OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	炎症歯周組織におけるPLAP-1の発現と機能
Author(s)	平井, 麻絵
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72253
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、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

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　　名　（　平井　麻絵　）	
論文題名	炎症歯周組織におけるPLAP-1の発現と機能

論文内容の要旨

【研究目的】

歯周病はデンタルプラークが原因となり、歯槽骨の吸収を伴う歯周組織の破壊が生じる慢性炎症疾患である。歯周組織の一つである歯根膜は歯を歯槽窩に保持し、線維性結合組織としての性質を維持しながら咬合に起因するメカニカルストレスを緩衝するとともに、歯周組織の恒常性維持や歯周組織再生に関与する未分化間葉系幹細胞の供給源として重要な役割を演じている。その一方で、細菌由来因子の暴露や咬合性外傷や矯正力等により、歯根膜細胞は各種炎症性メディエーターを産生するとともに、RANKLやOPGなどの破骨細胞分化調整因子の産生を介して歯槽骨のリモデリングや吸収にも積極的に関与することが示唆されている。

歯根膜に高発現している細胞外基質タンパクPLAP-1（Periodontal Ligament Associated Protein-1）はTGF-β、BMP-2、FGF-2といったサイトカインの機能を調節する一方、TLR2、TLR4の活性化を抑制するなど、歯根膜細胞の分化や炎症反応等を制御することにより、歯周組織の恒常性維持に重要な役割を果たす多彩な機能を持つ分子である。しかしながら、炎症反応が歯根膜におけるPLAP-1の発現に及ぼす影響についてはこれまでに十分な検討がなされていない。

またPLAP-1が属するSLRP familyはⅠ型からⅤ型までに分類され、同familyに属する複数の分子が破骨細胞の分化過程を抑制することが報告されている。破骨細胞の形成に対するSLRPの関与が明らかになる一方で、同familyに属するPLAP-1が歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化に及ぼす影響が明らかになっているものの、同分子が破骨細胞の形成に果たす役割に関しては全く報告がない。

そこで本研究では、炎症歯周組織におけるPLAP-1の発現制御について明らかにするとともに、歯周病の病態形成過程におけるPLAP-1の役割の一端を明らかにするために、PLAP-1が破骨細胞の形成に及ぼす影響についても検討することを目的とした。

【材料および方法】

Lonza社ヒト歯根膜細胞（HPDL）をヒト型リコンビナントIL-1β、IFN-γ、TNF-α、IL-6存在下にて培養し、*PLAP-1*の発現をリアルタイム PCR（qPCR法）にて検討した。またIL-1βが、PLAP-1と同様に歯根膜に高発現しているPeriostin、およびPLAP-1と同じSLRP family class Iに属するBiglycan、Decorin両分子の遺伝子発現に影響を及ぼすか否かについての検討を行った。

また、8週齢のC57BL6J♂マウスの上顎左側第二後臼歯に5-0絹糸を結紮後、7日間SPF環境下にて飼育し、絹糸結紮マウス歯周炎モデルを作製した。CO_2を用いて安楽死後、結紮側を試験側、上顎右側第二後臼歯部を対照側として採取し、μCTにて骨吸収を確認後、HE染色、蛍光免疫染色にて組織学的評価を行った。次に新鮮凍結切片を作製し、Laser capture microdissection（LMD）にて歯根膜組織を採取した。採取した組織からRNAを抽出し*PLAP-1*の発現をqPCR法にて解析する一方で、タンパク質の発現はLC-MS/MS分析にて検討した。

さらに、マウス骨髄細胞を用いてPLAP-1が破骨細胞の分化過程に及ぼす影響を検討した。すなわち、M-CSF存在下にてマウス骨髄細胞を培養した際に、マウスリコンビナントPLAP-1を添加し、破骨細胞前駆細胞への分化に及ぼす影響について明らかにするために、マクロファージマーカーであるF4/80とCD11bの発現をフローサイトメトリー法にて解析するとともに、RANK遺伝子（*Tnfrs11a*）の発現を指標にqPCR法にて解析を行った。続いて、M-CSFにて誘導した破骨細胞前駆細胞に対し、RANKL添加とともにリコンビナントPLAP-1を添加し、各種破骨細胞マーカー遺伝子の発現をqPCR法にて検討するとともに、TRAP染色にて破骨細胞形成分化の評価を行った。同様の実験を、マウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞を用いて行った。

【結果】

HPDLをIL-1β存在下にて6時間、24時間、48時間培養した結果、*PLAP-1*の発現は刺激後24時間、48時間で無刺激群と比較し有意に抑制された。またIFN-γ、TNF-α存在下にて48時間培養した際にもIL-1β存在下同様に、*PLAP-1*の発現は無刺激群と比較し濃度依存的に有意に抑制されることが明らかとなった。一方で、IL-6は*PLAP-1*の発現に顕著な影響を及ぼさなかった。またHPDLをIL-1β存在下にて48時間培養した結果、*POSTN*、*BGN*、*DCN*の発現に顕著な影響を及ぼさなかった。

絹糸結紮マウス歯周炎モデルにおいてはμCTにより第二後臼歯周囲に歯槽骨の著しい吸収が確認されるとともに、組織学的解析において歯槽骨の破壊と歯根膜組織における炎症性細胞の浸潤が認められた。さらに、LMDにて採取した試験側の歯根膜組織における*Il1β*、*Il6*、*Spp1*の発現が対照側に比べ有意に上昇していたことから同上モデルにおいて歯根膜組織に炎症反応が惹起されていることが確認された。このモデルマウスの歯根膜組織における*Plap-1*の発現をqPCR法にて解析した結果、試験側における*Plap-1*の発現は対照側に比べ有意に低下していることが明らかになった。またこの発現低下は、蛍光免疫染色およびLC-MS/MS分析によってタンパクレベルでも確認された。

一方で、マウス骨髄細胞の破骨細胞前駆細胞への分化過程にPLAP-1を添加した結果、PLAP-1はM-CSFによって誘導されるF4/80陽性CD11b陽性のマクロファージへの分化および同細胞におけるRANK遺伝子(*Tnfrs11a*)の発現に影響を及ぼさなかった。しかしながらRANKL刺激により誘導される破骨細胞マーカー（*Ctsk*、*Calcr*、*Acp5*、*Oscar*）の遺伝子発現はPLAP-1の添加により濃度依存的に有意に低下した。さらにTRAP染色の結果、コントロールにて観察されたTRAP陽性の多核細胞は、PLAP-1添加により濃度依存的に抑制されることが明らかとなった。骨髄細胞と同様にRAW264.7細胞においてもRANKL刺激によって誘導される破骨細胞マーカー遺伝子の発現は、PLAP-1の添加により濃度依存的に有意に低下することが明らかとなった。

【結論および考察】

PLAP-1は、健常な抜去歯の歯根膜を試料として用いて作成されたcDNAライブラリーから、歯根膜に特異的かつ恒常的に発現する細胞外基質タンパクとして同定された。その後の機能解析から歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化に対する抑制作用が見出され、同分子が歯根膜の靭帯組織としての機能維持に重要な役割を担うことが明らかとなった。しかし近年、TLRのアンタゴニストとしてのPLAP-1の機能が見出される一方で、変形性関節症の病態形成や腫瘍の転移におけるPLAP-1/Asporinの機能が明らかとなり、同分子の病態生理学的な役割が注目されるようになってきた。

本研究では、PLAP-1の歯周病の病態形成への関与に着目し、歯根膜に恒常的に発現するPLAP-1は炎症反応に伴い、その発現が低下することを明らかにした。またPLAP-1に破骨細胞の形成を抑制する機能が見出されたことから、炎症反応に伴うPLAP-1の発現低下が歯周病における歯槽骨破壊の一端となることが示唆された。

歯根膜には、未分化間葉系幹細胞や骨芽細胞が含まれ、歯槽骨の再生過程やリモデリングの際に歯槽骨の形成に重要な役割を果たしている。歯根膜は歯槽骨の形成のみならず、破骨細胞による歯槽骨吸収をも調整する役割を担っていること、さらに、健康な歯根膜においてPLAP-1は恒常的に発現していることから、歯根膜周囲にはPLAP-1に依存した破骨細胞分化抑制機構が存在していることが示唆される。本研究にて明らかとなったPLAP-1による破骨細胞形成の抑制は、常に咬合力などのメカニカルストレスに晒された歯根膜においてPLAP-1が恒常的に発現することにより歯根膜周囲で生理的な範囲を超えた破骨細胞形成が生じないよう恒常性を維持する役割を果たしていると考えられる。しかしながら、歯周病や咬合性外傷などの炎症反応が惹起されると、歯根膜におけるPLAP-1の発現は低下し、同分子による骨吸収抑制効果が抑制され、病的歯槽骨吸収の発症と進行に関与するのではないかと考えられる。また、歯周病の病巣局所においてPLAP-1の発現が低下していることが想定されることから、炎症抑制因子、破骨細胞抑制因子としてのPLAP-1を局所的に投与することができれば、歯周病進行の抑制につながる新たな歯周病の治療薬として期待できるのではないかと考えられる。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名（　平井　麻絵　）			
	（職）		氏　名
論文審査担当者	主 査	教授	村上　伸也
	副 査	教授	野田　健司
	副 査	准教授	中田　匡宣
	副 査	講師	関根　伸一

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯根膜に高発現する PLAP-1 分子が歯周病の病態形成にどのように関与するのかを解明するために、炎症歯周組織における PLAP-1 発現の制御を解明するとともに、PLAP-1 が破骨細胞過程において果たす役割について解析したものである。

その結果、歯根膜細胞に発現する PLAP-1 は炎症性サイトカイン存在下でその遺伝子発現が低下することに加え、マウス歯周炎モデルを用いた *in vivo* の解析から炎症歯根膜における PLAP-1 の発現低下が見出された。さらに、PLAP-1 は RANKL 依存性の破骨細胞形成を抑制することが明らかとなった。

以上の研究成果は、炎症反応に伴う PLAP-1 の発現変化が歯周病の病態形成に果たす役割の一端を明らかにし、歯周病における組織破壊の原因を解明する上で重要な知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位を授与するのに値するものと認める。