

論文の内容の要旨

氏名：中 村 純 基

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名： マウス歯根膜における leptin receptor 陽性細胞の幹細胞性と LRP1 陽性細胞の役割について

歯根膜細胞 (PDLs) に含まれる歯根膜幹細胞 (PDLSCs) の特性を調べるには、PDLSCs の分離・解析が必須である。PDLSCs は、CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166, および Stro-1 などの MSCs と同じ細胞膜抗原をもつことが知られている。近年、leptin シグナルが MSCs の細胞分化を制御することが報告され、また、骨髄にみられる leptin receptor (Lepr) 陽性細胞が骨芽細胞、脂肪細胞、および軟骨細胞への分化能をもつことと、PDLs に存在する Lepr 陽性細胞が抜歯窩の骨再生に関与することが明らかになった。これらの研究は、Lepr が PDLSCs の分離において有望な細胞膜抗原であることを示唆している。そこで、本研究では、まず、この Lepr に注目して歯根膜組織から Lepr 陽性細胞を分離し、それらの幹細胞性と分化能を検証した。一方、抜歯窩治癒過程を理解するには、骨形成関連因子に関する知見も不可欠である。Bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) は、転写因子の runt-related transcription factor 2 (Runx2) と osterix の発現を介して PDLSCs の骨芽細胞分化を促進する。BMP-2 と同様に、receptor activator of the NF- κ B ligand (RANKL) も骨代謝を維持するために欠かせないサイトカインである。RANKL は骨芽細胞や MSCs から分泌され、前駆破骨細胞の RANK と結合することによって、前駆破骨細胞から破骨細胞への分化を誘導する。興味深いことに、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は、RANKL 産生が増加し、破骨細胞分化が促進する。この LRP1 は、transforming growth factor- β 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、LRP1 の発現抑制が骨形成関連因子へ及ぼす影響についても検討を加えた。

3 種混合麻酔薬の深麻酔によって安楽死させた雄性 ddy マウス (6 週齢) の上下臼歯を抜歯し、2 mg/ml collagenase および 0.25% trypsin を含んだ phosphate buffer saline (PBS) で、37°C、20 分間インキュベートした後、PDLs を回収した。培養シャーレへ播種し、 α -minimal essential medium を用いて、37°C、5%炭酸ガス存在下で 7 日間培養して実験に供した。培養した PDLs を 35 mm glass base dish に播種し、ヤギ抗マウス Lepr ポリクロナール抗体と二次抗体の alexa fluor 555 標識ロバ抗ヤギ IgG を用いて、免疫組織化学的に染色した。また、培養した PDLs を PBS に懸濁させ、ウサギ抗 Lepr ポリクロナール抗体で処理後、ヤギ抗ウサギ IgG マイクロビーズを加えて、4°C、30 分間の反応によって、細胞を磁気ビーズで標識した。その後、磁石に設置した分離カラムへアプライし、カラムに吸着したものを Lepr 強発現 PDLs (Lepr^{hi} PDLs)、分離カラムに吸着しなかった flow through を Lepr^{fl} PDLs としてそれぞれ回収した。それぞれの細胞は培養後、骨芽細胞分化については骨芽細胞マーカーの *alkaline phosphatase (alp)*、*osterix (osx)*、*osteocalcin (ocn)* の発現によって、脂肪細胞分化については脂肪細胞マーカーである *adiponectin* と *c/ebp* の発現と oil red O 染色によって検討した。また、マウスの上顎臼歯を抜歯後、micro-CT を使用して抜歯窩を撮影した。さらに、抜歯後 1, 3, 5, 7, および 10 日目に、上顎骨を摘出し、脱灰後、パラフィン包埋し、厚さ約 4 μ m の切片を作成し、ウサギ抗 LRP1 ポリクロナール抗体で免疫組織化学的に染色した。LRP1 の PDLs に与える影響は LRP1 siRNA (終濃度: 8 pmol/well) を細胞に導入することによって検討した。PDLs は、LRP1 siRNA 存在下で 3 日間培養した後、実験に供した。なお、LRP1 siRNA 1~4 を導入した PDLs をそれぞれ siPDL1~4 とし、negative control siRNA を導入した PDLs を cPDL とした。siPDL1~4, iPDL, cPDL は細胞溶解液でそれぞれ処理し、12% polyacrylamide gel 電気泳動で分画した。泳動後、nitrocellulose membrane に転写し、ウサギ抗 LRP1 ポリクロナール抗体と反応させたのち、ECL 溶液によって、抗体との反応性を可視化した。

培養した PDLs における Lepr 発現を免疫組織化学的に調べた結果、PDLs の一部に Lepr 陽性細胞の存在が確認できた。磁気ビーズによって分離した Lepr^{hi} PDLs は分離カラムに吸着しなかった Lepr^{fl} PDLs よりも

約 1.8 倍高い *Lepr* の遺伝子発現を示した。また, *Lepr^{hi}* PDLs は *Lepr^{fl}* PDLs と比べて MSCs の細胞膜抗原である *cd44*, *cd73*, *cd90*, *cd105*, および *cd146* の強い発現が確認できた。骨芽細胞分化能の検討では, *Lepr^{hi}* PDLs は, *Lepr^{fl}* PDLs よりも骨芽細胞マーカーの *alp*, *osx*, および *ocn* の強い発現を認めた。一方, 脂肪細胞への分化能について調べた結果, *Lepr^{hi}* PDLs と *Lepr^{fl}* PDLs のどちらにも *oil red O* 陽性細胞が観察できたが, *Lepr^{hi}* PDLs は成熟脂肪細胞の特徴である脂肪滴と脂肪細胞マーカーの *adiponectin* と *c/ebp* の発現が強かった。続いて抜歯窩の骨再生を観察するため, マウス上顎第一臼歯の抜歯窩を *micro-CT* を利用して経日的に撮影した。抜歯後 5 日目の抜歯窩に不透過像は認められなかったが, 7 日目になると抜歯窩の辺縁に骨組織と思われる不透過像が出現し, 10 日目には抜歯窩全体を占めた。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 日目になると窩内全体が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, 抜歯窩は未熟な骨組織の形成と, LRP1 陽性細胞が窩内の広範囲に現れた。さらに, PDLs に siRNA (siLRP1 1~4) によって LRP1 mRNA の発現を抑制した結果, siLRP1 1, 2, 4 を導入した PDLs で, LRP1 の発現レベルがコントロール (cPDL) と比較して低かった。特に顕著な発現抑制が確認できた 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。

これらの結果から, 次の結論を得た。

1. PDLs に *Lepr* 陽性細胞の存在を確認した。
2. *Lepr^{hi}* PDLs は幹細胞マーカーの *cd44*, *cd73*, *cd90*, *cd105*, *cd146* の発現と, 骨芽細胞と成熟脂肪細胞への分化能を示した。
3. LRP1 陽性細胞は抜歯後 3 日の窩内にみられ, 骨芽細胞に分化して, 抜歯窩の骨再生を誘導した。
4. LRP1 の発現抑制によって, PDLs の *bmp-2*, *bmp-4*, *opg* の発現が抑制され, *rankl* の発現が亢進した。

以上のことから, PDLs にみられる *Lepr* 陽性細胞は, 幹細胞性および多分化能を持つこと, また, LRP1 は, PDLs の BMP-2, BMP-4, OPG, RANKL 発現を調節することが明らかになった。