

令和 3 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K24090

研究課題名(和文)炎症性歯槽骨破壊におけるPLAP-1の役割

研究課題名(英文)Role of PLAP-1 in inflammatory alveolar bone destruction

研究代表者

平井 麻絵 (Asae, Hirai)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：30846530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では炎症歯根膜におけるPLAP-1の発現低下が歯槽骨の吸収に及ぼす影響を明らかにすることを目的に研究を実施した。

ヒト歯根膜細胞における炎症性サイトカインによるPLAP-1発現抑制の分子機序に関する解析を行った結果、炎症時にmicroRNA21、101の発現が確認され、両microRNAの関与が示唆された。またリコンビナントPLAP-1が破骨細胞形成過程に及ぼす影響について検討した結果、M-CSF誘導性の骨髄細胞から破骨細胞前駆細胞への分化には影響せず、RANKL誘導性の破骨細胞への分化を抑制することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

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で歯根膜周囲に生理的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、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と考えられる。本研究結果は新しい歯周組織の恒常性維持機構の解明につながる情報といえる。

研究成果の概要(英文)：In this study we investigated the effect of reduced expression of PLAP-1 in the inflamed periodontal ligament on alveolar bone resorption.

We examined the molecular mechanism of the suppression of PLAP-1 expression by inflammatory cytokines in human periodontal ligament cells. Our data suggested the involvement of microRNA21 and 101 in the decrease of PLAP-1 expression during inflammation. In addition, a series of in vitro studies demonstrated that recombinant PLAP-1 does not affect M-CSF-induced differentiation of bone marrow cells into osteoclast progenitors, but inhibits RANKL-induced differentiation into osteoclasts.

研究分野：歯周病学

キーワード：PLAP-1 歯根膜 炎症 歯周病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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力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、咬合性外傷や矯正力、細菌由来因子の暴露により、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吸収にも積極的に関与することが示唆されている。私はこれまでに、歯周病の病態形成過程における歯根膜の炎症反応を解明するために、Laser capture microdissection (LMD) システムを用いてマウス絹糸結紮歯周病モデルの歯根膜からタンパクを採取し、LC-MS/MS 分析にて炎症歯根膜に発現する分子を網羅的に解析した。その結果、大変興味深いことに、対照側に比べ絹糸結紮側の歯根膜で有意に発現低下している分子の一つとして PLAP-1 が同定された。

PLAP-1 は small leucine-rich proteoglycan (SLRPs) family class に属し、歯根膜に高発現する細胞外基質タンパクである。PLAP-1 は BMP-2 や FGF-2 等のサイトカインと直接結合することで歯根膜細胞の分化を調整する役割を担う一方で、TLR と LPS との結合を阻害することで、LPS 誘導性の炎症反応を抑制することを、私の所属する研究室より報告してきた。一方で、PLAP-1 が属する SLRP family の複数の分子が破骨細胞の分化過程を制御することが近年、報告されている。しかしながら、PLAP-1 が炎症反応により発現が低下する分子機序、さらには、炎症歯根膜における PLAP-1 の発現低下が歯周病の病態形成における骨吸収に対し、いかなる影響を及ぼすかについては十分な解析がなされていない。

2. 研究の目的

本研究では、炎症歯根膜における PLAP-1 の発現低下の分子機序について検討するとともに、PLAP-1 が破骨細胞の形成過程に及ぼす影響について検討することにより、炎症歯根膜における PLAP-1 の発現低下が歯槽骨の吸収に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

炎症歯根膜における PLAP-1 の発現低下の分子機序について、ヒト歯根膜細胞 (HPDL) を用いた *in vitro* 解析にて micro RNA の関与を中心に検討した。一方で、PLAP-1 が破骨細胞形成過程に及ぼす影響を *in vitro*、*in vivo* の両面から解析を行った。

(1) HPDL における炎症性サイトカインによる PLAP-1 発現抑制の分子機序に関する解析

HPDL を 6 穴細胞培養プレートに播種し、1 週間培養を行い、IL-1 で刺激した。48 時間後に培養上清を回収し、PLAP-1 の発現低下がプラトーに達する濃度条件を検討した。次にその濃度にて IL-1 存在下での HPDL における miRNA21 および miRNA101 の発現を検討した。

(2) PLAP-1 が骨髄細胞から破骨細胞前駆細胞への分化に及ぼす影響の検討

8 週齢 C57BL6J 雄性マウスから骨髄細胞を採取し、M-CSF (100 ng/ml) によって、破骨細胞前駆細胞へ分化誘導する際にリコンビナント PLAP-1 (10、100 ng/ml) を添加し、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した。また同細胞における RANK 遺伝子 (*Tnfrs11a*) の発現を Real-time PCR 法にて検討した。

(3) PLAP-1 が破骨細胞の形成過程に及ぼす影響に関する解析

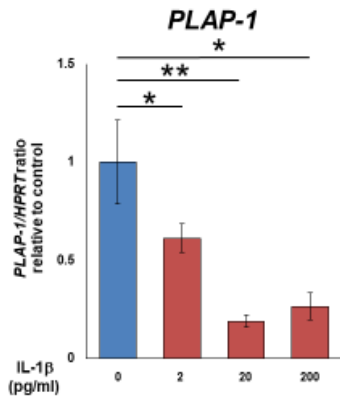
8 週齢 C57BL6J 雄性マウスから採取した骨髄細胞を、M-CSF (100 ng/ml) 下で 4 日間培養し、破骨細胞前駆細胞を分化誘導した。その後、RANKL (図 1: 400 ng/ml、図 2-3: 100 ng/ml) 存在下で PLAP-1 (10、100ng/ml) を添加し、6 日間培養を継続した。破骨細胞マーカー遺伝子である *Ctsk*、*Acp5*、*Calcr*、*Oscar* の発現を Real-time PCR 法にて検討した。さらに同条件にて 3 日間培養を継続したのち、TRAP 染色にて破骨細胞形成の評価を行った。さらにマウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞を用いて同様の検討を行った。

4. 研究成果

(1) HPDL における炎症性サイトカインによる PLAP-1 発現抑制の分子機序に関する解析

IL-1 刺激時に PLAP-1 の発現低下がプラトーに達する濃度条件を検討した結果、20pg/ml であることが明らかとなった。(図 1) *in vitro* において、IL-1 存在下での HPDL における miRNA21、miRNA101 の発現を検討した結果、IL-1 刺激時の歯根膜細胞に両 miRNA が発現していることが明らかとなった。(図 2)

(図 1)



(図 2)

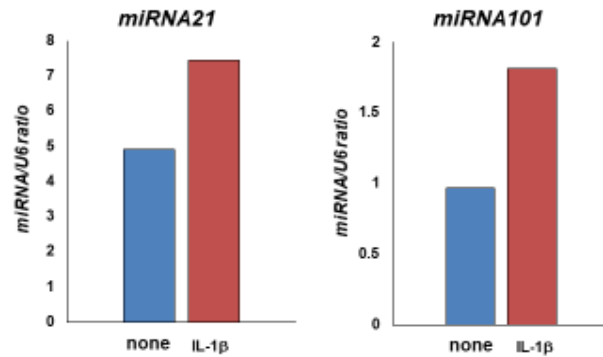


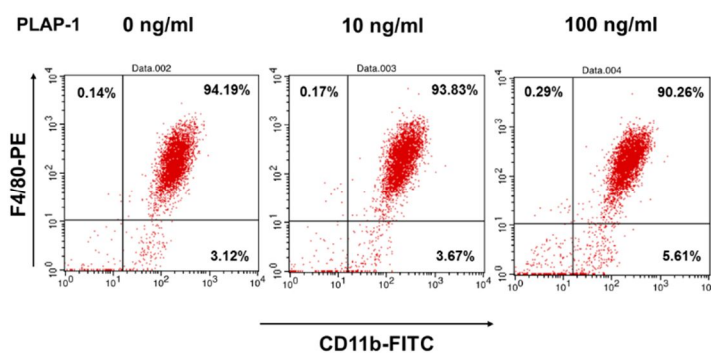
図 1 IL-1 が HPDL における PLAP-1 遺伝子の発現に及ぼす影響
 HPDL を IL-1 で刺激し 48 時間後の PLAP-1 の発現低下がプラトーに達する濃度条件を示す。PLAP-1 の発現量は、IL-1 非存在下における値を 1 としたときの相対量として算出した。
 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$

図 2 IL-1 存在下での HPDL における miR-21 および miR-101 の発現上昇
 IL-1 (20pg/ml) 存在下での HPDL における miRNA21, 101 の発現を示す。
 miR-21 および miR-101 の発現量は、PLAP-1 非存在下における値を 1 としたときの相対両として算出した。 $* p < 0.05$ 、 $** p < 0.01$

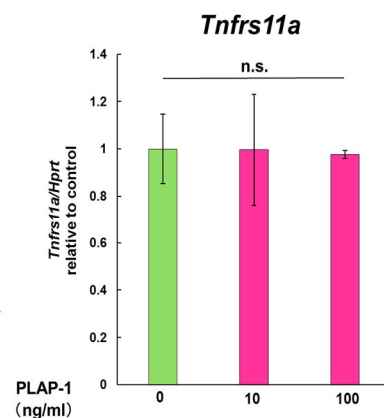
(2) PLAP-1 が骨髄細胞から破骨細胞前駆細胞への分化に及ぼす影響の検討

培養 4 日目のマクロファージマーカー F4/80 と CD11b の発現をフローサイトメトリー法にて解析した結果、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に影響を及ぼさなかった。(図 3) また M-CSF 誘導性のマクロファージにおける RANK 遺伝子 (*Tnfrs11a*) の発現を Real-time PCR 法にて検討した結果、リコンビナント PLAP-1 の添加は *Tnfrs11a* の発現に有意な影響を及ぼさなかった。(図 4) このことより、PLAP-1 は M-CSF 誘導性の破骨細胞前駆細胞への分化に影響しないことが示された。

(図 3)



(図 4)



マウス骨髄細胞から破骨細胞前駆細胞への分化に PLAP-1 が及ぼす影響の検討

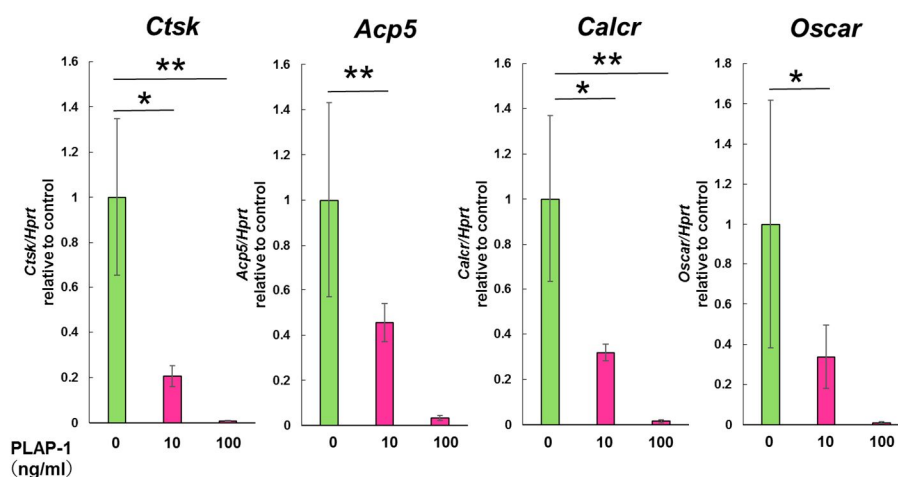
8 週齢 C57BL6J 雄性マウスから骨髄細胞を採取し、M-CSF (100 ng/ml) によって、破骨細胞前駆細胞へ分化誘導する際に PLAP-1 (10, 100 ng/ml) を添加した。培養 4 日目のマクロファージマーカー F4/80 と CD11b の発現 (図 3) と *Tnfrs11a* の発現 (図 4) を示す。*Tnfrs11a* の発現量は、PLAP-1 非存在下における値を 1 としたときの相対量として算出した。

n.s. : not significant

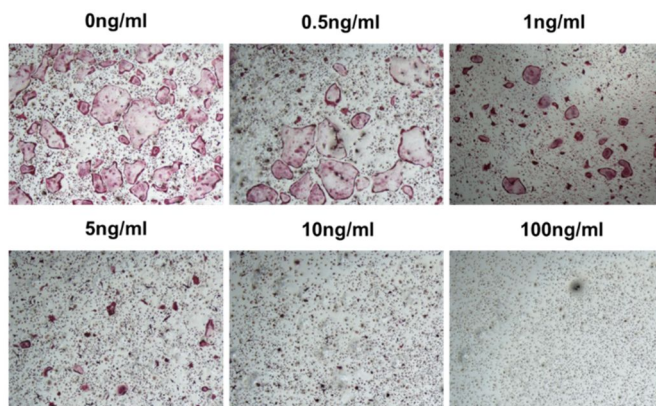
(3) PLAP-1 が破骨細胞の形成過程に及ぼす影響に関する解析

RANKL 刺激により誘導される破骨細胞マーカー (*Ctsk*, *Calcr*, *TRAP5b*, *OSCAR*) の遺伝子発現はリコンビナント PLAP-1 の添加により濃度依存的に有意に低下し (図 5)、さらに TRAP 染色の結果、コントロールにて観察された核を 3 個以上有する TRAP 陽性の多核細胞の数は PLAP-1 存在下で濃度依存的に有意に減少することが明らかとなった。(図 6-7) マウス骨髄細胞と同様に 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 の濃度依存的に有意に抑制された。(図 8) このことから、RANKL により誘導される破骨細胞への分化を、PLAP-1 は抑制することが明らかとなった。

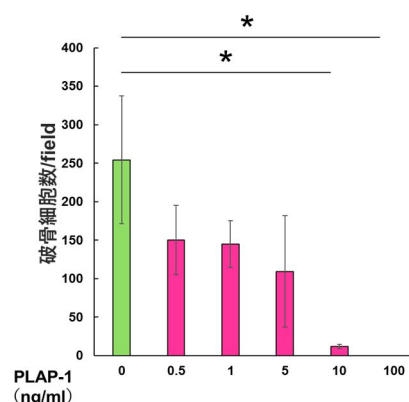
(図 5)



(図 6)



(図 7)



破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化に PLAP-1 が及ぼす影響の検討

8 週齢 C57BL6J 雄性マウスから採取した骨髄細胞を、M-CSF (100 ng/ml) 下で 4 日間培養し、破骨細胞前駆細胞を分化誘導した。その後、RANKL (図 5 : 400 ng/ml、図 6-7 : 100 ng/ml) 存在下で PLAP-1 (10、100ng/ml) を添加し、6 日間培養を継続した。

図 5 RANKL 存在下で、PLAP-1 を添加し、3 日間培養した際の *Ctsk*, *Acp5*, *Calcr*, *Oscar* の発現を示す。発現量は、PLAP-1 非存在下における値を 1 としたときの相対量として算出した。

図 6 RANKL 存在下で、PLAP-1 を添加し、6 日間培養した際の TRAP 染色像を示す。

図 7 図 6 の染色像にて、核が 3 個以上の破骨細胞数を示す。* p < 0.05、** p < 0.01

(図 8)

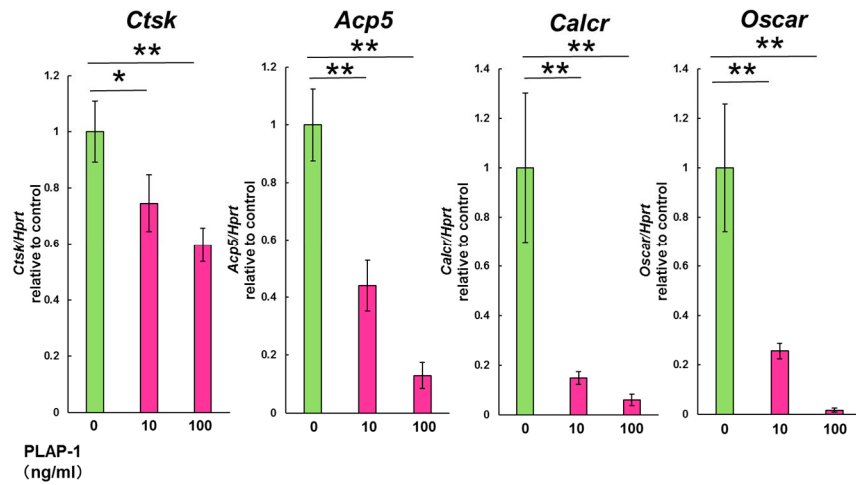


図 8 RAW264.7 細胞における RANKL 誘導性の破骨細胞マーカー遺伝子発現に PLAP-1 が及ぼす影響の検討

RAW264.7 細胞を RANKL (100 ng/ml) 存在下で、PLAP-1 (10、100 ng/ml) を添加し、3 日間培養した際の *Ctsk*、*Acp5*、*Calcr*、*Oscar* の発現を示す。発現量は、PLAP-1 非存在下における値を 1 としたときの相対量として算出した。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hirai A, Takedachi M, Shimomura J, Kawasaki K, Murata M, Sawada K, Morimoto C, Iwayama T, Yamada S, Murakami S
2. 発表標題 PLAP-1 expression was decreased within inflamed murine periodontal ligament
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------