

学 位 研 究 紹 介

Periostin Knockout 歯根膜細胞における マルチオミックス解析 Multi-omics analysis of periostin- knockout periodontal ligament cells

新潟大学大学院医歯学総合研究科 生体歯科補綴学分野
(主任教員：魚島 勝美)

土橋 梓

Division of Bio-Prosthetics, Faculty of Dentistry & Graduate
School of Medical and Dental Sciences, Niigata University
(Director: Prof. Katsumi Uoshima)

Azusa Dobashi

【背景および目的】

歯根膜は咬合力の緩衝作用や歯の萌出など、口腔機能において重要な役割を担っている。歯根膜に最も豊富に存在する非コラーゲン性の細胞外基質タンパクである Periostin (Postn) は、線維形成に重要な役割を果たしている¹⁾。Postn は線維形成だけでなく、種々のタンパクと直接結合することによってマトリセルラータンパクとして細胞の増殖分化にも寄与する。Postn 遺伝子を全身的に欠失させた *Postn*-knockout (KO) マウスは重度の歯周組織破壊を呈するが²⁾、その機序は未解明である。多機能分子である Postn は多様なタンパクとの相互作用を有することから、*Postn*-KO マウスの歯周組織における表現系は単なる Postn の欠失だけでなく、Postn と相互に作用するタンパク群の変化として捉える必要がある。しかし Postn の欠失が個々の Extracellular matrix (ECM) タンパクの増減や局在に及ぼす影響を解析した報告はあるものの、その包括的な理解には至っていない。そこで本研究では、歯根膜における Postn の機能を明らかにするため、Postn の欠失が歯根膜の ECM に及ぼす影響をマルチオミックスの手法を用いて解析することを目的とした。

【方 法】

野生型 (WT: C57BL/6J) および *Postn*-KO マウスの上下顎臼歯から歯根膜細胞 (PDLC: Periodontal ligament cell) を採取した。PDLC の培養 7, 14 日目に total RNA を回収し、RNA-seq による網羅的遺伝子発現解析

を行った (n=4)。また PDLC を 7 日間増殖させた後に、アスコルビン酸の存在下で 14 日間培養し、ECM を豊富に含む歯根膜細胞シートを調整した (n=5)。RIPA buffer を用いてタンパクの回収を行い、遠心分離により上清中に回収されるタンパクを Cell 画分 (Cell-Fr)、沈殿物を ECM 画分 (ECM-Fr) とした。可溶化したそれぞれの画分をペプチド化し、質量分析装置によりタンパクの同定を行った。得られた網羅的データから ECM とその合成に関わる分子群 (Matrisome) を抽出し、統計的に優位な発現変動遺伝子/タンパクにおいて各種経路解析を行った。

【結果と考察】

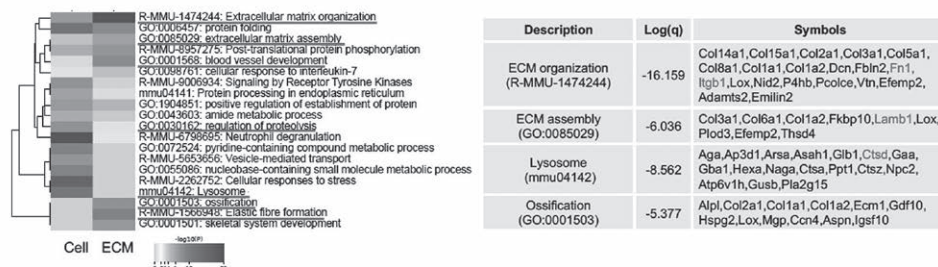
Matrisome 遺伝子における発現変動遺伝子の Enrichment 解析の結果、*Postn*-KO PDLC では Matrix metalloproteinase (MMP) による ECM 分解系の促進が示唆された。

Postn-KO の ECM-Fr におけるタンパク量は WT と比較して約 48% 少なく、WT では Matrisome タンパクの 13.2% を占める Postn は *Postn*-KO では検出されなかった。WT では 42.5% を示す ECM-Fr のコラーゲン組成は、*Postn*-KO では 57.2% に増加していた。Cell-Fr と ECM-Fr における発現変動タンパクを用いて統合的な Enrichment 解析を行ったところ、発現が増加したタンパク群からは ECM organization, lysosomes, ossification の関与が示唆され、発現が減少したタンパク群からは、ECM organization, focal adhesion, ECM-receptor interaction の関与が示唆された。

遺伝子発現解析の結果、*Postn*-KO では MMP による ECM 分解系の促進が示唆されたが、これは *Postn*-KO において *Mmp2*, *Mmp11*, *Mmp14* が減少し、*Mmp12*, *Mmp13*, *Mmp23* が増加していたためであった。しかしタンパクレベルでは ECM-Fr からは *Mmp2* のみが検出され、Cell-Fr からは *Mmp2* と *Mmp14* が検出されたが、いずれの MMP においても *Postn*-KO と WT 間ではタンパク量の変化は認められなかった。

前述のように、遺伝子発現解析に基づく Enrichment 解析により示唆された経路の一部は、タンパクレベルではその変化は確認されなかった。遺伝子発現解析はそのダイナミックレンジの広さから未知の経路を探索するのに有効であるが、本研究結果は単独のオミックスデータが必ずしも生体内で生じている現象を反映しない可能性を示しており、今後更なる検証が必要であることを強く

Enrichment analysis of upregulated DEPs



Enrichment analysis of downregulated DEPs

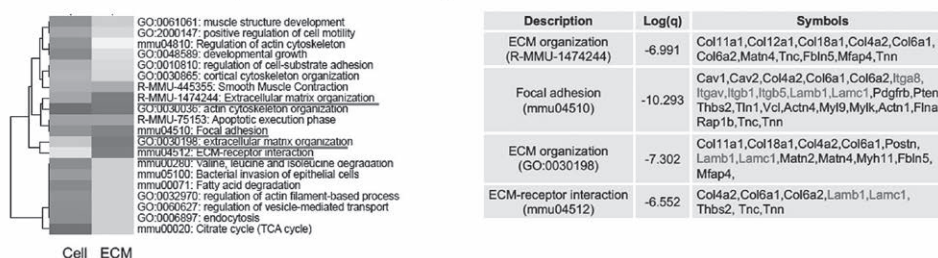


図1. *Postn*-KO Cell-Fr と ECM-Fr における発現変動タンパクを用いた Enrichment 解析

示唆している。さらには得られた結果を組織学的に検証することも不可欠であり、現在は *Postn*-KO マウスの歯根膜組織標本を用いた解析を進めている。

【結 論】

マルチオミックス解析を用いた本研究の結果、*Postn* が PDLC の ECM-細胞間相互作用と MMP による ECM 分解に寄与していることが示唆された。近年の研究から歯根膜は均一な組織ではなく、部位や力学的な環境によって ECM の組成がダイナミックに変化することが明らかとなりつつある^{3, 4, 5)}。*Postn*-KO マウスにおける歯周組織破壊は、ECM における特定のタンパクの変化が歯周組織破壊のリスクとなり得ることを示唆しており、歯根膜組織の ECM 組成を把握することが臨床的な歯周組織破壊のリスク評価に有効である可能性を示している。また本研究で示唆された *Postn*-KO 歯根膜細胞における ECM-細胞間相互作用の変化は、歯根膜の ECM 分解系を抑制するための介入対象としても期待される。さらなる実験的研究が必要であるが、マルチオミックス解析による本研究結果は、歯根膜の恒常性維持における *Postn* の新たな機能を示唆するものであった。

【参考論文】

- 1) Kudo A, Kii I. Periostin function in communication with extracellular matrices. J Cell Commun Signal. 12 (1) : 301-308, 2018.
- 2) Rios HF, Ma D, Xie Y, Giannobile WV, Bonewald LF, Conway SJ, Feng JQ. Periostin is essential for the integrity and function of the periodontal ligament during occlusal loading in mice. J Periodontol. 79 (8) : 1480-1490, 2008.
- 3) Thant L, Kaku M, Kakiyama Y, Mizukoshi M, Kitami M, Arai M, Kitami K, Kobayashi D, Yoshida Y, Maeda T et al. Extracellular matrix-oriented proteomic analysis of periodontal ligament under mechanical stress. Front Physiol. 13 : 899699, 2022.
- 4) Denes BJ, Ait-Lounis A, Wehrle-Haller B, Kiliaridis S. Core matrisome protein signature during periodontal ligament maturation from pre-occlusal eruption to occlusal function. Front Physiol. 11 : 174, 2020.
- 5) Connizzo BK, Sun L, Lacin N, Gendelman A, Solomonov I, Sagi I, Grodzinsky AJ, Naveh GRS. Nonuniformity in periodontal ligament: Mechanics and matrix composition. J Dent Res. 100 (2) : 179-186, 2021.