

学 位 論 文

# 歯髄における破歯/破骨細胞の分化抑制のメカニズム解析

西田 大輔

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座 硬組織機能解析学  
(主指導教員:宇田川 信之 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

## Analysis of the inhibitory mechanism of odontoclast/osteoclast formation in dental pulp

Daisuke Nishida

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine  
(Chief Academic Advisor : Professor Nobuyuki Udagawa)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University, for the degree Ph. D. (in Dentistry)

## 目次

	ページ
1. 略号, 略号・用語の説明	p.2
2. 要旨	p.4
3. 緒言	p.5
3. 実験材料及び方法	p.7
1) 動物	
2) 試薬および抗体	
3) RANKL, OPG, c-Fms および F4/80 免疫染色(パラフィン切片)	
4) CD45 および Ter119 免疫染色(凍結切片)	
5) TRAP 染色	
6) Real Time PCR 解析	
7) 窩洞形成モデル	
4. 結果	p.10
1) 歯髄組織における破骨細胞分化関連因子の発現	
2) 野生型マウスにおける歯髄組織の破骨細胞の観察	
3) OPG 欠損マウスにおける歯髄組織の破骨細胞の観察	
4) OPG 欠損マウスにおける象牙芽細胞の観察	
5) 歯髄組織における血球系細胞の解析	
6) 歯髄組織における破骨細胞前駆細胞の解析	
7) 歯の切削による外部刺激下における歯髄破骨細胞の観察	
5. 考察	p.13
1) 歯髄における破骨細胞分化調節因子の発現解析	
2) OPG 欠損における象牙芽細胞の観察	
3) 歯に対する外部刺激後の破骨細胞出現の観察	
4) 歯髄における破骨細胞分化抑制機構	
6. 結論	p.16
7. 謝辞	p.17
8. 参考文献	p.18
9. 図表の説明	p.21
10. 図表	p.23

## 略号

RANKL	<u>r</u> ecceptor <u>a</u> ctivator of <u>NF-<math>\kappa</math>B</u> <u>l</u> igand
OPG	<u>o</u> steoprotegerin
M-CSF	<u>M</u> acrophage <u>C</u> olony <u>S</u> timulating <u>F</u> actor
Col1	type I Collagen
TRAP	<u>T</u> artrate- <u>R</u> esistant <u>A</u> cid <u>P</u> hosphatase
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GFP	<u>g</u> reen <u>f</u> luorescent <u>p</u> rotein
VE-Cad	VE-cadherin
PI	<u>P</u> ropidium <u>I</u> odide
LPS	Lipopolysaccharide
PECAM-1	<u>p</u> latelet <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ell <u>a</u> dhesion <u>m</u> olecule

## 略号・用語の説明

RANKL:破骨細胞の分化と骨吸収機能を誘導するサイトカインである。破骨細胞前駆細胞は RANKL の受容体である RANK を発現し、接触機構で RANKL を認識し破骨細胞に分化する。この RANKL-RANK 相互作用は破骨細胞の分化に必須の因子である。

OPG:破骨細胞の分化抑制因子である RANKL のデコイ(おとり)受容体である。RANKL/RANK の結合を競合阻害し、破骨細胞の分化と骨吸収機能抑制する。また、OPG を欠損させたマウスは、破骨細胞の分化亢進により、骨吸収が上昇し、骨粗鬆症を呈する。

M-CSF/CSF-1:単球・マクロファージ系細胞の増殖と分化を促進するサイトカインである。M-CSF 受容体である c-Fms/CD115 に結合し、破骨細胞前駆細胞の増殖を促進する。

破骨細胞分化に必須の因子として知られている。

**Col1:I 型コラーゲン**は、人体の最も豊富なコラーゲンである。腱、靱帯、筋原繊維の内膜、骨の有機部分、真皮、象牙質などに存在し、骨芽細胞、象牙芽細胞のマーカータンパク質として知られている。

**Nestin**:中枢神経系幹細胞に一過性に発現する中間径フィラメントである。また、象牙芽細胞のマーカータンパク質として報告されている。

**TRAP**:酒石酸抵抗性酸ホスファターゼは、破骨細胞に特異的に発現しているマーカー酵素である。破骨細胞の染色によく用いられている。

**Cathepsin K**:リソソームに局在するシステインプロテアーゼである。破骨細胞において産生されたカテプシン K は、骨表面へ向けて分泌され、I 型コラーゲンを分解にすることにより、骨吸収に関わる。分化初期から成熟型に至る破骨細胞において高発現しており、代表的な破骨細胞マーカーである。

**CD31/PECAM-1**:血小板内皮細胞接着分子-1 は、血管内皮細胞に発現する細胞表面レセプターである。

**CD144/VE-cadherin**:内皮細胞に特異的な接着分子である。内皮組織の接着部位の細胞間隙にみられる。血管内皮の透過性に関与すると考えられている。

**CD45**:赤血球および血小板を除く、全ての造血系細胞の細胞膜上に発現するタンパク質である。

**Ter119/Ly76**:赤血球発生の後期ステージに対する分化マーカーであると考えられている。

**F4/80 /EMR1/Ly71**:広範囲の成熟マクロファージ上で発現する細胞表面糖タンパク質である。



## 要旨

歯髄に破骨細胞(以下、破骨細胞)は存在しない。一方、炎症、外傷、感染などともない、歯髄側の象牙質に破骨細胞が出現し、内部吸収が惹起されることが知られている。以上の所見は、正常な歯髄組織では破骨細胞の形成が抑制されていることを示唆するが、その詳細については良く分かっていない。

破骨細胞はマクロファージ系の前駆細胞から分化する。骨芽細胞は、破骨細胞分化誘導因子である RANKL(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand)を発現する。一方、骨芽細胞は、RANKL のデコイ受容体である OPG (osteoprotegerin)も発現し、破骨細胞分化を抑制する。以前、歯髄組織では OPG の発現が高く、その結果、破骨細胞形成が抑制されることが報告された。そこで本研究は、歯髄組織における破骨細胞分化抑制に対する OPG の重要性を検討した。

骨と歯における RANKL と OPG の発現を、mRNA レベルで調べた。その結果、歯の RANKL/OPG 比は、骨と比較して有意に低いことが明らかになった。以上の所見は、歯は骨と比較し、破骨細胞分化が負に制御された環境であることを示す。そこで、OPG 欠損マウスの歯髄における破骨細胞を観察した。その結果、OPG 欠損マウスの歯髄でも、破骨細胞は認められなかった。一方、象牙芽細胞についても、野生型と OPG 欠損マウスに違いは認められなかった。次に、破骨細胞前駆細胞である血球系細胞を、歯髄組織で観察した。その結果、血球系細胞の殆どが血管内に局在することが明らかになった。さらに、破骨細胞前駆細胞マーカーである c-Fms 陽性細胞も同様に歯髄の血管内に主な局在が認められ、その細胞数は OPG 欠損マウスでも同等であった。一方、マクロファージマーカーである F4/80 陽性細胞は歯髄組織全体に局在した。その分布は、野生型と OPG 欠損マウスで同等であった。さらに、マウスの臼歯に切削による外部刺激を与えた後の、歯髄における破骨細胞の出現を観察した。その結果、外部刺激を加えても、野生型および OPG 欠損マウスの歯髄に破骨細胞は認められなかった。

以上の所見より、正常な歯髄における、破骨細胞形成抑制に OPG が必要ない事が示唆された。歯髄組織に破骨細胞が存在しない理由として、破骨細胞前駆細胞が血管から歯髄組織に遊走する頻度が低いことが考えられた。一方、外部刺激後も、OPG 欠損マウスの歯髄組織に破骨細胞は出現しなかった。以上より、歯髄組織における OPG 以外による破骨細胞分化の抑制機構の存在も示唆された。

## 緒言

骨組織は絶えず骨芽細胞による形成と破骨細胞による吸収が繰り返され、新しい骨に置き換わる。この過程を、「骨のリモデリング」と呼ぶ。破骨細胞は骨吸収を担う多核の細胞であり、単球・マクロファージ系の破骨細胞前駆細胞から分化する<sup>1)</sup>。骨芽細胞は破骨細胞の分化に必須な2つの因子、M-CSF(macrophage colony stimulating factor)とRANKL(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand)を発現することで、破骨細胞の形成を支持する。一方、破骨細胞前駆細胞は、M-CSF および RANKL の受容体であるRANKとc-Fmsを発現する。M-CSFは、骨芽細胞により恒常的に産生される。RANKLは、活性型ビタミンD<sub>3</sub>、副甲状腺ホルモン、プロスタグランジンE<sub>2</sub>、インターロイキン-1(IL-1)、IL-6、IL-11 およびリポ多糖(LPS: Lipopolysaccharide)などの、各種の骨吸収因子により発現が誘導される<sup>1)</sup>。一方で、骨芽細胞は、RANKL のデコイ(おとり)受容体である OPG(osteoprotegerin)も発現する。OPGは、RANKL/RANKの結合を競合阻害し、破骨細胞の分化と骨吸収機能抑制する<sup>2)</sup>。

歯髄では、マクロファージ・樹状細胞様の抗原提示細胞が存在することが、報告されている<sup>3)</sup>。歯においては、象牙細管や露髄部より侵入した微生物は、歯髄の免疫細胞により処理される。Iwasaki らは、歯髄におけるマクロファージの増殖・分化を歯の器官培養にて確認しており、大部分の歯髄のマクロファージは、血流から前駆細胞を供給されることなく、歯髄中で増殖・分化することを報告している。また、この時に抗 M-CSF 抗体で歯髄におけるマクロファージの数が減少することも確認している<sup>4)</sup>。マクロファージのマーカーとして F4/80 が知られている<sup>5)</sup>。Zhang らは、歯髄には、象牙芽細胞層に存在し、抗原監視を主要な役割とする CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>と抗原捕獲・貪食を主要な役割とする CD11c<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>の2種類のマクロファージ・樹状細胞が存在することを報告している<sup>3)</sup>。以上のように、歯髄中には、破骨細胞前駆細胞となりえるマクロファージの存在が報告されている。

象牙芽細胞は、歯髄の最表層に接して配列している円柱形の細胞で、象牙質基質であるコラーゲンやムコ多糖を分泌し、象牙質を形成する。象牙芽細胞のマーカータンパク質として、タイプ I コラーゲン(Col1)および Nestin が知られている<sup>6)</sup>。象牙質はコラーゲン線維を主成分とする基質にリン酸カルシウムのハイドロキシアパタイト結晶が沈着したもので、成分から見ると骨と類似している。しかし、象牙質は骨とは似て異なる組織である。一番の違いは、骨はリモデリングが行われるのに対し、象牙芽細胞により造られた象牙質は一度造られるとリモデリングされることはない<sup>7)</sup>。つまり、歯髄内には破骨細胞(破歯細胞)は存在せず、生理的条件下では象牙質は吸収されることはない。破骨細胞と破歯細胞は具備する特異的性質は同一であり、細胞の分化機構に違いはないと考えられている<sup>8)</sup>(以下破骨細胞として統一)。

しかし、病的状態において歯質の吸収が起こることがある。これは吸収部位に基づ

き、内部吸収と外部吸収に大別される。歯の内部吸収は、歯髄組織の炎症変化などに起因する歯髄腔の象牙質壁面から発生する病的吸収である<sup>9)</sup>。内部吸収は、外傷、過度な矯正力、切削による熱刺激、歯科治療に用いられた薬物による化学刺激などが誘因となり起こるとされているが<sup>10)</sup>、外部吸収と比較してその発生頻度は低く、詳細な原因、メカニズムは不明である<sup>11)</sup>。この時におこる吸収は、破骨細胞が中心的役割を担うとされている<sup>12)</sup>。以上の所見は、炎症や外傷により歯髄内に破骨細胞形成が誘導されるメカニズムが存在する一方で、正常な歯髄内には破骨細胞の形成を抑制するメカニズムが存在することを示唆している。

以前 Zheng らは、歯髄では OPG の発現が高く、その結果、破骨細胞形成が抑制されることを報告した<sup>13)</sup>。そこで本研究は、OPG 欠損マウスの歯髄の組織学的解析を行った。OPG 欠損マウスは、破骨細胞の分化亢進により、骨吸収が上昇し、骨粗鬆症を呈する<sup>14)</sup>。OPG 欠損において象牙質形成に問題がないかを確認するため、象牙芽細胞の観察も行った。

## 実験材料及び方法

### 1. 動物

C57BL/6 マウスは、日本 SLC 社(静岡)より購入した。OPG 欠損マウスは、CLEA ジャパン社(東京)より購入した。Col1-GFP マウスは慶応義塾大学の松尾光一先生より供与された。Nestin-GFP マウスは、Stony Brook University の Grigori Enikolopov 先生から供与された。動物は松本歯科大学ハイテクセンター内の実験室にて飼育した。飼育に関しては、松本歯科大学動物実験委員会が定める動物実験指針に基づいて行った。

### 2. 試薬および抗体

抗 RANKL 抗体(AF462)、抗 OPG 抗体(AF459)、抗 CD115 /c-Fms 抗体(AF3818)は R&D Systems 社(Minneapolis, MN)より購入した。抗カテプシン K 抗体(ab19027)は abcam 社(Cambridge, British)より購入した。抗 F4/80 抗体(MCA497GA)は BIO-RAD 社(Hercules, CA)より購入した。抗 CD31 抗体/PECAM-1 と抗 CD144 抗体/VE-cadherin(MEC13. 3)は Biolegend 社(San Diego, CA)より購入した。抗 CD45 抗体(30-F11)、抗 Ter119/ly76 抗体は Thermo Fisher Scientific 社(Waltham, MA)より購入した。

### 3. RANKL, OPG, c-Fms および F4/80 免疫染色(パラフィン切片)

野生型マウス、OPG 欠損マウスを 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液にて還流固定を行い、歯を回収した。それぞれの組織は、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液にて 4 °C で 24 時間固定した。その後、10%EDTA 溶液を用いて脱灰した(4 °C, 2 週間)。それぞれの脱灰組織は、上昇エタノール系列での脱水後、パラフィン包埋し、ミクローム(SM2000R, LEICA, Germany)にて 4 μm の厚さで薄切した。さらに抗 RANKL 抗体、抗 OPG 抗体、抗 c-Fms 抗体にて、それぞれ 4 °C で 12 時間処理後、ヒストファイン Max-Po(rat, rabbit, goat)kit(ニチレイバイオサイエンス株式会社、東京)、ImmPACT DAB Substrate(VECTOR Laboratories 社, Burlingame, CA)を用いた DAB 染色を行った。

### 4. CD45 および Ter119 免疫染色(凍結切片)

抗 CD31 抗体と抗 VE-Cad 抗体を静脈注射した野生型マウスを 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液にて還流固定を行い、歯を回収した。組織は、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液にて 4 °C で 24 時間固定した。その後、10%~30%のスクロースに段階的に浸し、スクロース置換を行った。凍結包埋剤(SCEM, SECTION-LAB 株式会社, 広島)に組織を浸し、液体窒素にて凍結を行い

包埋した。包埋した組織は、川本法に従い、Cryofilm Type II C(SECTION-LAB 株式会社)を用いて、凍結ミクローム(CM3050S, LEICA)にて、10  $\mu$ m の厚さに薄切した。凍結切片は 5%酢酸含有エタノールにより、-20  $^{\circ}$ C で 15 分固定した。その後、抗 CD45 抗体、抗 Ter119 抗体で 4  $^{\circ}$ C で 12 時間処理後、Propidium Iodide(PI)にて核を染色しスライドガラスに封入した。

## 5. TRAP(Tartrate-Resistant Acid Phosphatase)染色

野生型マウス、OPG 欠損マウスを 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液にて還流固定を行い、歯を回収した。それぞれの組織は、4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝液にて 4  $^{\circ}$ C で 24 時間固定した。その後、10%EDTA 溶液を用いて脱灰した(4 $^{\circ}$ C, 2 週間)。それぞれの脱灰組織は、上昇エタノール系列での脱水後、パラフィン包埋し、ミクローム(SM2000R, LEICA)にて 4  $\mu$ m の厚さで薄切した。TRAP 染色液にて 37  $^{\circ}$ C で 20 分インキュベートを行い、ヘマトキシリンにて対比染色を行った。

## 6. Real Time PCR 解析

野生型マウスより大腿骨および歯は 0.5 ml の TRIzol の中でホモジェナイザーを用いて粉碎した。粉碎した組織に TRIzol を 0.5 ml 加え、5 分後にクロロホルムを 0.2 ml 加えて、12000 g, 4  $^{\circ}$ C で 10 分間遠心した。上清から RNA を 0.6 ml 回収した。そこに、0.6 ml の 70% ethanol を加え、カラムに 0.7 ml 移し、11500 rpm, 4  $^{\circ}$ C で 1 分遠心した。その後、さらに RNA を 0.7 ml 加え同じ条件で遠心した。そして、Wash Buffer I を 0.35 ml カラムに加え、同じ条件で遠心した。その後、DNase 10 ml に DNAase Buffer 10 ml を加えて作製した DNAase をカラムに加え、15 分経過の後、0.35 ml の Wash Buffer I を加えて、1500 rpm, 4  $^{\circ}$ C で 30 秒遠心し、その後、100% ethanol を加えた Wash Buffer II を 0.5 ml 加えて先程と同じ条件で遠心を行った後、さらに 11500 rpm, 4  $^{\circ}$ C で 1 分遠心した。non-stick RNase-Free 1.5 ml Microfuge Tubes に入れ替え、そこに RNA free water 12  $\mu$ l を加え、上記と同様の条件で遠心分離することで、カラム下に RNA が抽出された。

抽出された RNA から CellAmp<sup>TM</sup> Whole Transcriptome Amplification Kit (Real Time) Ver. 2 (タカラバイオ株式会社、滋賀)を用いて、mRNA の逆転写および cDNA の増幅を行った。各分子の mRNA の発現量は、One Step SYBR Prime Script PLUS RT-PCR キット(タカラバイオ株式会社)および Applied Biosystems StepOnePlus<sup>TM</sup>(Applied Biosystems, City of Foster City, CA)を用いて、測定した。各種プライマーは以下の通りである。

マウス RANKL, 5'-CATGTGCCACTGAGAACCTTGAA-3' (forward);

5'-CAGGTCCCAGCGCAATGTAAC-3' (revers)

マウス OPG, 5'-CATGAGGTTTCCTGCACAGCTTC-3' (forward);

5'-ACAGCCCAGTGACCATTCTAGTTA-3' (revers)

マウス M-CSF, 5'-GAACAGCCTGTCCCATCCATC-3' (forward);

5'-TGAGGCCAGCTCAGTGCAA-3' (revers)

マウス GAPDH, 5'-TGTGTCCGTCGTGGATCTGA-3' (forward);

5'-TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG-3' (revers)

マウス Col1, 5'-TCAGTGCAATTGTGTTGCTGAAAG-3' (forward);

5'-GATACCAAACCTGGGCGTGCTG-3' (revers)

#### 7. 窩洞形成モデル

野性型マウス, OPG 欠損マウスに腹腔麻酔を施し, 手術台に固定し, 上顎第一臼歯にスチールバーにて窩洞形成を行い, コンポジットレジンにて仮封した. そして, 2 週間後に回収した. その後, パラフィン切片を作製し, TRAP 染色を行った.

## 結果

### 1. 歯髄組織における破骨細胞分化調節因子の発現解析

M-CSFとRANKLは、破骨細胞分化に必須の因子である。一方、OPGは、破骨細胞の分化を負に制御する。以上の破骨細胞分化調節因子の発現を、骨と歯と比較した。まず、GAPDHを内部標準に用いて解析を行った。その結果、歯におけるM-CSFの発現量は、骨よりも高い傾向が示された(図1a)。また、骨と比較して、歯のRANKL発現は低い傾向があり、OPGの発現量は有意な高値を示した(図1a)。以上の値より、RANKL/OPG比を算出した。その結果、骨のRANKL/OPG比が歯よりも高い傾向を示した(図1a)。

タイプIコラーゲン(Col1)は、骨芽細胞および象牙芽細胞のマーカータンパク質である<sup>6), 15)</sup>。そこで、Col1を内部標準として、骨および歯におけるM-CSF, RANKL, OPGの発現量を解析した。その結果、骨と比較して、歯のRANKL発現は低い傾向が、そしてOPGの発現量は高い傾向が示された(図1b)。一方、RANKL/OPG比は、歯の値が骨よりも有意に低いことが示された(図1b)。また、M-CSFの発現量は、骨と歯で同等であった(図1b)。以上のデータより、歯は骨と比較して、OPG発現がRANKL発現に対して優位であることが示された。すなわち、歯髄組織は、骨髓と比較して破骨細胞の分化を負に制御された環境であることが示唆された。

次に、マウスの歯髄組織におけるRANKL, OPGの発現を免疫染色により調べた。その結果、RANKLの発現は、象牙芽細胞に認められた(図1c)。この時、コントロール抗体では、陽性反応は認められなかった(図1c)。一方、OPGの発現は、歯髄細胞に認められた(図1d)。OPG欠損マウスの第一大臼歯では、OPG陽性細胞は認められなかった(図1d)。以上より、歯髄組織でRANKLおよびOPGがタンパク質レベルで発現することが示された。

### 2. 野生型マウスにおける歯髄組織の破骨細胞の観察

野生型マウスの歯髄組織における破骨細胞の存在を調べた。その結果、野生型マウスの歯槽骨にはTRAP陽性の破骨細胞が認められた(図2a)。さらに、破骨細胞のマーカーであるCathepsin Kに対する抗体で染色した。その結果、歯槽骨にCathepsin K陽性の破骨細胞が認められた(図2c)。一方、歯髄組織にはTRAPおよびCathepsin K陽性の破骨細胞が認められなかった(図2 a and b)。以上より、野生型マウスの正常歯髄組織には、破骨細胞が存在しないことが示された。

### 3. OPG欠損マウスにおける歯髄組織の破骨細胞の観察

以前、歯髄組織ではOPGの発現が高く、そのために破骨細胞形成が抑制されることが報告された<sup>13)</sup>。そこで次に、OPG欠損マウスの歯髄組織における破骨細胞の有

無を調べた。OPG 欠損マウスの歯槽骨には、野生型マウスよりも多くの TRAP および Cathepsin K 陽性の破骨細胞が認められた(図 2 b and d)。しかし、OPG 欠損マウスの歯髄組織には野生型マウスと同様に、TRAP および Cathepsin K 陽性の破骨細胞が認められなかった(図 2b and d)。以上の結果より、正常な歯髄組織における OPG の発現は、破骨細胞分化の抑制には関与しないことが示された。

#### 4. OPG 欠損マウスにおける象牙芽細胞の観察

次に OPG 欠損マウスの象牙芽細胞の観察を行った。タイプ I コラーゲン(Col1)および Nestin は、象牙芽細胞のマーカータンパク質として知られている<sup>6)</sup>。Col1 または Nestin のプロモーターの下流で Green Fluorescent Protein (GFP)を発現するマウスと OPG 欠損マウスを交配させ、野生型/Col1-GFP と OPG 欠損/Col1-GFP および野生型/Nestin-GFP と OPG 欠損/Nestin-GFP マウスを作製し、共焦点顕微鏡による解析を行った。野生型/Col1-GFP における歯髄組織において、Col1 陽性の象牙芽細胞が観察された(図 3 a 矢印)。また、OPG 欠損/Col1-GFP の歯髄組織にも Col1-GFP 陽性の象牙芽細胞が認められ、その局在および形態は、野生型/Col1-GFP と同様であった(図 3 c)。野生型/Nestin-GFP の歯髄組織では、象牙芽細胞に近接した subodontoblastic layer に Nestin-GFP の主な発現が認められた(図 3 b 矢頭)。一方、象牙芽細胞には Nestin-GFP の発現は認められなかった(図 3 b 矢印)。また、OPG 欠損/Nestin-GFP の歯髄組織にも、subodontoblastic layer Nestin-GFP 陽性細胞が認められ、その局在および形態は、野生型/Nestin-GFP と同様であった(図 3 d 矢頭)。以上より、OPG の欠損による象牙芽細胞への影響は無いことが明らかになった。

#### 5. 歯髄組織における血球系細胞の解析

破骨細胞の前駆細胞は血球系の細胞である<sup>16)</sup>。次に、歯髄組織における血球系細胞の観察を行った。歯槽骨には破骨細胞が存在する(図 2)。この所見に対応し、歯槽骨では血管内および血管外に、多くの血球系細胞が認められた(図 4 a)。一方、歯髄では、血管内に血球系細胞が局在し、血管外には殆ど認められなかった(図 4 b and c)。以上の所見より、歯髄組織では血球系細胞が血管外に遊走する頻度が低いため、破骨細胞形成が誘導されないことが示唆された。

#### 6. 歯髄組織における破骨細胞前駆細胞の解析

破骨細胞前駆細胞は M-CSF の受容体である c-Fms を発現する<sup>18)</sup>。次に歯髄組織中における c-Fms 陽性の破骨細胞前駆細胞を観察した。その結果、血管の内部に c-Fms 陽性細胞が認められた(図 5 a)。以上より、歯髄組織における c-Fms 陽性の破骨細胞前駆細胞は、主に血管内にとどまることが示唆された。次に、OPG 欠損マウス



の歯髄組織における c-Fms 陽性細胞を解析した。その結果、OPG 欠損マウスの歯髄組織にも c-Fms 陽性細胞は、ほとんど認められなかった(図 5 b)。以上の所見より、歯髄組織では破骨細胞前駆細胞が歯髄内にほとんど存在しないため、破骨細胞形成が誘導されないことが示唆された。

F4/80 陽性のマクロファージおよび樹状細胞が歯髄組織に局在することが報告されている<sup>3)</sup>。そこで、歯髄組織における F4/80 陽性細胞を免疫染色により観察した。野生型マウスにおいて、F4/80 陽性細胞は、歯髄組織の全体に局在が認められた(図 5 c)。一方、OPG 欠損マウスにも、F4/80 陽性細胞は歯髄組織全体に認められ、その局在および形態は、野生型と同等であった。

#### 7. 歯の切削による外部刺激下における歯髄破骨細胞の観察

外傷により歯髄組織に破骨細胞が誘導され、内部吸収を引き起こす所見が報告されている<sup>19)</sup>。そこで、外部刺激下における歯髄の破骨細胞の観察を行った。外部刺激後 2 週での野生型マウスの歯髄組織には破骨細胞は認められなかった。一方、OPG 欠損マウスの歯髄組織にも外部刺激による破骨細胞形成は認められなかった。

## 考察

### 1. 歯髄における破骨細胞分化調節因子の発現解析

乳歯の生理的歯根吸収において、破骨細胞に隣接したセメント芽細胞様あるいは線維芽細胞様の間質細胞に RANKL が発現し、破骨細胞形成に寄与することが報告されている<sup>20)</sup>。また、内部吸収時の吸収窩において、RANKL が発現していることが報告されている<sup>13)</sup>。以上のことから、歯質吸収に関わる破骨細胞においても、RANKL が重要な役割を果たしていることが推測される。以前 Zheng らは、歯髄では RANKL の発現が低く、OPG の発現が高いことを示し、これが歯髄に破骨細胞が存在しない理由であると結論付けた<sup>13)</sup>。彼らと同様に、本研究では Real-time PCR を用いて、骨と歯の RANKL と OPG の値を比較した。その結果、歯は骨と比較して RANKL 発現が低い傾向を示した。また、GADPH を内部標準に用いた場合、歯における OPG の発現は、骨よりも有意に高いことが明らかになった。Col1 を内部標準に用いて、RANKL/OPG 比を算出した結果、歯は骨よりも有意に低値を示した。従って、RANKL および OPG の発現量から考えると、歯は骨と比較して、破骨細胞形成が負に制御された組織であることが示唆され、以上は Zheng らの報告と一致した。

さらに、歯髄における RANKL と OPG の発現を、免疫染色により確認した。その結果、RANKL は象牙芽細胞に、OPG は歯髄細胞に発現が認められた。一方、破骨細胞分化に必須な分子である、M-CSF の発現は、骨と歯で同程度であることが、Real-time PCR による解析から明らかになった。M-CSF の発現は歯髄全体もしくは象牙芽細胞に発現していると考えられるが、歯髄において M-CSF を発現する細胞種については、今後、免疫染色により明らかにすることが必要である。以上の結果から、破骨細胞の分化に必須な M-CSF および RANKL、そして破骨細胞分化抑制因子である OPG は、歯髄に発現することが示された。

### 2. OPG 欠損における象牙芽細胞の観察

野生型、および OPG 欠損マウスにおける象牙芽細胞を、Col1-GFP マウスを用いて観察した。野生型マウスでは、象牙芽細胞が Col1 陽性細胞として認められた。また、野生型と OPG 欠損マウスにおける Col1-GFP 陽性の象牙芽細胞の、形態および分布に違いは認められなかった。以上の所見より、歯髄組織の OPG は、象牙芽細胞の維持には関与しないことが示唆された。

さらに、Nestin-GFP マウスを用いて野生型、および OPG 欠損マウスにおける象牙芽細胞を観察した。野生型マウスの歯髄組織において、Nestin-GFP の発現は、象牙芽細胞ではなく、subodontoblastic layer に認められた。Nakatomi らも、Nestin-GFP マウスの歯髄組織を観察し、今回の結果と同様の結果を報告している<sup>21)</sup>。また、野生型と OPG 欠損を比較した結果、Nestin 陽性の subodontoblastic layer の

形態・分布に違いは認められなかった。以上の所見より、歯髄組織の OPG は、subodontoblastic layer の維持には関与しないことが示唆された。

### 3. 歯に対する外部刺激後の破骨細胞出現の観察

歯に外部刺激を加えることにより、歯髄内に破骨細胞が出現することが報告されている<sup>19)</sup>。今回の研究において、同様に外部刺激による破骨細胞の出現を確認した。しかし、外部刺激後においても、歯髄に破骨細胞の出現は認められなかった。

次に、正常な歯髄における破骨細胞前駆細胞の分布を調べた。その結果、殆どの CD45/Ter119 陽性の血球系細胞が、歯髄血管の内部に認められた。破骨細胞前駆細胞のマーカーである c-Fms が陽性の細胞も、その多くが歯髄血管内部に局在が認められた。以上の所見は、正常な歯髄組織では、破骨細胞前駆細胞が血管内部に留まり、血管外に遊走されず、その結果、破骨細胞に分化しないことを示唆する。従って、歯に対する外部刺激により、破骨細胞前駆細胞が血管の外に遊走すれば、破骨細胞が出現する可能性が考えられる。今回、歯に対する外部刺激を加えても歯髄内に破骨細胞が出現しなかった理由として、刺激が弱く、血管外に破骨細胞前駆細胞が遊走しなかったことが考えられる。今後、歯の外部刺激後の歯髄組織における、破骨細胞前駆細胞の分布を免疫染色により解析することが必要である。

歯の内部吸収の発生頻度は、約 0.01%~0.07%と報告されており、外傷の既往歴が認められることが多いとされている<sup>22)</sup>。そして、歯種別には上顎前歯に多いと報告されている<sup>22)</sup>。また、一般的に歯牙破折や脱臼などの外傷の好発部位は、上顎前歯部であることが知られている。このことは、前述の内部吸収の特徴である、外傷の既往があり、その好発部位が上顎前歯部であるという所見と一致していることから、内部吸収の発生と外傷は強く関連していることが示唆されている。今回、窩洞形成による外部刺激を加えたが、破骨細胞は出現しなかった。このことから破骨細胞および破骨細胞前駆細胞が歯髄内に遊走するメカニズムの可能性として、外傷による歯髄内の血流障害、また根先からの進入により、歯髄の外部から遊走されることも考えられた。

### 4. 歯髄における破骨細胞分化抑制機構

以前 Zheng らは、歯髄では RANKL の発現が低く、OPG の発現が高いことを示し、これが歯髄に破骨細胞が存在しない理由であると結論付けた<sup>13)</sup>。また、今回の解析結果も、歯は骨と比較して、OPG の発現が高いことを示した。そこで本研究では、OPG 欠損マウスを用いて、歯髄における破骨細胞の存在を確認した。その結果、OPG 欠損マウスの歯髄にも破骨細胞は、存在しなかった。さらに、OPG 欠損マウスの歯に外部刺激を加え、破骨細胞の出現を確認したが、この条件下でも、歯髄に破骨細胞は認められなかった。以上の所見は、歯髄組織では、OPG 以外の破骨細胞抑制機構が機能していることを示唆する。

Trope らは、内部吸収は象牙芽細胞層と象牙前質の消失または変質したときに発生

することを示した<sup>23)</sup>。外傷と切削刺激により象牙前質が消失し、歯髄の炎症で歯髄表層の硬組織に破骨細胞が付着する状態になれば内部吸収が開始すると結論している。以上の所見が、外部吸収と比較して内部吸収の発生頻度が低い理由かもしれない。

今回、免疫染色により象牙芽細胞に RANKL が発現することを明らかにした。しかし、歯における mRNA レベルでの RANKL の発現量は、骨組織よりも低い傾向を示した。以上より、RANKL の発現が少ないことが、歯髄での破骨細胞形成を抑制する 1 つの要因である可能性も考えられる。

また、免疫染色の結果、殆どの c-Fms 陽性の破骨細胞前駆細胞は歯髄の血管外に存在することが明らかになった。従って、破骨細胞前駆細胞が歯髄中に存在しない事が示唆された。以上のことも、OPG 欠損マウスの歯髄組織に、破骨細胞が出現しない理由であることが示唆される。

一方、破骨細胞はマクロファージ系細胞から分化する<sup>1)</sup>。マクロファージマーカーである F4/80 が陽性のマクロファージが歯髄に存在することが報告されている。そこで、歯髄組織における F4/80 陽性細胞の分布を、免疫染色により調べた。その結果、正常な歯髄には、F4/80 陽性細胞が広範に分布しており、その局在は血管外にも認められた。以上より、歯髄組織の F4/80 陽性細胞は、in vivo における破骨細胞前駆細胞ではないことが示唆された。

以上のように歯髄は破骨細胞分化がおこりにくい環境であり、生理的・構造的バリアーが存在していることを示唆している。近藤らは、内部吸収の発生に先立って、歯髄組織が潜在的に有する歯質吸収の抑制機構が解除される必要があるとしている<sup>24)</sup>。今回の研究結果からも、炎症や外傷などの様々な刺激によって、生理的・構造的バリアーが消失・変質することで破骨細胞分化がおこりやすい環境に変化することが示唆された。その全容を明らかにするには、歯髄組織に特異的に発現する破骨細胞分化抑制因子の存在も視野に入れた、さらなる研究が必要である。

## 結論

OPG 欠損マウスの歯髄に破骨細胞は存在しなかったことから，正常な歯髄において，破骨細胞形成抑制に OPG は関与しない事を示す．一方，歯髄組織において血球系細胞は血管外には存在しなかった．この所見から，正常な歯髄組織では，破骨細胞前駆細胞が硬組織に遊走・分化しないため，破骨細胞が存在しない可能性が示された．しかし，切削による外部刺激後も，野生型，OPG 欠損共に歯髄に破骨細胞は認められなかった．以上より，外部刺激時における歯髄組織には，OPG 以外による破骨細胞分化の抑制機構が存在すること示唆された．

## 謝辞

本研究に際し、終始御懇意なる御指導、御校閲を賜りました松本歯科大学大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座 宇田川信之教授、松本歯科大学大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座 高橋直之教授、東京歯科大学口腔科学研究センター 溝口利英講師に謹んで謝意を申し上げます。また本研究に多大なる御指導、御助言を賜りました松本歯科大学歯科矯正学講座 荒井敦講師、硬組織疾患制御再建学講座 中道裕子講師に厚く感謝申し上げます。

同じグループの大学院生の楊さん、趙さんとは共同で研究を進め、多くの刺激と示唆を得ることができ、精神的にも支えられました。感謝の意を表します。本研究の遂行および論文の作成にあたり、御助言、御協力頂きました松本歯科大学総合歯科医学研究所、松本歯科大学口腔生化学講座、松本歯科大学口腔解剖学講座の各先生および大学院生、ならびに本研究に携わってくださった全ての皆様に御礼申し上げます。

最後にこの研究を絶えず支え励ましてくれた両親(父正明、母明子)、弟(洋平)に心から感謝いたします。

## 参考論文

1. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT and Martin TJ (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20:345-57.
2. Yasuda H, Shima N, Nakagawa N, Yamaguchi K, Kinosaki M, Mochizuki S, Tomoyasu A, Yano K, Goto M, Murakami A, Tsuda E, Morinaga T, Higashio K, Udagawa N, Takahashi N and Suda T. (1998) Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 3597-602.
3. Zhang J, Kawashima N, Suda H, Nakano Y, Takano Y and Azuma M. (2006) The existence of CD11c+ sentinel and F4/80+ interstitial dendritic cells in dental pulp and their dynamics and functional properties. *Int Immunol* 18:1375-84.
4. Iwasaki Y, Otsuka H, Yanagisawa N, Hisamitsu H, Manabe A, Nonaka N and Nakamura M (2011) In situ proliferation and differentiation of macrophages in dental pulp. *Cell Tissue Res* 346:99-109 .
5. Austyn JM and Gordon S. (1981) F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage. *Eur J Immunol* 11:805-15.
6. Uribe F, Kalajzic Z, Bibko J, Nanda R, Olson C, Rowe D and Wadhwa S. (2011) Early effects of orthodontic forces on osteoblast differentiation in a novel mouse organ culture model. *Angle Orthod* 81:284-91.
7. 須田立雄, 小澤英浩, 高橋榮明, 田中栄, 中村浩彰, 森諭史 (2007) 新骨の科学, 1-327, 医師薬出版, 東京.
8. Ten Cate AR and Anderson RD (1986): An ultrastructural study of tooth resorption in the kitten. *J Dent Res* 65: 1087-93.

9. 須田英明, 戸田忠夫 (2004) エンドドンティクス 21, 301-11, 永末書店, 京都.
10. Tronstad L (1999) Root resorption-etiology, terminology and clinical manifestations. *Endod Dent Traumatol* 4:241-252.
11. 北村和夫, 勝海一郎 (2010) 内部吸収穿孔歯における非外科的歯内療法の一症例. *日歯内療誌* 31:103-7.
12. 五十嵐勝, 北島佳代子, 田中幹久, 新井恭子, 川崎孝一 (2006) 変色歯の内部吸収に関する臨床的および病理組織学的観察. *日歯内療誌* 27:29-36.
13. Zheng Y, Chen M, He L, Marão HF, Sun DM, Zhou J, Kim SG, Song S, Wang SL and Mao JJ (2015) Mesenchymal dental pulp cells attenuate dentin resorption in homeostasis. *J Dent Res* 94:821-7.
14. Nakamura M, Udagawa N, Matsuura S, Mogi M, Nakamura H, Horiuchi H, Saito N, Hiraoka BY, Kobayashi Y, Takaoka K, Ozawa H, Miyazawa H and Takahashi N (2003) Osteoprotegerin regulates bone formation through a coupling mechanism with bone resorption. *Endocrinology* 144:5441-9.
15. Dacic S, Kalajzic I, Visnjic D, Lichtler AC and Rowe DW (2001) Col1a1-driven transgenic markers of osteoblast lineage progression. *J Bone Miner Res* 16:1228-36.
16. Muto A, Mizoguchi T, Udagawa N, Ito S, Kawahara I, Abiko Y, Arai A, Harada S, Kobayashi Y, Nakamichi Y, Penninger JM, Noguchi T and Takahashi N (2011) Lineage-committed osteoclast precursors circulate in blood and settle down into bone. *J Bone Miner Res* 26:2978-90.
17. Mizoguchi T, Pinho S, Ahmed J, Kunisaki Y, Hanoun M, Mendelson A, Ono N, Kronenberg HM and Frenette PS (2014) Osterix marks distinct waves of primitive and definitive stromal progenitors during bone marrow development. *Dev Cell* 29:340-9.
18. Sherr CJ, Roussel MF and Rettenmier CW (1988) Colony-stimulating factor-1 receptor (c-fms). *J Cell Biochem* 38:179-87.



19. Zhao Y, Yuan X, Liu B, Tulu US and Helms JA (2018) Wnt-Responsive Odontoblasts Secrete New Dentin after Superficial Tooth Injury. J Dent Res 97:1047-54.
20. 大城卓寛, 塩谷あや, 横谷浩爾, 佐藤友紀, 柴崎好伸, 佐々木崇寿 (2002) 歯根吸収における破歯細胞の免疫組織化学的発現. 昭歯誌 22:121-9
21. Nakatomi M, Quispe-Salcedo A, Sakaguchi M, Ida-Yonemochi H, Okano H and Ohshima H (2018) Nestin expression is differently regulated between odontoblasts and the subodontoblastic layer in mice. Histochem Cell Biol 149:383-91.
22. 石川梧朗, 秋吉正豊 (1970) 口腔病理学 I, 305-7, 永末書店, 京都
23. Trope M, Yamauchi S and Sigurdsson A (2002) 歯根吸収 Part1 歯根吸収の一般的原則 Quintessence 21:91-102.
24. 近藤千尋, 北島佳代子, 田中幹久 (1999) 歯の内部吸収, 実験動物モデルの確立と発症機序の解明. Quintessence 18 :1689-98.

## 図の説明

### 図 1 歯髄組織における破骨細胞分化調節因子の発現

(a and b) 歯における破骨細胞分化調節因子(M-CSF, RANKL, OPG)の Real-time PCR 解析. GAPDH を内部標準にして解析(a). Col1 を内部標準として解析(b).  $n = 3$  \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 平均  $\pm$  SD  
(c and d) 歯髄の RANKL(c)と OPG(d)に対する免疫染色  
矢印:陽性細胞. 抗 RANKL 抗体のネガティブコントロールとして, goat IgG を使用した. 抗 OPG 抗体のネガティブコントロールとして, OPG 欠損マウス由来の歯髄組織を用いた. スケールバー, 200  $\mu\text{m}$ .

### 図 2 野生型および OPG 欠損マウスにおける歯髄組織の破骨細胞の観察

(a and b)歯髄組織の TRAP 染色. 野生型(a), OPG<sup>-/-</sup>(b).  
1:alveolar bone, 2:Dental pulp, 矢印:TRAP 陽性細胞, スケールバー, 200  $\mu\text{m}$ .  
(c and b)歯髄組織の Cathepsin K 免疫染色. 野生型(a), OPG<sup>-/-</sup>(b).  
61:alveolar bone, 2:Dental pulp, 矢印:Cathepsin K 陽性細胞, スケールバー, 200  $\mu\text{m}$ .

### 図 3 野生型および OPG 欠損マウスにおける象牙芽細胞の観察

(a and b)Col1-GFP(a)および Nestin-GFP(b)マウスの象牙芽細胞の観察.  
(c and d)Col1-GFP/OPG<sup>-/-</sup>(c), Nestin-GFP/OPG<sup>-/-</sup>(d)マウスの象牙芽細胞の観察.  
矢印:Col1-GFP 陽性(a and c)および Nestin-GFP 陰性の象牙芽細胞. (b and d), 矢頭: Nestin-GFP 陽性の subodontoblastic layer, DP: Dental pulp, スケールバー, 200  $\mu\text{m}$ .

### 図 4 歯槽骨および歯髄組織における血球系細胞の解析

(a and b) 歯槽骨(a)および歯髄(b)における血球系細胞の解析.  
白: CD31/VE-cadherin(VE-Cad)陽性の血管内皮細胞, 緑: CD45/Ter119 陽性の血球系細胞, 赤: Propidium Iodide(PI)陽性の核, スケールバー, 50  $\mu\text{m}$ .  
(c)歯髄における血球系細胞の定量解析  
1 匹の組織から作成した切片 6 枚を用いて解析した. \*\* $P < 0.01$  平均 $\pm$  SD

### 図 5 歯髄組織における c-Fms および F4/80 陽性細胞の解析

(a and b)歯髄の c-Fms 陽性細胞の免疫染色. 野生型(a), OPG<sup>-/-</sup>(b).  
矢印:c-Fms 陽性細胞. スケールバー, 200  $\mu\text{m}$ .

(c and d) 歯髄の F4/80 陽性細胞の免疫染色. 野生型(c), OPG-/- (d).  
矢印:F4/80 陽性細胞. スケールバー, 200  $\mu\text{m}$ .

図 6 歯の切削による外部刺激下における歯髄破骨細胞の観察  
(a and b) 外部刺激後のマウスの歯髄の TRAP 染色. 野生型(a), OPG-/- (b).  
1: 歯槽骨, 2: 歯髄, 矢印: TRAP 陽性細胞, スケールバー, 200  $\mu\text{m}$ .

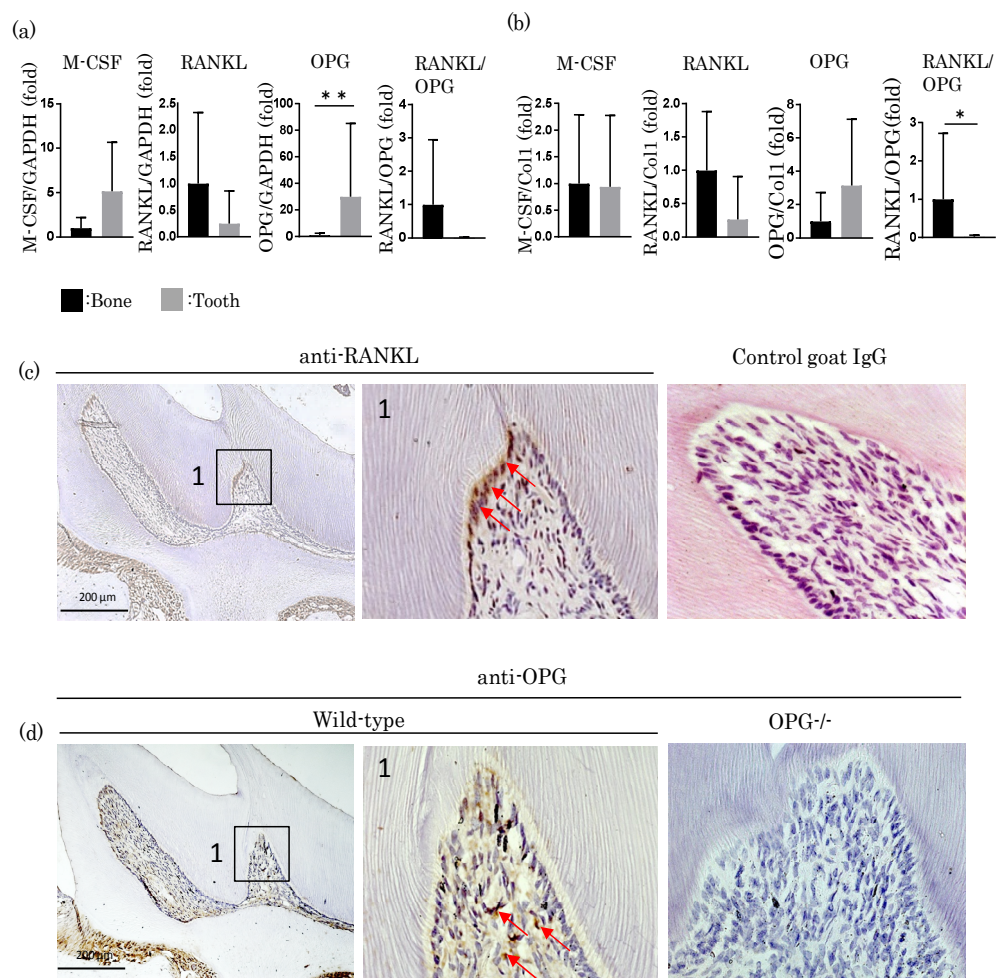


図1 歯髄組織における破骨細胞分化調節因子の発現

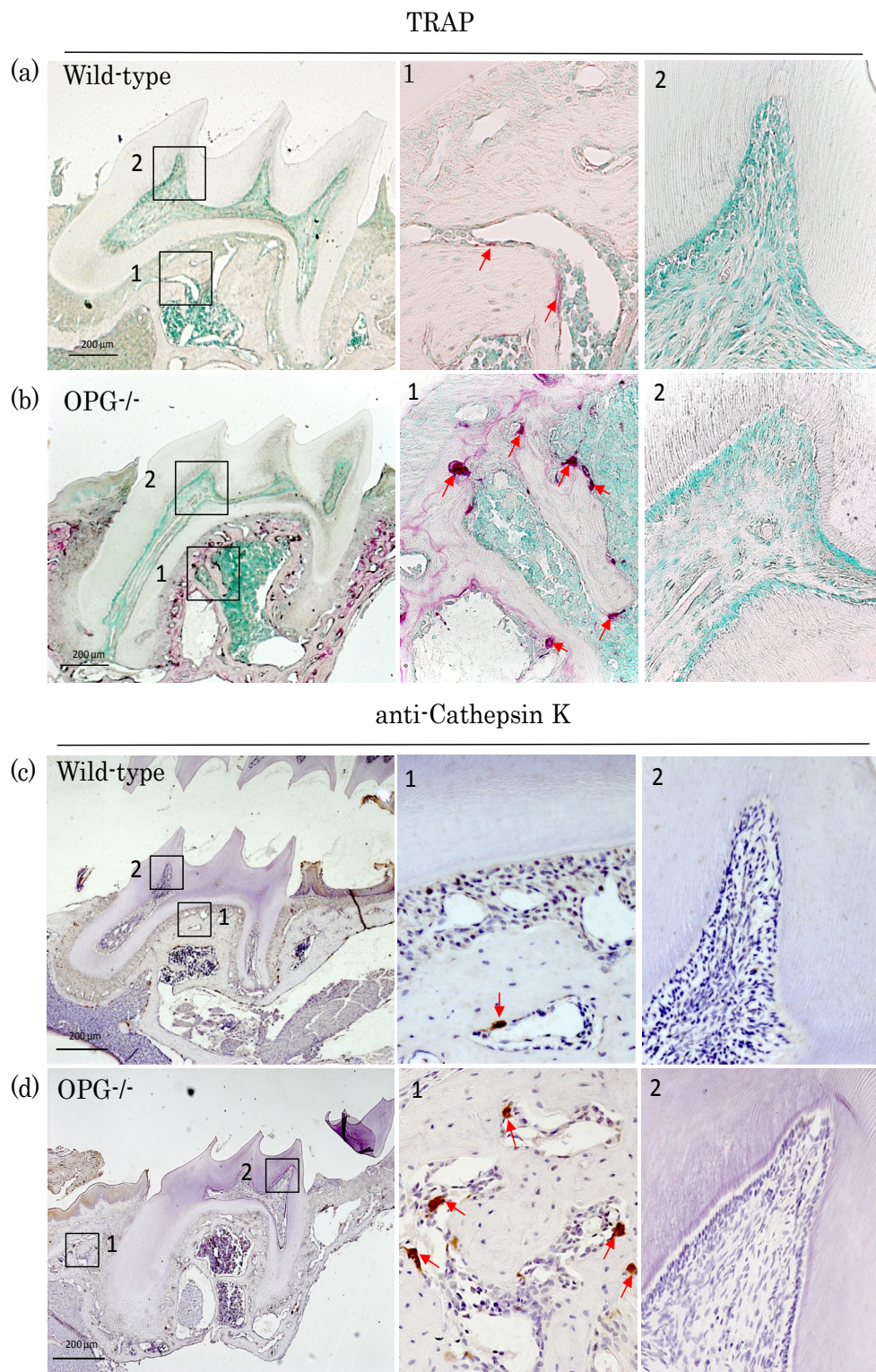


図2 野生型およびOPG欠損マウスにおける歯髄組織の破骨細胞の観察



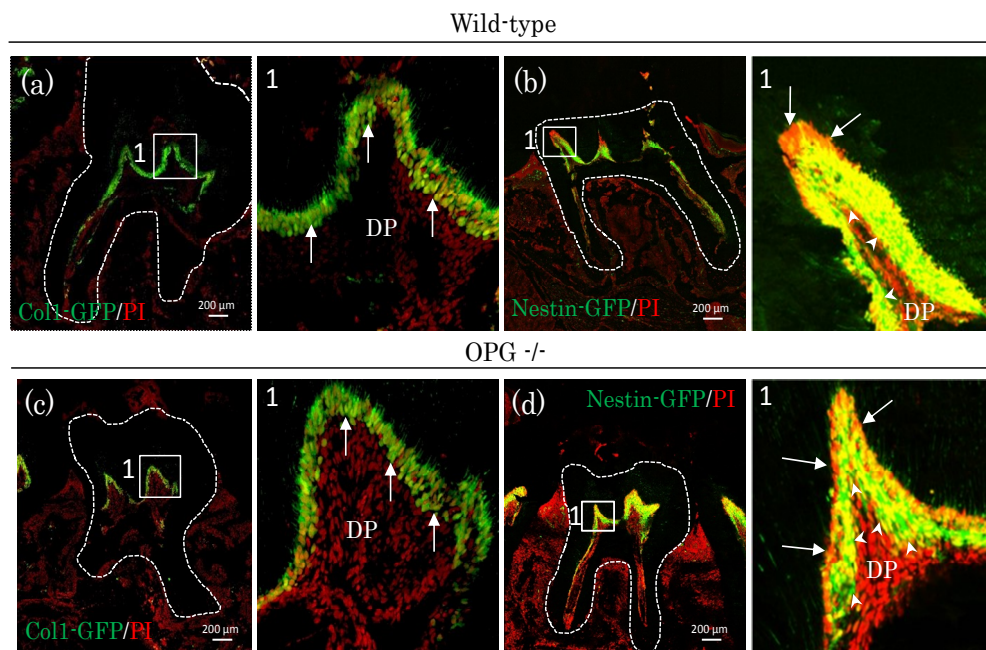


図3 野生型およびOPG欠損マウスにおける象牙芽細胞の観察

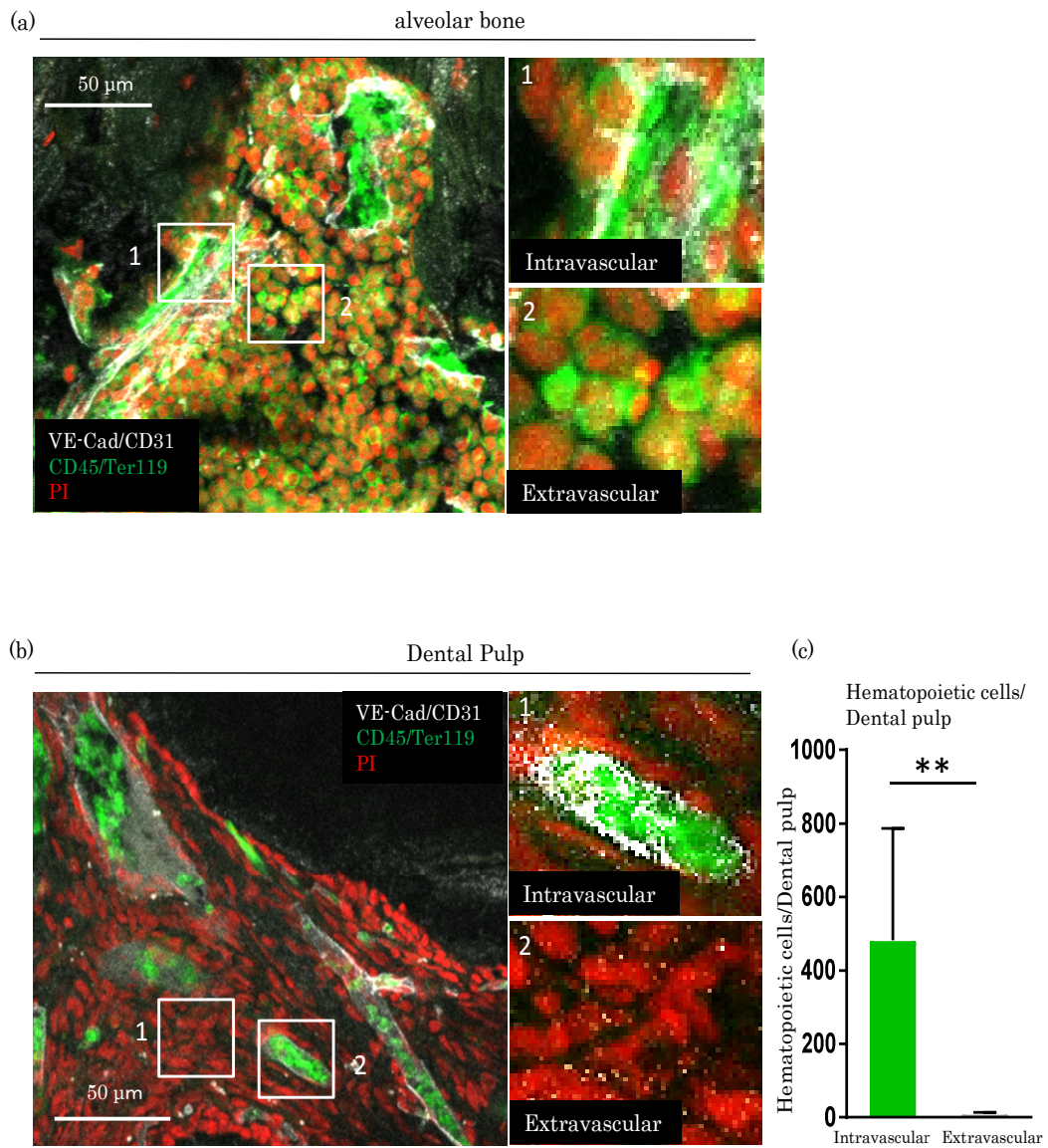


図4 歯槽骨および歯髄組織における血球系細胞の解析

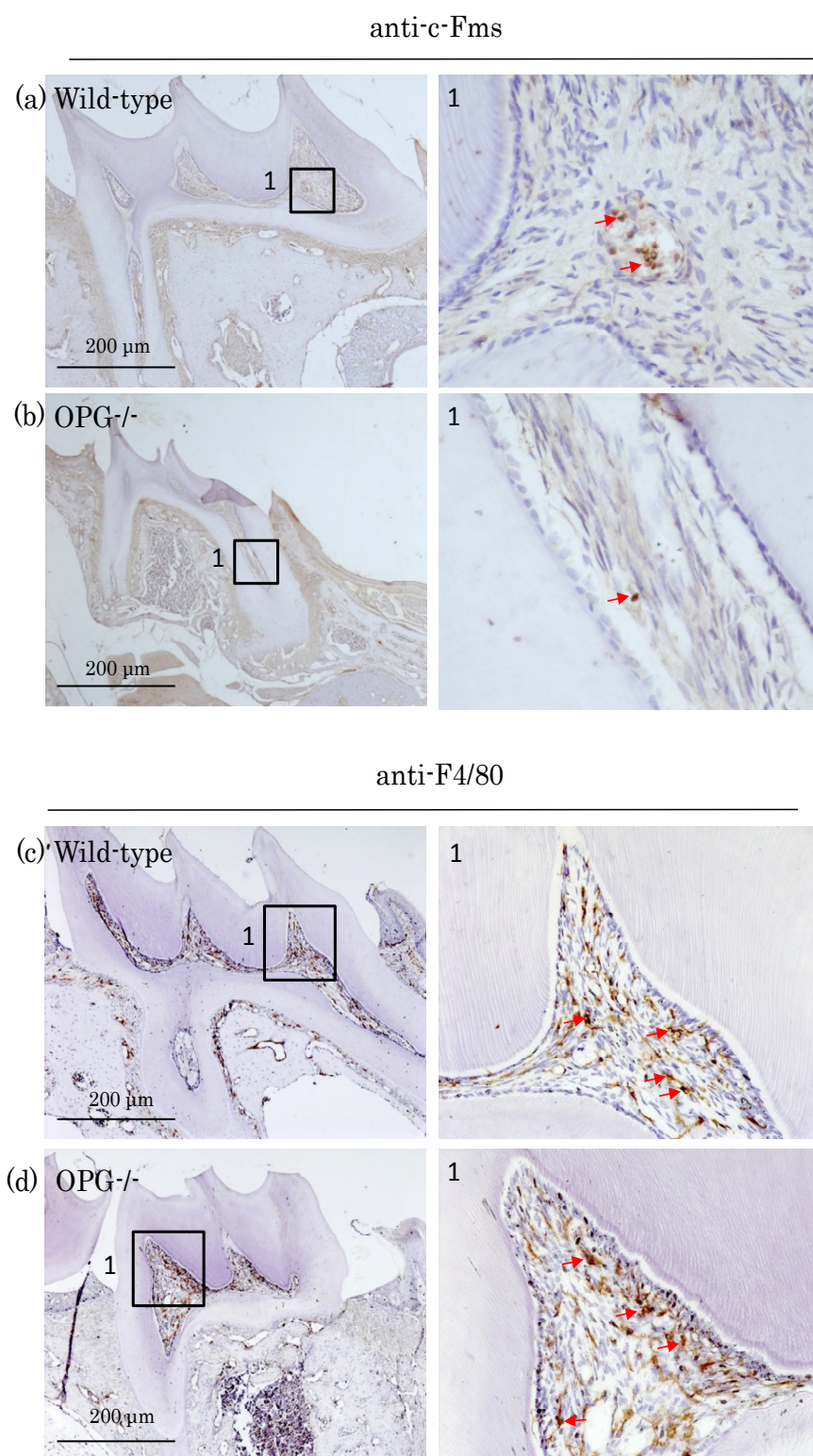


図5 歯髄組織におけるc-FmsおよびF4/80陽性細胞の解析



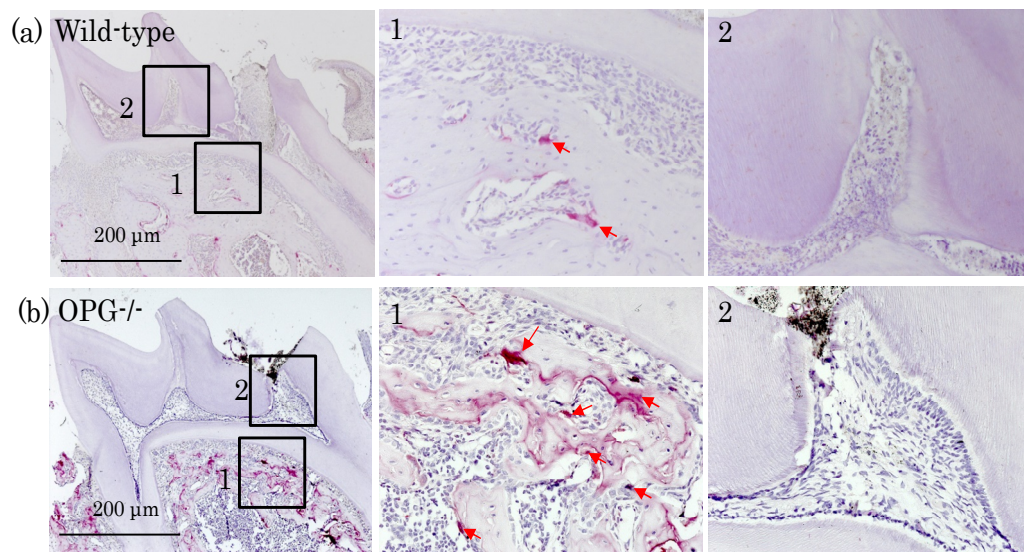


図6 歯の切削による外部刺激下における歯髓破骨細胞の観察

# 歯髄における破歯細胞の分化抑制のメカニズム解析

西田 大輔

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座 硬組織機能解析学  
(主指導教員: 宇田川 信之 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

## Analysis of the inhibitory mechanism of odontoclast/osteoclast formation in dental pulp

Daisuke Nishida

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine  
(Chief Academic Advisor : Professor Nobuyuki Udagawa)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,  
Matsumoto Dental University, for the degree Ph. D. (in Dentistry)

## 要旨

歯髄に破歯細胞(以下、破骨細胞)は存在しない。一方、炎症、外傷、感染などともない、歯髄側の象牙質に破骨細胞が出現し、内部吸収が惹起されることが知られている。以上の所見は、正常な歯髄組織では破骨細胞の形成が抑制されていることを示唆するが、その詳細については良く分かっていない。

破骨細胞はマクロファージ系の前駆細胞から分化する。骨芽細胞は、破骨細胞分化誘導因子である RANKL(receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand)を発現する。一方、骨芽細胞は、RANKL のデコイ受容体である OPG (osteoprotegerin)も発現し、破骨細胞分化を抑制する。以前、歯髄組織では OPG の発現が高く、その結果、破骨細胞形成が抑制されることが報告された。そこで本研究は、歯髄組織における破骨細胞分化抑制に対する OPG の重要性を検討した。

骨と歯における RANKL と OPG の発現を、mRNA レベルで調べた。その結果、歯の RANKL/OPG 比は、骨と比較して有意に低いことが明らかになった。以上の所見は、歯は骨と比較し、破骨細胞分化が負に制御された環境であることを示す。そこで、OPG 欠損マウスの歯髄における破骨細胞を観察した。その結果、OPG 欠損マウスの歯髄でも、破骨細胞は認められなかった。一方、象牙芽細胞についても、野生型と OPG 欠損マウスに違いは認められなかった。次に、破骨細胞前駆細胞である血球系細胞を、歯髄組織で観察した。その結果、血球系細胞の殆どが血管内に局在することが明らかになった。さらに、破骨細胞前駆細胞マーカーである c-Fms 陽性細胞も同様に歯髄の血管内に主な局在が認められ、その細胞数は OPG 欠損マウスでも同等であった。一方、マクロファージマーカーである F4/80 陽性細胞は歯髄組織全体に局在した。その分布は、野生型と OPG 欠損マウスで同等であった。さらに、マウスの臼歯に切削による外部刺激を与えた後の、歯髄における破骨細胞の出現を観察した。その結果、外部刺激を加えても、野生型および OPG 欠損マウスの歯髄に破骨細胞は認められなかった。

以上の所見より、正常な歯髄における、破骨細胞形成抑制に OPG が必要ない事が示唆された。歯髄組織に破骨細胞が存在しない理由として、破骨細胞前駆細胞が血管から歯髄組織に遊走する頻度が低いことが考えられた。一方、外部刺激後も、OPG 欠損マウスの歯髄組織に破骨細胞は出現しなかった。以上より、歯髄組織における OPG 以外による破骨細胞分化の抑制機構の存在も示唆された。