密医療の実現】歯科口腔外科疾患 歯周病のゲノム解析 医学のあゆみ	

〔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
---------	---------