

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K21048

研究課題名（和文）歯の移動における骨免疫機能を制御する因子の解明

研究課題名（英文）Regulation of osteoimmune system in tooth movement

研究代表者

中村 純基（NAKAMURA, Yoshiki）

日本大学・歯学部・専修医

研究者番号：20962088

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）：本研究は、抜歯窩におけるLRP1陽性細胞の局在とLRP1の機能について検討した。その結果、抜歯後、早期にLRP1陽性細胞が出現し、その後、その細胞は抜歯窩内に骨組織を形成した。また、歯根膜細胞（PDLs）からLRP1遺伝子を欠損させると、PDLsの骨芽細胞分化能は抑制され、OPG発現が低下してRANKL発現は増加した。PDLsはLRP1を介して、OPGを発現してRANKLを抑えることで破骨細胞分化を阻害する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で、歯根膜細胞のLRP1が骨形成と骨吸収を制御する因子であることが示唆された。このLRP1の発現を調節することで、歯の矯正移動において圧迫側の骨吸収を促進させることが可能になると考えられる。また、急激な矯正移動を実施した際でも、LRP1の発現によって牽引側の骨形成を誘導することができるため、効率的に歯を移動することができる。本研究で明らかにしたLRP1の機能は、歯の矯正移動のみならず、骨折治癒など整形外科領域にも応用が可能な知見である。

研究成果の概要（英文）：This study investigated the localization of LRP1-positive cells in tooth socket and the function of LRP1. As a result, LRP1-positive cells appeared early after tooth extraction, and then these cells formed bone tissue in the socket. In addition, periodontal ligament cells (PDLs) with the deletion of LRP1 gene were suppressed the osteoblast differentiation ability, decreased the level of OPG expression, and increased RANKL expression. These findings revealed that PDLs may inhibit osteoclast differentiation by expressing OPG and suppressing RANKL via LRP1.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯根膜細胞 LRP1

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯列矯正は、2年から3年という長い期間を要する治療法である。この長期治療は、患者のストレスの原因になるだけでなく、歯肉退縮や重度の歯根吸収のリスクが高まる可能性が報告されている。これらのリスクは、歯に対する過剰な負荷やジグリングなどにより引き起こされると考えられている。したがって、いかにしてこのようなリスクを回避し、効率的に歯列矯正を実施するかが大きな課題になっている。

歯根周囲を覆う歯根膜細胞 (PDLs) は、歯の支持、刺激の感受、および歯周組織の維持や再生の役割を担っている。さらに、歯列矯正による歯の移動にも PDLs は関わっており、圧迫力が加わった PDLs は、破骨細胞分化を誘導する骨免疫因子である RANKL を発現するのに対し、RANKL のデコイ受容体である osteoprotegerin (OPG) の発現を低下させ、RANKL/OPG 比を増大させることで破骨細胞の形成を誘導する。一方、牽引側では、BMP シグナルによって osterix が発現して骨芽細胞分化が誘導される。この歯の移動を制御するサイトカインは、PDLs よりも PDLSCs で高い発現がみられるため、歯の移動に対する PDLSCs の強い関連性が推測されるが、歯の移動と PDLSCs の関係はいまだ解明されていない。したがって、PDLSCs の役割を明らかにすることで、より効率的な歯科矯正法の開発に繋がることが期待される。

2. 研究の目的

PDLSCs は、骨芽細胞、脂肪細胞、および軟骨細胞などへの多分化能を有する細胞で、様々な刺激によって特定の細胞へ分化が誘導される。近年、低密度リポタンパク受容体ファミリーに属する膜タンパクの low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) を欠失した骨芽細胞では、RANKL 産生が増加し、破骨細胞分化が促進することが示された。この LRP1 は、transforming growth factor- や platelet-derived growth factor などの多くのリガンドと結合することで、受容体依存型エンドサイトーシスにおいて機能し、細胞遊走、細胞内タンパク輸送、細胞分化などを調節している。また、前駆破骨細胞にみられる LRP1 の発現抑制は、破骨細胞分化を阻害することから、LRP1 は骨代謝および骨再生を調節する重要な因子の一つであると考えられている。しかし、抜歯窩の骨再生に関与する PDLSCs に発現している LRP1 の役割については不明な点が多い。そこで、本研究では、抜歯窩での LRP1 陽性細胞の動態を調べるとともに、歯の移動に関わる骨免疫因子を PDLSCs の LRP1 が制御することについても検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス臼歯の抜歯と組織切片作成

三種混合麻酔薬の腹腔内投与によって、マウスを麻酔し、上顎第一臼歯を鉗子によって抜歯した。抜歯後、1、3、5、7、および10日目に上顎骨を摘出し、4% paraformaldehydeで4、16時間固定した。採取した上顎骨は10% EDTA溶液に4週間浸漬して脱灰後、パラフィン包埋し、厚さ約4 μmの切片を作成した。

(2) 磁気細胞分離 (MACS) による PDLSCs の単離

本実験では、leptin receptor (Lepr) 陽性細胞を PDLSCs として使用した。

マウス臼歯から酵素処理によって、PDLsを採取した。PDLsにウサギ抗ヒトLepr抗体を加えてインキュベートした。PBSで洗浄した後、ヤギ抗ウサギIgGマイクロビーズを加えて、磁気ビーズで細胞を標識した。PBSで洗浄後、細胞浮遊液は分離カラムへアブライし、PDLsに含まれるLepr陽性細胞をカラムに吸着させた。その後、分離カラムを磁石から取り外し、吸着したLepr陽性細胞

をシリンジで押し出して回収した。回収されたLepr陽性細胞と陰性細胞からRNAを抽出し、cDNAを合成後、LRP1とLeprの発現について調べた。

(3) siRNAを使用したLRP1発現の抑制

PDLsを6-well plateに播種した後、Lipofectamine RNAiMAX transfection reagentと10 nMのLRP1 siRNAを添加し、3日間培養した。LRP1 siRNA 1~4を導入したPDLsをそれぞれsiPDL1~4とし、negative control siRNAをcPDLとした。

(4) コンディショナルノックアウト (cKO) マウスの作製

Jackson Laboratoryから供与されたB6.129-LepRtm2(cre)Rck/J(LepR-cre^{+/+})とB6.129S7-Lrp1tm2Her/J(Lrp1^{fl/+})マウスを用いて、Lepr陽性細胞のLRP1を欠損させたcKOマウスと対照となる野生型(WT)マウスは、雌雄のLepR-cre^{+/+}Lrp1^{fl/+}マウスを作製した。cKOマウスとWTマウスからPDLsを採取した後、MSCsによってLepr陽性細胞を分離した。それぞれのLepr陽性細胞からRNAを抽出して、LeprとLRP1の遺伝子発現を検出した。

(5) マイクロCT撮影

WTマウスとcKOマウスを三種混合麻酔薬の腹腔内投与によって麻酔し、第1大臼歯を含む上顎骨をマイクロCTで撮影した。撮影データは、画像解析ソフトウェアで分析した。歯根を含む関心領域を抽出した。歯と歯根膜組織を除いた組織領域(tissue volume、TV)を測定し、TVにおける骨量(bone volume、BV)の割合(BV/TV)をbone mass(BM)として算出した。

(6) 免疫組織化学染色

WTマウスとcKOマウスから上顎骨を摘出し、4% PFAで固定した。10% EDTAに4週間浸漬して脱灰後、パラフィン包埋した後、パラフィン切片を作製した。パラフィン切片は、脱パラフィン・ブロッキングを行い、一次抗体の Maus抗 Runx2 モノクロナール抗体、またはウサギ抗マウス Osx モノクロナール抗体と反応を行った。PBSで洗浄後、二次抗体であるHRP標識抗ウサギIgGと反応させた。切片は洗浄後、DAB基質キットによって、抗体との反応物を可視化し、ヘマトキシリン溶液で対比染色を施した。スライドは水洗後、上昇エタノールに浸漬させて脱水し、キシレンで透徹後、標本用封入剤で封入した。

(7) Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色

脱パラフィンした切片を親水化した後、TRAP染色によって破骨細胞を同定し、ヘマトキシリン溶液で対比染色を施した。スライドは水洗後、上昇エタノールに浸漬させることで脱水し、キシレンで透徹後、標本用封入剤で封入した。槽間中隔(interalveolar septum、IAS)領域とIRS領域のTRAP陽性細胞を光学顕微鏡で観察した。それらの画像から破骨細胞の数(number of osteoclasts、N.Oc)を計測し、さらに、ImageJを使用して、破骨細胞面(osteoclast surface、Oc.S)と骨表面(bone surface、BS)の距離を測定し、破骨細胞数の割合(N.Oc/BS)と破骨細胞接着面(Oc.S/BS)を算出した。

4. 研究成果

(1) 抜歯窩修復におけるLRP1陽性細胞の局在

抜歯窩の骨再生過程にみられるLRP1陽性細胞の存在を調べるために、LRP1を免疫組織化学的に染色した。抜歯後1日目は、抜歯窩内の細胞は乏しかったが、3日目になると抜歯窩全体は肉芽組織によって覆われ、わずかにLRP1陽性細胞が確認できた。5日目になると、抜歯窩には未熟な骨組織の形成が始まり、LRP1陽性細胞が窩内の広範囲に認められた。7日目の抜歯窩は骨組織によってほとんど置換され、LRP1の発現も再生骨周辺の骨芽細胞や骨小腔内の骨細胞に確認

できた。しかし、10日目になると、LRP1の発現は弱まり、一部の骨芽細胞や骨細胞のみに発現がみられた。

(2) Lepr 陽性細胞の LRP1 発現

MACS によって分離した Lepr 陽性細胞は、陰性細胞と比べて LRP1 遺伝子の発現レベルが有意に高かった。ここまでの結果から、Lepr 陽性細胞などの PDLSCs が LRP1 を発現して、欠損部位に集積することが示唆された。

(3) LRP1のPDLsにおける役割

PDLSCsに発現しているLRP1の機能を明らかにするため、PDLsにsiRNA (siLRP1 1~4) を導入してLRP1 mRNAの発現を抑制した。その結果、siLRP1 1、2、4を導入したPDLsで、LRP1の発現レベルがcPDLと比較して、顕著に低かった。特にLRP1の発現抑制が確認できたsiPDL1とsiPDL4からRNAを抽出して、骨代謝関連因子の発現について調べた。その結果、siPDL1とsiPDL4は、cPDLと比較して、BMP-2、BMP-4、OPGの発現が少なく、RANKLの発現が多かった。

(4) Lepr陽性細胞のLRP1欠損が歯槽骨量と骨形成能に及ぼす影響

MACS システムによって分離した WT と cK0 Lepr 陽性細胞の Lepr と LRP1 の発現レベルを比較すると、両細胞ともに Lepr の発現レベルは同等であったが、LRP1 の発現は cK0 Lepr 陽性細胞では検出できなかった。WT マウスと cK0 マウスの上顎大臼歯部歯槽骨をマイクロ CT で撮影すると、cK0 マウスの海綿骨に大小不同の透過像が確認できた。同部位の BM を算出した結果、cK0 マウスは WT マウスよりも 12%の減少を示した。cK0 マウスでみられた BM 減少の要因を探るため、2 回のカルセイン投与で骨組織を標識して歯槽骨形成能を調べた。その結果、髄床底に近接した IRS 領域の皮質骨にカルセイン二重標識が確認できた。また、カルセイン二重標識された WT マウスの皮質骨は比較的平坦であったのに対して、cK0 マウスでは多くの凹凸をみる不規則な形態を呈していた。このカルセイン二重標識から MAR を算出すると、cK0 マウスは WT マウスに比べて、27%の減少を示し、歯槽骨形成能の低下が認められた。しかし、PDL 幅は、WT マウスと cK0 マウスの間に差は認められなかった。

(5) Lepr陽性細胞のLRP1欠損が骨芽細胞分化に及ぼす影響

WTマウスとcK0マウスの歯根膜に分布するLepr陽性細胞の骨芽細胞分化能を比較するため、Runx2陽性細胞とOsx陽性細胞の単位面積あたりの細胞数と全細胞に対する割合を調べた。Runx2陽性細胞は、IRS領域とIAS領域を含む歯根膜の全体に広く確認できた。このうち髄床底に近接した歯根膜にみられるcK0マウスのRunx2陽性細胞数と割合は、WTマウスに比べて、それぞれ17%と14%の減少を示した。両マウスのOsx陽性細胞も歯根膜の全体に検出できたが、Runx2陽性細胞の分布と同様に、髄床底に近接した歯根膜におけるcK0マウスのOsx陽性細胞数と割合はWTマウスと比べて、それぞれ20%と9%減少した。

(6) Lepr陽性細胞のLRP1欠損が破骨細胞形成に及ぼす影響

WTマウスとcK0マウスともに破骨細胞は、IAS領域の近心歯槽骨頂部とIRS領域の骨髓腔側海綿骨に確認できた。近心歯槽骨頂部におけるcK0マウスのN.Oc/BSとOc.S/BSはWTマウスと比べて、それぞれ124%と65%の増加を示した。同じく骨髓腔側海綿骨で計測したcK0マウスのN.Oc/BSとOc.S/BSはWTマウスと比べて、それぞれ36%と52%の増加がみられた。

以上のことから、Lepr陽性細胞が発現するLRP1は、BMP2とBMP4の発現を増加させ、骨芽細胞分化を促進すること、さらに、OPGの増加とRANKLの発現を抑制することで破骨細胞分化を阻害することによって歯槽骨量を維持していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nishimura Shirabe, Kariya Hitoshi, Gakiya Yu, Shinohara Rie, Nakamura Yoshiki, Mizoguchi Toshihide, Ohashi Akiko, Motoyoshi Mitsuru, Ninomiya Tadashi	4. 巻 158
2. 論文標題 LRP1-deficient leptin receptor-positive cells in periodontal ligament tissue reduce alveolar bone mass by inhibiting bone formation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 105853 ~ 105853
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2023.105853	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naya-Imai Haruna, Uchida Yasuki, Inaba Mizuki, Namura Yasuhiro, Osada Ayaka, Charleston-Coad Tasku, Nakamura Yoshiki, Motoyoshi Mitsuru	4. 巻 161
2. 論文標題 Age dependence of the maturation of the midpalatal suture in the stability of orthodontic anchoring screws	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics	6. 最初と最後の頁 809 ~ 819
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajodo.2021.01.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	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
---------	---------