



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Histochemical examination on periodontal tissues of Klotho-deficient mice fed with phosphate insufficient diet [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	彦根, 久美子
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(歯学)
Dissertation Number	甲第11706号
Issue Date	2015-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/58967
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Kumiko_Hikone_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 彦根 久美子

学 位 論 文 題 名

Histochemical examination on periodontal tissues of *Klotho*-deficient mice fed with phosphate insufficient diet

（ 低リン餌飼育 *Klotho* 欠損マウスの歯周組織における組織化学的検索 ）

【緒言】

咬合力などのメカニカルストレスが負荷される歯槽骨や歯根膜において、老化、あるいは、それによって引き起こされる組織変性に関する解明は重要である。老化モデルとして、*αKlotho* 遺伝子のプロモーター領域に変異が生じ、コード領域の転写活性が著しく低下したマウス (*kl/kl* マウス) および *αKlotho* 遺伝子が欠損したマウス (*αKlotho*^{-/-}マウス) が存在し、それらは骨粗鬆症、皮膚萎縮症、異所性石灰化や肺気腫症などの老化性変性を呈す。*kl/kl* マウスと *αKlotho*^{-/-}マウスは、*αkltho*/FGF23 シグナルの低下・遮断による高リン血症が生じており、それらの老化性変性は高リン血症に起因するという推測がなされている。そこで、今回我々は、これらマウスの組織異常の主な要因が血中リン濃度上昇であるか、あるいは、*αkltho* の局所的な別の機序が存在するのかを明らかにするために、低リン餌を与えた *kl/kl* マウスと *αKlotho*^{-/-}マウスの下顎臼歯部の歯周組織を組織化学的に検索した。

【材料と方法】

生後4週齢の野生型マウス、*kl/kl* マウスおよび *αKlotho*^{-/-}マウスに 1.17%Ca, 0.69%Pi 含有の通常餌（通常餌群 各 n=6）、または、1.17%Ca, 0.415%Pi およびリン吸着剤である塩酸セベラマーを 3%含有した低リン餌（低リン餌群 各 n=6）を与え、3週間飼育した。生後7週齢でジエチルエーテルおよびペントバルビタール麻酔下にて、体重測定および右心室より採血を行った後、4%パラホルムアルデヒド溶液にて灌流固定した。その後、下顎骨を採取し、通法にて、下顎骨のパラフィン切片を作製した。これら切片を用いて、下顎第一臼歯・第二臼歯の槽間中隔の歯周組織におけるアルカリフォスファターゼ (ALP)、DMP1、オステオポンチンの免疫組織化学および酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ (TRAP) 酵素組織化学を行った。また、RT-PCRにより、腎臓における *αKlotho* と *Fgfr1c* の遺伝子解析を行った。

【結果】

低リン餌群の *kl/kl* マウスは、通常餌群の *kl/kl* マウスに比べて体重が有意に増加しており、体長も野生型マウスと変わらないほど伸長していた。血清リン濃度は、野生型マウスと *kl/kl* マウスの両者において、通常餌群と低リン餌群との間に有意差はなかったが、低リン餌飼育の方がやや低い傾向がみられた。

野生型マウスの第一臼歯と第二臼歯の槽間中隔を顕微鏡観察すると、低リン餌群の歯槽骨および歯根膜は、通常餌群の組織像と同様であった。一方、通常餌群の *kl/kl* マウスでは、幅の狭い歯根膜や歯槽骨内にヘマトキシリン濃染の領域が認められたが、低リン餌群

の *kl/kl* マウスでは、歯根膜の幅は広くなり、ヘマトキシリン濃染の領域が著しく減少するなど野生型マウスに近い組織像へと改善していた。通常餌群・低リン餌群の野生型マウスの槽間中隔では、歯の生理的遠心移動に伴い、近心面には鋸歯状の骨表面に TRAP 陽性破骨細胞が観察され、遠心面には滑らかな骨表面に ALP 陽性骨芽細胞が局在した。一方、通常餌群の *kl/kl* マウスでは、近遠心面ともに不規則な形状を示し、ALP 陽性骨芽細胞は散在的に局在していた。さらに TRAP 陽性セメントラインを歯槽骨内部に認めたが、TRAP 陽性破骨細胞はほとんど認められなかった。ところが、低リン餌群の *kl/kl* マウスでは、槽間中隔の近心面に TRAP 陽性破骨細胞が局在し、野生型マウスに近い組織像を示した。槽間中隔の骨基質を観察すると、通常餌群・低リン餌群の野生型マウスでは、DMP-1 陽性反応が骨細胞・骨細管に一致して広範囲に均一に認められるのに対して、通常餌 *kl/kl* マウスでは、骨小腔とセメント質に DMP-1 強陽性反応が認められ、歯根膜内には DMP-1 陽性の不定形構造物が散在していた。また、野生型マウスの槽間中隔の近心面の骨表面にはオステオポンチン陽性反応を認めたが、通常餌飼育の *kl/kl* マウスの槽間中隔では、広範囲にわたってオステオポンチン陽性の不定形構造物がみられた。しかし、低リン餌群の *kl/kl* マウスの槽間中隔には、一部、DMP1 強陽性を示す骨小腔が残存するものの、オステオポンチンの局在が野生型マウスに近い正常な組織像へと改善した。

さらに、*kl/kl* マウスの槽間中隔における組織異常の改善が、腎臓における血清リン濃度によるものか、あるいは、 α kl o tho/FGF23 シグナルのリン濃度調節とは異なる局所的な作用によるものかを解明するために、 α Kl o tho^{-/-}マウスにおいて同様の実験を行った。すると、通常餌群および低リン餌群の α Kl o tho^{-/-}マウスは、通常餌群の *kl/kl* マウスと同様の組織異常を示しており、それは、低リン餌飼育によって改善されないことが明らかとなった。また、低リン餌群の *kl/kl* マウスの腎臓では、*Fgfr1c* 遺伝子の発現は変わらないが、 α Kl o tho 遺伝子の発現が上昇していた。

【考察】

kl/kl マウスと α Kl o tho^{-/-}マウスにおける歯根膜の狭小化、歯根膜内の不定形構造物の局在、歯根膜線維の不規則な走行といった組織異常は、高齢のヒトでも報告されており、歯周組織における老化メカニズムを理解する手掛かりとなると考えられる。低リン餌飼育の *kl/kl* マウスの槽間中隔では、TRAP 陽性破骨細胞が近心面に認められたことから、歯の生理的遠心移動が正常化された可能性が示唆された。さらに、DMP-1 とオステオポンチンの局在も改善傾向を示したが、リン酸カルシウム結晶に高親和性を示す DMP-1 やオステオポンチンが老化とどのような関係にあるか、また、 α kl o tho 欠損環境下で過剰産生されるメカニズムは不明である。今回の解析で、低リン餌飼育によって組織異常が改善した *kl/kl* マウスでは α Kl o tho 遺伝子の発現が上昇していたことが分かった。このことは、低リン餌飼育により α kl o tho の産生が一部回復していることを示唆しているが、 α Kl o tho^{-/-}マウスの組織異常は改善されなかったことを考慮すると、これらマウスの歯周組織における異常は、高リン血症だけでなく、歯周組織における局所的な α kl o tho/FGF23 シグナルの破綻にも起因する可能性が考えられた。

【結語】

kl o tho 欠損によって生じる組織異常は、高リン血症だけでなく、歯周組織における局所的な α kl o tho/FGF23 シグナルの破綻にも起因する可能性が推察された。