



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_review.pdf, 審査の要旨



学位論文審査の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（歯学） 氏 名 彦根 久美子

主査 教授 飯田 順一郎

審査担当者 副査 教授 網塚 憲生

副査 教授 川浪 雅光

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 ）

審査は、審査担当者全員の出席の下、はじめに申請者より提出論文の概要の説明が行われ、審査担当者が提出論文の内容および関連した学問分野について口頭により試問する形式で行われた。

咬合力などのメカニカルストレスが負荷される歯周組織において、組織学的老化の解明は重要である。老化モデルとして、 $\alpha Klotho$ 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 $\alpha Klotho$ 遺伝子が欠損したマウス ($\alpha Klotho^{-/-}$ マウス) が存在し、それらは骨粗鬆症、異所性石灰化などの老化性変性を呈す。そのメカニズムとして、 $\alpha klotho/FGF23$ シグナルの低下・遮断により血中リン濃度が上昇することで老化性変性が生じることが論じられている。そこで、今回我々は、これらマウスの組織異常が血中リン濃度上昇に起因するのか、あるいは、 $\alpha klotho$ には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、これらマウスに低リン餌を与え、下顎臼歯部の歯周組織を組織化学的に検索した。

4 週齢の野生型マウス、 kl/kl マウスおよび $\alpha Klotho^{-/-}$ マウスに通常餌または低リン餌を 3 週間与え、通法にて固定し、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 $\alpha Klotho$ と *Fgfr1c* の遺伝子解析を行った。

野生型マウスの槽間中隔では、通常餌群・低リン餌群ともに同様の組織像を示した。一方、通常餌群の kl/kl マウスでは、幅の狭い歯根膜および歯槽骨内にヘマトキシリン濃染領域が認められたが、低リン餌群の kl/kl マウスでは野生型マウスに近い組織像へと改善していた。野生型マウスの槽間中隔では、両群とも、歯の生理的遠心移動に伴い、近心面では鋸歯状の骨表面に TRAP 陽性破骨細胞が観察されたが、遠心面で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す一方、

ALP 陽性骨芽細胞は散在的に局在しており、TRAP 陽性破骨細胞はほとんど認められなかった。しかし、低リン餌群の *kl/kl* マウスは野生型マウスに近い組織像を示した。さらに、野生型マウスでは、両群とも 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、通常餌群の *kl/kl* マウスは、骨小腔とセメント質に DMP-1 強陽性反応を示し、歯根膜内には DMP-1 陽性の不定形構造物を有していた。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、通常餌群の *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、野生型マウスに近い正常な組織像へと改善した。次に、 $\alpha Klotho^{-/-}$ マウスにおいて、同様の実験を行った。すると、 $\alpha Klotho^{-/-}$ マウスは、両群とも通常餌群の *kl/kl* マウスと同様の組織異常を示しており、低リン餌飼育によって組織異常が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、 $\alpha Klotho$ 遺伝子の発現が上昇していた。

以上より、 $\alpha klotho$ が欠損または低下した状態では歯周組織に異常が生じること、また、低リン餌飼育によって、その組織異常が改善した *kl/kl* マウスでは $\alpha Klotho$ 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 $\alpha klotho$ の産生が一部回復していることを示唆しているが、 $\alpha Klotho^{-/-}$ 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 $\alpha klotho$ /FGF23 シグナルの破綻にも起因する可能性が考えられた。

引き続き論文内容及び関連事項について、以下の項目を中心に質疑応答がなされた。

- (1) $\alpha klotho$ /FGF23/FGFR1c シグナル経路について
- (2) $\alpha klotho$ 遺伝子変異マウス (*kl/kl*) と $\alpha klotho$ 遺伝子欠損マウス ($\alpha Klotho^{-/-}$) の差異について
- (3) 低リン食飼料の設定と作製方法について
- (4) *kl/kl* マウスの歯根膜および歯槽骨でみられるヘマトキシリン濃染領域について
- (5) 歯根膜腔内における歯根膜線維および線維芽細胞の走行について
- (6) *kl/kl* マウスの歯槽骨内でみられる空の骨小腔と DMP-1 の関連性について
- (7) $\alpha Klotho$ 遺伝子の発現部位について
- (8) FGF23 と歯根膜線維との関連性について
- (9) *kl/kl* マウスにおける矯正力負荷実験について

これらの質問に対して、申請者は適切な説明によって回答し、本研究の内容を中心とした専門分野はもとより、関連分野について十分な理解と学識を有していることが確認された。

本研究は、 $\alpha klotho$ 欠損環境下の歯周組織に関する組織学的解析をしたことが高く評価された。本研究の内容は、歯科医学に発展に十分に貢献するものであり、審査担当者全員は、学位申請者が博士(歯学)の学位を授与するに値するものと認めた。