指 導 教 授 氏 名	指 導 役 割
(自署)	研究総括
(自署)	研究指導
(自署)	

学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

教育研究分野	歯周病態学分野	身分 大学院生	氏名	児玉 加奈子
論 文 題 名	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			
論文内容の要旨 (2000字程度)				
【緒言】 侵襲性歯周炎 (AgP) は、若年者に急速な歯周組織破壊を引き起こす特異な歯周炎で、その病因についてはこれまで様々な研究がなされてきた。しかし、その病態に関して、いまだに統一した見解は得られていない。一方、細胞外小胞 (EV) はさまざまな生理的および病的プロセスを調節することから注目されている。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 のタンパク質の同定を目的とした。 【方法】 1. 研究対象者 2017年12月～2023年3月に岡山大学病院の侵襲性歯周炎センターで診断された AgP 患者 (18～34歳) から、全身的な疾患がなく喫煙歴のない患者を対象とした (AgP 群)。これらの除外基準に該当せず、年齢をマッチングさせた歯周炎を有しないボランティアを対照群 (H 群) とした (研 1706-039)。 2. EV 抽出 初診時に末梢血液を採血して得た 3.0 mL の血漿を、岡山大学病院バイオバンクの液体窒素中に 0.5 mL 毎に分注・保管した。EV は、血漿からホスファチジルセリンに対するアフィニティー法によるキット (FUJIFILM) を用いて抽出した。EV 性状は、粒子径測定、透過型電子顕微鏡解析、免疫プロット法を行って確認した。 3. プロテオーム解析 EV のタンパク質をプロテアーゼ処理し、質量分析を行い、Linear Models for Microarray Data (Limma) と Proteome Discoverer Software を用いてタンパク質を同定・定量した。				

4. 統計学的解析

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 Differential Expression analysis of quantitative Mass Spectrometry data (DEqMS) を用いた。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。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】

研究対象者は AgP 群を 10 名、H 群を 10 名とした。2 群間における臨床データでは、歯周ポケット深さ、プロービング時の出血、歯周炎症表面積、および歯槽骨吸収率について有意差があった ($p < 0.0001$)。抽出した EV のプロテオーム解析から 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。DEqMS において、AgP 群での高発現タンパク質を 7 種、低発現タンパク質を 18 種同定した (発現差: $p < 0.001$)。これらを含めた AgP で発現変動する全てのタンパク質に関連性が高い遺伝子オントロジーは、生物学的プロセスで 19 種、細胞構成要素で 9 種、そして分子機能で 12 種であった。AgP で発現変動のあった 25 種のタンパク質からさらに 6 種のタンパク質に着目すると、Proteome Discoverer Software でも有意差 ($p < 0.05$) を認めた。その中には、発現量が歯周炎症表面積に相関しているタンパク質が含まれていた。

【考察】

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、Tryptophanyl-tRNA synthetase 1, Thrombospondin 1 は創傷治癒に、Protein phosphatase 2 scaffold subunit A alpha, Enolase 1, Syndecan binding protein, MAGUK p55 scaffold protein 1 は細胞増殖に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 群では歯周組織の恒常性維持力が低下していると考えられる。

AgP 群で有意に高発現していたタンパク質のうち、BPI fold-containing family B member 1 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。Matrix Gla protein は骨形成の抑制作用があり、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 の特徴を説明できる可能性がある。GCN1 activator of EIF2AK4 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。また、Alcohol dehydrogenase 4 は AgP 発症後、経時的に発現量が変化することによって、AgP の病態に関与すると考えられる。

今後、これらの中でも特に 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 バイオマーカーの候補となる可能性のある複数種の EV タンパク質が存在した。