

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09941

研究課題名(和文) 歯周組織再生におけるLRP1の機能的役割とシグナル経路の解明

研究課題名(英文) Functional role and signaling pathway of LRP1 in regeneration of periodontal tissue

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、歯周組織形成に対するLRP1の役割とそのシグナル経路を解明することを目的とした。LRP1は、歯根膜細胞の組織幹細胞(PDLSCs)であるLeptin receptor (Lepr)陽性細胞に強い発現がみられ、Lepr陽性細胞からLRP1遺伝子を欠損させると、歯根膜細胞の骨芽細胞分化が阻害されて、歯槽骨形成が低下した。このLRP1欠損によって、BMPシグナルであるSmad1/5/9のリン酸化が阻害されて、その結果、骨芽細胞分化が抑制され、骨形成が低下することが示された。したがって、LRP1はBMPシグナルを亢進し、骨芽細胞分化を誘導することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、LRP1は骨芽細胞分化を制御するため歯周組織形成に必要な分子であることが示された。歯周炎治療や歯の矯正移動では、歯根膜細胞による骨形成能が必須となっている。これらの治療および処置において、LRP1を制御することで、より効率的な手法の構築が可能になる。また、本研究で得られた結果は、LRP1の新たな機能を示しており、歯科領域のみならず、骨折治癒など整形外科領域、また生化学分野の発展に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to demonstrate the function and signaling pathway of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1). LRP1 was strongly expressed in leptin receptor (Lepr)-positive cells, which are periodontal ligament stem cells. Conditional knockout mice lacking LRP1 in Lepr-positive cells, were inhibited osteoblast differentiation of periodontal ligament cells and decreased ability of bone formation. In addition, LRP1 deficiency suppressed the phosphorylation of Smad1/5/9, a BMP signaling pathway, suggesting that osteoblast differentiation was inhibited and bone formation was reduced. Therefore, LRP1 in Lepr-positive cells promotes osteoblast differentiation and bone formation by activating BMP signaling.

研究分野：口腔組織学

キーワード：LRP1 歯根膜細胞 歯周組織形成 leptin receptor

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会において、咬合機能は Quality of Life (QOL) の向上に極めて重要である。歯周炎や失活歯の破折などによる歯の喪失は、咬合や顎関節のバランスが崩れ、口腔機能のみならず、肩こりやめまいなどの全身的機能に支障をきたすことが報告されている。そのため、いかにして正常な口腔機能を維持および獲得し、QOL を向上させるかが大きな課題になっている。現在、臨床分野では、主に、guided tissue regeneration (GTR) 法や Emdogain® による歯周組織再生が行われている。一方、基礎研究分野では、新たな組織誘導剤の開発が進められている。歯根膜細胞 (PDL) に存在する Stro-1 と CD146 を発現する歯根膜幹細胞 (PDLSC) の細胞分画が抜歯窩修復および歯周組織再生に寄与する亜集団として考えられているが、その中でも組織修復に携わる中心的な細胞およびその細胞に働くシグナル経路はいまだ不明である。したがって、この細胞とシグナル経路を明らかにすることで、より効率的な歯周炎治療法および歯周組織再生法を構築することが可能になり、正常な口腔機能の獲得に繋がることが期待される。

2. 研究の目的

本研究は、歯槽骨代謝制御システムを構築するために、PDLSCs に発現する LRP1 が歯周組織代謝を制御する主要な因子であることを明らかにする。この目的を達成するため、以下の項目について検討した。

- (1) PDLSCs で LRP1 発現が高いこと
- (2) leptin receptor (Lepr) が PDLSCs の特徴をもつこと
- (3) Lepr 陽性細胞の LRP1 が歯周組織形成に必須であること
- (4) 骨芽細胞分化における LRP1 のシグナル経路
- (5) 骨形成における p53 と LRP1 の相関関係

3. 研究の方法

(1) PDLSCs における LRP1 の発現の検索

C57BL/6 マウスの臼歯から採取した PDLs に対して、magnetic activated cell sorting system (MACS) によって Lepr 陽性細胞を単離し、Western blotting および real-time PCR 解析によって、マウス PDLSCs の LRP1 発現を検索した。ここでは、Lepr 陽性細胞を PDLSCs として用いた。

(2) PDL 由来 Lepr 陽性細胞の組織幹細胞性の検討

MACS で単離した Lepr 陽性細胞と Lepr 陰性細胞から RNA を抽出して、real-time PCR 解析によって、間葉系幹細胞マーカーの遺伝子発現を検索した。さらに、これらの細胞の細胞遊走能、骨芽細胞分化能、および脂肪細胞分化能を評価した。細胞遊走能は、トランスウェルの上面に細胞を播種して、6、12 時間後にトランスウェル下面に移動した細胞をトルイジンブルーで染色し、細胞数を計測した。骨芽細胞分化は、BMP2 添加培地で 5 日間培養後、ALPase の染色を行い、また細胞から抽出した RNA を利用して骨芽細胞分化マーカーの遺伝子発現を検索した。脂肪細胞分化の評価は、脂肪細胞分化誘導培地で 21 日間培養した後、Oil red O 染色、また細胞から RNA を抽出して脂肪細胞マーカーの遺伝子発現を調べた。

(3) コンディショナルノックアウトマウスおよび PDLs を用いた骨形成評価

遺伝子改変マウスの歯槽骨形成評価

Lepr-cre マウスと LRP1-flox マウスを用いて、Lepr 陽性細胞から LRP1 遺伝子を欠損させた LRP1 flox Lepr cre (cK0) マウスと野生型 (WT) マウスを得た。5 週齢雄性マウスの cK0 マウスと WT マウスの歯周組織形成を調べるために、マイクロ CT を用いてそれぞれのマウスの上顎骨を撮影した。画像解析ソフトによって、撮影したマイクロ CT 像から cK0 マウスと WT マウスの歯槽骨量を計測・比較した。さらに、カルセインを 7 日間隔でマウスの腹腔内に投与した後、非脱灰標本作製し、蛍光顕微鏡で骨石灰化速度を計測することで歯槽骨形成能を調べた。

cK0 マウスの歯根膜組織における骨芽細胞分化の検討

cK0 マウスと WT マウスの第 1 大臼歯を含む上顎骨のパラフィンブロックからパラフィン切片を作製した。その切片を用いて、免疫組織化学染色で osterix と runx2 の局在を検索した。

cK0 マウス由来 PDLs の骨芽細胞分化能の検討

cK0 マウスと WT マウスの臼歯から採取した cK0 PDLs と WT PDLs の RNA を抽出して、real-time PCR によって LRP1 遺伝子欠損がおよぼす作用を検討した。さらに、BMP2 の添加によって骨芽細胞分化を誘導した後、5 日後に ALPase 染色および RNA 抽出によって骨芽細胞分化マーカーを検索することで、骨芽細胞分化に対する LRP1 の役割を調べた。さらに、これらの PDLs を石灰化誘導培地で培養し、10 日後に alizarin red によって染色することで、LRP1 欠損による硬組織形成能への影響を検討した。

(4) LRP1 欠損が BMP シグナルに与える影響の検討

免疫組織化学染色によるシグナルの検討

パラフィン切片を用いて、免疫組織化学染色によって Smad1/5/9 と p-Smad1/5/9 の発現を検索することで、LRP1 欠損が BMP シグナル経路に与える影響を調べた。

cKO PDLs で阻害されるシグナルの検討

それぞれのマウスから採取した PDLs を BMP2 で刺激することで骨芽細胞分化を誘導した。刺激 5 日後にタンパクを抽出した後、Western blotting によって Smad1/5/9 と p-Smad1/5/9 の発現を比較した。

(5) LRP1 と p53 の相互関係の検討

C57BL/6 マウスから採取した PDLs に対して siRNA LRP1 を導入して LRP1 遺伝子発現をノックダウンした後、RNA を抽出した。real-time PCR によって、LRP1 と p53 の発現レベルを調べた。また、cKO マウス、p53 KO マウス、および WT マウスから MACS によって Lepr 陽性細胞を単離した。これらの細胞の LRP1 と p53 の発現レベルを比較することで、LRP1 と p53 の相互関係を検討した。

4. 研究成果

(1) PDLSCs における LRP1 の発現

PDLs から単離した Lepr 陽性細胞は、Lepr 陰性細胞と比べて、LRP1 の遺伝子 (図 1) およびタンパク発現が高レベルだった。これまでに、抜歯窩修復過程の早い段階で LRP1 陽性細胞が出現することを明らかにしており、これらのことから抜歯窩修復で動員された PDLSCs が骨芽細胞に分化する前に LRP1 の発現レベルが高くなると考えられる。

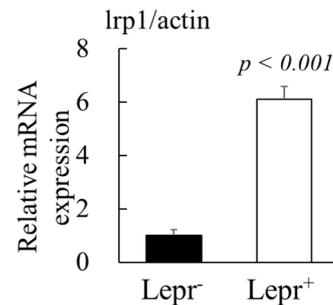


図 1 : Lepr 陽性細胞 (Lepr⁺) と陰性細胞 (Lepr⁻) の LRP1 発現

(2) PDLs 由来 Lepr 陽性細胞の組織幹細胞性

PDLs から単離した Lepr 陽性細胞が発現する幹細胞マーカーを調べると、Lepr 陰性細胞と比べて CD44, CD73, CD90, CD146 が有意に高い発現レベルであった。

細胞遊走能に関して、培養 6 時間後には、Lepr 陽性細胞と Lepr 陰性細胞に大きな差はみられなかったが、12 時間後には、Lepr 陽性細胞の方がメンブレン下面に多くの細胞が移動しており、Lepr 陰性細胞と比べて約 2 倍の細胞が観察された。

骨芽細胞分化について、BMP2 刺激によって Lepr 陰性細胞は、ほとんど ALPase 陽性細胞がみられなかったが、Lepr 陽性細胞では、ウェル全体に ALPase 陽性の細胞が観察された。遺伝子発現においても、Lepr 陽性細胞は、ALP, osterix, bone sialoprotein, osteocalcin が Lepr 陰性細胞よりも高い発現を示し、Lepr 陽性細胞の骨芽細胞分化能が高いことが明らかにされた。

脂肪細胞分化においても、Lepr 陽性細胞は、21 日間の培養によって、Oil red O 陽性の脂肪滴を含む細胞が多くなり、adiponectin や C/EBP の発現も Lepr 陰性細胞よりも高くなった。

これらの結果は、Lepr 陽性細胞が幹細胞性を有することを示唆している。

(3) cKO マウスおよび PDLs を用いた骨形成評価

遺伝子改変マウスの歯槽骨形成

Lepr 陽性細胞から LRP1 遺伝子を欠損させた cKO マウスは、WT マウスに比べて、歯槽骨内に骨髓腔が多く見られ、歯槽骨量が有意に減少していた (図 2)。カルセインラベルで骨石灰化速度を評価すると、cKO マウスでは、二重ラベルの領域が少なく、それらのラベル幅も狭くなっており、骨石灰化速度が減少していた (図 3)。これらの結果は、cKO マウスでは、骨形成能が低下することを示している。

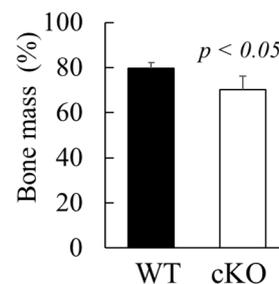


図 2 : cKO マウスの骨量 (Bone mass)

cKO マウスの骨芽細胞分化

免疫組織化学染色によって、osterix と runx2 の発現を調べると、cKO マウスでは、歯根膜組織全体で osterix 陽性細胞と runx2 陽性細胞が減少していた。

cKO マウス由来 PDLs の骨芽細胞分化

WT PDLs を BMP2 添加培地および石灰化誘導培地で培養すると、ウェル全体に ALPase で染色された細胞、また alizarin red 陽性の硬組織形成がみられたのに対し、cKO PDLs では、ほとんど ALPase で染色されずに、硬組織形成もまったく認められなかった。これらのことから、cKO マウスでは、骨芽細胞分化が阻害されることで、骨形成が抑制されていると考えられる。

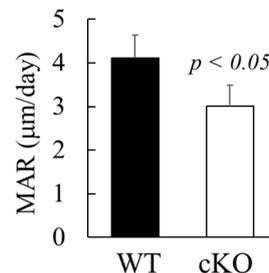


図 3 : cKO マウスの骨石灰化速度 (MAR)

(4) LRP1 欠損が BMP シグナルに与える影響

cKO マウスの骨芽細胞分化が阻害されていたため、歯根膜組織での BMP シグナルを検索すると、Smad1/5/9 の発現は歯根膜組織全体にみられ、WT マウスとほとんど変わらなかったが、cKO マウスの p-Smad1/5/9 陽性細胞は、WT マウスと同様に歯根膜全体

に認められたが、弱い発現しかみられなかった。また、cKO PDLs に対して BMP2 刺激を加えても、p-Samd1/5/9 の発現レベルは WT PDLs よりも低かった。

(5) LRP1 と p53 の相互関係の検討

WT PDLs に siRNA LRP1 を導入すると、LRP1 の発現は減少するのに対し、p53 の発現は増加した。また、cKO マウスの PDLs は p53 の遺伝子発現が WT PDLs よりも高くなったのに対し、p53 KO マウスの PDLs では LRP1 の発現は、WT PDLs よりも高いレベルを示し、LRP1 と p53 の発現には相反する関係性がみられた。

本研究によって、PDLSCs に発現する LRP1 は、歯根膜細胞の骨芽細胞分化を誘導することで歯槽骨形成を促進する役割を担っていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Nagashima Toshimichi, Ninomiya Tadashi, Nakamura Yoshiki, Nishimura Shirabe, Ohashi Akiko, Aoki Junya, Mizoguchi Toshihide, Tonogi Morio, Takahashi Tomihisa | 4. 巻 40 |
| 2. 論文標題 p53 deficiency promotes bone regeneration by functional regulation of mesenchymal stromal cells and osteoblasts | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Bone and Mineral Metabolism | 6. 最初と最後の頁 434 ~ 447 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00774-022-01314-w | 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 39 |
| 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 558 ~ 571 |
| 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 - |

| | |
|---|----------------------|
| 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 |
| 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 - |

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 二宮禎、西村調、仮谷仁志、高橋富久 |
| 2. 発表標題 歯根膜組織由来leptin receptor陽性細胞が発現するLRP1の役割 |
| 3. 学会等名 第128回日本解剖学会全国学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岩本莉奈、高橋拓実、二宮禎、中村浩彰、雪田聡 |
| 2. 発表標題 ケモカインリガンド28(CCL28)は骨芽細胞及び破骨細胞活性化を抑制することで海綿骨量を負に制御する |
| 3. 学会等名 第39回日本骨代謝学会学術集会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中村純基、西村調、二宮禎、高橋富久、本吉満 |
| 2. 発表標題 歯根膜leptin receptor陽性細胞による骨代謝調節機能 |
| 3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 二宮禎、永島利通、中村純基、西村調、仮谷仁志、高橋富久 |
| 2. 発表標題 p53遺伝子欠損マウスにおける骨損傷修復の検討 |
| 3. 学会等名 第127回日本解剖学会全国学術集会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 二宮禎、仮谷仁志、西村調、溝口利英、高橋富久 |
| 2. 発表標題 LRP1欠損がLeptin receptor陽性細胞の骨形成に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 西村調、二宮禎、高橋富久、本吉満 |
| 2. 発表標題 Leptin receptor陽性細胞のLRP1欠損が歯槽骨形成に及ぼす影響 |
| 3. 学会等名 第82回日本矯正歯科学会学術大会 |
| 4. 発表年 2023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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|