OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	PLAP-1ノックアウトマウスにおける歯根膜の構造機能解析
Author(s)	木下, 昌毅
Citation	大阪大学, 2020, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/76299
rights	
Note	

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　（　木下　昌毅　）	
論文題名	*PLAP-1*ノックアウトマウスにおける歯根膜の構造機能解析

論文内容の要旨

【研究目的】

PLAP-1は、当研究室にてヒト歯根膜cDNAライブラリーより同定された細胞外基質であり、歯根膜に高頻度かつ特異的な発現を示す分子量約40kDaのプロテオグリカン様分子である。PLAP-1はN末端領域に4つ、C末端領域に2つのシステイン残基を含むコンセンサスモチーフを有し、中央部には10個のleucine-rich repeat（LRR）ドメインを持つことから、Decorin、Biglycanと共にsmall leucine-rich repeat proteoglycan（SLRP）family class Ⅰに属している。歯周組織においてPLAP-1は歯根膜細胞のborn morphogenetic protein-2（BMP-2）誘導性分化の抑制や、fibroblast growth factor-2（FGF-2）機能亢進など歯周組織の恒常性維持に重要な役割を担っている。また、PLAP-1がToll-like receptor2（TLR2）およびToll-like receptor4（TLR4）を介した炎症反応を抑制する事で歯周組織の炎症反応を制御し歯周病などの病態形成に関与している可能性を明らかにしてきた。さらに、PLAP-1はtransforming growth factor-β（TGF-β）と結合する事でTGF-βの機能を抑制する事が報告されている。歯根膜を構成する線維成分で最も多いcollagen type1の形成や架橋にECMが直接関与している事が報告されており、PLAP-1がcollagen type1と結合することにより線維形成やコラーゲンの強度などの機能に直接関与している可能性が示唆される。しかしながら、歯根膜の構造や機能へのPLAP-1の関与や、歯周病の進行におけるPLAP-1の関与については、未だその詳細は不明である。そこで、我々はPLAP-1の歯根膜における役割と機能およびPLAP-1と歯周病との関連性について明らかにする事を目的として以下の研究を行った。

【材料および方法】

① *PLAP-1* KOマウスの歯周組織表現型の解析

10～12週齢オスC57BL/6（WT）マウスおよび*PLAP-1* KOマウスからそれぞれ上顎骨を回収し、マイクロCT撮影を行い歯周組織の状態および歯根形態の観察を行った。また、上顎歯周組織の切片を作製し、Hematoxylin-Eosin（HE）染色、ピクロシリウスレッド染色を行い、歯周組織の組織学的解析を行った。上顎歯周組織の切片の蛍光免疫染色を行い歯根膜でのタンパク質発現解析を行った。次に、それぞれのマウスから上顎骨の歯肉剥離後、第一大臼歯を抜歯、歯根膜を掻爬しRNAを抽出し、リアルタイムPCR法にて遺伝子発現解析を行った。

② *PLAP-1* KOマウスの歯根膜の微細構造解析

12週齢オスのWTマウスおよび*PLAP-1* KOマウスの上顎骨第一臼歯部歯根膜のコラーゲン原線維に対して走査型電子顕微鏡を用いて観察を行った。さらに6週齢、12週齢、48週齢オスのWTマウスおよび*PLAP-1* KOマウスの上顎骨第一臼歯部歯根膜のコラーゲン原線維に対して、透過型電子顕微鏡を用いてコラーゲン原線維の直径の定量解析を行った。

③ *PLAP-1*ノックダウン歯根膜細胞におけるコラーゲン形成能解析

siRNAを用いてヒト歯根膜細胞の内在性*PLAP-1*遺伝子の発現を抑制した。同細胞を培養し6日目、9日目に免疫細胞染色を行い、collagen type1の形成を観察した。

④ *PLAP-1* KOマウスの歯根膜機械的強度解析

12週齢オスのWTマウスおよび*PLAP-1* KOマウスから採取した下顎骨周囲をコンポジットレジンにて補強し固定を行った。下顎第一臼歯根分岐部にタングステンワイヤーを通し、クロスヘッドスピード毎分1mmにて牽引を行い、牽引時の最大応力を計測した。

⑤ 絹糸結紮歯周病モデルを用いた歯周組織の解析

8週齢オスWTマウスおよび*PLAP-1* KOマウスに全身麻酔下で上顎左側第二臼歯部歯頚部に8-0絹糸にて結紮を

行い、結紮側とした。また、上顎右側第二臼歯には処置をせず非結紮側とした。絹糸結紮後14日目にすべての群のマウスから回収した上顎骨をマイクロCT撮影し、結紮側および非結紮側の第二臼歯周辺の歯槽骨の状態を観察した。マイクロCT撮影後に歯周組織の切片を作製し、HE染色、ピクロシリウスレッド染色およびTRAP染色を行い、歯周組織の組織学的解析を行った。

【結果】

① マイクロCT撮影の結果、*PLAP-1* KOマウスとWTマウスには歯槽骨吸収量や上顎第二臼歯歯根の形態に差は認められなかった。一方で、上顎第二臼歯の歯根膜腔の体積が、WTマウスと比較して*PLAP-1* KOマウスにて有意に増加している事が明らかとなった。上顎歯周組織のHE染色ではWTマウスと比較して*PLAP-1* KOマウスにて、歯周組織に明らかな形態的異常は認められなかった。ピクロシリウスレッド染色にて歯根膜線維の観察を行ったところ、WTマウスと比較して*PLAP-1* KOマウスにて歯根膜線維が有意に疎になっている事が明らかとなった。歯根膜の遺伝子発現解析の結果から、Decorin、BiglycanではWTマウスと比較して*PLAP-1* KOマウスで発現に差は認められなかった。また、歯根膜で著明な発現の認められるcollagen type1やtype3においても遺伝子発現に差は認められなかった。一方で、上顎歯周組織の蛍光免疫染色より、WTマウスと比較して*PLAP-1* KOマウス歯根膜にてBiglycanとDecorin、collagen type3の有意なタンパク質発現の上昇が認められた。

② 走査型電子顕微鏡を用いた解析で*PLAP-1* KOマウスの歯根膜のコラーゲン原線維の三次元的な構造の異常が認められた。また、透過型電子顕微鏡を用いた解析より、6週齢と12週齢においてWTマウスと比較して*PLAP-1* KOマウスではコラーゲン原線維の直径が有意に大きくなっていることが明らかとなった。

③ siRNAにて*PLAP-1*をノックダウンした歯根膜細胞において、培養6日目、培養9日目それぞれにおいてcollagen type1の形成抑制が観察された。

④ WTマウスと比較して*PLAP-1* KOマウスにて牽引による抜歯時の最大応力の有意な減少が明らかとなった。

⑤ WTマウスと比較して*PLAP-1* KOマウスにおいて、絹糸結紮側にて有意に骨吸収が起こっている事が明らかとなった。HE染色およびピクロシリウスレッド染色よりWTマウスと比較して*PLAP-1* KOマウスにて、歯根膜線維の断裂や血管の拡張が認められた。また、絹糸結紮側にてWTマウスと比較して*PLAP-1* KOマウスにおいて、破骨細胞数が有意に増加している事がTRAP染色より明らかとなった。

【結論および考察】

PLAP-1は正常な歯根膜のコラーゲンの構造と強度の維持に深く関与し、歯周病の進行を抑制的に制御している事が示唆された。PLAP-1はTGF-βと結合する事でTGF-βの機能を抑制する事が報告されているが、*PLAP-1* KOマウスでの歯根膜を構成するコラーゲン原線維の異常には、TGF-βシグナルの亢進による細胞外マトリックスの制御の破綻が関連していると考えられる。また、同時にPLAP-1はコラーゲンに直接的に作用し、歯根膜を構成するコラーゲンの形成や架橋に関与している。これらのことから*PLAP-1* KOマウスにおいて歯根膜のコラーゲンの形成や網目構造に異常が生じ、コラーゲンの強度が低下する事で、構造が脆弱になり、歯周病による歯根膜の破壊が亢進したものと考えられる。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（　木下昌毅　）		
	（職）	氏　名
論文審査担当者	主 査　教授 副 査　教授 副 査　准教授 副 査　講師	村上　伸也 豊澤　悟 中澤　敬信 黒坂　寛

論文審査の結果の要旨

本研究は、歯根膜に特異的に発現する細胞外基質である periodontal ligament associated protein-1（PLAP-1）が、歯根膜を構成するコラーゲン線維の機能に及ぼす影響を解明する事を目的として、歯根膜の強度や歯周炎の進行に対する PLAP-1 の影響について、同分子のノックアウトマウスを用いて解析したものである。

その結果、*PLAP-1* ノックアウトマウスは歯根膜腔の体積が大きく、歯根膜を構成するコラーゲン原線維に異常が見られ、歯根膜が脆弱であること、また、絹糸結紮歯周病モデルにおいて、野生型マウスと比較して *PLAP-1* ノックアウトマウスにおいて歯槽骨吸収が増加し、歯周組織破壊の増悪を認めることが明らかとなった。以上の結果より、PLAP-1 は正常な歯根膜のコラーゲンの構造と強度の維持に深く関与し、歯周病の進行を抑制的に制御していることが明らかとなった。これらの研究成果は、歯周組織の恒常性維持における PLAP-1 の機能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）の学位論文として価値のあるものと認める。