

学 位 論 文

侵襲性歯周炎患者から分離した血液由来細胞外小胞の プロテオーム解析

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻

病態機構学講座 歯周病態学分野

児玉 加奈子

Proteomic Analysis of Blood-derived Extracellular Vesicles Isolated from Aggressive Periodontitis Patients

Department of Pathophysiology - Periodontal Science,

Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical Sciences, Okayama University

KODAMA Kanako

(令和 6 年 12 月 6 日受付)

緒言

歯周炎は歯周組織に生じる炎症性疾患であり，細菌叢の乱れに加え，宿主の遺伝子型，ストレス，食事，および喫煙などのリスク因子と関連し引き起こされる。中高年期に発症して緩徐に歯周組織の破壊を来たすのみならず，心疾患，神経変性，自己免疫疾患，癌など他の慢性炎症疾患と疫学的に関連している¹⁾。

一方，若年者に発症する歯周炎は，上記の一般的な慢性歯周炎（Chronic Periodontitis：CP）とは異なる病態として捉えられてきた。すなわち，全身的に健康であるにも関わらず10代から30代の若年成人に発症し，少ない細菌性プラークの付着量に比して急速に重度な歯周組織破壊を起こす病態を呈することが報告されてきた²⁾。1999年のアメリカ歯周病学会（AAP）の歯周病分類で，この特異な疾患は侵襲性歯周炎（aggressive periodontitis；AgP）と定義づけられ，日本においても，この分類を基に，日本歯周病学会が発表した歯周病分類システム³⁾が広く使用されてきた。

これまでAgPの病因に関して様々な研究がなされてきたが，未だに統一した見解は得られていない。当初は，AgP患者の歯肉縁下プラークから *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* が高頻度に検出されることから，AgP発症への関与が提唱さ

れてきた⁴⁾。しかし、その後の細菌学研究の技術進歩に伴って、AgP と CP の歯肉縁下細菌叢に有意な差異が無く⁵⁾、さらには地域や人種の違いによって AgP の細菌叢は様々であることが分かってきた⁶⁾。また、AgP の発症は家族内で集積する場合がある⁷⁾ことから、AgP の病因には宿主の生体防御機能や免疫応答の異常などが原因と考えられてきた⁸⁾。そのため、長年にわたって細菌抗原の認識性⁹⁾や炎症性サイトカインの発現や遺伝子の変異^{10,11)}などが調べられてきたが、未だに明確な病因説明が可能とはなっていない。

臨床的にも AgP の診断基準は曖昧で、年齢要素以外に AgP と CP を明確に定義付けることが困難¹²⁾であったため、2018 年の AAP とヨーロッパ歯周病連盟 (EFP) において歯周病分類が再考され、これまでの CP と AgP という分類は廃止され、単一の「歯周炎」としてまとめられた。すなわち、AgP の診断名が削除され、AgP は歯周炎 (ステージ III/IV グレード C) と分類されるようになった^{13,14)}。しかし、日本歯周病学会では、これまでに長年蓄積されてきた臨床上および研究上の貴重な資料を継続的に活用するために、暫間的な対応として、これまでの分類に新分類を併記して用い、今後の新たなバイオテクノロジーを駆使することによって AgP の病態を明らかにすることを目指している¹⁵⁾。

生体の反応は、遺伝子に記録された情報が転写によって mRNA へ、そして翻訳によってタンパク質へと情報の発現によって起こる「遺伝情報の一方向的な流れ」であるセントラルドグマで考えられてきた¹⁶⁾。しかし、近年では RNA 干渉 (RNA interference, RNAi) の発見¹⁷⁾ とそれに続くマイクロ RNA (microRNA, miRNA) の同定¹⁸⁾ によって、この概念が変化してきた¹⁹⁾。細胞間での情報伝達や生体反応の制御における新しいメカニズムが提示されたのである。miRNA が細胞内で遺伝子発現を制御することが示され²⁰⁾、さらには細胞外小胞 (extracellular vesicle : EV) に包まれて細胞外環境に放出されて他の細胞に取り込まれることで、別な細胞の遺伝子発現や反応を遠隔調節することが分かった²¹⁾。すなわち、細胞間の情報伝達がホルモンやサイトカインなどの分泌因子だけではなく、EV と miRNA によって細胞間で遺伝子レベルの情報を直接やり取りしているのである。まさに、細胞間の情報伝達の種類が増加して、遺伝子発現の制御が個々の細胞内に限定されずに組織や生体レベルで動的に調節されるという「セントラルドグマの拡張」を考えることが可能な時代になった²²⁾。

血中を循環する EV は、タンパク質、脂質、さらには miRNA を含む核酸などを分解から保護しつつ遠隔組織まで効率的に輸送し、それら機能分子の標的細胞への取込みを促進することによって、炎症の増悪と消退、腫瘍の進展、組織の修復などの

さまざまな生理的および病理的プロセスを調節する^{23,24)}。EVの表面と内面は、EV放出細胞ごとに特異的な様々なコートタンパク質で覆われており、それぞれが異なった輸送シグナルを認識することによって選択的な輸送が行われると考えられている²⁵⁾。さらに近年、様々な研究によって、EV表面のタンパク質や糖鎖がEVの輸送に関与すること^{26,27)}、さらにEVと標的細胞表面分子との相互作用によって取込み機構が制御される²⁸⁾ことが報告されてきた。すなわち、AgP患者のEV由来タンパク質の特異性は、AgPの病態制御に関与する可能性があり、バイオマーカーとしての診断ツールの実現化に重要な存在と考えられる。

私の所属する研究チームでは、AgPの特異な歯周組織の免疫・炎症反応にEVが内包するmiRNAが関与すると考え、河本²⁹⁾はAgPバイオマーカーの可能性を、そして森³⁰⁾はこれらの内のmiRNAの機能を突き止めようとした。本研究では、AgPの病態形成に血中EVが関与すると仮定し、患者の血漿中EVに含まれるタンパク質の網羅的なプロテオーム解析を行い、AgPに特異的なEVのタンパク質の探索を目的とした。

材料と方法

1. 研究対象者

研究期間は 2017 年 12 月～2023 年 3 月とした。包含基準は岡山大学病院の侵襲性歯周炎センターを受診した患者であり，日本歯周病学会の 2006 年歯周病分類³⁾に基づいて AgP と診断され，2018 年 AAP/EFP の分類¹⁴⁾ でステージⅢ，グレード C である AgP 患者とした。除外基準は，18 歳未満，35 歳以上，全身疾患あり，喫煙者とした。また，年齢をマッチングさせた上記除外基準に該当せず，歯周炎を有しないボランティア（H）を対照者とした。本研究は，岡山大学倫理委員会の承認を得た後に，全ての研究対象者に，研究開始前に十分説明を行い，書面による同意を得た（岡山大学倫理審査委員会 承認番号 #1706-039）。

2. 歯周組織検査

研究対象者の当院初診時年齢，口腔内診査により歯周ポケット深さ（periodontal pocket depth : PPD），プロービング時の出血（bleeding on probing : BOP），および歯周炎症表面積（periodontal inflamed surface area : PISA）³¹⁾を，さらにフルマウスデンタル X 線画像により歯槽骨吸収レベル（bone resorption level : BL）を調べた。

3. EV の抽出

- 1) 血漿分離：初診時に 6 mL の末梢血液を上腕皮静脈からベノジェクト® II 真空採血管（滅菌品）（TERUMO, Tokyo, Japan）を用いて採血し，遠心分離（25 °C, $2,330 \times g$, 10 分間）後，上清をチューブに移し，さらに遠心分離（25 °C, $1,600 \times g$, 10 分間）によって Buffy coat 層の 3.0 mL の血漿を抽出した。これらは岡山大学病院バイオバンクにおいて液体窒素中に 0.5 mL ごとに分注して保管した。これらのうち 2.5 mL を，バイオバンク規定の分譲手続きを行い入手し，解析に用いた。
- 2) EV の単離：EV は，血漿（200 μ L）から MagCapture™ Exosome Isolation Kit PS Ver.2（FUJIFILM Wako, Osaka, Japan）を用いて使用説明書にしたがって単離した。すなわち，EV の膜表面に発現するホスファチジルセリンに特異的に結合する T cell immunoglobulin and mucin domain-containing protein 4（Tim4）を固相化した磁気ビーズを用いて，血漿中の EV を補足し，その後にキレート剤を添加して EV を抽出した³²⁾。
- 3) EV の粒子径，形態，表面マーカーの確認
 - (a) EV の粒子径測定：単離した EV を含む溶液 185 μ L, 200 μ L を Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Unit 10kDa（Merck, Darmstadt, Germany）を用いてそれぞれ 50 μ L, 125 μ L に濃縮した。それらを混合した 175 μ L の

うち 50 μ L を qNano (メイワフォーシス, 東京, 日本) で測定した。すなわち, ナノポアを挟んだ溶液中に電圧をかけ, 溶液中に含まれるナノ粒子が細孔を通過する際の電気抵抗ナノパルス法を用いて, 粒子径を測定した³³⁾。

(b) EV の電子顕微鏡解析: 単離した EV (血清由来) を含む溶液 5 μ L をグリットに入れて 5 μ L の 2%酢酸ウラニール水溶液でネガティブ染色した試料を作製した。そして, 試料を可視化するため, 透過型電子顕微鏡 (Transmission Electron Microscope : TEM, Hitachi H-7650 ; HITACHI, 東京, 日本) を用いて 80 kV, 30,000 倍の条件下で撮影した。

(c) EV 表面マーカーの解析: 単離した EV を含む溶液 185 μ L, 200 μ L を Amicon Ultra-2 Centrifugal Filter Unit 10kDa (Merck) を用いてそれぞれ 50 μ L, 125 μ L に濃縮した。それらを混合した 175 μ L のうち 5 μ L を Radio-Immunoprecipitation Assay (RIPA) Buffer (Cell Signaling, MA, USA) で溶解した。溶解した試料のタンパク質量を Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて定量した。Mini-PROTEAN®TGX™Precast Protein Gels (4-20% プレキャストポリアクリルアミドゲル ; BIO RAD, CA, USA) に 23.1 μ g/Lane の試料をロード

して電気泳動（25 V，1 A，室温，30 分間）を行った。続いて Trans-Blot Turbo（BIO RAD）を用いて 0.2 μ m Polyvinylidene DiFluoride 膜（Trans-Blot Turbo Transfer Pack；BIO RAD）に転写した。転写した膜を 0.05% Tween 20（FUJIFILM Wako）と 5% スキムミルク（BD Difco, NJ, USA）を含むトリス緩衝生理食塩水（pH 7.4）で 60 分間ブロッキングし，一次抗体としてマウス抗ヒト CD9 抗体（クローン 12A12；コスモ・バイオ，東京，日本）と反応させ（4 °C，一夜），西洋ワサビペルオキシダーゼ（Horseradish peroxidase；HRP）結合二次抗体（Goat Anti-Mouse IgG Antibody, Peroxidase Conjugated, H+L；MERK）と反応させた（室温，1 時間）³⁴⁾。ポジティブコントロールは岡山大学学術研究院医歯薬学域口腔顎顔面外科学分野の梅森先生から供与いただいた低分化型扁平上皮癌細胞株（SAS）の培養上清由来の EV³⁵⁾ を対照とした。

4. プロテオーム解析

1) プロテオーム解析用サンプルの調製

上記 3 項で単離した EV を含む溶液は，基本的には Ikeda らの方法³⁶⁾に従ってプロテオーム解析用に調製した。

EV を含む溶液に 100 mM triethylammonium bicarbonate buffer (TEAB ; Honeywell International, NC, USA) を含む同量の 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) を加えてタンパク質を溶解し、遠心分離 ($13,000 \times g$, 8 分間) して回収した上清を、終濃度 10 mM の tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride solution (TCEP ; MERCK) によって 55 °C で 10 分間還元し、終濃度 50 mM の iodoacetamide (MERCK) で遮光下の室温で 45 分間アルキル化した。これに終濃度 2.5% のリン酸 (FUJIFILM Wako) を添加して攪拌して、さらに 100 mM TEAB (90% Liquid Chromatography-Mass spectrometry (LC/MS) 用メタノール溶液 ; FUJIFILM Wako) を終濃度 86 mM TEAB となるように加えた。

この溶液を S-Trap (C02-micro-80 ; PROTIFI, NY, USA) ³⁷⁾ に移して遠心分離した (室温, $4,000 \times g$, 30 秒間)。このチューブ内に残ったタンパク質を 150 μ L の 100 mM TEAB (90% LC/MS 用メタノール溶液) を入れて同様に遠心分離した。この洗浄ステップを 3 回繰り返し、最後は室温で $4,000 \times g$, 1 分間遠心した。

タンパク質が付着した S-Trap を新しい 2 mL チューブに移した。50 mM 重炭酸アンモニウムで 0.5 μ g/ μ L に調整した Trypsin/Lys-C (#V5072 ; Promega, WI, USA) を 50 mM TEAB で 10 倍希釈した。その混合液を 20 μ L 加えて、47 °C で 1~2 時間反応させて溶液内のタンパク質を消化した。その後に 50 mM TEAB を 40 μ L 加

えて室温で $4,000 \times g$, 1 分間遠心し, さらに 0.2% ギ酸水溶液を 40 μL 加えて再度室温で $4,000 \times g$, 1 分間遠心した。最後に, 50% アセトニトリル水溶液 (018-19853 ; FUJIFILM Wako) を 41.7 μL 加えて室温で $4,000 \times g$, 1 分間遠心して, タンパク質が付着した S-Trap を一晩風乾させた。

2) プロテオーム解析

得られたペプチドをゲル断片から抽出し, Orbitrap Fusion Lumos 質量分析計 (Thermo Fisher Scientific) と UltiMate 3000 RSLC nano-flow HPLC (Thermo Fisher Scientific) を組み合わせて分析した。ペプチドは $\mu\text{-Precolumn}$ (0.3 mm i.d. $\times$ 5 mm, 5 μm ; Thermo Fisher Scientific) で濃縮し, AURORA カラム (0.075 mm i.d. $\times$ 250 mm, 1.6 μm ; Ion Opticks Pty Ltd, Australia) で, 2% から 40% までアセトニトリルで 110 分間, 次いで 0.1% ギ酸存在下, 40% から 95% までアセトニトリルで 5 分間の, 2 段階グラジエントで分離した。FAIMS Pro (Thermo Fisher Scientific) による気相分画の補正電圧は, -40, -60, -80 V に設定した。Orbitrap Fusion Lumos の分析パラメーターは次のように設定した ; フルスキャンの分解能 = 50,000, スキャンレンジ (m/z) = 350-1500, フルスキャンの最大注入時間 = 50 ミリ秒, フルスキャンの AGC ターゲット = 4×10^5 , ダイナミック排除時間 = 30 秒, データ依存 MS/MS 取得のサイクルタイム = 2 秒, アクチベーションタイプ = HCD,

MS/MS の検出器=イオントラップ, MS/MS の最大注入時間=35 ミリ秒, MS/MS の AGC ターゲット= 1×10^4 。

3) タンパク質の同定

タンデム質量分析法 (Mass Spectrometry / Mass Spectrometry ; MS/MS) で得たスペクトルは, Proteome Discoverer 3.1 ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific) を用いて, UniProt の *Homo sapiens* タンパク質配列データベースを検索した。

また Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV) ガイドライン³⁸⁾に従って, CD9, CD63, CD81, CD82, Tetraspanin-XX series, TSG101, Alix などの代表的な EV マーカーが検出できるかを解析した。また, タンパク質の機能はスウェーデンの研究グループが提供している The Human Protein Atlas のタンパク質発現情報データベース³⁹⁾を用いて調べた。

4) タンパク質の無標識定量

バイアスの低減を目的として, 2 種類の手法を用いてタンパク質の定量を行った⁴⁰⁾。

a) Linear Models for Microarray Data (Limma) を用いた定量

発現解析ソフトウェア Limma⁴¹⁾ を用いて、線形モデルを採用し、経験的ベイズ法を用いて各タンパク質の変動を推定し、さらにタンパク定量し、バッチ補正を行った。

b) Proteome Discoverer 3.1 ソフトウェアを用いた定量

Proteome Discoverer 3.1 ソフトウェアを用いて、Minora Feature Detector node, Feature Mapper node, Precursor Ions Quantifier node のデフォルトパラメーターで、タンパク質のラベルフリー相対定量分析を行った³⁹⁾。

5. 統計処理

各データの統計処理は、GraphPad Prism8 (GraphPad Software, MA, USA) を用いて、Mann-Whitney *U* test で検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

また、Limma で定量したデータの統計解析には DEqMS (Differential Expression analysis of quantitative Mass Spectrometry data) を用いた。DEqMS は、タンパク質定量に使用されるペプチドの数に対する分散の依存性を考慮しながら、MS データで差次的に発現するタンパク質を識別するための統計的手法である。さらに、Benjamini-Hochberg 法で多重検定補正を行うことによって p 値を調整した⁴³⁾。各因子間の相関分析ではピアソンの相関係数を用いた。

結果

研究対象者の臨床データ

研究対象者は AgP 群を 10 名，H 群を 10 名とした（図 1）。2 群間における臨床データ（表 1）統計学的に解析した結果（表 2），年齢以外の PPD，BOP，PISA，および BL について有意差があった（ $p < 0.0001$ ）。すなわち，AgP 群の臨床症状は H 群に比較して明らかに歯周病症状があった。

血漿から単離した EV の粒子径と形態

1 名のドナー H の血清から単離した EV を透過型電子顕微鏡で確認すると（図 2A），直径 100 nm 強の小胞があり，EV に特徴的なカップ型の形態を示していた。それらの粒子径を測定したところ，最小値は 68.6 nm，最大値は 597.8 nm で，ピークの値は 107.2 nm あった（図 2B）。そして，直径約 30～150 nm のサイズの EV を多く含んでいた。さらに，代表的な EV 表面マーカーである CD9 をウェスタンブロッティングで検出できた（図 2C）。

AgP 患者と健常ボランティアの血中 EV に含まれるタンパク質の同定

プロテオーム解析を行い，1,755 種のタンパク質が偽陽性率（FDR）<1%の条件で同定された。これらのデータを以下の解析に用いた。なお，主要な歯周病原細菌

である *Porphyromonas gingivalis* (Pg) , *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) ,
Prevotella intermedia (Pi) , *Treponema denticola* (Td) , *Tannerella forsythia* (Tf) ,
Fusobacterium nucleatum (Fn) 由来のタンパク質は検出されていなかった。

Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) 結果

エンリッチメント解析として、GSEA で AgP 群と H 群の二群間で発現が異なる遺伝子が特定の遺伝子セットに偏っているかどうかを調べることを、EV から同定されたタンパク質に応用した。

オントロジーエンリッチメント解析では、生物学的過程・生体内作用 (Biological Process : BP) , 細胞構成要素 (Cell Component : CC) , そして分子機能 (Molecular Function : MF) の観点で、EV から同定された全ペプチド中の該当ペプチドの比率を解析した (図 3) 。ドットプロットで発現比が 0.50 以上を示して関連性が高いものとしては、BP で 19 種、CC で 9 種、そして MF で 12 種あった。

DEqMS での発現差の解析

タンパク質の発現量の差をヒートマップ分析すると、AgP 群で発現が上昇していたものとして 7 種、H 群で発現が上昇していたものとして 18 種が見つかった

(図 4)。AgP 群のうち AgP #3 のみ、H 群に高発現の 8 種タンパク質と、AgP 群に高発現の 2 種タンパク質の発現量が逆転しており、発現パターンがやや H 群に近かった。これらは、ボルケーノプロットでも明瞭に示された (図 5)。発現の変動比を示す x 軸と統計的差を示す y 軸で示される領域内で $p < 0.001$ として、AgP 群で発現が上昇した 7 種は右上に、H 群で発現が上昇した 18 種は左上に示された (図 5 中の文字付きの点)。これら 25 種のタンパク質の機能は、表 3 に示した。

なお、これらの内で AgP 群と H 群間での発現差に強い有意差 ($p < 0.0005$) があつた 6 種のタンパク質を、枠線で囲んで示した。さらに、この 6 種のタンパク質に関しては、Benjamini-Hochberg 法によって $FDR < 5\%$ の条件で調整した p 値でも有意差 ($p < 0.05$) があることを確認した。続いて、これら 6 種のタンパク質を以後の解析に用いた。

Proteome Discoverer での発現差の解析

Proteome Discoverer のデータを基に、25 種のタンパク質の発現比の差を解析すると、発現比に有意差 ($p < 0.05$) があつたのは 6 種のタンパク質であつたので、AgP 群と H 群間で個人毎の発現量を比較した (図 6)。AgP 群で高発現したものは Alcohol dehydrogenase 4 (ADH4) のみで、H 群で高発現したものは NSF attachment protein alpha (NAPA)、Typtophanyl-tRNA synthetase 1 (WARS1)、

Protein 4.2 (EBP42) , Protein phosphatase 2 scaffold subunit A alpha (PPP2R1A) ,

Enolase 1 (ENO1) の 5 種であった。これらの機能は表 3 に示した。

AgP 群と H 群間で発現量が有意に異なるタンパク質と臨床所見の関係

以上の 6 種タンパク質発現と研究対象者の個人毎の PISA 値 (表 1) とをピアソンの相関係数を求めて比較検討した。6 種のタンパクのうち、ADH4 のみが正の相関関係を示す傾向を示し、他の 5 種タンパク質は負の相関を示した。(図 7)。

ADH4 に着目すると、PISA 値が比較的高い 3 者 (AgP#15, 17, 19) では、PISA 値が高く BL が小さいほど ADH4 の発現量が多い傾向にあった。また、PISA 値が比較的低い 4 者 (AgP#12, 14, 18, 20) では、PISA 値が低く BL が大きいほど ADH4 の発現量が多かった。

考察

EV の表面タンパク質の一部には臓器向性を制御する機能があると考えられており、様々な疾患において新たな診断マーカーとなる可能性が秘められている²⁶⁾。そこで本研究では、本研究では、AgP の病態形成に血中 EV が関与すると仮定し、患者の血漿中 EV に含まれるタンパク質の網羅的なプロテオーム解析を行い、AgP に特異的な EV のタンパク質の探索を目的とした。また、健常者と AgP 患者間の血中 EV 由来タンパク質の発現差を分析し、そのタンパク質の機能を類推した。

GSEA は、統計的アプローチを使用して、網羅的に検出したタンパク質のセット内で 2 群間での発現量に有意な差を示し、Gene Ontology の各タームに対応する遺伝子リストを調べるのに有用であるため発現解析に広く用いられている。本研究結果では、endosome organization や endoplasmic reticulum lumen など EV 形成に関与するタームが多く同定された（図 3）。EV は細胞外の物質を細胞内に取り込むことで生成されるエンドソームという小胞内に、さらに細胞内の物質を取り込むことで生成されるため、細胞成分を内包するという特性をもつ⁴⁴⁾。そのことから、EV の産生細胞の状態が EV の BP, CC, および MF に反映されていると考えられている⁴⁵⁾。各タームで細胞外小胞の形成や免疫応答に関与するといった特徴を多く認め、今回

質量分析で同定した 1755 種のタンパク質には EV 由来タンパク質が多く含まれていると考えられる。また，regulation of phagocytosis, phagocytic vesicle は細胞の貪食機能⁴³⁾に，cell surface pattern recognition receptor signaling pathway, purine ribonucleotide metabolic process は免疫応答の調節⁴⁴⁾に参与している。macro autophagy は感染が生じた際に活性化する⁴⁶⁾ことが知られている。cellular response to oxygen levels は酸素が不足した際に活性化する細胞反応⁴⁷⁾で，重度歯周炎においては歯周ポケット内が嫌気環境になることからこの反応が生じる⁴⁸⁾。collagen trimer は歯周炎症等による組織破壊が生じた際に活性化する⁴⁹⁾。これらの要素が AgP 群で高発現しているということから，AgP 患者血中の EV の産生細胞に炎症反応が生じていたことが考えられる。今後，これらの事実を基に EV の産生細胞について調べる必要がある。

定量解析したタンパク質データを基に作成したヒートマップでは（図 4），AgP #3 のみ発現パターンがやや H 群に近かった。AgP #3 の初診時の臨床検査データを確認すると，PISA に関しては AgP 群の中では一番低値であったが，BL は 5 番目に高く，初診時以前に歯周組織の破壊が生じていたことが伺える。タンパク質の発現パターンが H 群に近いことから，初診の時点で AgP の病状は安定傾向にあったと考えられる。発現量の逆転していたタンパク質のうち，Spectrin alpha chain, erythrocytic 1（SPTA1），Spectrin beta chain, erythrocytic（SPTB），Ferry endosomal RAB5

effector complex subunit 3 (FERRY3) , Ankyrin-1 (ANK1) , EPB42, Protein 4.1

(EPB41) , solute carrier family 4 member 1 (SLC4A1) の機能は赤血球に関するものであり⁴³⁾ , AgP 病態形成へ関与しているとは考えにくい。MAGUK p55 scaffold protein 1 (MPP1) , BPI fold-containing family B member 1 (BPIFB1) , Stalled ribosome sensor GCN1 (GCN1) については, AgP の発症に関与している可能性があり, 機能に関して後述する。

AgP 群と H 群間で発現量が異なった 25 種のタンパク質の機能を調べると (表 3) , WARS1, thrombospondin 1 (THBS1) は創傷治癒に³⁹⁾ , PPP2R1A, ENO1, syndecan binding protein (SDCBP) , MPP1 は細胞増殖に³⁹⁾ 関与するものであった。AgP 群ではこれらのタンパク質が H 群より低発現であったことから, 健常者と比較し AgP では歯周炎症に対する抵抗性が低下していることが考えられる。AgP 群で有意に高発現していたタンパク質のうち, BPIFB1 には細菌のリポ多糖類 (LPS) に結合し, LPS に対する細胞反応を調整する働きがあり, 口腔での自然免疫に役割を果たすことが示唆されている⁴³⁾ 。また, Matrix Gla protein (MGP) は骨形成の抑制作用があり³⁹⁾ , 少ない感染量で炎症や, 炎症による歯槽骨破壊が亢進するといった AgP の特徴と一致する。GCN1 は統合ストレス応答の正の活性化因子として機能す

るタンパク質⁴⁴⁾であり、AgPの病態形成の修飾因子として関与している可能性がある。

特に統計的有意差のあった6種のタンパク質に関してはAgPの病態形成に関与している可能性が高いと考え、各タンパク質の発現量と、研究対象者の初診時PISAの関連性（図7）に着目すると、ADH4は、PISA値が比較的高い3患者（AgP #15, 17, 19）ではPISA値が高くBLが小さい患者ほどADH4の発現量が多い傾向にあった。逆に、PISA値が比較的低い4者（AgP #12, 14, 18, 20）では、PISA値が高くBLが小さい患者ほどADH4の発現量が少なかった。また、PISA値が低いもののBLが大きい者に関しては初診時以前にAgP発症して歯槽骨吸収を生じたと考えられる。ADH4はレチノールの代謝に関与し、レチノイン酸の前駆物質であるレチナールを生成することが知られており^{39,50)}、レチノイン酸はTh17細胞の分化を制御する。Th17細胞はRANKLの発現を亢進することにより歯槽骨吸収を引き起こす⁵¹⁾。また、Th17細胞が産生するIL-17は炎症性サイトカイン産生を促進することにより歯周炎に関与する⁵²⁾。これらのことから、ADH4はAgP発症後、経時的に発現量が増加することによって、AgPの病態に関与する可能性が考えられる。

本研究にはいくつか限界がある。第一に、対象人数が少ないことである。第二に、単一施設の患者を対象としているため外的妥当性に注意が必要である。第三に、横断研究であることが挙げられる。今後、大規模コホート研究などが必要である。第四に、重要な交絡因子を調べていないことである。第五に、対照群が慢性歯周炎の患者ではないことである。最後に、各タンパク質が実際に生体へどのような影響を及ぼすのかは不明である。今後、25種のタンパク質の中でも特に AgP の病態形成への関与が疑われるタンパク質については、*in vivo* ならびに *in vitro* で検証を行う必要がある。

結論

AgP 患者の循環血中には、AgP の病態形成に関与する可能性がある複数種の EV タンパク質が存在した。

謝辞

稿を終えるにあたり，終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った岡山大学学術研究院医歯薬学域病態制御科学専攻病態機構学講座歯周病態学分野の高柴正悟教授に深甚なる謝意を表します。そして，様々な面にわたり，終始御指導賜り，貴重な御助言と御協力を下さいました岡山大学病院卒後臨床研修センターの山本直史教授，歯科・歯周科部門の森彩乃先生，ならびに歯周病態学分野の諸先生に厚く御礼申し上げます。また，EV 表面マーカー検出に関して協力してくださった岡山大学学術研究院医歯薬学研究科口腔顎顔面外科学分野の小野喜章先生と梅森洸樹先生，細胞外小胞に関して技術的な御助言を賜った岡山大学学術研究院医歯薬学域歯科薬理学分野の江口傑徳准教授，プロテオーム解析に関して協力してくださった岡山大学大学院医歯薬学研究科膜輸送分子生物学分野の宮地考明教授と樹下成信先生，公益財団法人がん研究会がんプレシジョン医療研究センタープロテオミクス解析グループの植田幸嗣先生，そして，プロテオームインフォマティクスに関して岡山大学学術研究院医歯薬学域インプラント再生補綴学分野の大野充昭准教授と岡山大学学術研究院医歯薬学域分子医化学分の Ziyi Wan 助教に深く感謝申し上げます。

表題脚注

岡山大学 大学院医歯薬学総合研究科 病態制御科学専攻 病態機構学講座 歯周病

態学分野

(指導：高柴正悟教授)

本論文の一部は，以下の学会において発表した。

- 第 17 回日本口腔検査学会学術大会（2024 年 12 月，千葉）

参考文献

- 1) Hajishengallis G, Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. *Nat Rev Immunol* **15**:30-44, 2015.
- 2) Pocolos DK, Lerche-Sehm J, Abron A, Fine JB, Papapanou PN. Infection patterns in chronic and aggressive periodontitis. *J Clin Periodontol* **32(10)**:1055-61, 2005.
- 3) 五味一博, 栗原英見, 吉江弘正, 河口浩之, 菅野直之, 吉野敏明, 坂上竜資, 児玉利朗, 若林健史, 荒木久生, 内田剛也. 歯周治療の指針 2015, 第1版. 東京: 医歯薬出版, 9, 2015.
- 4) Fine DH, Markowitz K, Furgang D, Fairlie K, Ferrandiz J, Nasri C, McKiernan M, Gunsolley J. *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and its relationship to initiation of localized aggressive periodontitis: longitudinal cohort study of initially healthy adolescents. *J Clin Microbiol* **45(12)**:3859-69, 2007.
- 5) Montenegro SCL, Retamal-Valdes B, Bueno-Silva B, Duarte PM, Faveri M, Figueiredo LC, Feres M. Do patients with aggressive and chronic periodontitis exhibit specific differences in the subgingival microbial composition? A systematic review. *J Periodontol* **91(11)**:1503-1520, 2020.
- 6) Arredondo A, Álvarez G, Isabel S, Teughels W, Laleman I, Contreras MJ, Isbej L, Huapaya E, Mendoza G, Mor C, Nart J, Blanc V, León R. Comparative 16S rRNA gene sequencing study of subgingival microbiota of healthy subjects and patients with periodontitis from four different countries. *J Clin Periodontol* **50(9)**:1176-1187, 2023.
- 7) Rapp GE, Pineda-Trujillo N, McQuillin A, Tonetti M. Genetic power of a Brazilian three-generation family with generalized aggressive periodontitis. II. *Braz Dent J* **22(1)**:68-73, 2011.
- 8) Kulkarni C, Kinane DF. Host response in aggressive periodontitis. *Periodontol 2000* **65(1)**:79-91, 2014.
- 9) Stein JM, Machulla HK, Smeets R, Lampert F, Reichert S. Human leukocyte antigen polymorphism in chronic and aggressive periodontitis among Caucasians: a meta-analysis. *J Clin Periodontol* **35(3)**:183-92, 2008.

- 10) Lavu V, Venkatesan V, Venkata Kameswara Subrahmanya Lakkakula B, Venugopal P, Paul SF, Rao SR. Polymorphic regions in the interleukin-1 gene and susceptibility to chronic periodontitis: a genetic association study. *Genet Test Mol Biomarkers* **19(4)**:175-81, 2015.
- 11) Suzuki A, Ji G, Numabe Y, Muramatsu M, Gomi K, Kanazashi M, Ogata Y, Shimizu E, Shibukawa Y, Ito A, Ito T, Sugaya A, Arai T, Yamada S, Deguchi S, Kamoi K. Single nucleotide polymorphisms associated with aggressive periodontitis and severe chronic periodontitis in Japanese. *Biochem Biophys Res Commun* **317(3)**:887-92, 2004.
- 12) Albandar JM. Aggressive periodontitis: case definition and diagnostic criteria. *Periodontol 2000* **65(1)**:13-26, 2014.
- 13) 特定非営利活動法人日本歯周病学会. 歯周治療のガイドライン 2022, 第1版. 東京: 医歯薬出版, 10-16, 2022.
- 14) Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol* **89**: S159-S172, 2018.
- 15) 日本歯周病学会. 歯周病新分類への対応.
http://www.perio.jp/file/news/info_191220.pdf (最終アクセス2024年11月30日)
- 16) Tonetti MS, Greenwell H, Kornman KS. Staging and grading of periodontitis: Framework and proposal of a new classification and case definition. *J Periodontol* **89**: S159-S172, 2018.
- 17) Sarkar S, Rammohan J. Nearly maximal information gain due to time integration in central dogma reactions. *iScience* **26(6)**:106767, 2023.
- 18) Felekis K, Deltas C. RNA Interference: a powerful laboratory tool and its therapeutic implications. *Hippokratia* **10(3)**:112-5, 2006.
- 19) Redis RS, Calin S, Yang Y, You MJ, Calin GA. Cell-to-cell miRNA transfer: from body homeostasis to therapy. *Pharmacol Ther* **136(2)**:169-74, 2012.
- 20) Ille AM, Lamont H, Mathews MB. The Central Dogma revisited: Insights from protein synthesis, CRISPR, and beyond. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **13(5)**:e1718, 2022.

- 21) Rani V, Sengar RS. Biogenesis and mechanisms of microRNA-mediated gene regulation. *Biotechnol Bioeng* **119(3)**:685-692, 2022.
- 22) Boon RA, Vickers KC. Intercellular transport of microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **33(2)**:186-92, 2013.
- 23) Clancy J, D'Souza-Schorey C. Extracellular vesicles in cancer: Purpose and promise. *Cancer J* **24(2)**:65-69, 2018.
- 24) Shi M, Sheng L, Stewart T, Zabetian CP, Zhang J. New windows into the brain: Central nervous system-derived extracellular vesicles in blood. *Prog Neurobiol* **175**:96-106, 2019.
- 25) Silva AM, Teixeira JH, Almeida MI, Gonçalves RM, Barbosa MA, Santos SG. Extracellular vesicles: Immunomodulatory messengers in the context of tissue repair/regeneration. *Eur J Pharm Sci* **98**:86-95, 2017.
- 26) Hoshino A, Kim HS, Bojmar L, Gyan KE, Cioffi M, Hernandez J, Zambirinis CP, Rodrigues G, Molina H, Heissel S, Mark MT, Steiner L, Benito-Martin A, Lucotti S, Di Giannatale A, Offer K, Nakajima M, Williams C, Nogués L, Pelissier Vatter FA, Hashimoto A, Davies AE, Freitas D, Kenific CM, Ararso Y, Buehring W, Lauritzen P, Ogitali Y, Sugiura K, Takahashi N, Alečković M, Bailey KA, Jolissant JS, Wang H, Harris A, Schaeffer LM, García-Santos G, Posner Z, Balachandran VP, Khakoo Y, Raju GP, Scherz A, Sagi I, Scherz-Shouval R, Yarden Y, Oren M, Malladi M, Petriccione M, De Braganca KC, Donzelli M, Fischer C, Vitolano S, Wright GP, Ganshaw L, Marrano M, Ahmed A, DeStefano J, Danzer E, Roehrl MHA, Lacayo NJ, Vincent TC, Weiser MR, Brady MS, Meyers PA, Wexler LH, Ambati SR, Chou AJ, Slotkin EK, Modak S, Roberts SS, Basu EM, Diolaiti D, Krantz BA, Cardoso F, Simpson AL, Berger M, Rudin CM, Simeone DM, Jain M, Ghajar CM, Batra SK, Stanger BZ, Bui J, Brown KA, Rajasekhar VK, Healey JH, de Sousa M, Kramer K, Sheth S, Baisch J, Pascual V, Heaton TE, La Quaglia MP, Pisapia DJ, Schwartz R, Zhang H, Liu Y, Shukla A, Blavier L, DeClerck YA, LaBarge M, Bissell MJ, Caffrey TC, Grandgenett PM, Hollingsworth MA, Bromberg J, Costa-Silva B, Peinado H, Kang Y, Garcia BA, O'Reilly EM, Kelsen D, Trippett TM, Jones DR, Matei IR, Jarnagin WR, Lyden D. Extracellular vesicle and particle biomarkers define multiple human cancers. *Cell* **182(4)**:1044-1061, 2020.

- 27) Macedo-da-Silva J, Santiago VF, Rosa-Fernandes L, Marinho CRF, Palmisano G. Protein glycosylation in extracellular vesicles: Structural characterization and biological functions. *Mol Immunol* **135**:226-246, 2021.
- 28) Mulcahy LA, Pink RC, Carter DR. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* **4**:3, 2014.
- 29) 河本美奈. 局侵襲性歯周炎診断の血液バイオマーカーとしての細胞外小胞由来マイクロ RNA の探索する. 岡山歯誌, 2021 (博士論文) .
- 30) 森彩乃. 侵襲性歯周炎の血液診断マーカー候補となる細胞外小胞由来マイクロ RNA とその炎症誘導機構について. 岡山歯誌, 2022 (博士論文) .
- 31) Leira Y, Martín-Lancharro P, Blanco J. Periodontal inflamed surface area and periodontal case definition classification. *Acta Odontol Scand* **76(3)**:195-198, 2018.
- 32) Nakai W, Yoshida T, Diez D, Miyatake Y, Nishibu T, Imawaka N, Naruse K, Sadamura Y, Hanayama R. A novel affinity-based method for the isolation of highly purified extracellular vesicles. *Sci Rep* **6**:33935, 2016.
- 33) Maas SL, De Vrij J, Broekman ML. Quantification and size-profiling of extracellular vesicles using tunable resistive pulse sensing. *J Vis Exp* **19(92)**:e51623, 2014.
- 34) Ono K, Eguchi T, Sogawa C, Calderwood SK, Futagawa J, Kasai T, Seno M, Okamoto K, Sasaki A, Kozaki KI. HSP-enriched properties of extracellular vesicles involve survival of metastatic oral cancer cells. *J Cell Biochem* **119(9)**:7350-7362, 2018.
- 35) Umemori K, Ono K, Eguchi T, Kawai H, Nakamura T, Ogawa T, Yoshida K, Kanemoto H, Sato K, Obata K, Ryumon S, Yutori H, Katase N, Okui T, Nagatsuka H, Ibaragi S. EpEX, the soluble extracellular domain of EpCAM, resists cetuximab treatment of EGFR-high head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* **142**:106433, 2023.
- 36) Ikeda A, Nagayama S, Sumazaki M, Konishi M, Fujii R, Saichi N, Muraoka S, Saigusa D, Shimada H, Sakai Y, Ueda K. Colorectal cancer-derived CAT1-positive extracellular vesicles alter nitric oxide metabolism in endothelial [cells](#) and [promote angiogenesis](#). *Mol Cancer Res* **19(5)**:834-846, 2021.

- 37) Ludwig KR, Schroll MM, Hummon AB. Comparison of in-solution, FASP, and S-Trap based digestion methods for bottom-up proteomic studies. *J Proteome Res* **17(7)**:2480-2490, 2018.
- 38) Welsh JA, Goberdhan DCI, O'Driscoll L, Buzas EI, Blenkiron C, Bussolati B, Cai H, Di Vizio D, Driedonks TAP, Erdbrügger U, Falcon-Perez JM, Fu QL, Hill AF, Lenassi M, Lim SK, Mahoney MG, Mohanty S, Möller A, Nieuwland R, Ochiya T, Sahoo S, Torrecilhas AC, Zheng L, Zijlstra A, Abuelreich S, Bagabas R, Bergese P, Bridges EM, Brucale M, Burger D, Carney RP, Cocucci E, Crescitelli R, Hanser E, Harris AL, Haughey NJ, Hendrix A, Ivanov AR, Jovanovic-Talisman T, Kruh-Garcia NA, Ku'uilei-Lyn Faustino V, Kyburz D, Lässer C, Lennon KM, Lötval J, Maddox AL, Martens-Uzunova ES, Mizenko RR, Newman LA, Ridolfi A, Rohde E, Rojalin T, Rowland A, Saftics A, Sandau US, Saugstad JA, Shekari F, Swift S, Ter-Ovanesyan D, Tosar JP, Useckaite Z, Valle F, Varga Z, van der Pol E, van Herwijnen MJC, Wauben MHM, Wehman AM, Williams S, Zendrini A, Zimmerman AJ; MISEV Consortium; Théry C, Witwer KW. Minimal information for studies of extracellular vesicles (MISEV2023): From basic to advanced approaches. *J Extracell Vesicles* **13(2)**:e12404, 2024.
- 39) The Human Protein Atlas. <https://www.proteinatlas.org>
(最終アクセス2024年11月30日)
- 40) Välikangas T, Suomi T, Elo LL. A systematic evaluation of normalization methods in quantitative label-free proteomics. *Brief Bioinform* **19(1)**:1-11, 2018.
- 41) Ritchie ME, Phipson B, Wu D, Hu Y, Law CW, Shi W, Smyth GK. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res* **43(7)**:e47, 2015.
- 42) Orsburn BC. Proteome discoverer-a community enhanced data processing suite for protein informatics. *Proteomes* **9(1)**:15, 2021.
- 43) Zhu Y, Orre LM, Zhou Tran Y, Mermelekas G, Johansson HJ, Malyutina A, Anders S, Lehtiö J. DEqMS: A method for accurate variance estimation in differential protein expression analysis. *Mol Cell Proteomics* **9(6)**:1047-1057, 2020.
- 44) Guillaume van Niel G, D'Angelo G, Raposo G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19(4)**:213-228, 2018.

- 45) Maas SLN, Breakefield XO, Weaver AM. Extracellular vesicles: Unique intercellular delivery vehicles. *Trends Cell Biol* **27(3)**:172-188, 2017.
- 46) Khandia R, Dadar M, Munjal A, Dhama K, Karthik K, Tiwari R, Yatoo MI, Iqbal HMN, Singh KP, Joshi SK, Chaicumpa W. A comprehensive review of autophagy and its various roles in infectious, non-infectious, and lifestyle diseases: Current knowledge and prospects for disease prevention, novel drug design, and therapy. *Cells* **8(7)**:674, 2019.
- 47) Ortmann B, Druker J, Rocha S. Cell cycle progression in response to oxygen levels. *Cell Mol Life Sci* **71(18)**:3569-82, 2014.
- 48) Grant MM, Kolamunne RT, Lock FE, Matthews JB, Chapple IL, Griffiths HR. Oxygen tension modulates the cytokine response of oral epithelium to periodontal bacteria. *J Clin Periodontol* **37(12)**:1039-48, 2010.
- 49) Romanelli R, Mancini S, Laschinger C, Overall CM, Sodek J, McCulloch CA. Activation of neutrophil collagenase in periodontitis. *Infect Immun* **67(5)**:2319-26, 1999.
- 50) Martras S, Alvarez R, Martínez SE, Torres D, Gallego O, Duester G, Farrés J, de Lera AR, Parés X. The specificity of alcohol dehydrogenase with 11 cis-retinoids. Activity with 11-cis-retinol and localization in retina. *Eur J Biochem* **271(9)**:1660-70, 2004.
- 51) Wang L, Wang J, Jin Y, Gao H, Lin X. Oral administration of all-trans retinoic acid suppresses experimental periodontitis by modulating the Th17/Treg imbalance. *J Periodontol* **85(5)**:740-50, 2014.
- 52) Huangfu L, Li R, Huang Y, Wang S. The IL-17 family in diseases: from bench to bedside. *Signal Transduct Target Ther Oct* **11;8(1)**:402, 2023.

図の説明

図 1. 研究対象者の選択

2017 年 12 月から 2023 年 3 月までの間に岡山大学病院の侵襲性歯周炎センターを受診した患者 51 名のうち、2006 年の JSP 歯周病分類に基づいて AgP と診断された 19 歳から 34 歳で、全身疾患がなく、現在喫煙していない AgP 患者 10 名と、年齢をマッチングさせた歯周病を有さない健常ボランティア（H）10 名を対象に研究を行った。

図 2. EV の性状確認

A：透過型電子顕微鏡像 拡大すると、中心部が凹み周辺が盛り上がっているようなカップ型の構造を観察できる。 B：粒子径の分布 直径のピーク値が 107.8 nm に急激に出現し、その後は徐々に減少した。 C：免疫ブロット像 陽性対照細胞と今回血漿から得た EV を、抗 CD9 抗体で検出した。約 24 kDa の明瞭なバンドが還元剤（2-メルカプトエタノール： β ME）の有無にかかわらず検出できた。マーカー：Precision Plus Protein™ Standards, Bio-Rad)

図 3. オントロジー解析

EV 中の推定されたタンパク質に関連付けられた生物学的情報を，生物学のプロセス（BP），細胞内コンポーネント（CC），そして分子機能（MF）のカテゴリで，体系的・階層的に役割を整理した。これらの役割のうち，EV の生成や免疫応答に関与すると思われるものを太字で示した。また，AgP 群と H 群間で発現量が異なった 25 種のタンパク質の該当する要素には横にタンパク名を記載した。

図 4. 質量分析で推定されたタンパク質の発現強度と類似性

H 群と AgP 群の各 10 名の対象者間で，EV 中の推定されたタンパク質の発現強度を比較した。ペプチドスペクトラムマッチング (Peptide-Spectrum Matches) を Log_2 変換（対数変換）によって，倍率変化が 2 倍（上昇）は+1 として，半分（減少）は -1 として表し，それを色調基準に示すように可視化した。また，クラスタリング解析によってタンパク質間の類似性をデンドログラムによって示した。

図 5. 質量分析で推定されたタンパク質の発現の統計的有意性と変化量

X 軸にログスケールでの発現変化 (Log_2 Fold Change) を，Y 軸に統計的有意性 ($-\text{Log}_{10} p$ 値) を示した。上下左右に分布した有意かつ大きな変化を示すものはタンパク名を記載した。なお，枠線は，本研究で注目したものを示す。

図 6. 質量分析で推定されたタンパク質の発現の統計的有意性の確認

Y 軸にそれぞれのタンパク質の発現量を，箱ひげ図によって有意性を可視化し，を
図の下に統計的有意性 (p 値) を示した。

図 7. 統計的有意差のあるタンパク質と初診時 PISA の関連性

統計的有意差のあったタンパク質に関して，散布図によって各タンパク質の発現量
と研究対象者ごとの PISA との間のピアソンの相関係数 r と p 値を示す。Y 軸に各タ
ンパク質の発現量を，X 軸に PISA の数値を示し，研究対象者は，表 1 の H #1～10 を
番号 1～10，AgP #1～10 を番号 11～20 で示した。