

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：32650

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18711

研究課題名(和文) PTH応答性の歯根膜幹細胞の同定と骨再生誘導への応用

研究課題名(英文) Identification of PTH-responsive periodontal ligament stem cells and application to induction of bone regeneration

研究代表者

川上 真奈 (KAWAKAMI, Mana)

東京歯科大学・歯学部・臨時教員

研究者番号：70550060

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：抜歯窩は、時間の経過とともに硬組織で満たされるが、臨床現場ではより速やかな硬組織の形成が求められる。近年、歯根膜に局在する幹細胞が骨芽細胞に分化して、抜歯窩の治癒に寄与することが報告された。一方、これまで硬組織ではレプチン受容体(LepR)陽性細胞が骨格幹細胞(SSCs)として同定されている。本研究では、LepR陽性細胞をマウス歯根膜組織で同定した。Cre/LoxPシステムを用いた細胞系譜解析により、歯根膜のLepR陽性細胞がセメント細胞および歯槽骨の骨細胞に分化することが示唆された。さらに、抜歯窩の修復骨内における一部の骨細胞もLepR陽性細胞由来であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

学術的意義：本研究により、歯根膜のLepR陽性細胞が正常および骨修復時の硬組織形成細胞に寄与することが分かった。したがって、本研究結果は、歯根膜幹細胞の性状解明に繋がる有意義な内容である。

社会的意義：抜歯後に認められる顎骨の陥凹は、時間の経過とともに自然治癒力で修復され、最終的に硬組織で満たされる。しかし、糖尿病やステロイド投与患者では、免疫力の低下から抜歯後の骨髄炎の発症リスクが上昇するため、より速やかな硬組織の形成が求められる。本研究結果は、抜歯窩の治癒を促進する方法の開発につながる有意義な内容である。

研究成果の概要(英文)：Regenerative hard tissue forms over extraction sockets over time; however, in clinical settings, rapid hard tissue formation is required. Recently, it was reported that stem cells localized in periodontal ligament(PDL) differentiate into osteoblasts and contribute to bone regeneration in the extraction socket. On the other hand, leptin receptor(LepR)+ cells have been identified as skeletal stem cells in bone tissue. In this study, we identified LepR+ cells in the PDL. Cre/LoxP-based strategy revealed that LepR+ PDL cells differentiate into cementoblasts embedded in the cementum and osteocytes in the alveolar bone. In addition, we found that the part of the osteocyte detected in the regenerative bone in the extraction socket was derived from LepR+ cells.

研究分野：口腔外科

キーワード：歯根膜幹細胞 抜歯窩修復 レプチン受容体 Cre/LoxPシステム 細胞系譜解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

抜歯後に生ずる顎骨の陥凹は、時間の経過とともに自然治癒力で修復され、最終的には修復硬組織で満たされる。しかし、糖尿病や長期のステロイド投与患者では、抜歯後の治癒遅延や免疫力の低下が原因となり、骨髄炎を発症するリスクが高まることが知られている。また、顎変形症の患者では、迅速に手術を実施するために、術前準備において施された抜歯窩の速やかな修復が求められる。これまで、歯根膜(PDL)に局在する幹細胞が骨芽細胞に分化して、抜歯窩の治癒に寄与することが報告されているが、その性状および骨芽細胞への分化機構については良くわかっていない。当初、本申請研究は、副甲状腺ホルモン(PTH)受容体を発現する PDL の解析に取り組んだが、一連の研究過程で我々は、PDL にレプチン受容体(LepR)陽性細胞 (LepR<sup>+</sup> PDL)が存在することを見出した。LepR は、骨組織における骨格幹細胞(SSCs)のマーカー蛋白質として報告されている。しかしながら、PDL に局在する LepR<sup>+</sup>細胞が、SSCs と同様に幹細胞能を発揮するかについては未解明である。

### 2. 研究の目的

本研究は、LepR<sup>+</sup> PDL の性状について、遺伝子情報改変マウス Cre/loxP システムを用いた細胞系譜解析を用いて明らかにする。PDL に含まれる細胞画分の理解を深め、抜歯窩の治癒を促進する治療法の開発に繋げる。

### 3. 研究の方法

#### (1) LepR<sup>+</sup> PDL の局在解析

LepR-cre; ROSA26-loxP-stop-loxP-tdTomato(R26-tdTomato)遺伝子改変マウスを作製した。4週齢マウスの上顎第一臼歯の凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡により Tomato 標識された細胞(LepR/Tom<sup>+</sup>細胞)の PDL における局在を定量解析した。抗 CD31 抗体および抗 Endomucin 抗体により血管(血管内皮細胞)を染色し、LepR/Tom 細胞との局在を比較した。

#### (2) 加齢にともなう LepR<sup>+</sup> PDL の硬組織寄与の解析

4週、4カ月、および1年齢の LepR-cre; R26-tdTomato マウスの上顎第一臼歯を回収し、凍結切片を作製した。共焦点レーザー顕微鏡により LepR/Tom<sup>+</sup>細胞における PDL、歯槽骨骨細胞およびセメント細胞への寄与を調べた。

#### (3) 抜歯にともなう LepR<sup>+</sup> PDL の修復硬組織寄与の解析

4週齢の LepR-cre; R26-tdTomato マウスの上顎第一臼歯を抜歯し、2週間後に修復硬組織を回収した。凍結切片を作製し、共焦点レーザー顕微鏡により LepR/Tom<sup>+</sup>細胞の修復骨内の骨細胞への寄与を調べた。

#### (4) in vitro スフェロイド培養系による LepR<sup>+</sup> および LepR<sup>+</sup> PDL の幹細胞能の解析

4週齢の LepR-cre; R26-tdTomato マウスの上顎第一臼歯を抜歯し、PDL をコラゲナーゼにより回収した。セルソーターにより、LepR/Tom<sup>+</sup>細胞と LepR/Tom<sup>-</sup>細胞を回収した。それぞれの細胞画分を非接着環境下で2週間培養し、スフェロイドの形成能を指標に、幹細胞能を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) LepR<sup>+</sup> PDL の局在解析

上顎第一臼歯の 1.根分岐部、2.近心根の根尖部、3.近心根表面の近心側、4.近心根表面の遠心側の PDL に局在する LepR/Tom<sup>+</sup>細胞数を定量した。その結果、根尖部により多くの LepR/Tom<sup>+</sup>細胞が認められ、近心側および遠心側より有意に高い値を示した。また、CD31 および Endomucin 陽性の血管に近接した場所に LepR/Tom<sup>+</sup>細胞は局在していた。

#### (2) 加齢にともなう LepR<sup>+</sup> PDL の硬組織寄与の解析

様々な週齢における LepR-cre; R26-tdTomato マウス上顎第一臼歯の PDL、歯槽骨骨細胞およびセメント細胞を観察した。その結果、LepR/Tom<sup>+</sup>細胞に由来する PDL は週齢を重ねるごとに有意に上昇することが明らかになった。また、4週齢では LepR/Tom 細胞の骨細胞への寄与は殆ど認められず、セメント芽細胞への寄与は全く確認されなかった。一方、LepR/Tom<sup>+</sup>細胞の骨細胞およびセメント細胞への寄与は、加齢にともない上昇することが明らかになった。しかしながら、その寄与率は LepR/Tom<sup>+</sup>細胞に由来する骨細胞およびセメント細胞と比較し、低値を示した。以上より、成長にともない形成される歯槽骨およびセメント質は、LepR/Tom<sup>+</sup>細胞と LepR/Tom<sup>-</sup>細胞の両方の細胞画分が寄与することが示唆された。

(3) 抜歯にともなう LepR<sup>+</sup> PDL の修復硬組織寄与の解析

4 週齢の LepR-cre; R26-tdTomato マウスにおける上顎第一臼歯を抜去し、2 週間後の修復骨に出現する骨細胞を観察した。その結果、LepR/Tom<sup>+</sup>細胞に由来する修復骨骨細胞が確認された。しかしながら、その寄与率は LepR<sup>-</sup>Tom<sup>-</sup>細胞に由来する骨細胞と比較し、低値を示した。以上より、抜歯窩における修復骨の形成には、LepR/Tom<sup>+</sup>細胞と LepR<sup>-</sup>/Tom<sup>-</sup>細胞の両方の細胞画分が寄与することが示唆された。

(4) in vitro スフェロイド培養系による LepR<sup>+</sup> および LepR<sup>-</sup> PDL の幹細胞能の解析

LepR-cre; R26-tdTomato マウスの上顎第一臼歯の PDL から LepR/Tom<sup>+</sup>細胞と LepR<sup>-</sup>/Tom<sup>-</sup>細胞を回収し、スフェロイドの形成能を解析した。その結果、LepR/Tom<sup>+</sup>細胞と LepR<sup>-</sup>/Tom<sup>-</sup>細胞の両者にスフェロイド形成能が認められた。また、LepR<sup>-</sup>/Tom<sup>-</sup>細胞から形成されたスフェロイドには、LepR/Tom<sup>+</sup>細胞が含まれた物が散見された。以上より、(1) LepR/Tom<sup>+</sup>細胞と LepR<sup>-</sup>/Tom<sup>-</sup>細胞の両者が幹細胞能を有すること、(2) LepR<sup>-</sup>/Tom<sup>-</sup>細胞は、LepR/Tom<sup>+</sup>細胞の分化の上流に位置することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Mana Kawakami, Hisataka Yasuda, Daisuke Nishida, Akira Katakura, Toshihide Mizoguchi	4. 巻 63
2. 論文標題 Development of a method for the identification of receptor activator of nuclear factor- B+ populations in vivo	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 45-51
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.job.2021.01.009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------