

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09625

研究課題名(和文)細胞遊走因子LRP1の歯周組織修復環境における機能的役割

研究課題名(英文)Functional role of cell migration factor LRP1 in periodontal tissue repair

研究代表者

二宮 禎(NINOMIYA, Tadashi)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：00360222

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、骨損傷部位や抜歯窩に動員される間葉系細胞(MSCs)の特徴およびそれらが発現するLow density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1)の機能的役割について検討した。組織損傷後、早期にMSCsが動員されるのだが、そのMSCsにはLRP1が発現することが明らかにされた。そして、LRP1発現が細胞遊走能に関与し、骨代謝関連遺伝子を調節することが明らかになった。本実験によって、MSCsが発現するLRP1が骨組織損傷部位で、骨形成および骨吸収を調節する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯周炎などによる歯の喪失に対して、どのように歯を再生するかが大きな課題になっている。歯槽骨を再生および維持するためには、歯根膜に存在する細胞機能を解明することが重要である。歯根膜には、幹細胞である歯根膜幹細胞が存在し、この細胞によって、歯槽骨が形成されている。しかしながら、歯根膜幹細胞がどのようにして、歯周組織の環境を維持しているのかが不明であった。本研究によって、歯根膜幹細胞の持つLRP1が骨代謝を調節する可能性が示された。この成果は、歯周病治療薬および歯科矯正の新たな治療法の開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the characteristics of mesenchymal cells (MSCs) mobilized to bone defect sites and tooth sockets, and the functional role of low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) expressed by them.

It was revealed that MSCs were mobilized to the injured site early after tissue damage, and that MSCs expressed LRP1. Then, it was clarified that LRP1 expression is involved in cell migration ability and regulates bone metabolism-related genes.

This study revealed that LRP1 expressed by MSCs mobilized to the site of injury, may regulate bone resorption and bone formation.

研究分野：口腔解剖学

キーワード：歯根膜細胞 LRP1 幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

歯槽骨修復を含めた組織損傷治癒は、間葉系幹細胞(Mesenchymal stem cells:MSCs)の遊走から始まり、細胞接着、細胞分化、そして、基質形成による組織修復の過程を辿る。効率的な組織損傷治癒を目指すためには、いかにして損傷部位に細胞を集積させるかが問われる。そのため、MSCs の細胞遊走および誘導因子に関わる研究が幅広く行われている。細胞遊走の制御因子として、CXCL12-CXCR4 軸や CX3CL1-CX3CR1 軸が有力とされている。また、損傷部位への細胞誘導因子は、IL6, TNF α などの炎症性サイトカインが多く報告されている。一方、MSC 遊走機能のメカニズムに関しては、細胞遊走に直接的に関わる葉状仮足形成および維持に PI3Ks シグナルが重要であることが報告された。しかしながら、この PI3Ks シグナルを制御する因子はいまだ不明である。細胞遊走機能を制御する因子およびそのメカニズムを解明することで、MSCs を積極的に遊走させることが可能となり、新たな組織修復システムの構築が期待される。

2. 研究の目的

本研究では、新たな組織修復システムを構築するため、細胞遊走機能を制御する因子とそのメカニズムの解明を目的とした。この目的を達成するために、以下のことを明らかにする。

- (1) 組織修復部位に遊走される MSCs の細胞性状を明らかにする。
- (2) 組織損傷修復における LRP1 の機能的役割を明らかにする。
- (3) MSCs の細胞遊走機能における LRP1 と p53 の相互関係を明らかにする。

3. 研究の方法

(1)- 骨欠損修復部位に遊走される MSCs の単離：マウス大腿骨に骨欠損を作製し、術後3日目に欠損部位から細胞を採取した。その細胞から Magnetic activating cell sorting system (MACS)を用いて、血球系細胞である Lin 陽性細胞を除去し、MSCs を単離した。Real-time PCR によって、その MSCs が発現する遺伝子を解析し、非骨欠損部位から採取した MSCs と比較した。

(1)- 歯根膜組織からの歯根膜幹細胞(PDLSC)の単離：これまでに、骨髄中の Leptin receptor (Lepr)陽性細胞が幹細胞性を持つことが報告されているため、Lepr 抗体を用いて、PDLSC の単離を試みた。Real-time PCR を用いて、Lepr 陽性 PDL の幹細胞マーカーを検索した。

(1)- Lepr 陽性 PDL の多分化能の検索：単離した Lepr 陽性 PDL を骨芽細胞分化培地および脂肪細胞分化培地で、それぞれの細胞に分化誘導を行った。骨芽細胞分化では、骨芽細胞マーカーである alp, osterix, osteocalcin の遺伝子発現を検索した。脂肪細胞分化では、Oil red O 染色に加え、adiponectin および c/ebp の遺伝子発現を検索した。

(2)- 骨欠損修復における LRP1 陽性細胞の局在：免疫組織化学染色によって、骨欠損修復過程での LRP1 陽性細胞の局在を検索した。

(2)- 骨欠損部位での LRP1 の機能：siRNA を遺伝子導入して、骨髄由来間葉系細胞(BMSCs)と骨芽細胞(OB)から LRP1 発現を抑制した。LRP1 の機能を検討するため、ボイデンチャンバーを用いて、siRNA 処理した細胞の細胞遊走能を評価した。

(2)- 抜歯窩における LRP1 陽性細胞の局在：免疫組織化学染色によって、抜歯窩修復と LRP1 陽性細胞の局在を検索した。

(2)- PDL における LRP1 の機能：PDL に siRNA を遺伝子導入して、LRP1 発現を抑制した PDL の遺伝子発現を検討した。

(3) LRP1 KO マウス由来 PDL における p53 発現の検索：LRP1-flox マウスと Lepr-cre マウスを交配し、lepr 陽性細胞の LRP1 発現が欠損されるマウス(cLRP1 KO マウス)を作成した。cLRP1 KO マウスの PDL を採取し、遺伝子発現を検索した。

4. 研究成果

(1)- 単離した MSCs マーカーの遺伝子を検索すると、非骨欠損部位からの MSCs よりも骨欠損部位から採取した MSCs の方が、cd73, cd106, cd146 において高い発現が見られた(図 1)。また、alkaline phosphatase (alp)および osterix (osx)などの骨芽細胞マーカーを検索すると、骨欠損部位の MSCs (Lin-)の方が有意に高い値を示した(図 2)。これらの結果は、骨欠損部の MSCs は、非骨欠損部の MSCs よりも高い幹細胞マーカーを有しており、すでに前駆骨芽細胞に分化する状況にあることを示している。

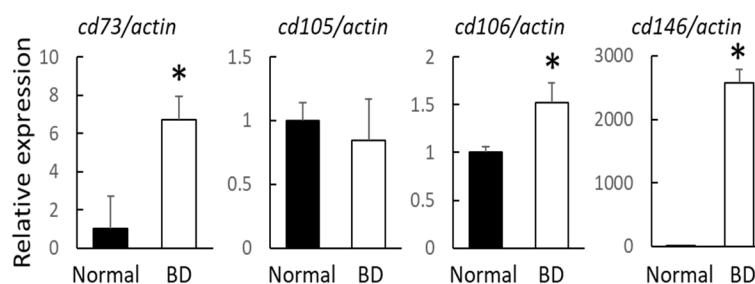


図 1. 骨欠損部位から単離した MSCs の遺伝子発現

と、骨欠損部位の MSCs (Lin-)の方が有意に高い値を示した(図 2)。これらの結果は、骨欠損部の MSCs は、非骨欠損部の MSCs よりも高い幹細胞マーカーを有しており、すでに前駆骨芽細胞に分化する状況にあることを示している。

(1)- PDL から単離した Lepr 陽性 PDL は、MSCs マーカーである cd44, cd73, cd90, cd105, cd146 の発現が Lepr 陰性細胞に比べて高値を示した。さらに、Lepr 陽性細胞は、接着性を有しているため、PDLSC である可能性が示唆された。

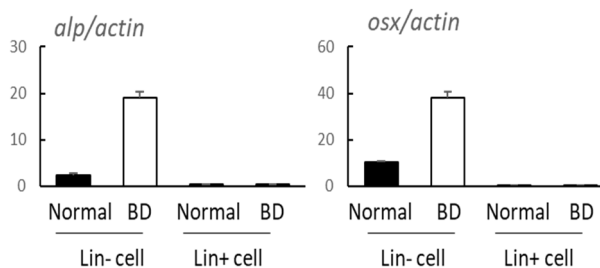


図 2. 骨欠損部位から単離した MSCs の遺伝子発現

(1)- PDL は、骨芽細胞分化誘導培地によって alp, osx, および ocn 発現が増加された。特に、Lepr 陽性 PDL は、Lepr 陰性 PDL よりも、alp および ocn 発現が有意に高くなった。一方、脂肪細胞分化では、分化誘導培地によって、PDL は脂肪滴を持った脂肪細胞を形成し、Lepr 陰性 PDL よりも Lepr 陽性 PDL の方が有意に高い脂肪滴形成能が示された。そして、脂肪細胞マーカーである adiponectin および c/ebp においても、同様に、Lepr 陽性 PDL の方が有意に高い発現が認められた。これらの結果は、Lepr 陽性 PDL が、骨芽細胞および脂肪細胞への高い分化能を有することを示している。実験(1)では、1) 組織損傷後 3 日で、組織修復部位に MSCs が動員されること、2) 抜歯窩における Lepr 陽性 PDL が、PDLSCs の特性を有することが示唆された。

一方、脂肪細胞分化では、分化誘導培地によって、PDL は脂肪滴を持った脂肪細胞を形成し、Lepr 陰性 PDL よりも Lepr 陽性 PDL の方が有意に高い脂肪滴形成能が示された。そして、脂肪細胞マーカーである adiponectin および c/ebp においても、同様に、Lepr 陽性 PDL の方が有意に高い発現が認められた。これらの結果は、Lepr 陽性 PDL が、骨芽細胞および脂肪細胞への高い分化能を有することを示している。

(2)- 骨欠損修復過程において、骨欠損 1 日目は、血球系細胞が集積し、肉芽組織形成が開始された。3 日目には、欠損部位に動員される MSCs に強い LRP1 発現が認められた (図 3, 矢印)。時間経過とともに、MSCs の細胞数は増加し、ほとんどの MSCs は LRP1 を発現した。7 日目になると、骨様硬組織が形成された。骨様硬組織周囲に認められる骨芽細胞もまた LRP1 発現が見られ、さらに、硬組織内に存在する骨細胞様細胞にも LRP1 が認められた (図 3, 矢印)。これらの結果は、LRP1 が MSCs の骨欠損部位への動員に関与する可能性、そして、MSCs が骨芽細胞および骨細胞に分化するまで、LRP1 が発現することを明らかにした。

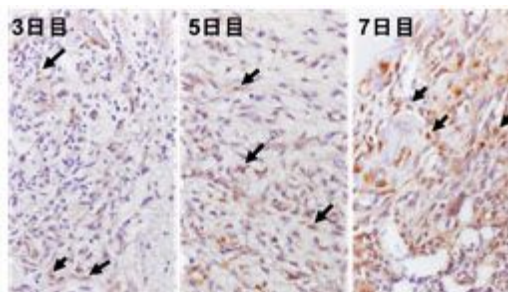


図 3. 骨欠損部位における LRP1 陽性細胞の局在

(2)- 本実験では、4 種類の siRNA のうち、効率的に LRP1 発現を抑制した siRNA2 と siRNA4 を使用した。OB および BMSC のいずれにおいても、siRNA は、細胞遊走能を抑制した (図 4)。

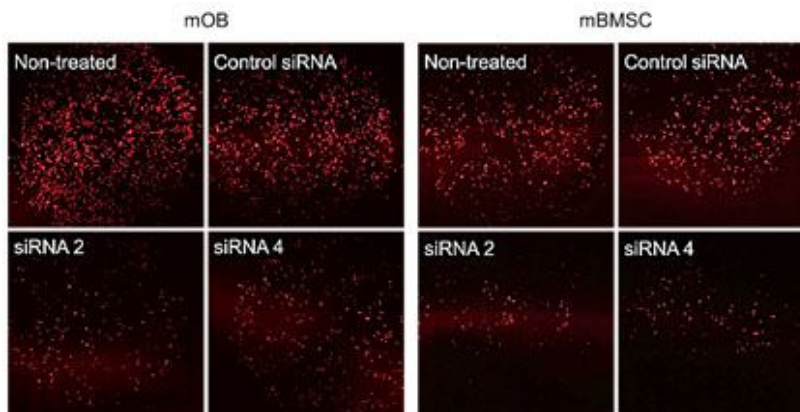


図 4. 細胞遊走能に対する LRP1 抑制の作用

Well に BMP2 添加培地を加え、インサートに細胞を播種した。播種 12 時間後に、well 内の細胞を Phalloidin-Phodamine (赤) で染色した。

実験(2)- の結果は、MSCs が骨欠損部位に動員するために、LRP1 が働いている可能性を示唆している。

(2)- 免疫組織化学染色によって、抜歯窩における LRP1 陽性細胞の局在を検索した。骨欠損部位の修復と同様に、3 日目で、LRP1 陽性細胞が出現し、その細胞数が増加するとともに、抜歯窩辺縁に硬組織の形成が認められた。その骨様硬組織周囲の骨芽細胞および硬組織内の骨細胞もまた LRP1 陽性であった。

(2)- PDL に対して siRNA を遺伝子導入し、効率的に LRP1 を抑制した siRNA1 と siRNA4 を用いて、実験を行った。siRNA は、PDL の BMP2, BMP4 および OPG 発現を抑制、RNAKL 発現を増加した。実験(2)- の結果は、PDL が骨代謝関連の遺伝子を発現し、LRP1 によって、それらの発現が調節されることを示した。

(3) Lepr 陽性細胞の LRP1 遺伝子を欠損した cLRP1 KO マウスから PDL を採取し、遺伝子発現を検索した。実験(2)- と同様に、BMP-2, および OPG 発現の抑制、そして、RANKL 発現の亢進が見られた。さらに、cLRP1 KO PDL は、p53 発現を増加させた。これらの結果は、LRP1 が骨形成に対して、促進的に働くことを示唆している。また、p53 KO マウスは、骨欠損修復が促進されることから、p53 が骨形成を負に制御すると考えらえる。そして、本研究で、LRP1 KO が p53 発現を増加させたことから、p53 と LRP1 が相反する関係性を有することが明らかにされた。

本研究によって、LRP1 は、組織修復のための細胞遊走に関与し、その後の硬組織形成を調節することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Yoshioka Yohsuke, Yamachika Eiki, Nakanishi Makoto, Ninomiya Tadashi, Akashi Sho, Kondo Sei, Moritani Norifumi, Kobayashi Yasuhiro, Fujii Tatsuo, Iida Seiji	4. 巻 9
2. 論文標題 Intermittent parathyroid hormone 1-34 induces oxidation and deterioration of mineral and collagen quality in newly formed mandibular bone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8041
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-44389-8	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 -
1. 著者名 Hiraga Toru, Ninomiya Tadashi	4. 巻 37
2. 論文標題 Establishment and characterization of a C57BL/6 mouse model of bone metastasis of breast cancer	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 235 ~ 242
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-018-0927-y	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 Tsukune Naoya, Naito Masako, Ohashi Akiko, Ninomiya Tadashi, Sato Shuichi, Takahashi Tomihisa	4. 巻 375
2. 論文標題 Forced expression of mouse progerin attenuates the osteoblast differentiation interrupting beta-catenin signal pathway in vitro.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cell Tissue Res	6. 最初と最後の頁 655-664
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00441-018-2930-y	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 Yoshioka Y, Yamachika E, Nakanishi M, Ninomiya T, Nakatsuji K, Matsubara M, Moritani N, Kobayashi Y, Fujii T, Iida S	4. 巻 47
2. 論文標題 Molecular alterations of newly formed mandibular bone caused by zoledronate.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 1206-1213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijom.2018.02.002.	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 Yoshioka Y., Yamachika E., Nakanishi M., Ninomiya T., Nakatsuji K., Kobayashi Y., Fujii T., Iida S.	4. 巻 56
2. 論文標題 Cathepsin K inhibitor causes changes in crystallinity and crystal structure of newly-formed mandibular bone in rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery	6. 最初と最後の頁 732 ~ 738
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bjoms.2018.08.003	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 Iwamoto Rina, Takahashi Takumi, Yoshimi Kazuto, Imai Yuji, Koide Tsuyoshi, Hara Miroku, Ninomiya Tadashi, Nakamura Hiroaki, Sayama Kazutoshi, Yukita Akira	4. 巻 -
2. 論文標題 Chemokine ligand 28 (CCL28) negatively regulates trabecular bone mass by suppressing osteoblast and osteoclast activities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00774-021-01210-9	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15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 大橋晶子、二宮禎、藤原恭子、高橋富久、原田智紀、長谷川宏幸
2. 発表標題 テトラヒドロピオプテリンのプロドラック (セピアプテリン) 投与による脳内セロトニン生合成活性の促進
3. 学会等名 第124回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 平賀 徹、二宮禎
2. 発表標題 C57BL/6マウスを用いた新規乳がん骨転移モデルの開発
3. 学会等名 第37回日本骨代謝学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二宮 禎、中村純基、永島利通、大橋晶子、高橋富久
2. 発表標題 マウス歯根膜細胞の硬組織形成におけるLRP1の役割
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋拓実、二宮禎、細矢明宏、中村浩彰、雪田聡
2. 発表標題 ケモカインCCL25が骨組織に与える影響
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋富久、大橋晶子、二宮禎
2. 発表標題 Lamin A 遺伝子変異体のprogerinの発現が骨芽細胞分化に与える影響
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大橋晶子、内藤昌子、二宮禎、高橋富久、原田智紀、長谷川宏幸
2. 発表標題 テトラヒドロピオプテリンの尿中排出における有機陰イオン輸送体の役割
3. 学会等名 第123回日本解剖学会総会・全国学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉岡洋祐、山近英樹、中西 真、二宮 禎、明石 翔、松原正和、森谷徳文、小林泰浩、藤井達生、飯田征二
2. 発表標題 PTH間歇投与による下顎新生骨の骨質変化 ~ラマン分光法を用いた骨質解析~
3. 学会等名 第38回日本骨形態計測学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田久留実、二宮 禎、細矢明宏、中村浩彰、雪田 聡
2. 発表標題 CCL25遺伝子欠損マウスの骨組織解析
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 吉田千尋、二宮 禎、中村浩彰、杉山稔恵
2. 発表標題 プロイラーにおける骨格の含氮化過程に関する研究
3. 学会等名 第67回北信越畜産学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 二宮 禎、永島利通、中村純基、大橋晶子、藤原恭子、高橋富久
2. 発表標題 P53発現抑制による骨組織修復の促進
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋拓実、二宮禎、細矢明宏、中村浩彰、雪田聡
2. 発表標題 ケモカインCCL25が骨組織に与える影響
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋拓実、岩本莉奈、二宮 禎、原弥革力、細矢明宏、中村浩彰、雪田 聡
2. 発表標題 CCL25が骨代謝に与える影響の解明
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高橋拓実、岩本莉奈、原弥革力、二宮 禎、中村浩彰、雪田 聡
2. 発表標題 CCL28遺伝子欠損マウスは骨量が増加し高回転型骨代謝状態を呈する
3. 学会等名 第38回日本骨代謝学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永島利通、二宮 禎、青木淳也、桐原祐喜、上道一輝、三宅悠介、三宅希和、中島諄也、篠塚啓二、外木守雄
2. 発表標題 間葉系幹細胞が発現するp53の骨欠損修復に対する役割
3. 学会等名 第65回日本口腔外科学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 二宮 禎、永島利通、中村純基、西村調、高橋富久
2. 発表標題 The p53 deficiency promotes bone defect healing by enhancing the function of mesenchymal cells.
3. 学会等名 第126回日本解剖学会全国学術集会
4. 発表年 2021年

〔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
研究分担者	小出 雅則 (KOIDE Masanori) (10367617)	松本歯科大学・総合歯科医学研究所・准教授 (33602)	
研究分担者	中村 浩彰 (NAKAMURA Hiroaki) (50227930)	松本歯科大学・歯学部・教授 (33602)	

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
---------	---------