（ 様式D－２ ）
（ 別　　紙 ）

令和４年度　海外派遣研究員研究報告書

令和 6 年 11 月 13 日

日本大学理事長　　殿
日本大学学長　　殿

所　　属　　歯学部　（総合歯学研究所）
資格・氏名　　専任講師・蓮池 聡

■本報告書の内容を公表することは，了承しております。
□本報告書の内容を公表することは，差し控えください。
※いずれかにチェックし（■）提出すること

令和４年度海外派遣研究員（　長期　）の研究実績を，下記のとおり報告いたします。

記

１　区　　分　　長期

２　研 究 課 題

シングルセル解析，空間プロテオミクス解析を用いた歯周病発症メカニズムに関する研究

３　派 遣 期 間　　西暦　2023 年 3 月 29 日 ～ 2024 年 10 月 6 日

４　派　遣　先　　米国

５　研 究 目 的

歯周病は、世界人口の大部分に影響を与える重大な健康課題である。この疾患は慢性の不調整炎症と細菌叢の不均衡によって特徴づけられ、全身疾患との関連が指摘されている。歯周病の複雑な病態メカニズムの解明には、精密医療アプローチと最先端の研究手法を用いた精密医療アプローチの確立が不可欠である。近年、シングルセル・マルチオミクス技術の著しい進歩により、歯周組織におけるシングルセルレベルでの詳細な解析が可能となった。本研究では、この革新的な技術を活用し、ヒト歯周炎罹患組織ならびにマウス歯周炎モデルを対象として、包括的な解析を実施した。また、研究対象を歯周組織から鼻および口腔の粘膜上皮へと拡大し、同一のテクノロジーを利用し、微生物と生体との相互作用を解明した。これらの解析により得られる知見は、歯周組織における宿主-微生物相互作用の理解を深めるとともに、歯周病に対する新たな治療戦略の開発に貢献することが期待される。本研究を通じて、歯周病に対する精密医療の確立に向けた科学的基盤を構築することを目標とする。

（ 様式D-２ ）

６　研　究　概　要

① 研究の方法

まず過去の研究によって得られたヒト歯周組織シングルセル RNAseq データをオープンソースシングルセル分析ツール Cellenics を使用して統合する。このアトラスから得られたデータを基に、ヒト歯周組織におけるそれぞれの細胞の特徴ならびに機能を免疫染色や多重蛍光 in situ ハイブリダイゼーション（FISH），33 種類の抗体を用いた多重蛍光イメージング技術を用いて同定する。さらにシングルセルメタゲノミクスを使用して細胞内に存在する細菌種を特定し、細胞と種類・機能と細菌の相互作用を検証する。得られたデーター Drug2Cell による薬物ターゲット予測分析、CellChat による細胞間相互作用解析、NicheNet によるシグナルパスウェイ解析に用いられた。この検証は歯周組織のみならず、上気道の粘膜組織に対しておこなわれ、顎顔面全体の細胞が、細菌とコミュニケーションをとりながら、歯周病進展に関与していることを解明した。

② 渡航先での活動内容

渡航先の American Dental Association Science and Research Institute（ADA SRI）とペンシルバニア大学歯学部が協力して進めた共同研究では、ペンシルバニア大学歯学部臨床講座から供与されたヒト組織切片を用いて検証を行った。ADA SRI 研究室に配備されている最先端 FISH 装置「RNAscope」と多重蛍光イメージング技術「Phenocycler fusion」を駆使し、シングルセルレベルでのタンパク発現および遺伝子発現の検証を実施。口腔粘膜および上気道粘膜に感染した細菌の検出にも成功した。これらのデータはバージニアコモンウェルス大学情報科学分野の技術支援を受け、細胞間コミュニケーションおよび細胞-細菌間コミュニケーションの解析を行い、新たな生物学的洞察を提供した。

ペンシルバニア大学歯学部から供与されたマウス歯周組織の検証も同様のシステムを用いて行われた。このマウスは歯周病を発症した糖尿病モデルであり、糖尿病が歯周病発症に及ぼす影響とその生物学的メカニズムの検証に焦点を当てた。

シングルセル解析は歯周病研究における新しい手法であり、歯周病動物モデルを用いた研究の現状を把握し、課題を検証するためにレビューを作成。これにより、ヒト歯周病と歯周病動物モデルの生物学的共通点および相違点が明らかになり、将来の研究方向性に対する重要な示唆を提供した。

また歯周病学研究の米国での現状を把握するため、ペンシルバニア大学、ノースカロライナ大学、ハーバード大学、ラトガース大学の歯周病学研究室を訪問し、歯周病研究の展望と教育方法についてディスカッションを行った。

研究の途中経過は 2024 年 3 月にニューオリンズで開催された AADOCR(アメリカ歯科基礎医学会)にてポスター発表し、多くの研究者とディスカッションを行った。

7　研究結果・成果

本研究では、ヒト歯周組織の包括的な理解を目指し、4 つの異なる単一細胞 RNA シーケンシングデータセットを統合し、34 サンプル、約 10 万 6 千個の細胞からなる歯周炎アトラスを作成した。このアトラスでは 32 種類の細胞タイプを同定し、特に上皮細胞については 7 つの異なるタイプに分類することに成功した。このデータは CELLxGENE プラットフォームで公開され、研究コミュニティ全体で利用可能となっている。特に重要な発見として、歯肉角化細胞の新しいサブポピュレーションの同定が挙げられる。歯肉溝上皮細胞と歯肉付着上皮細胞という 2 つの重要な細胞タイプを同定し、これらが KRT19 をマーカーとして発現することを見出した。これらの細胞は健康な状態と疾患状態で異なる遺伝子発現パターンを示し、歯周炎の進行に重要な役割を果たしていることが明らかになった。細菌との相互作用に関する研究では、単一細胞メタゲノム解析を通じて 37 種の細菌種が細胞特異的な親和性を示すことを発見した。特に *Porphyromonas gingivalis* などの歯周病原菌が角化細胞と強い相互作用を示すことが明らかになった。FISH を用いた検証では、これらの細菌が実際に細胞内に存在することを確認した。また、歯周病の進行に伴い、細菌の読み取り数が著しく増加することも示された。免疫応答の空間解析では、33 種類の抗体を用いた多重蛍光イメージング技術を駆使し、免疫細胞の詳細な空間分布を明らかにした。その結果、歯肉付着上皮細胞周辺領域では主に自然免疫系の細胞（好中球やマクロファージなど）が集積し、歯肉溝上皮細胞周辺領域では適応免疫系の細胞（T 細胞や B 細胞など）が多く存在することが判明した。特筆すべきは、歯周炎状態において PD-L1 を介した免疫抑制が観察されたことだ。この発見は、歯周炎における免疫応答の空間的な制御機構の存在を示唆している。

さらに、シングルセルレベルでの宿主-微生物相互作用の解析により、特定の細胞が複数の細菌種と同時に相互作用を持つ「多細菌相互作用」という現象を発見した。この相互作用は、健康な状態でも観察されたが、歯周炎状態でより顕著になることを示した。また、この相互作用は特定のサイトカインの発現パターンと相関していることも明らかになった。これらの知見は、歯周組織における細胞間相互作用の複雑なネットワークを明らかにした。また、細菌との相互作用や免疫応答の制御メカニズムについての新しい知見は、歯周炎の治療戦略の開発に重要な示唆を与えている。具体的には、バイオフィルムの除去、抗菌療法、宿主免疫応答の調節を組み合わせた包括的なアプローチの必要性が示唆された。この結果は Nature communications 誌に掲載された。(Easter et al., 2024)

さらにマウスモデルを用いた検証とレビューも行い、ヒトとマウスの歯周組織における類似点と相違点も明らかにした。これらの結果は、歯周病研究における適切な動物モデル選択の重要性を示している。この成果は現在投稿中である。

〔７　研究結果・成果（つづき）〕

本研究成果は、歯周炎の病態メカニズムの理解を大きく前進させ、新しい治療法開発への道を開くものと期待される。特に、個々の患者の状態に応じた精密医療の実現に向けて、重要な基礎的知見を提供している。

文献

1) Easter, Q. T., Fernandes Matuck, B., Beldorati Stark, G., Worth, C. L., Predeus, A. V., Fremin, B., Huynh, K., Ranganathan, V., Ren, Z., Pereira, D., Rupp, B. T., Weaver, T., Miller, K., Perez, P., Hasuike, A., Chen, Z., Bush, M., Qu, X., Lee, J., . . . Byrd, K. M. (2024). Single-cell and spatially resolved interactomics of tooth-associated keratinocytes in periodontitis. *Nat Commun*, *15*(1), 5016. https://doi.org/10.1038/s41467-024-49037-y

以　上