



Title	低ホスファターゼ症モデルマウスの作製および表現型の解析
Author(s)	落合, まりん
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105344
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed >大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (落合 まりん)

論文題名 低ホスファターゼ症モデルマウスの作製および表現型の解析

論文内容の要旨

【緒言】

低ホスファターゼ症 (Hypophosphatasia; HPP) は、*ALPL* 遺伝子の病的バリエーションによって引き起こされる骨系統疾患であり、主症状として骨の石灰化不全やセメント質形成不全に起因する乳歯の早期脱落が挙げられる。*ALPL* 遺伝子におけるバリエーションの多様性から、HPP の表現型も多様である。本邦の HPP 患者において高頻度に認められるバリエーションとして、常染色体潜性遺伝形式である c.1559delT および p.F327L が挙げられ、c.1559delT はホモ型において重症型、p.F327L はコンパウンドヘテロ型において軽症型に関連する可能性が示されている。また、歯限局型 HPP 患者には常染色体顕性遺伝形式である p.R184W のヘテロ型が多く報告されている。

近年、酵素補充療法の確立や HPP に対する認知度の高まりから、歯科を受診する HPP 患者は増加傾向にある一方で、歯科症状に関しては未知の部分が多いことから、HPP 患者に対する系統立った歯科的管理法は未だ確立されていない。そこで、本研究では3つの *ALPL* 遺伝子のバリエーションを有するノックイン (KI) マウスを作製し、全身症状ならびに顎骨や歯周組織の状態について分析を行うこととした。

【方法】

1. *ALPL* 遺伝子の病的バリエーションを有する KI マウスの作製

本研究は、ICR 系統のマウスを使用し、3種類の *ALPL* 遺伝子のバリエーションを有するヘテロ型 KI マウスを作製した。HPP 患者における遺伝形式を再現するため、c.1559delT および p.F327L においては、ヘテロ型マウス同士を交配させた。また、p.R184W においては、ヘテロ型マウスの雄と野生型マウスの雌を交配させた。さらに、c.1559delT ヘテロ型と p.F327L ヘテロ型マウスを交配させた。

生まれた子マウスから3週齢時に尾の一部を genotyping 用のサンプルとして採取して DNA を抽出し、PCR 法を用いて *ALPL* 遺伝子型を確認した。

2. 血清 TNAP 値の測定および長管骨の分析

12 週齢を迎えた子マウスに対し、血液を採取した後に灌流固定を行い、下顎骨および下肢骨を摘出した。その後、血清 TNAP 値と長管骨の長径および幅径を測定した。また、下肢骨全体のマイクロ CT 撮影を行い、得られたデータから長管骨中央の海綿骨を測定部位として骨密度を測定した。

3. 顎骨の分析

下顎骨の片顎をマイクロ CT を用いて撮影し、第一臼歯根分岐部の海綿骨を測定部位として骨密度測定を行った。また、画像の三次元構築を行ってセメントエナメル境-歯槽骨頂 (Cement enamel Junction-alveolar bone crest; CEJ-ABC) 間距離を計測し、歯槽骨レベルを評価した。

4. 歯および歯周組織の分析

マイクロCT で得られたデータをもとに歯髓腔面積の割合を算出した。また、第一臼歯根分岐部に直径 0.2 mm のタングステンワイヤーを通し、そのワイヤーをクロスヘッド速度 1 mm/分にて垂直方向に牽引することにより、第一臼歯が抜歯されるまでに要した最大荷重を計測し、歯根膜の強度を評価した。さらに、もう一方の片顎を用いて薄切切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色

およびセメント質形成に関与する遺伝子の1つであるオステオポンチン (OPN) 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、病理組織学的評価を行った。

5. 統計学的分析

2群間の比較は Student の t 検定を用い、多群間の比較には ANOVA の後 post-hoc test として Bonferroni 法を用いた。統計学的有意水準は全て 5 %以下とした。

【結果】

1. 生まれた子マウスの遺伝子型

c.1559delT ヘテロ型マウス同士の交配では、c.1559delT ホモ型マウスは生まれず、c.1559delT ヘテロ型マウスの出生を確認することができた。また、p.F327L ホモ型およびヘテロ型、p.R184W ヘテロ型、c.1559delT/p.F327L コンパウンドヘテロ型マウスは出生を確認することができた。

2. 血清 TNAP 値

3種類のヘテロ型、p.F327L ホモ型および c.1559delT/p.F327L コンパウンドヘテロ型 KI マウスは、野生型マウスと比較して有意に低い血清 TNAP 値を示した ($P<0.05$)。

3. 長管骨の分析

c.1559delT/p.F327L コンパウンドヘテロ型マウスにおける長管骨の長径および幅径それぞれの平均値は、野生型マウスのものと比較して有意に小さかった ($P<0.05$)。一方で、長管骨の骨密度の平均値は、いずれの KI マウスにおいても野生型マウスのものと比較して有意差は認められなかった。

4. 顎骨の分析

p.F327L ホモ型、p.R184W ヘテロ型および c.1559delT/p.F327L コンパウンドヘテロ型マウスにおける歯槽骨の骨密度の平均値は、野生型のものと比較して有意に低かった ($P<0.05$)。また、p.R184W ヘテロ型および c.1559delT/p.F327L コンパウンドヘテロ型マウスにおける CEJ-ABC 間距離は、野生型のものと比較して有意に離れていることが示された ($P<0.01$)。

5. 歯および歯周組織の分析

c.1559delT/p.F327L コンパウンドヘテロ型マウスにおける切歯の歯髓腔面積の割合の平均値は、野生型のものと比較して有意に大きかった ($P<0.05$)。また、第一臼歯が抜歯されるまでに要した最大荷重の平均値は、p.R184W ヘテロ型および c.1559delT/p.F327L コンパウンドヘテロ型マウスにおいて、野生型のものと比較して有意に低かった ($P<0.05$)。病理組織学的評価では、c.1559delT/p.F327L コンパウンドヘテロ型マウスの HE 染色標本において、深い歯肉溝が生じているマウスが確認された。また、免疫染色標本において、p.R184W ヘテロ型および c.1559delT/p.F327L コンパウンドヘテロ型マウスの歯根では、野生型マウスと比較して OPN の発現が少なかった。

【考察】

本研究において、c.1559delT ホモ型マウスは、ヒトにおける周産期重症型 HPP の表現型と類似し、胎死または出生後数日以内に死亡した可能性があると考えられる。また、c.1559delT/p.F327L コンパウンドヘテロ型マウスは、血清 TNAP の低値、軽度の骨症状および歯科症状を発症しており、ヒトにおける軽症型 HPP の表現型と類似していることが示された。さらに、p.R184W ヘテロ型マウスは、血清 TNAP の低値および歯科症状を発症しており、ヒトにおける歯限局型 HPP の表現型と類似していることが示された。c.1559delT および p.F327L のヘテロ型マウスは、血清 TNAP の低値のみを認め、ヒトにおける HPP 保因者の表現型と類似していることが示された。

以上のことから、本研究を通して、*ALPL* 遺伝子の病的バリエントを有し、ヒトの病態を再現した HPP モデルマウスを構築できたと考えられる。今後は、このモデルマウスを用いて HPP 患者の歯科症状に対する治療法の確立を目指していきたい。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (落 合 ま り ん)		
	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査	教授 仲野 和彦
	副 査	教授 竹立 匡秀
	副 査	准教授 高畑 佳史
	副 査	講師 犬伏 俊博

論文審査の結果の要旨

本研究は、日本人低ホスファターゼ症患者に多く認められる 3 つの *ALPL* 遺伝子のバリエントをノックインしたマウスを作製し、全身の状態ならびに顎骨や歯周組織の状態について分析を行ったものである。その結果、本研究で作製したノックインマウスは、全身症状と歯科症状ともにヒトにおける表現型と類似していることが示された。

本研究成果は、ヒトの病態を再現した新たな **HPP** モデルマウスを構築することができたということを示すものであり、博士（歯学）の学位授与に値するものと認める。