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

学位論文

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

大阪大学大学院歯学研究科　口腔科学専攻

口腔分子免疫制御学講座　歯周病分子病態学

木下　昌毅

（指導教官：村上　伸也教授）

本論文の要旨は、第 148 回日本歯科保存学会春季大会（2018 年 6 月 14、15 日、横浜）、第 61 回日本歯周病学会秋季学術大会（2018 年 10 月 26、27 日、大阪）、第 66 回国際歯科学研究学会（JADR、2018 年 11 月 17、18 日、北海道）、The 97th General Session and Exhibition of the International Association for Dental Research（2019 年 6 月 19 日、Vancouver）、第 62 回日本歯周病学会秋季学術大会（2019 年 10 月 25、26 日、北九州）において発表した。

緒言

PLAP-1（Periodontal ligament associated protein-1）は我々の研究室においてヒト歯根膜 cDNA ライブラリーより同定された細胞外基質（ECM）タンパクであり、歯根膜において高頻度かつ特異的に発現する分子量約 40kDa のプロテオグリカン様分子である[1,2]。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[3]。我々の先行研究から、PLAP-1 は BMP-2 や TGF-β と結合することで、歯根膜細胞が硬組織形成細胞へと分化する事を抑制的に制御することを明らかにしてきた[4-6]。また、歯根膜細胞が Toll-like receptor2（TLR2）および Toll-like receptor4（TLR4）を介して発現する炎症反応を PLAP-1 が負に制御することで、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[7]。これらの機能を通じて、PLAP-1 は様々なサイトカインの作用を制御し、歯根膜の恒常性維持に重要な役割を果たしていると考えられる。

歯根膜は歯と歯槽骨の２つの硬組織に囲まれ、咬合力等のメカニカルストレスを受けつつ、靭帯として軟組織の性質を維持しているユニークな組織である。歯根膜は歯根膜線維芽細胞をはじめとする様々な細胞成分とコラーゲンなどの各種 ECM により構成されている[8]。歯根膜を構成する ECM は常に細胞間を埋める構成成分として機能するのみならず、種々の生物学的活性を発現する事で、細胞の増殖や分化、線維形成に関与している[9]。歯根膜の線維成分で最も多い I 型コラーゲンの形成や架橋の成熟には ECM が直接関与している事が報告されている[10]。特に PLAP-1 は I 型コラーゲンに結合することにより、PLAP-1 が歯根膜における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[11]。PLAP-1 と相同性が高く、PLAP-1 と同じ SLRP class I である Biglican や Decorin においても I 型コラーゲンとコアタンパク質を通して相互作用する事で、線維形成や架橋の恒常性の維持に関与している事が報告されている[12-14]。

歯周炎は、細菌感染にメカニカルストレスを伴う慢性炎症性疾患であり、歯周組織の破壊を伴い進行する[15,16]。歯根膜の恒常性維持に重要な役割を演じる PLAP-1 が、歯周炎の進行による恒常性の破綻に対してどのような役割を持つかについては未だ詳細は不明である。

そこで本研究では当研究室にて樹立した *PLAP-1* ノックアウトマウス[17]において、歯周組織にいかなる変化が起こっているのかを詳細に観察し、歯槽骨や歯根膜、および歯根膜コラーゲン線維の構造解析を行った。さらに、PLAP-1

が歯根膜を構成するコラーゲン線維束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伴う反応を観察する事で、歯根膜の形態およびその強度における PLAP-1 の役割と機能について解析を行った。

材料および方法

1. 歯槽骨吸収量の定量解析

本研究における全ての動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認を得て行った（承認番号：動歯 30-010-0）。10-12 週齢の C57BL/6J マウス（日本 SLC 株式会社、浜松、静岡、日本、以下 WT マウスと略す）および *PLAP-1* KO マウスをペントバルビタールナトリウム麻酔下にて 4%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液（和光純薬工業、大阪、日本、以下 4%PFA と略す）を用いて還流固定後、上顎を採取し、実験動物用 3D マイクロ X 線 CT R_mCT2（リガク、東京、日本）により断層撮影を行い、得られた 3 次元画像を 3 次元画像解析ソフトウェア TRI/3D-BON（ラトックシステムエンジニアリング、東京、日本）により 2 次元化した。画像解析ソフトウェア WinROOF（三谷商事、福井、日本）を用いて、2 次元化した画像におけるセメントエナメルジャンクションから歯槽骨頂までの根尖方向の距離を測定し、第一臼歯遠心根、第二臼歯近心および遠心根、第三臼歯の歯根における測定値の合計を同上マウスの歯槽骨吸収量とした。

2. Micro Computed Tomography（以下 μCT と略す）による歯根離開度と歯根膜腔の定量解析

12 週齢の WT および *PLAP-1* KO マウスをペントバルビタールナトリウム麻酔下にて 4%PFA を用いて還流固定後、上顎骨と下顎骨を摘出し、4%PFA に浸漬した。そして、高分解能 3D X 線顕微鏡 SKYSCAN1272（ブルカージャパン、神奈川、日本）により断層撮影を行い、得られた上顎第二臼歯の 3 次元画像を CTvox（ブルカージャパン）にて 2 次元化し、近心頬側根と遠心頬側根の歯根軸の角度を計測し定量解析を行った。また、得られた 3 次元画像を画像解析ソフトウェア CTAn（ブルカージャパン）を用いて歯根膜腔の体積の定量解析を行った。

3. マウス歯周組織の組織学的解析

10 週齢雄 WT および *PLAP-1* KO マウスをペントバルビタールナトリウム麻酔にて安楽死後、4%PFA を用いて還流固定を行い、上顎骨を摘出し、PFA に浸漬した。EDTA にて脱灰処理後、組織をパラフィンワックスに埋没し、LEICA RM2245（Leica Microsystems、Wetzlar、Germany）を用いて厚さ 8 μm で薄切標本を作製した。薄切切片は、マイヤー・ヘマトキシリン（武藤化学）および 1%エオシン Y 液（和光純薬工業）を用いてヘマトキシリン・エオシン（HE）染色を行い、形態学的に評価した。また、コラーゲンの走行を観

察するため、薄切切片を Picrosirius Red Stain Kit（Polysciences、Philadelphia、USA）を用いてピクロシリウスレッド染色を行い、光学顕微鏡 ECLIPSE Ci（Nikon、東京、日本）にて観察および写真撮影を行い形態学的に評価した。歯根膜におけるコラーゲン線維束の密度を評価するため、歯根膜の歯槽骨頂から根尖側に 300μm の範囲の、直径 20μm 以上の血管を除外した領域を二値化し、定量的に解析した。さらに、歯槽骨に近接した破骨細胞の発現について検討するため、薄切切片を TRAP / ALP 染色キット（和光純薬株式会社）を用いて Tartrate-Resistant Acid Phosphatase（以下 TRAP と略す）染色を行い解析した。破骨細胞の発現数について定量的に解析するため、1000μm 四方の第 1 臼歯遠心根周囲の歯槽骨表面における破骨細胞数を数え、比較した。

Chondroitinase ABC from Proteus vulgaris（Sigma-Aldrich Co.、MO、USA）にて室温で 2 時間反応させた（同処理は Decorin 抗体と Biglycan 抗体の染色のみ行った)。Decloaking Chamber NxGen（BIOCARE Medical LLC、Pacheco、CA、USA）を用いて薄切切片を 90℃の Target Retrieval Solution（Agilent Technologies、Santa Clara、CA、USA）に 3 分間反応させた。また、薄切切片を 3%ウシ血清アルブミン（Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA）含有ダルベッコリン酸緩衝液（和光純薬工業、以下 PBS と略す）で 1 時間、室温にてブロッキングを行った。一次抗体にはヤギ抗マウス PLAP-1 抗体（1:100、abcam plc、Cambridge、Cambridgeshire、UK)、ウサギ抗マウス I 型コラーゲン抗体（1:100、abcam plc)、ウサギ抗マウスⅢ型コラーゲン抗体（1:100、abcam plc)、ウサギ抗マウス Decorin 抗体（1:2000、東北大学鈴木茂樹博士より供与)、ウサギ抗マウス Biglycan 抗体（1:2000、東北大学鈴木茂樹博士より供与）を 4℃にて 18 時間反応させた。0.05%ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート（和光純薬工業）含有 PBS にて洗浄後、二次抗体として Alexa Fluor Plus 488 標識ロバ抗ヤギ IgG 抗体（1:200、abcam)、Alexa Fluor Plus 488 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体（1:200、abcam)、Alexa Fluor Plus 594 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体（1:200、abcam）を室温暗室で 30 分反応させ、DAPI（Sigma-Aldrich）にて 10 分、室温で核染色を行った。なお、一次抗体および二次抗体は、いずれも 3%ウシ血清アルブミン含有 PBS で希釈した。Prolong™ Diamond Antifade Mountant （Thermo Fisher Scientific Inc.）を用いて封入した後、共焦点顕微鏡 SP8 LIGHTNING（Lica Microsystems）を用いて観察した。蛍光免疫染色像の定量解析には歯根膜から、3 つの異なる代表的な部位を抽出し、二値化を行った。ネガティブコントロールも同様の手法にて二値化を行い、発現量を

差し引き、単位面積あたりの 3 部位の平均値を計測した。それぞれ個体の異なる 3 切片で繰り返し計測し、その平均値を発現強度とした。

4. マウス歯根膜および培養細胞における遺伝子発現解析

摘出した上顎組織を、RNA*later* Stabilization Solution（Thermo Fisher Scientific、Massachusetts、USA）に浸漬した。上顎組織から歯肉を含む軟組織を剥離後、26G 注射針（テルモ、東京、日本）にて上顎第一臼歯の抜歯を行った。上顎第一臼歯をピンセットで把持し、マイクロ鋭匙（Fine Science Tools、Vancouver、Canada）を用いて第一臼歯近心根周囲の歯根膜組織を掻爬し回収した。採取した組織から RNeasy Micro Kit（QIAGEN、Hilden、Germany）を用いて全 RNA を抽出した。また、各培養細胞より PureLink RNA Mini Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて全 RNA を抽出した。High Capacity RNA-to-cDNA Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて逆転写反応を行い、相補鎖 DNA（cDNA）を作製した。得られた cDNA を鋳型として表 1 に示す各遺伝子特異的プライマーを用いて Real-time PCR 法にて解析を行った。PCR 反応は Fast SYBR Green Master Mix（Thermo Fisher Scientific）を用いて StepOnePlus Real-time PCR System（Life Technologies）にて行った。その際、*hypoxanthine phosphoribosyltransferase*（以下 *Hprt* と略す）遺伝子の発現を内在性コントロールとして用いた。

表1　本研究で使用したReal-time PCR用プライマー

GenBank Acc.	遺伝子	プライマー
NM_025711	mouse *PLAP-1*	5'-ATGATGACGATAACGATGATGACGA-3' 5'-TGTTGTTTGGAACCGATGTCAGA-3'
NM_007742	mouse *Col1a1*	5'-CAGGGTATTGCTGGACAACGTG-3' 5'-GGACCTTGTTTGCCAGGTTCA-3'
NM_009930	mouse *Col3a1*	5'-CAGGCCAGTGGCAATGTAAAGA-3' 5'-CTCATTGCCTTGCGTGTTTGATA-3'
NM_007542	mouse *Bgn*	5'-GATGATTGAGAATGGGAGCCTGA-3' 5'-TCCGAAGCCCATAGGACAGAAG-3'
NM_001190451	mouse *Dcn*	5'-CTGGGCTGGCACAGCATAAGTA-3' 5'-CGGACAGGGTTGCCGTAAAG-3'
NM_013556	mouse *Hprt*	5'-TTGTTGTTGGATATGCCCTTGACTA-3' 5'-AGGCAGATGGCCACAGGACTA-3'
NM_017680	human *PLAP-1*	5'-TGGATGTCAGTGCTATTCACGAG-3' 5'-AGCTTGTTGTTGTTCAGGATCAGA-3'
NM_000088	human *COL1A1*	5'-CCCGGGTTTCAGAGACAACTTC-3' 5'-TCCACATGCTTTATTCCAGCAATC-3'
NM_000194	human *HPRT*	5'-GGCAGTATAATCCAAAGATGGTCAA-3' 5'-GTCAAGGGCATATCCTACAACAAAC-3'

5. マウス歯根膜における走査型電子顕微鏡解析

摘出した上顎歯周組織を、0.1M リン酸緩衝液含有 2%グルタラールアルデヒドリン酸緩衝液に一晩浸漬した。次に、上顎歯周組織を 0.1M リン酸緩衝液に一晩浸漬後、4℃の 2%オスミウム水溶液にて 3 時間浸漬した。同組織は、オスミウム蒸着処理を行い、電界放出形走査型電子顕微鏡 JSM-7500F（JEOL Ltd.、東京、日本）にて観察および写真撮影を行った。

6. マウス歯根膜における透過型電子顕微鏡解析

2%パラホルムアルデヒドリン酸緩衝液（2%PFA と略す）を用いて還流固定後、上顎歯周組織を摘出し、2%PFA に一晩浸漬した。次に上顎歯周組織を 0.1M リン酸緩衝液含有 2%グルタラールアルデヒドリン酸緩衝液に浸漬後、4℃の 0.1M リン酸緩衝液含有 2%オスミウム水溶液にて 3 時間浸漬した。脱水後、上顎歯周組織にプロピレンオキサイドを 30 分間 2 回浸透させ、レジン（ニッシン、東京、日本）とプロピレンオキサイドの混合液に 6 時間浸漬、さらにレジンにて一晩浸漬した。60℃にて 48 時間重合させ、ウルトラミクロト

ーム（Leica Microsystems）を用いて厚さ 70nm の極薄切片を作製した。極薄切片を透過型電子顕微鏡 JEM-1400Plus（JEOL Ltd.）にて観察および写真撮影を行った。画像解析ソフトウェア WinROOF を用いて、ランダムに選択した部位 8 カ所のコラーゲン原線維直径を合計 800 個計測し、定量化を行った。

7. 細胞培養

初代培養ヒト歯根膜細胞（以下 HPDL と略す）は、Lonza（Basel、Switzerland）より購入した。HPDL は、10%ウシ胎仔血清（Equiteck Bio、Texas、USA、以下 FBS と略す）および 60 μg/mL カナマイシン（和光純薬工業株式会社）含有 α 変法イーグル最小必須培地（和光純薬工業、以下 MEM α と略す）にて培養した。

8. PLAP-1 siRNA の導入

内在性 *PLAP-1* 遺伝子の発現を抑制した HPDL を以下の方法により、作製した。すなわち、10%FBS 含有 α-MEM を用いて、HPDL に *PLAP-1* 遺伝子の異なる 2 カ所の配列をターゲットとした siRNA（Thermo Fisher Scientific）S29534（5'-GGUCUGAUCCUGAACAACAtt-3'）、S29535（5'-GGAUUUUAAACGAUACAAAtt-3'）、またコントロールとして Silencer Select Negative Control siRNA（Thermo Fisher Scientific）（共に 5nM）を Lipofectamin RNAiMAX（Thermo Fisher Scientific）存在下にて reverse transfection 法にて導入し、6 穴培養プレート(Corning、New York、USA)あるいはガラスボトムディッシュ（松浪硝子工業、大阪、日本）に、1.0×10^5 個になるように播種した。その後培養 72 時間後に 10%FCS 含有 α-MEM と培地交換しそのまま培養した。

9. 免疫細胞染色

培養細胞を 4℃の PBS にて 2 回洗浄した後に 4%PFA を用いて室温で 10 分固定した。PBS で洗浄した後、1%ウシ血清アルブミン（SIGMA-Aldrich）にて室温で 1 時間ブロッキングを行った。一次抗体ならびに二次抗体はブロッキング溶液で希釈した。一次抗体には、ウサギ抗マウス I 型コラーゲン抗体（1:100、abcam plc）を用いて 4℃にて一晩反応させた。二次抗体には、Alexa Fluor Plus 594 標識ロバ抗ウサギ IgG 抗体（1:200、abcam plc）を用い、室内で 1 時間反応させた後 PBS にて洗浄した。DAPI（Sigma-Aldrich）にて 10 分、室温で核染色を行った後、共焦点顕微鏡 SP8 LIGHTNING にて観察を行った。

10. 抜歯による歯根膜牽引試験

マウスの歯根膜牽引試験は Trombetta-e Silva らの方法[18]に準じて行った。すなわち、12 週齢の WT および *PLAP-1* KO マウスをペントバルビタールナトリウム麻酔後、下顎骨を摘出し、PBS に浸漬した。直ちに下顎骨周囲を歯科充填用コンポジットレジン　クリアフィルマジェスティ ES フロー（クラレノリタケデンタル、新潟、日本、以下 CR と略す）にて補強を行い、第一臼歯根分岐部に直径 0.2mm のタングステンワイヤー（ニラコ、東京、日本）を通した。小型卓上試験機 SHIMADZU EZ-S 500N（島津製作所、京都、日本）を用いて下顎骨周囲の CR を固定し、タングステンワイヤーをクロスヘッドスピード毎分 1mm にて牽引した。第一臼歯が抜歯されるまでに必要な最大応力を計測し比較した。

11. 絹糸結紮によるマウス実験的歯周炎モデル

絹糸結紮によるマウス実験的歯周炎モデルは Abe らの方法[19]に準じて行った。すなわち、ペントバルビタールナトリウム麻酔下の 8 週齢 WT および *PLAP-1* KO マウスの上顎第二臼歯に 8-0 絹糸（秋山製作所、東京、日本）を結紮した。絹糸結紮後 14 日後にペントバルビタールナトリウム麻酔下で、PFA を用いて還流固定したマウスより上顎第二臼歯を含む上顎を摘出した。同組織を、実験動物用 3D マイクロ X 線 CT R_mCT2 を用いて断層撮影を行い、得られた 3 次元画像を 3 次元画像解析ソフトウェア TRI/3D-BON により 2 次元化した。画像解析ソフトウェア WinROOF を用いて、2 次元化した画像におけるセメントエナメルジャンクションから歯槽骨頂までの根尖方法の距離を測定し、第一臼歯遠心根、第二臼歯近心および遠心根、第三臼歯の歯根における測定値の合計を同上マウスの歯槽骨吸収量とした。

12. 統計処理

実験データは 3 群の平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、2 群比較は Student's-t 検定を、多群比較は分散分析（ANOVA）を行った後に post-hoc として Tukey 検定を用いて行い、$p<0.05$ を有意差があるものとした。

結果

1. *PLAP-1* KO マウスにおける歯周組織の表現型の解析

in vivo における PLAP-1 の歯周組織での役割を、当研究室にて樹立した *PLAP-1* KO マウスを用いて検討した。10 週齢雄の WT および *PLAP-1* KO マウスから採取した上顎歯槽骨のμCT 撮影を行い、歯槽骨吸収の評価を行った。歯槽骨吸収はセメント-エナメル境から歯槽骨頂の距離、すなわち第 1 臼歯遠心根（a)、第 2 臼歯近心根（b)、第 2 臼歯遠心根（c)、第 3 臼歯の歯根（d）の測定値の合計を計測した（図 1A 黄線)。測定の結果、WT マウスと比較して *PLAP-1* KO マウスの歯槽骨吸収に有意な差は認められなかった（図 1B)。

12 週齢の WT および *PLAP-1* KO マウスから採取した上顎第 2 臼歯の形態についてμCT を用いて観察を行った。根離開度として、近心頬側根と遠心頬側根の歯根軸の角度を計測した（図 1C 黄線)。WT マウスと比較して *PLAP-1* KO マウスの上顎第 2 臼歯歯根離開度に有意な差は認められなかった。（図 1D)。

12 週齢の WT および *PLAP-1* KO マウスから採取した上顎骨から第 2 臼歯周囲の歯根膜腔をμCT から再構築を行い観察した（図 1E)。WT マウスと比較して *PLAP-1* KO マウスの上顎第 2 臼歯歯根膜腔の体積が有意に増加している事が示された（図 1F)。

10 週齢雄の WT および *PLAP-1* KO マウスから採取した上顎歯周組織の薄切切片を作製し、HE 染色を行った。HE 染色で WT マウスと比較して *PLAP-1* KO マウスの歯肉やセメント質、歯槽骨に形態的異常は認められなかった（図 1G)。

次に、歯根膜における ECM 関連遺伝子の発現解析を行った。10-13 週齢 WT および *PLAP-1* KO マウスから採取した上顎第 1 臼歯の歯根に付着した歯根膜を採取し、歯根膜にて特異的に発現を認める *Plap-1*、歯根膜で高い発現量を認める *Collagen type Ⅰ alpha1* や *Collagen typeⅢ alpha1*、PLAP-1 と同族の SLRPs Class I である *Biglycan* 、*Decorin* の mRNA 発現を Real-time PCR 法にて解析した。その結果、WT マウスにて歯根膜に特異的に発現している *Plap-1* の遺伝子が *PLAP-1* KO マウスの歯根膜にて発現していない事を確認した。また、WT マウスと比較して *PLAP-1* KO マウスの歯根膜の *Col1a1*、*Col3a1*、*BGN* 、*DCN* の遺伝子発現に差は認めなかった（図 2)。

次に、歯根膜における ECM 関連のタンパク発現解析を行った。10 週齢雄の WT および *PLAP-1* KO マウスから採取した上顎歯周組織の薄切切片を

作製し、抗 PLAP-1 抗体、抗 Col1 抗体、抗 Col3 抗体、抗 BGN 抗体、抗 DCN 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った（図 3A）。それぞれ歯根膜における蛍光強度を定量化した結果、WT マウスと比較して *PLAP-1* KO マウスの歯根膜において Col3、BGN、DCN タンパク発現の有意な上昇が認められた（図 3B）。

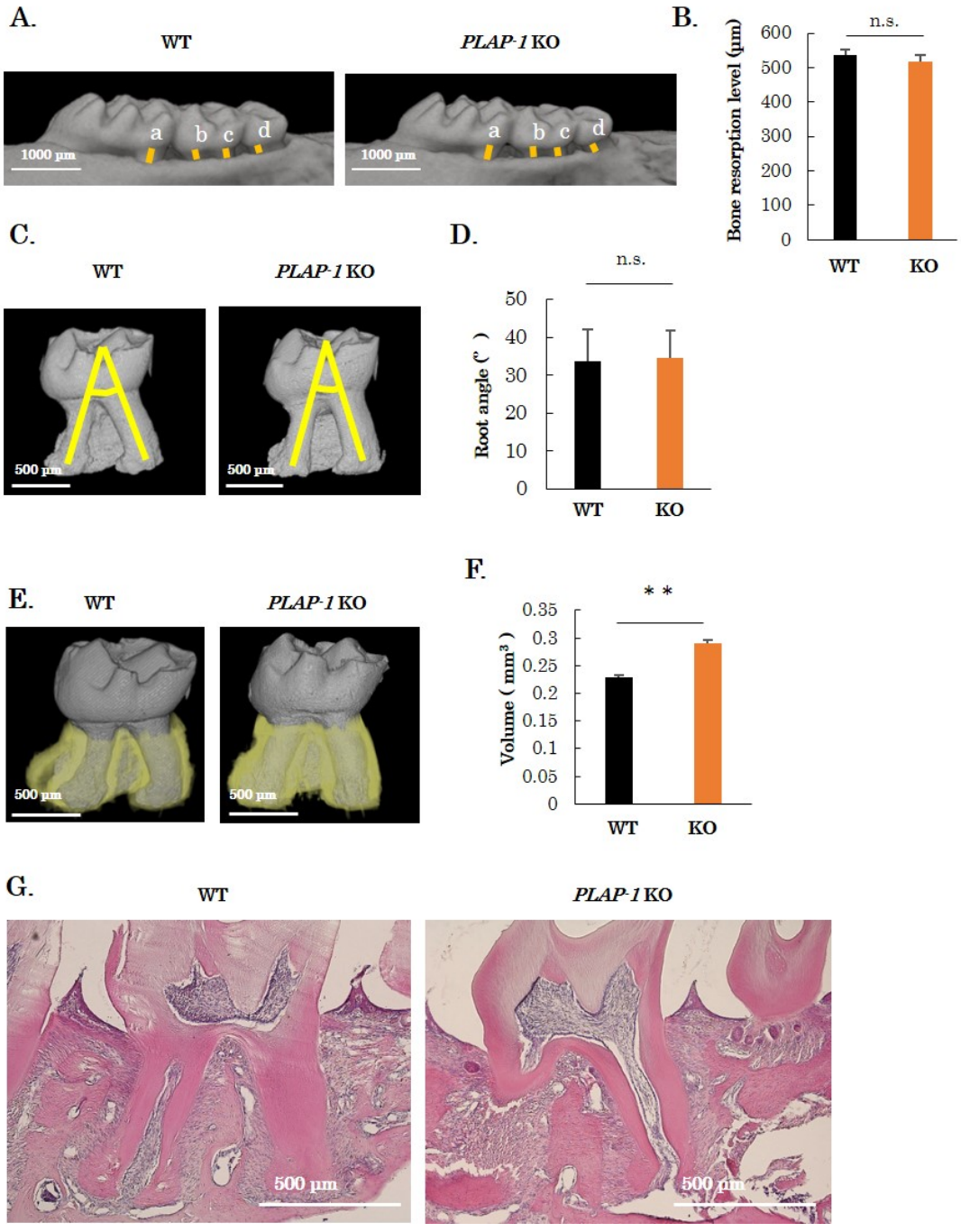


図 1　*PLAP-1* KO マウスの歯周組織の μCT 像と HE 染色像

A. 10 週齢の WT および *PLAP-1* KO マウスの上顎歯周組織の μCT 像を示す。

B. 歯槽骨吸収量として、セメントエナメルジャンクションから歯槽骨頂までの距離、すなわち第 1 臼歯遠心根（a）、第 2 臼歯近心根（b）、第 2 臼歯遠心根（c）、第 3 臼歯の歯根（d）における測定値の合計（a + b + c + d）を歯槽骨吸収量として示す。

C. 12 週齢の WT および *PLAP-1* KO マウスの上顎第 2 臼歯の高精細な μCT 像を示す。

D. 根離開度として、近心頬側根と遠心頬側根の歯根軸の角度を計測した。各群 n = 3。

E. 12 週齢の WT および *PLAP-1* KO マウスの上顎第 2 臼歯部歯根膜腔を再構築した μCT 像を示す。

F. 上顎第 2 臼歯部歯根膜腔の体積を示す。各群 n = 4。解析結果は、それぞれ平均値±標準誤差で示す。

G. 10 週齢の上顎第二臼歯における歯周組織の H-E 染色像を示す。

* *: p ＜0.01、n.s. = not significant、WT：野生型マウス、KO：*PLAP-1* ノックアウトマウス

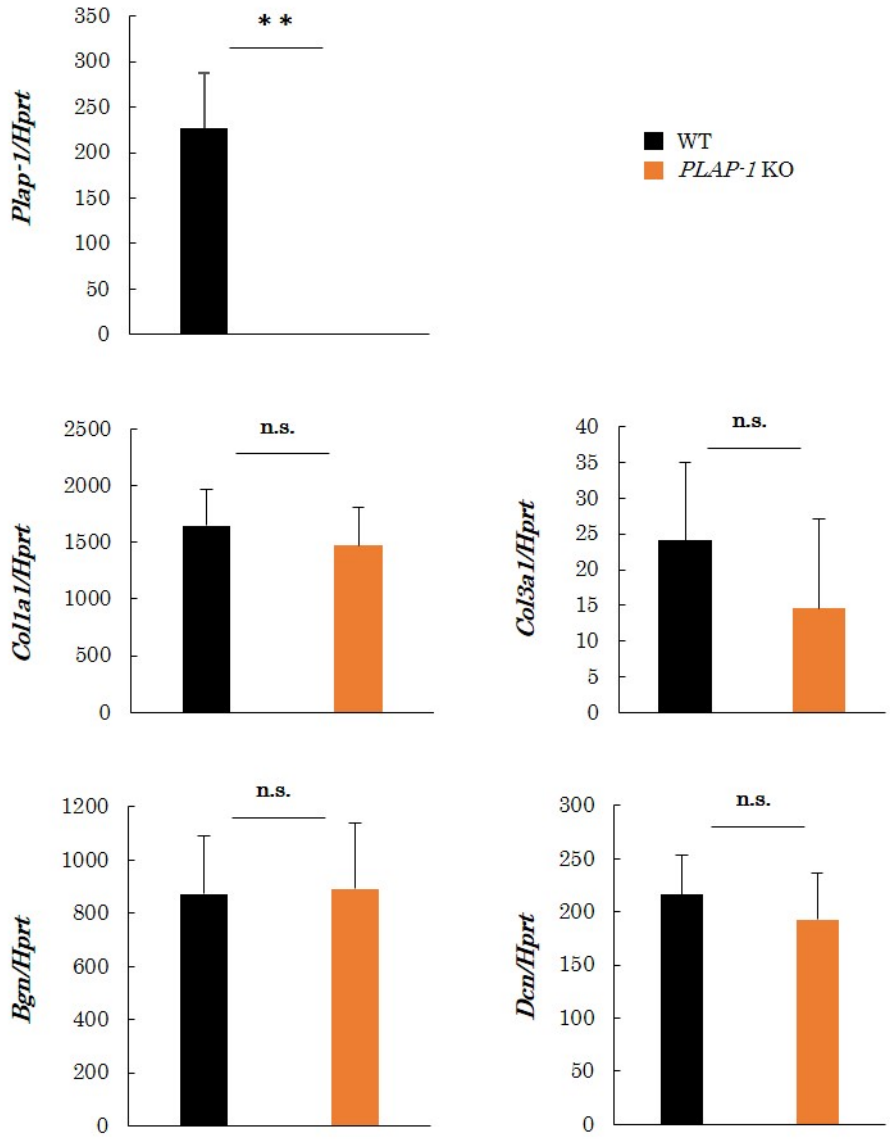


図 2　*PLAP-1* KO マウス歯根膜における細胞外基質の遺伝子発現解析

10-13 週齢雄の WT および *PLAP-1* KO マウスの上顎第 1 臼歯歯根膜から全 RNA を抽出し、細胞外基質の遺伝子発現を Real-time PCR 法により解析した。各群 n = 4。解析結果は、それぞれの平均値±標準誤差で示す。Col1a1：Collagen type I alpha1、Col3a1：Collagen typeⅢ alpha1、Bgn：Biglycan、Dcn：Decorin、n.s. = not significant、* *：$p<0.01$、WT：野生型マウス、KO：*PLAP-1* ノックアウトマウス

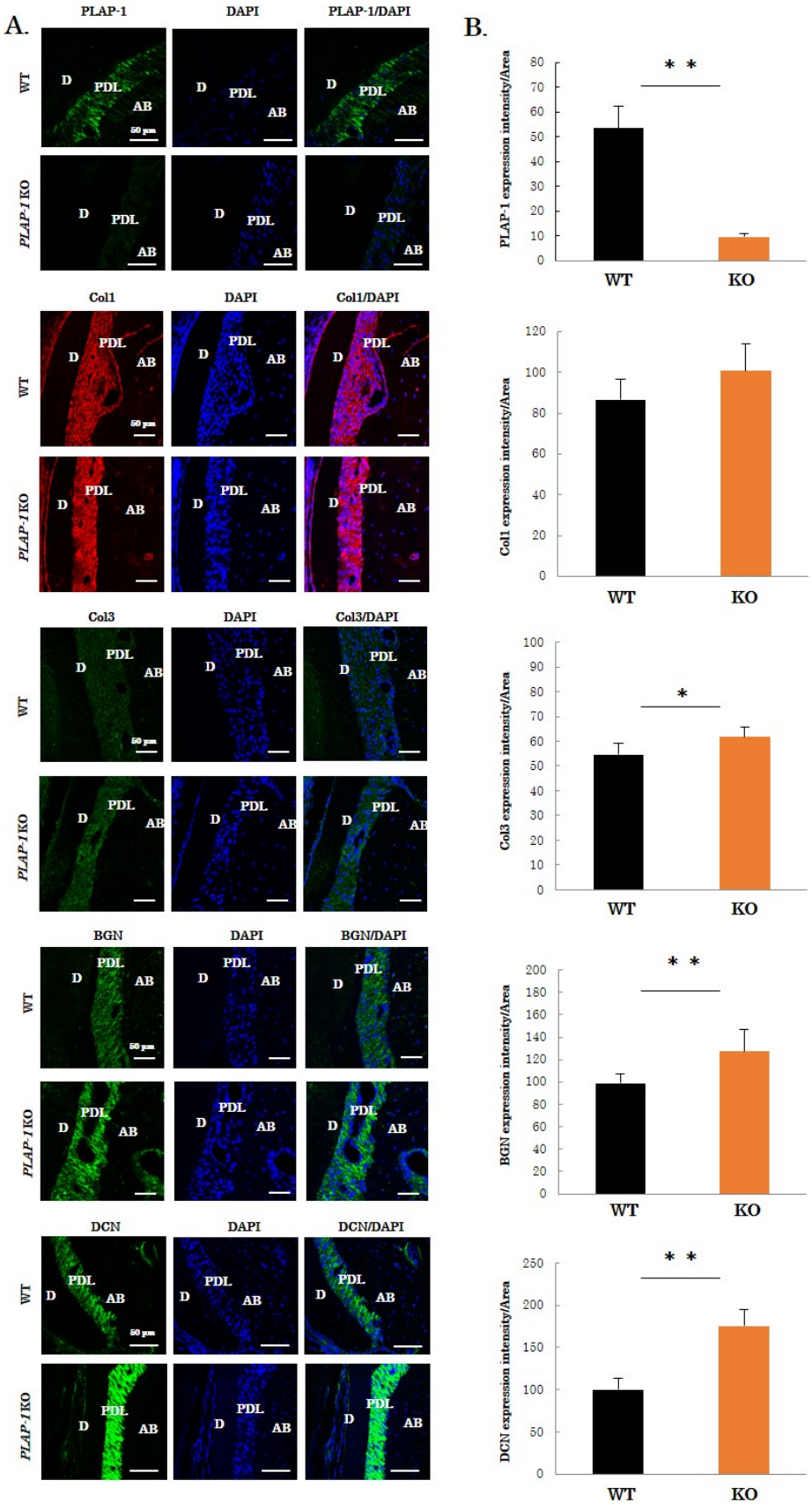

A.
PLAP-1
DAPI
PLAP-1/DAPI
WT
PLAP-1 KO
Col1
Col1/DAPI
Col3
Col3/DAPI
BGN
BGN/DAPI
DCN
DCN/DAPI
D
PDL
AB
50 μm
B.
PLAP-1 expression intensity/Area
Col1 expression intensity/Area
Col3 expression intensity/Area
BGN expression intensity/Area
DCN expression intensity/Area
WT
KO
* *
*

図 3　*PLAP-1* KO マウス歯根膜における ECM の蛍光免疫染色像

10 週齢雄の WT および *PLAP-1* KO マウス上顎歯周組織における ECM の蛍光免疫染色像を示す(A)。　AB：alveolar bone、 D：dentin、 PDL：periodontal ligament
歯根膜における蛍光強度の定量化を行った結果を示す（B）。それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。解析結果は、それぞれ 3 群の平均値±標準誤差で示した。Col1：Collagen type Ⅰ、Col3：Collagen typeⅢ、BGN：Biglycan、DCN：Decorin *: $p < 0.05$、* *：$p < 0.01$、WT： 野生型マウス 、KO：*PLAP-1* ノックアウトマウス

2.　*PLAP-1 KO*マウスの歯周組織のピクロシリウスレッド染色

歯根膜を構成するコラーゲン線維束を観察するために、10 週齢雄の WT および *PLAP-1* KO マウスから採取した上顎歯周組織の薄切切片を作製し、ピクロシリウスレッド染色を行った（図 4A)。WT マウスと比較して *PLAP-1* KO マウスの歯根膜においてコラーゲン線維束の密度の低下傾向が観察された為、第 1 臼歯近心部の直径 20 μ m 以上の血管を除外した歯根膜線維束の疎密の評価を行った（図 4B 黄枠)。その結果、WT マウスと比較して *PLAP-1* KO マウスの歯根膜においてコラーゲン線維束の密度の有意な低下が示された（図 4B)。

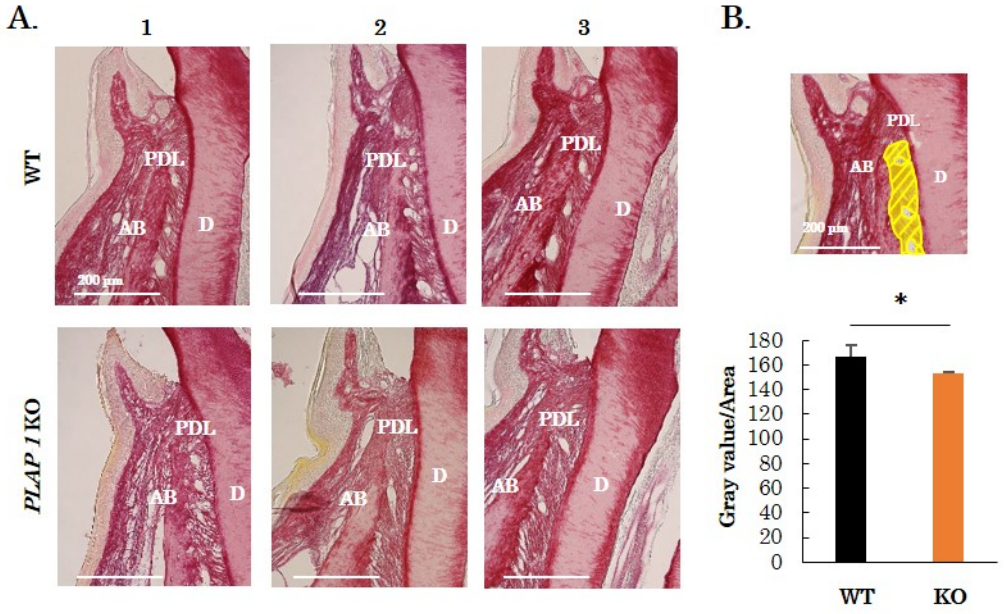


図 4　*PLAP-1* KO マウスの歯周組織のピクロシリウスレッド染色像

（A）　10 週齢雄の WT および *PLAP-1*KO マウスの上顎歯周組織のピクロシリウスレッド染色像を示す。 AB：alveolar bone、 D：dentin、 PDL：periodontal ligament

（B）　直径 20μm 以上の血管を除外した歯根膜線維束の疎密の定量解析結果を示す。各群 n = 4。それぞれ 4 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。解析結果は、それぞれの平均値±標準誤差で示す。*: p<0.05、WT： 野生型マウス、KO：*PLAP-1* ノックアウトマウス

3. *PLAP-1* KO マウスにおける歯根膜の走査型電子顕微鏡解析

歯根膜を構成するコラーゲンの微細構造であるコラーゲン原線維を観察するために、12 週齢雄の WT および *PLAP-1* KO マウスから採取した歯周組織を用いて走査型電子顕微鏡にて観察を行った。第 1 臼歯遠心部の歯根膜の強拡大像において、WT マウスで見られるコラーゲン線維同士がコラーゲン原線維にて網目状につながっている一方で、*PLAP-1* KO マウスでは網目構造の形成が不完全な部位が複数個所で認められた（図 5）。*PLAP-1* KO マウス歯根膜におけるコラーゲン原線維の三次元的な網目構造の異常が示唆された。

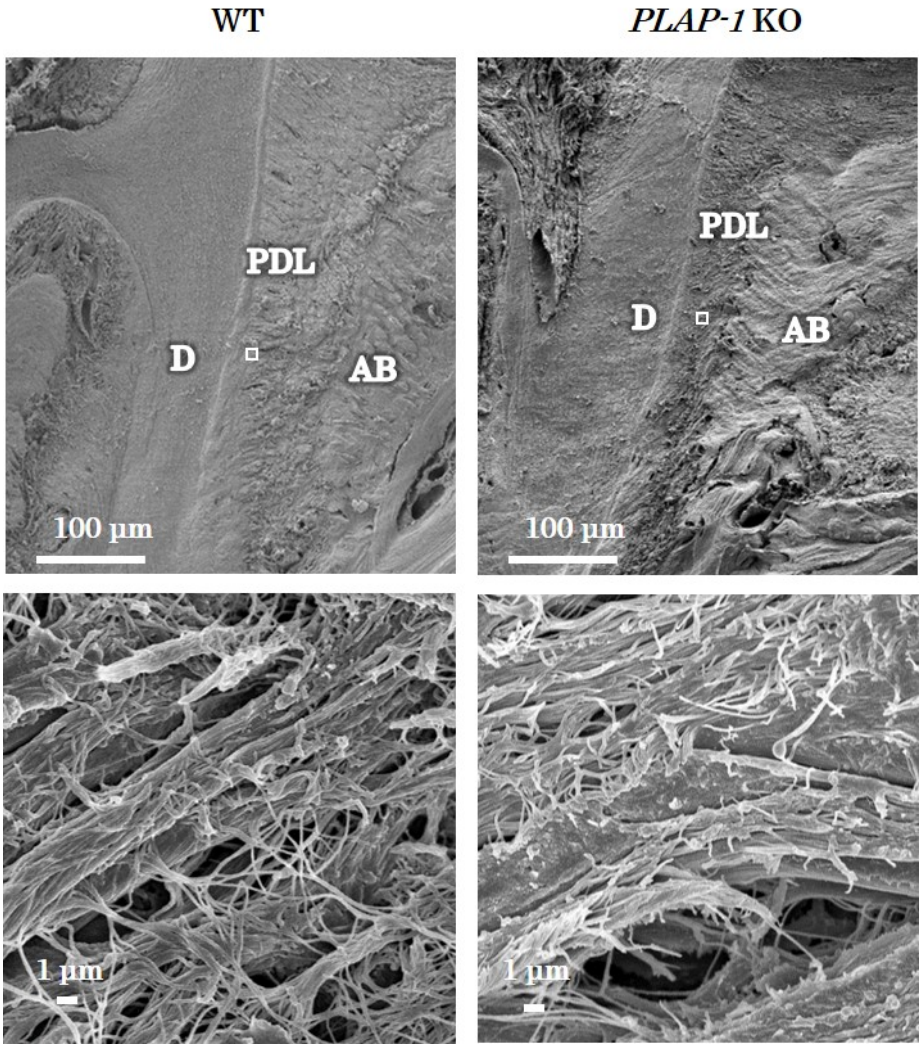
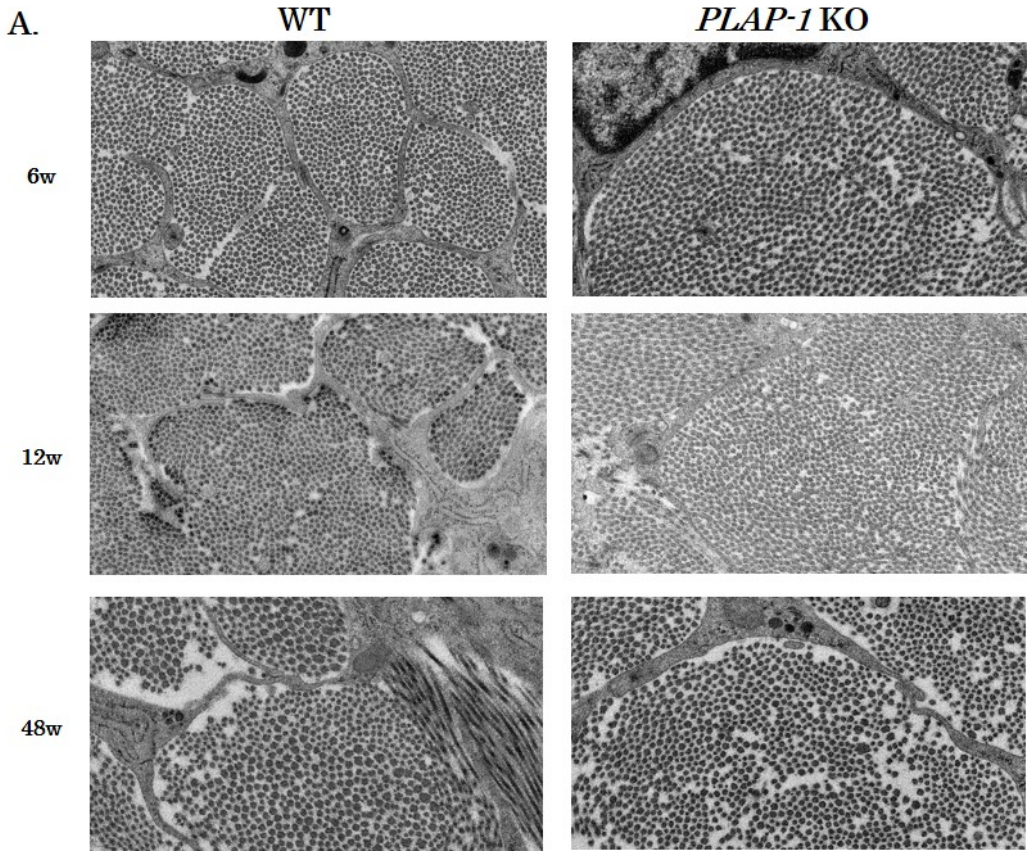


図 5　*PLAP-1* KO マウスの歯根膜の走査型電子顕微鏡像

12 週齢 WT および *PLAP-1* KO マウス上顎歯根膜の走査型電子顕微鏡像を示す（上段：150 倍像）。四角枠で囲むエリアの強拡大像を下段に示す（下段：5000 倍像）。AB：alveolar bone、D：dentin、PDL：periodontal ligament、WT：野生型マウス、KO：*PLAP-1* ノックアウトマウス

4. *PLAP-1* KO マウスにおける歯根膜の透過型電子顕微鏡解析

コラーゲン原線維の形態をさらに詳細に観察するために、6 週齢、12 週齢、48 週齢雄の WT および *PLAP-1* KO マウスから採取した歯周組織を用いて透過型電子顕微鏡にて観察を行った。それぞれの週齢の歯根膜のコラーゲン原線維の断面像を示す（図 6A)。歯根膜を構成するコラーゲン原線維の直径を計測し、定量解析を行ったところ、6 週齢、12 週齢において WT マウスと比較して *PLAP-1* KO マウスのコラーゲン原線維の直径が有意に増加している事が示された（図 6B、C)。また、48 週齢では WT マウスと比較して *PLAP-1* KO マウスのコラーゲン原線維の直径が有意に減少している事が示された（図 6B、C)。



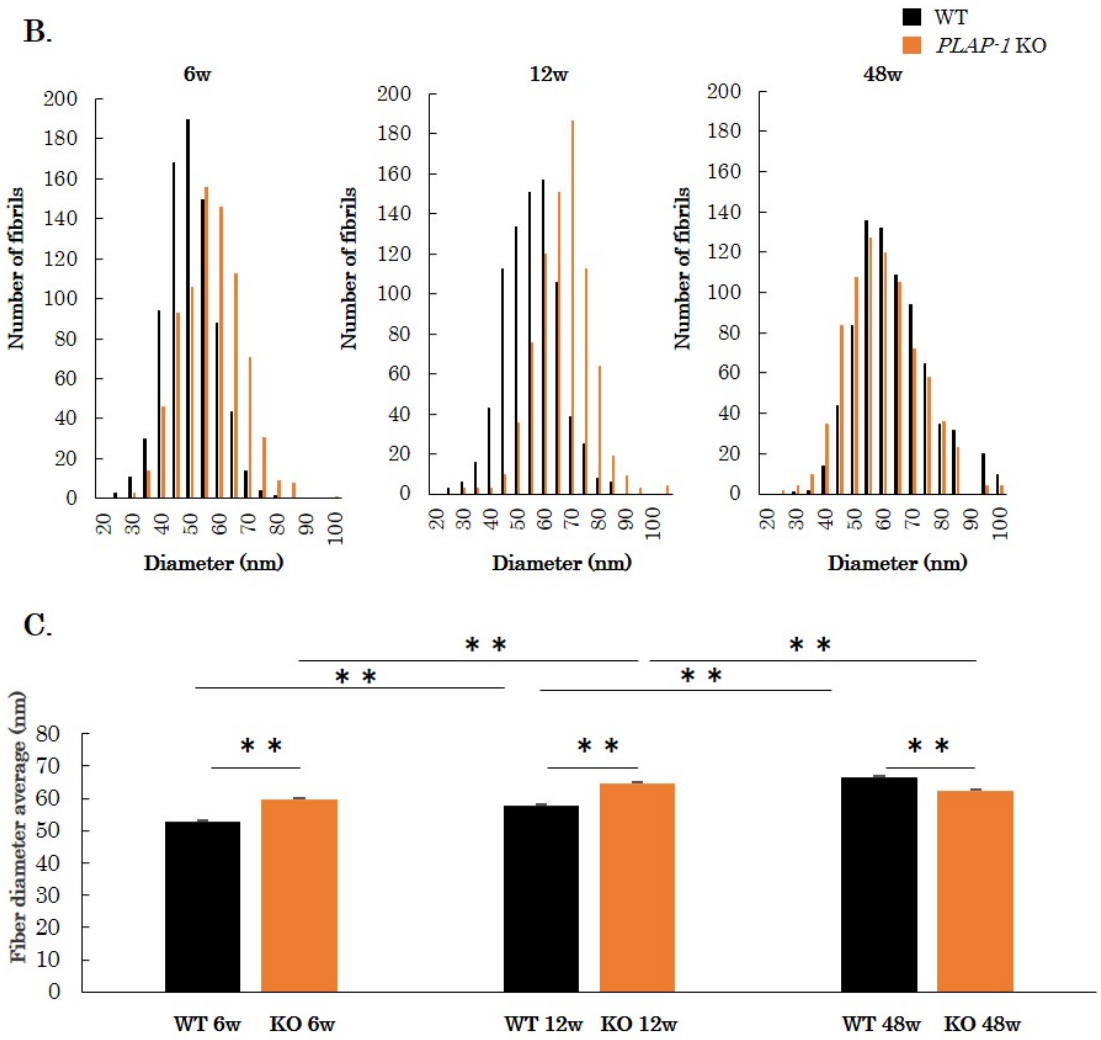


図 6　*PLAP-1* KO マウスの歯根膜の透過型電子顕微鏡像

6 週齢、12 週齢、48 週齢の WT および *PLAP-1* KO マウス上顎歯根膜の透過型電子顕微鏡像（19000 倍）を示す（A）。ランダムに選択した部位の 19000 倍像のコラーゲン原線維の直径を 6 週齢、12 週齢、48 週齢で WT および *PLAP-1* KO マウスそれぞれ合計 800 個計測し定量的に解析した結果を示す（B、C）。解析結果は、それぞれの平均値±標準誤差で示す。*: $p<0.05$、＊＊: $p<0.01$、WT：野生型マウ、KO：*PLAP-1* ノックアウトマウス、6w：6 週齢、12w：12 週齢、48w：48 週齢

5.　内在性 *PLAP-1* 遺伝子発現抑制が歯根膜細胞のコラーゲン形成に与える影響の解析

コラーゲンの形成に PLAP-1 が直接関与しているかについて検討するため、ヒト歯根膜細胞 HPDL を用いて siRAN により内在性 *PLAP-1* 遺伝子の発現を抑制した HPDL（S29534、S2935）を作製した。まず、PLAP-1 siRNA 導入による発現抑制を Real-Time PCR により確認した。その結果、コントロールと比較して、S29534、S2935 ともに有意に内在性 *PLAP-1* 遺伝子発現の抑制を認めた（図 7A)。そこで、PLAP-1 siRNA 導入群およびコントロールを培養し、培養 6 日目、培養 9 日目の *Col1a1* の mRNA 発現を Real-Time PCR 法にて解析した。その結果、培養 6 日目、培養 9 日目それぞれにおいて、コントロールと比較して S29534、S2935 ともに有意に *Col1a1* 遺伝子発現の抑制を認めた（図 7B)。さらに、培養 6 日目、培養 9 日目に抗 Col1 抗体を用いて免疫細胞染色を行いコラーゲンの形成を観察した。その結果、培養 6 日目、培養 9 日目それぞれにおいてコントロールと比較して、PLAP-1 siRNA 導入群で Col1 の形成抑制が観察された。以上の結果から PLAP-1 が I 型コラーゲンの形成に直接的に関与している事が示唆された（図 7C)。

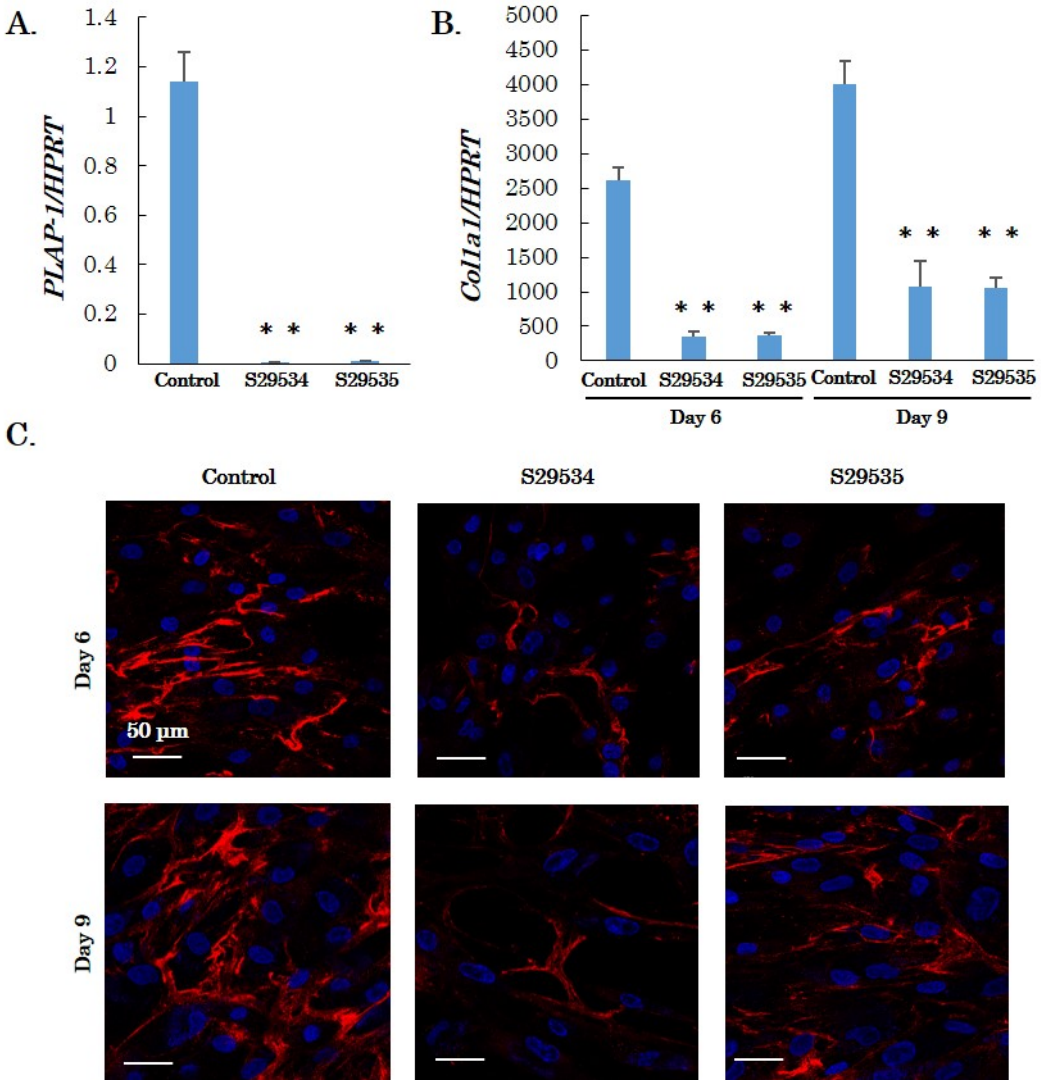

A.
PLAP-1/HPRT
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
* *
* *
Control
S29534
S29535
B.
Col1a1/HPRT
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
* *
* *
* *
* *
Control
S29534
S29535
Control
S29534
S29535
Day 6
Day 9
C.
Control
S29534
S29535
Day 6
Day 9
50 μm

図 7　内在性 *PLAP-1* 遺伝子発現抑制が歯根膜細胞のコラーゲン形成に与える影響の解析

（A）コントロール siRNA（control） および PLAP-1 siRNA 導入群（S29534、S29535）の全 RNA を抽出し、PLAP-1 の発現を Real-time PCR 法により解析した。解析結果は、それぞれ 3 群の平均値±標準誤差で示す。* *：$p<0.01$

（B）コントロール siRNA（control） および PLAP-1 siRNA 導入群（S29534、S29535）の培養 6 日目、9 日目の全 RNA を抽出し、*Collagen type I　alpha1* の発現を Real-time PCR 法により解析した。解析結果は、それぞれ 3 群の平均値±標準誤差で示した。Col1a1：Collagen type I　alpha1、 * *：$p<0.01$

（C）コントロール siRNA（control） および PLAP-1 siRNA 導入群（S29534、S29535）の培養 6 日目、9 日目の Col1 形成の免疫細胞染色像を示した。それぞれ 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

6.　抜歯時の最大応力計測試験による歯根膜の強度解析

歯根膜の強度を評価するために、歯根膜を物理的に牽引し抜歯を行うモデルを作製した。12 週齢の WT および *PLAP-1* KO マウスから採取した下顎骨を固定し、第 1 臼歯根分岐部に通したワイヤーを牽引し、抜歯までの最大応力を計測した。その結果、WT マウスと比較して *PLAP-1* KO マウスにて歯根膜牽引による抜歯時の最大応力の有意な減少が示された（図 8）。

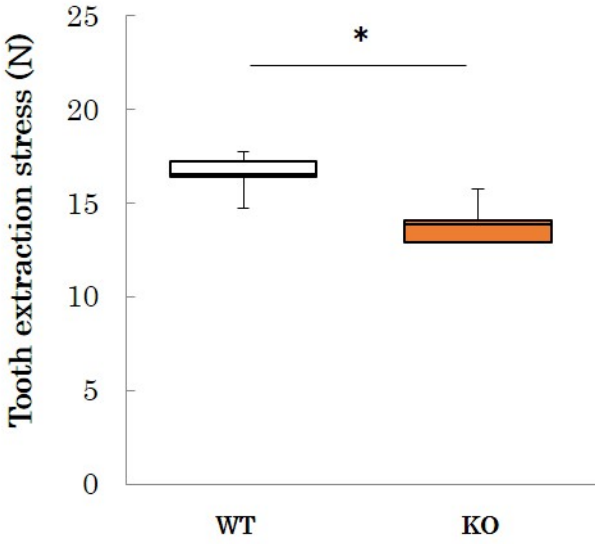


図 8　*PLAP-1* KO マウスの抜歯による歯根膜牽引試験

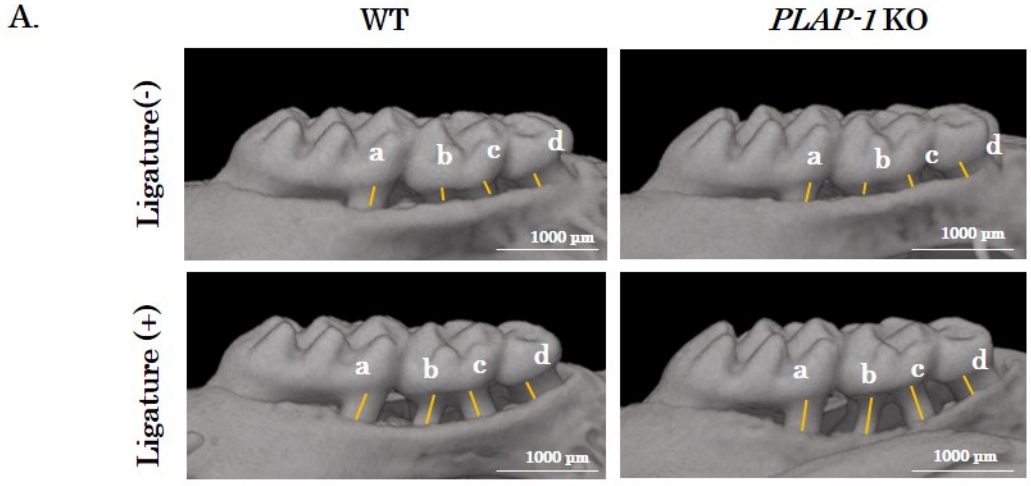
12 週齢の WT および *PLAP-1* KO マウスの下顎第 1 臼歯牽引による、抜歯に必要な最大応力を示す。各群 n = 4。解析結果は、それぞれの平均値±標準誤差で示す。*: $p < 0.05$、WT：野生型マウス、KO：*PLAP-1* ノックアウトマウス

7.　絹糸結紮歯周病モデルによる歯周組織の変化の解析

PLAP-1 KO マウスの歯周病に対する歯周組織の変化を観察するために、絹糸結紮による実験的歯周炎モデルを作製した。絹糸結紮 14 日後に上顎骨を回収し、μCT 撮影、切片の作製を行った。WT および *PLAP-1* KO マウスそれぞれにおいて、絹糸結紮により骨吸収が誘導された像が認められた。さらに、絹糸結紮群において、WT マウスと比較して *PLAP-1* KO マウスにて重篤な歯槽骨吸収が認められた（図 9A)。歯槽骨吸収はセメント-エナメル境から歯槽骨頂の距離、すなわち第 1 臼歯遠心根（a)、第 2 臼歯近心根（b)、第 2 臼歯遠心根（c)、第 3 臼歯の歯根（d）の測定値の合計を計測した（図 9A 黄線)。測定の結果、WT および *PLAP-1* KO マウスにおいて、絹糸結紮により有意に骨吸収が起こっている事が認められた。次に、コントロール側では歯槽骨吸収に差が認められない一方で、絹糸結紮側にて WT マウスと比較して、*PLAP-1* KO マウスにて有意に骨吸収が起こっている事が明らかとなった（図 9B)。

歯周組織の薄切切片を作製し、ピクロシリウスレッド染色にて絹糸結紮側のコラーゲン線維束を観察したところ、*PLAP-1* KO マウスにてコラーゲン線維束の断裂（矢印）が多数観察された（図 9C)。

さらに、歯槽骨吸収をになう破骨細胞を観察するために、歯周組織の薄切切片を作製し TRAP 染色を行った。その結果、絹糸結紮側にて破骨細胞が紫色に染まっている像（矢頭）が観察された（図 9D)。破骨細胞の発現数を定量的に解析するために、第 2 臼歯近心根周囲の破骨細胞数を比較したところ、絹糸結紮により WT マウスと比較して、*PLAP-1* KO マウスにおける破骨細胞数が有意に増加している事が示された（図 9E)。



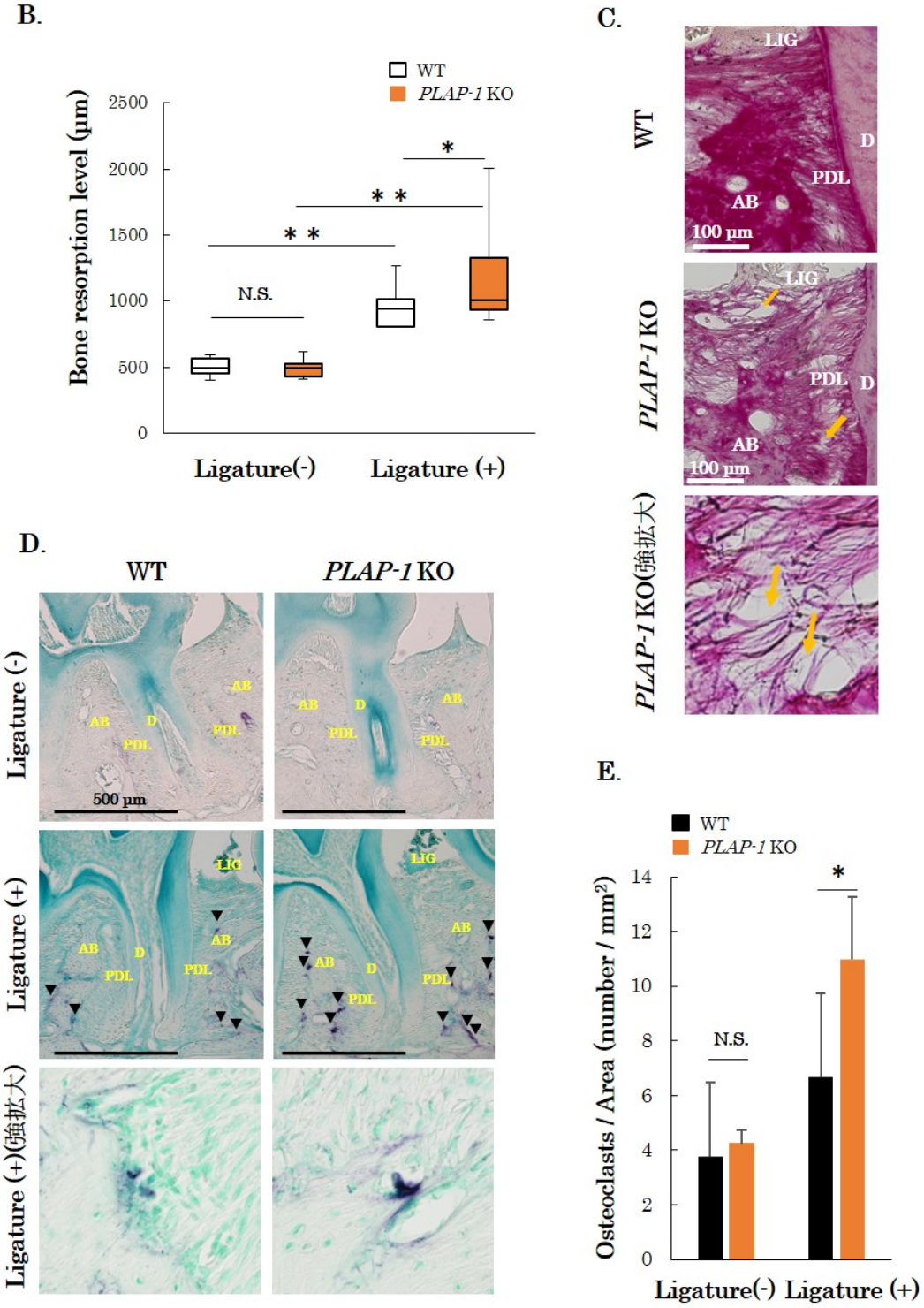

B.
WT
PLAP-1 KO
Bone resorption level (μm)
2500
2000
1500
1000
500
0
N.S.
* *
* *
*
Ligature(-)
Ligature (+)
C.
WT
PLAP-1 KO
PLAP-1 KO(強拡大)
LIG
D
PDL
AB
100 μm
D.
WT
PLAP-1 KO
Ligature (-)
Ligature (+)
Ligature (+)(強拡大)
AB
D
PDL
LIG
500 μm
E.
WT
PLAP-1 KO
Osteoclasts / Area (number / mm²)
14
12
10
8
6
4
2
0
N.S.
*
Ligature(-)
Ligature (+)

図 9　*PLAP-1* KO マウスを用いた絹糸結紮歯周病モデル

（A）絹糸結紮側と非絹糸結紮側の WT および *PLAP-1* KO マウスの上顎歯周組織の μCT 像を示す。（B）歯槽骨吸収量として、セメントエナメルジャンクションから歯槽骨頂までの距離の合計（黄線で示す a + b + c + d）を歯槽骨吸収量として示す。WT：n = 11、*PLAP-1* KO：n = 12（C）絹糸結紮側の WT および *PLAP-1* KO マウスの歯周組織のピクロシリウスレッド染色像を示す。矢印：コラーゲン線維束の断裂。下段に絹糸結紮側の *PLAP-1* KO マウスにおける歯周組織の強拡大像を示す。（D）絹糸結紮側と非結紮側の WT および *PLAP-1* KO マウスの歯周組織の TRAP 染色像を示す。矢頭：破骨細胞。下段にそれぞれの破骨細胞の強拡大像を示す。（E）第一臼歯遠心根周囲の歯槽骨表面における破骨細胞数を計測した結果を記す。各群 n = 6。解析結果は、それぞれの平均値±標準誤差で示す。AB：alveolar bone、D：dentin、PDL：periodontal ligament、LIG：ligature、*: $p < 0.05$、* *：$p < 0.01$、n.s. = not significant、WT：野生型マウス、*PLAP-1* KO：*PLAP-1* ノックアウトマウス、Ligature(-)：非絹糸結紮側、Ligature(+)：絹糸結紮側

考察

本研究は、歯根膜に特異的に発現する ECM 分子である PLAP-1 が、歯根膜を構成するコラーゲン線維の形成とその機能維持に重要であることを明らかにした。さらに、歯周病の進行において、PLAP-1 が歯周組織破壊に対して抑制的に制御する分子である可能性を示した。

PLAP-1 は当研究室にて同定した SLRP class I に属するタンパク質であり、歯周組織の歯根膜に特異的に発現を認める。また、これまでの解析結果より、PLAP-1 は歯の発生過程において、将来セメント質や歯根膜、固有歯槽骨へと分化していく歯小嚢に発現している事が明らかとなっている[2,20]。そこで、まず *PLAP-1* KO マウスにおいて歯根や歯槽骨にどのような影響を及ぼしているのか検討する為に、μCT や歯周組織の HE 染色により観察したが、*PLAP-1* KO マウスの歯槽骨吸収や歯根の形態に明らかな異常は認めなかった（図 1A、B、C、G）。次に、歯根膜を電子顕微鏡にて詳細に観察し、コラーゲン線維束を構成するコラーゲン原線維の観察を行った。まず走査型電子顕微鏡にて歯根膜を構成するコラーゲンの三次元的な観察を行った結果、12 週齢の *PLAP-1* KO マウスの歯根膜において歯根膜を構成するコラーゲン原線維の三次元的な構造の異常が観察された（図 5）。さらにコラーゲン原線維の異常を定量的に観察する為に、断面が観察できる透過型電子顕微鏡にて 12 週齢の *PLAP-1* KO マウスの歯根膜のコラーゲン原線維を観察した（図 6）。その結果、同 KO マウスにおいてコラーゲン原線維の直径の増加が明らかとなった。PLAP-1 はコアタンパク質の C 末端部位である LRR10 にてコラーゲン結合部位があるとの報告がある[11]。PLAP-1 がコラーゲンと直接結合する事で、コラーゲン原線維の成熟や架橋に重要な働きをしていると考えられ、*PLAP-1* KO マウスにて網目構造の異常や、成熟の異常によりコラーゲン原線維の断裂や直径の増加が認められたと考えられる。*in vitro* にて I 型コラーゲンの形成を観察した結果、PLAP-1 が存在しないことで Collagen type Ⅰ alpha1 の mRNA の減少や、Collagen type Ⅰ の形成の減弱が認められた事からも、PLAP-1 が直接Ⅰ型コラーゲンの形成に関与している事が考えられる。また、WT マウスのコラーゲン原線維の直径は加齢とともに増加しており加齢変化の表現型の一つと考える事が出来る。したがって、12 週齢において *PLAP-1* KO マウスの歯根膜のコラーゲン原線維の直径の増加は加齢変化を示し、PLAP-1 が歯根膜のコラーゲン原線維の加齢変化を抑制的に制御している可能性が考えられる。また、マウスの腱組織を用いた研究によると、ある一定の週齢まではコラーゲン原線維の直径が増加するが、ピークの週齢を超えると、

加齢とともにコラーゲン原線維の直径が減少するとの報告がある[21]。48 週齢にて *PLAP-1* KO マウスの歯根膜のコラーゲン原線維の直径が WT と比較して減少しているのは、PLAP-1 がない事でコラーゲン組織の恒常性維持の破綻が起こる事で、より加齢が進んでいるような状態に変化しているのではないかと考えられる。

小さい直径のコラーゲン原線維の割合が多いと塑性変形に耐える力が大きいとの報告や[22]、Decorin ノックアウトマウスにおいて皮膚のコラーゲン原線維の直径が大きいにもかかわらず、皮膚の引張強度が低下するとの報告がある[23-25]。本研究において、Trombetta-e Silva らの手法[18]にて *PLAP-1* KO マウスの歯根膜の牽引を行い、歯根膜の強度の評価を行った（図 8)。その結果、歯根膜の機械的な強度が低下している事が明らかとなった。このように PLAP-1 は正常な歯根膜のコラーゲン原線維の維持と歯根膜の強度に大きな影響を与えている事が明らかとなった。歯根膜のミクロの異常が、マクロでどのように観察されるのかをピクロシリウスレッド染色にてコラーゲン線維束を観察した結果、*PLAP-1* KO マウスの歯根膜にてコラーゲン線維束の密度の低下が認められた（図 4)。一方で、蛍光免疫染色の結果より、歯根膜の線維性コラーゲンの大部分をしめる I 型コラーゲンの発現量は変化が認められず、Ⅲ型コラーゲンの発現量は増加が認められた（図 3)。これらのことから、*PLAP-1* KO マウスにおけるコラーゲン線維束の局在の変化が考えられる。コラーゲン原線維の三次元的な断裂や異常が認められたが、その結果コラーゲン原線維が束となったコラーゲン線維束同士の三次元構造にも異常をきたし断裂する事で、局在の変化が起こったのではないかと考察される。また、μCT により歯根膜を観察した結果、*PLAP-1* KO マウスにおいて歯根膜腔の拡大が認められた。転写因子である Mkx のノックアウトマウスにおいて、破骨細胞増加や骨代謝マーカーの発現変化により歯根膜腔の拡大が認められたとの報告がある[26]。本研究にて *PLAP-1* KO マウス歯槽骨に破骨細胞の増加が認められなかった事から、破骨細胞の増加による骨吸収の可能性については否定的である。咬合性外傷により歯根膜腔の拡大が認められる事が知られているが、初期の段階では破骨細胞が存在し骨吸収を起こす事で歯根膜腔の拡大が起こり、定常状態では骨のリモデリングの均衡がとれる為、破骨細胞が認められないとの報告がある[15]。そのため、*PLAP-1* KO マウスの歯根膜が脆弱となり、咬合性外傷状態となることで歯根膜の拡大が起こっているのではないかと考えている。また、PLAP-1 が TGF-β シグナルを介して変形性関節症の軟骨形成を抑制しているとの報告がある[27,28]。組織の線維化の異常は TGF-β シグナルを介して調節される為、*PLAP-1* KO マウスの歯根膜におけるコラ

ーゲン線維の異常に関しても TGF-β シグナルの関与が示唆される[29,30]。PLAP-1 は TGF-β を抑制的に制御することから[6]、その下流に存在する Smad シグナルを介してコラーゲンの形成などに関与している可能性が考えられる。上述のように、PLAP-1 が TGF-β を抑制的に制御する事から *in vivo* でも抑制的に働いている事が考えられる。*PLAP-1* KO マウスを用いた歯根膜の蛍光免疫染色にて Smad2 の上昇は認められたが、リン酸化 Smad2 の発現上昇は認められず、代わりに負のフィードバック因子であるとの報告がある[31]Smad7 の発現上昇が認められた（データに示さず)。したがって、*PLAP-1* KO マウスの歯根膜においては、一時的に組織内にシグナルが強く入りすぎる事で、負のフィードバックが起こり、Smad7 の上昇により Smad2 のリン酸化が抑制されているのでないかと考えれらる。このことより、*in vivo* でも Smad シグナルの異常が起こっている事が強く示唆される。今後、*PLAP-1* KO マウスの歯根膜における TGF-β 関連遺伝子やタンパクの発現変化について詳細に解析を行う必要がある。

歯周病は歯周ポケットにバイオフィルムが蓄積した結果、シンバイオシスの状態からディスバイオシスの状態へと破綻し、炎症性サイトカインの持続的な産生を伴うことで歯周組織の炎症が慢性化し、結果的に歯根膜や歯槽骨を含む歯周組織の破壊を伴う病気である[32,33]。Jiao らの報告によると、絹糸結紮によるマウス実験的歯周炎モデルにおける歯槽骨吸収は、絹糸中に形成された細菌叢により引き起こされることが明らかとなっている[34]。したがって、本研究におけるマウス実験的歯周炎モデルにおいても、絹糸結紮により細菌叢が形成され、歯周組織の炎症性サイトカインの持続的な産生により、歯槽骨吸収が起こったと考えられる。さらに *PLAP-1* KO マウスの歯根膜においては、強度の低下が起こり、歯根膜腔の拡大が認められたことから、咬合性外傷が起こっている事が考えられ、歯槽骨吸収の増加と破骨細胞数の増加による歯周炎の重篤化が認められたのではないかと考察している。今後、咬合性外傷モデルや老齢マウスモデルを用いて *PLAP-1* KO マウスで歯周炎を発症するかの検討が必要であると考えられる。また、PLAP-1 は歯根膜細胞において、TRL2 と TRL4 を介した炎症反応を抑制的に制御する事から[7]、*PLAP-1* KO マウスにおいては、その抑制機構が作動せず、歯周炎の病態の重篤化につながった可能性も考えられる。

ヒトの PLAP-1 においては、N 末端領域にてアスパラギン酸の連続配列数による多型が存在し、日本人における保有頻度が最も高い N 末端のアスパラギン酸数が 13 個である D13 型 PLAP-1 と比較して、N 末端のアスパラギン酸数が 14 個である D14 型 PLAP-1 において変形性関節症の発症・

進行と関連性があり、D14 型 PLAP-1 における TGF-β シグナルの抑制が報告されている[6,35-37]。我々のこれまでの研究より歯根膜細胞において、D13 型 PLAP-1 と比較して、D14 型 PLAP-1 が骨芽細胞分化に重要な役割を担っている BMP-2 を強く抑制する事が示されている[38]。我々の先行研究から D13 型 PLAP-1 と比較して、D14 型 PLAP-1 にて侵襲性歯周炎の発症に関連がある可能性が高い事が明らかになっており、本研究から、異なる PLAP-1 遺伝子多型によって歯根膜の脆弱性に違いが生じた結果、PLAP-1 の遺伝子多型が歯周病の進行に関連していると考えられる。

PLAP-1 が属する SLRP class I はコアタンパクの LRR 領域にて、他のタンパクと分子間相互作用することが知られている[10]。Decorin は LRR4-6 および C 末端領域にてコラーゲンと結合する事でコラーゲン原線維形成に関与しており、同様にコラーゲンと結合する PLAP-1 と競合するとの報告がある。一方で、BMP およびその受容体へ結合能を有しながら Decorin、PLAP-1 は抑制的に、Biglycan は促進的に機能する事が明らかになっている。分子構造上の相違点として Decorin は一カ所、Biglycan は二カ所の glycosaminoglycan(GAG)領域を有するプロテオグリカン分子である一方、PLAP-1 は全く GAG 結合領域を有しておらず、N 末端領域に特有のアスパラギン酸の繰り返し構造を有する事が明らかとなっている[1,39]。SLRP class Ⅰにおいて、コアタンパクの相同性が高いため、同様な機能を持つ一方で、GAG 領域の数により PLAP-1 は Biglycan や Decorin と異なる機能を持つと考えられる。

歯周組織においては、Biglycan は象牙芽細胞に高い発現を認めるとの報告や[40,41]、Decorin は歯周組織に広く検出され歯根膜においても発現を認めるとの報告がある[42,43]。これまでの報告から、Biglycan および Decorin のノックアウトマウスにおいても、歯周組織に明らかな異常は認めなかったが[44-46]、Decorin のノックアウトマウスにて歯根膜のコラーゲン原線維における網目構造の異常や、コラーゲン原線維の直径の増加が認められるとの報告がある[39,44,45]。また、Biglycan のノックアウトマウスにて歯根膜のコラーゲン原線維における直径の増加が報告されている[23,39]。本研究にて *PLAP-1* KO マウスのコラーゲン原線維の直径の増加や網目構造の異常が認められ、コラーゲン原線維に対する SLRP class I の機能が一部重複している可能性が考えられる。しかしながら、歯根膜において PLAP-1 は、Biglycan や Decorin と比べ極めて高い発現を認め[47]、歯根膜における SLRP class I の機能の中心を担っており、コラーゲンの形成に対して主要な働きをしている事が示唆される。したがって、*PLAP-1* KO マウスの歯根膜において、mRNA の発現が変わらないにも関わらず、タンパクレベルに

て Biglycan や Decorin の発現量が増加している事から、代謝が遅くなる事で一部 PLAP-1 の機能を補完的に働くが、量的にも機能的にも補うことが出来ず、様々なコラーゲンの異常や強度の低下が認められたのではないかと考察している。

PLAP-1 KO マウスの皮膚にてコラーゲン原線維の直径の減少傾向と、強度の増加の報告がある[48]。*PLAP-1* KO マウスの歯根膜にて観察された表現型と異なるが、歯根膜は皮膚と比較して PLAP-1 の発現が極めて高く、歯根膜においては PLAP-1 の影響が直接的に観察されたのではないかと考えている。また、歯根膜は咬合力などの負荷を恒常的に受ける特殊な組織であり、PLAP-1 が果たす役割が他の組織と異なり、歯根膜においてはその負荷に耐える為に強度の維持に重要であるのではないかと考えている。

最後に、本研究の結果から PLAP-1 の歯根膜におけるコラーゲンに対する機能について考察する。PLAP-1 は TGF-β シグナルを抑制する事から、TGF-β シグナルを介した線維化を間接的に制御すると同時に、コラーゲンに直接働きかける事で歯根膜を構成するコラーゲンの形成に関与している（図 10A）。*PLAP-1* KO マウスの歯根膜において Biglycan や Decorin がタンパクレベルで代謝の抑制を行う事で、PLAP-1 の機能を一部補完するが、量的にも機能的にも補いきれず TGF-β シグナルの亢進やコラーゲンとの直接作用の破綻が起こり、線維化の抑制や網目構造の異常が見られ、コラーゲンの形成異常や恒常性の破綻が起こったものと考えられる（図 10B）。そして歯根膜にて定常的に PLAP-1 が存在する事で、コラーゲンの形成や網目構造の維持を行い、歯根膜の強度の維持に重要な役割を果たしている（図 10C）。一方、*PLAP-1* KO マウスの歯根膜において、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から歯根膜が脆弱となり、歯周病の重篤化につながったと考察される（図 10D）。結果として PLAP-1 は歯周病の進行を抑制的に制御していると考えられる。

今後、コラーゲンの形成に対して PLAP-1 がいかに関与するのか、ひいては歯周組織の恒常性維持において PLAP-1 がどのような役割を演じるのかについてさらに詳細に解析する事で、PLAP-1 が歯周病治療薬の新たな候補分子の一つとなる事が期待される。

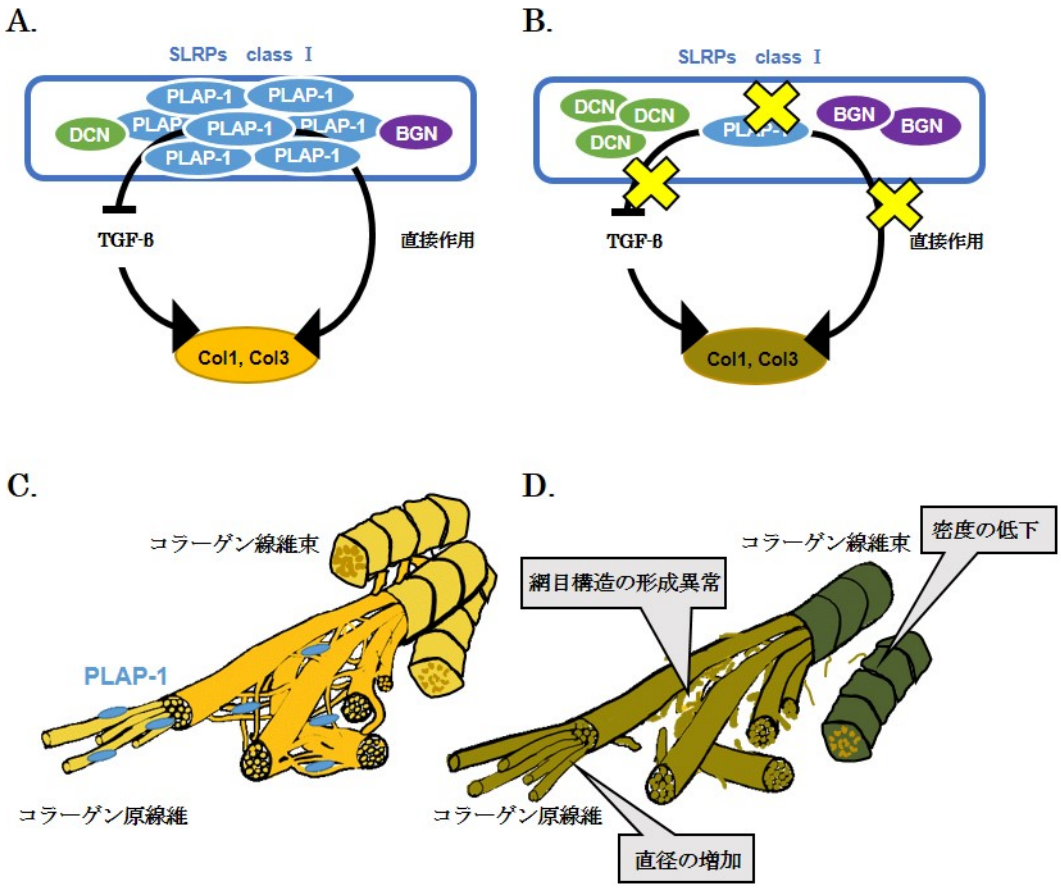


図 10　PLAP-1 の歯根膜におけるコラーゲンへの機能（作業仮設）

（A）PLAP-1 は歯根膜において、最も発現の高い SLRP class I タンパクであり、TGF-β を介して間接的に作用すると同時に、コラーゲンと直接作用する事で、コラーゲンの形成に関与している。

（B）PLAP-1 が存在しない事で、同一ファミリーである DCN や BGN のタンパク発現が上昇する事で、PLAP-1 の機能を一部補完するが、量的にも機能的にも補いきれず TGF-βシグナルの異常やコラーゲンとの直接作用の破綻が起こり、コラーゲンの形成異常が起こる。

（C）PLAP-1 は歯根膜においてコラーゲンの網目構造を保ち、強度の保持に重要な役割を果たしており、歯周病の進行を抑制的に制御している。

（D）PLAP-1 が存在しないことで、コラーゲンの網目構造に異常が生じ、コラーゲンの強度の低下から脆弱な歯根膜となる事で歯周病が増悪する。

結論

本研究結果より以下の結論を得た。

1. WT マウスと比較して、*PLAP-1* KO マウスにて歯槽骨吸収を認めなかったものの、歯根膜腔の体積が有意に増加していた。
2. WT マウスと比較して、*PLAP-1* KO マウス歯根膜での ECM 遺伝子発現に差が認めなかった一方で、ECM タンパク発現の上昇が認められた。
3. *PLAP-1* KO マウスにて歯根膜のコラーゲン線維束が有意に疎になっている事が示された。
4. *PLAP-1* KO マウス歯根膜において、コラーゲン線維の３次元構造が不完全で、コラーゲン原線維の異常が認められた。
5. HPDL において、siRNA により PLAP-1 をノックダウンすることで、Ⅰ型コラーゲンの形成が抑制された。
6. WT マウスと比較して、*PLAP-1* KO マウスの歯根膜は脆弱である事が示された。
7. 絹糸結紮歯周病モデルにおいて、WT マウスと比較して *PLAP-1* KO 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が認められた。

謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学　大学院歯学研究科　口腔分子免疫制御学講座、村上　伸也教授に深甚なる謝意を表します。

また、本研究の進行にあたり直接御指導ならびに御助言をいただきました東北大学　大学院歯学研究科　口腔修復学講座　歯内歯周治療学分野、山田　聡教授に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行に対して様々な御協力を頂きました大阪大学　大学院歯学研究科　口腔分子免疫制御学講座（口腔治療学教室）ならびに顎口腔機能再建学講座（歯科理工学教室）の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

1. Yamada S, Murakami S, Matoba R, et al. Expression profile of active genes in human periodontal ligament and isolation of PLAP-1, a novel SLRP family gene. *Gene.* 2001;275(2):279-286.
2. Yamada S, Tomoeda M, Ozawa Y, et al. PLAP-1/asporin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J Biol Chem.* 2007;282(32):23070-23080.
3. Henry SP, Takanosu M, Boyd TC, et al. Expression pattern and gene characterization of asporin. a newly discovered member of the leucine-rich repeat protein family. *J Biol Chem.* 2001;276(15):12212-12221.
4. Tomoeda M, Yamada S, Shirai H, Ozawa Y, Yanagita M, Murakami S. PLAP-1/asporin inhibits activation of BMP receptor via its leucine-rich repeat motif. *Biochem Biophys Res Commun.* 2008;371(2):191-196.
5. Yamada S, Kitamura M, Murakami S. PLAP-1　歯周組織のホメオスタシスを調節する新しい分子(PLAP-1: A novel molecule regulating homeostasis of periodontal tissues). *The Japanese Dental Science Review.* 2008;44(2):137-144.
6. Kizawa H, Kou I, Iida A, et al. An aspartic acid repeat polymorphism in asporin inhibits chondrogenesis and increases susceptibility to osteoarthritis. *Nat Genet.* 2005;37(2):138-144.
7. Yamaba S, Yamada S, Kajikawa T, et al. PLAP-1/Asporin Regulates TLR2- and TLR4-induced Inflammatory Responses. *J Dent Res.* 2015;94(12):1706-1714.
8. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000.* 1997;13:20-40.
9. Berkovitz BK. Periodontal ligament: structural and clinical correlates. *Dent Update.* 2004;31(1):46-50, 52, 54.
10. Kalamajski S, Oldberg A. The role of small leucine-rich proteoglycans in collagen fibrillogenesis. *Matrix Biol.* 2010;29(4):248-253.
11. Kalamajski S, Aspberg A, Lindblom K, Heinegård D, Oldberg A. Asporin competes with decorin for collagen binding, binds calcium and promotes osteoblast collagen mineralization. *Biochem J.* 2009;423(1):53-59.
12. Zhang G, Chen S, Goldoni S, et al. Genetic evidence for the coordinated regulation of collagen fibrillogenesis in the cornea by decorin and biglycan. *J Biol Chem.* 2009;284(13):8888-8897.
13. Svensson L, Heinegård D, Oldberg A. Decorin-binding sites for collagen type I are mainly located in leucine-rich repeats 4-5. *J Biol Chem.* 1995;270(35):20712-20716.
14. Keene DR, San Antonio JD, Mayne R, et al. Decorin binds near the C terminus of type I collagen. *J Biol Chem.* 2000;275(29):21801-21804.

15. Passanezi E, Sant'Ana ACP. Role of occlusion in periodontal disease. *Periodontol 2000.* 2019;79(1):129-150.
16. Mariotti A. Dental plaque-induced gingival diseases. *Ann Periodontol.* 1999;4(1):7-19.
17. Awata T, Yamada S, Tsushima K, et al. PLAP-1/Asporin Positively Regulates FGF-2 Activity. *J Dent Res.* 2015;94(10):1417-1424.
18. Trombetta-eSilva J, Rosset EA, Hepfer RG, et al. Decreased Mechanical Strength and Collagen Content in SPARC-Null Periodontal Ligament Is Reversed by Inhibition of Transglutaminase Activity. *J Bone Miner Res.* 2015;30(10):1914-1924.
19. Abe T, Hajishengallis G. Optimization of the ligature-induced periodontitis model in mice. *J Immunol Methods.* 2013;394(1-2):49-54.
20. Miletich I, Sharpe PT. Normal and abnormal dental development. *Hum Mol Genet.* 2003;12 Spec No 1:R69-73.
21. Goh KL, Holmes DF, Lu YH, Kadler KE, Purslow PP. Age-related dataset on the mechanical properties and collagen fibril structure of tendons from a murine model. *Sci Data.* 2018;5:180140.
22. Parry DA. The molecular and fibrillar structure of collagen and its relationship to the mechanical properties of connective tissue. *Biophys Chem.* 1988;29(1-2):195-209.
23. Corsi A, Xu T, Chen XD, et al. Phenotypic effects of biglycan deficiency are linked to collagen fibril abnormalities, are synergized by decorin deficiency, and mimic Ehlers-Danlos-like changes in bone and other connective tissues. *J Bone Miner Res.* 2002;17(7):1180-1189.
24. Roeder BA, Kokini K, Sturgis JE, Robinson JP, Voytik-Harbin SL. Tensile mechanical properties of three-dimensional type I collagen extracellular matrices with varied microstructure. *J Biomech Eng.* 2002;124(2):214-222.
25. Reed CC, Iozzo RV. The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. *Glycoconj J.* 2002;19(4-5):249-255.
26. Koda N, Sato T, Shinohara M, et al. The transcription factor mohawk homeobox regulates homeostasis of the periodontal ligament. *Development.* 2017;144(2):313-320.
27. Xu L, Li Z, Liu SY, Xu SY, Ni GX. Asporin and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2015;23(6):933-939.
28. Nakajima M, Kizawa H, Saitoh M, Kou I, Miyazono K, Ikegawa S. Mechanisms for asporin function and regulation in articular cartilage. *J Biol Chem.* 2007;282(44):32185-32192.

29. Biernacka A, Dobaczewski M, Frangogiannis NG. TGF-ß signaling in fibrosis. *Growth Factors.* 2011;29(5):196-202.
30. Hu HH, Chen DQ, Wang YN, et al. New insights into TGF-ß/Smad signaling in tissue fibrosis. *Chem Biol Interact.* 2018;292:76-83.
31. Nakao A, Afrakhte M, Morén A, et al. Identification of Smad7, a TGFbeta-inducible antagonist of TGF-beta signalling. *Nature.* 1997;389(6651):631-635.
32. Kornman KS, Page RC, Tonetti MS. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000.* 1997;14:33-53.
33. Johnson DA, Chen CL, Dombrowski JC, Nowotny A. Role of bacterial products in periodontitis. I. Endotoxin content and immunogenicity of human plaque. *J Periodontal Res.* 1976;11(6):349-359.
34. Jiao Y, Darzi Y, Tawaratsumida K, et al. Induction of bone loss by pathobiont-mediated Nod1 signaling in the oral cavity. *Cell Host Microbe.* 2013;13(5):595-601.
35. Ikegawa S. [Asporin, a susceptibility gene for osteoarthritis]. *Clin Calcium.* 2006;16(9):1548-1552.
36. Kaliakatsos M, Tzetis M, Kanavakis E, et al. Asporin and knee osteoarthritis in patients of Greek origin. *Osteoarthritis Cartilage.* 2006;14(6):609-611.
37. Nakamura T, Shi D, Tzetis M, et al. Meta-analysis of association between the ASPN D-repeat and osteoarthritis. *Hum Mol Genet.* 2007;16(14):1676-1681.
38. Kajikawa T, Yamada S, Tauchi T, et al. Inhibitory effects of PLAP-1/asporin on periodontal ligament cells. *J Dent Res.* 2014;93(4):400-405.
39. Ameye L, Young MF. Mice deficient in small leucine-rich proteoglycans: novel in vivo models for osteoporosis, osteoarthritis, Ehlers-Danlos syndrome, muscular dystrophy, and corneal diseases. *Glycobiology.* 2002;12(9):107R-116R.
40. Iozzo RV. The family of the small leucine-rich proteoglycans: key regulators of matrix assembly and cellular growth. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 1997;32(2):141-174.
41. Fisher LW, Termine JD, Dejter SW, et al. Proteoglycans of developing bone. *J Biol Chem.* 1983;258(10):6588-6594.
42. Tenório DM, Santos MF, Zorn TM. Distribution of biglycan and decorin in rat dental tissue. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36(8):1061-1065.
43. Häkkinen L, Westermarck J, Kähäri VM, Larjava H. Human granulation-tissue fibroblasts show enhanced proteoglycan gene expression and altered response to TGF-beta 1. *J Dent Res.* 1996;75(10):1767-1778.

44. Matheson S, Larjava H, Häkkinen L. Distinctive localization and function for lumican, fibromodulin and decorin to regulate collagen fibril organization in periodontal tissues. *J Periodontal Res.* 2005;40(4):312-324.
45. Häkkinen L, Strassburger S, Kähäri VM, et al. A role for decorin in the structural organization of periodontal ligament. *Lab Invest.* 2000;80(12):1869-1880.
46. Chiu R, Li W, Herber RP, Marshall SJ, Young M, Ho SP. Effects of biglycan on physico-chemical properties of ligament-mineralized tissue attachment sites. *Arch Oral Biol.* 2012;57(2):177-187.
47. Yamada S, Ozaki N, Tsushima K, et al. Transcriptome Reveals Cathepsin K in Periodontal Ligament Differentiation. *J Dent Res.* 2016;95(9):1026-1033.
48. Maccarana M, Svensson RB, Knutsson A, et al. Asporin-deficient mice have tougher skin and altered skin glycosaminoglycan content and structure. *PLoS One.* 2017;12(8):e0184028.