

論文の内容の要旨

氏名：西 村 調

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 を欠損させた leptin receptor 陽性細胞が歯槽骨形成に与える影響

歯根膜細胞（PDLs）には、歯周組織の維持や再生に深く関わる歯根膜幹細胞（PDLSCs）が含まれている。最近になって、PDLs に含まれる leptin receptor 陽性（LepR⁺）細胞は、骨芽細胞や骨細胞に分化して抜歯窩を修復することが明らかになった。さらに、LepR⁺ 細胞はセメント芽細胞やセメント細胞にも分化することから、PDLSCs の細胞集団として考えられている。LepR⁺ 細胞の骨芽細胞分化は、BMP シグナルの活性化に伴い発現する runt-related transcription factor 2（Runx2）や osterix（Osx）などの転写因子によって調節されている。これは、LepR⁺ 細胞が Runx2 と Osx の発現を介して骨芽細胞に分化することを示すものであるが、BMP や転写因子の発現を誘導する因子は未だ明らかにされていない。そこで本研究では、多種類のリガンドと高親和性をもつ low-density lipoprotein receptor-related protein 1（LRP1）に着目した。LRP1 を欠損させたマウスは、破骨細胞の増加によって骨量が減少することから、LRP1 は破骨細胞分化に抑制的に働くと考えられている。しかし、骨形成に作用する LRP1 の機能は不明であることから、LepR⁺ 細胞から LRP1 遺伝子を欠損させたマウスを用いて、歯槽骨形成に及ぼす LRP1 欠損の影響について検討した。

LepR-cre マウスと Lrp1-flox マウスを用いて、6 週齢雄性 LepR-cre^{+/+} Lrp1^{fl/fl}（conditional knockout, cKO）マウスと LepR-cre^{-/-} Lrp1^{+/+}（wild type, WT）マウスを得た。WT マウスと cKO マウスの上顎骨をマイクロ CT によって撮影し、歯槽骨量と PDL 幅を測定した。同時に、WT マウスと cKO マウスの腹腔内に 7 日間隔で 2 回、カルセイン（10 mg/kg）を投与後、上顎骨の非脱灰標本から厚さ約 10 μm の非脱灰凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡像から骨石灰化速度（mineral apposition rate, MAR）を計測した。また、厚さ約 4 μm の切片も作製し、Runx2 と Osx の一次抗体を使用して免疫組織化学染色を施した後、根間中隔（interradicular septum, IRS）領域の Runx2 と Osx の陽性細胞数を測定した。さらに、tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色によって破骨細胞を同定し、槽間中隔（interalveolar septum, IAS）領域と IRS 領域に観察された破骨細胞数と破骨細胞接着面を計測した。培養実験では、三種混合麻酔薬による深麻酔で安楽死させた WT マウスと cKO マウスから臼歯を摘出し、酵素処理によって採取した WT マウス PDLs（WT PDLs）と cKO マウス PDLs（cKO PDLs）を使用した。骨芽細胞分化能を知るために、WT PDLs と cKO PDLs を 48-well と 6-well plate に播種し、100 ng/ml の BMP2 を添加した培地で 5 日間培養した。48-well plate の細胞は 10%ホルマリン溶液で固定して PBS で洗浄後、NBT/BCIP 液で alkaline phosphatase (ALP) 活性を検出した。6-well plate の細胞からは RNA を抽出し、quantitative PCR によって ALP, RUNX2, OSX, bone sialoprotein (BSP), および osteocalcin (OCN) の発現レベルを調べた。また、石灰化能を調べるために、WT PDLs と cKO PDLs を 48-well plate に播種し、5 mM β-グリセロリン酸、0.5 mM アスコルビン酸、100 nM デキサメタゾンを含む培地（OGM）で 10 日間培養した後、10%ホルマリン溶液で固定し、アリザリンレッド染色した。さらに、LRP1 欠損による骨代謝制御への影響を知るために、WT PDLs と cKO PDLs の BMP2, BMP4, osteoprotegerin (OPG), および receptor activator of nuclear factor-κB ligand (RANKL) の遺伝子発現を調べた。一方、加齢と LRP1 欠損の関係を調べるために、マイクロ CT を利用して 5 カ月齢雄性 WT マウスと cKO マウスの歯槽骨量と PDL 幅を測定した。

マイクロ CT 撮影によって 6 週齢 cKO マウスの歯槽骨量は WT マウスよりも 12%の減少が認められた。また、カルセイン投与による骨形成評価では、IRS 領域の髓床底皮質骨と髓腔側海綿骨に明瞭なカルセインの二重標識が観察された。cKO マウスの MAR は WT マウスよりも 27%の減少がみられた。この cKO マウスにみられた歯槽骨量低下は PDL 幅に影響しなかった。免疫組織化学染色によって Runx2 と Osx の発現を調べると、cKO マウスの Runx2⁺ 細胞数と Osx⁺ 細胞数はそれぞれ WT マウスよりも 17%と 20%の減少がみられ、全細胞数に対する陽性細胞の割合も、WT マウスよりも低値を示した。一方、破骨細胞は、両マウスで IAS 領域の近心側と IRS 領域の骨髓腔周囲に観察された。cKO マ

ウスで計測された IAS 領域と IRS 領域の破骨細胞数は、それぞれ WT マウスと比べて 36%と 124%の増加が示された。同様に、破骨細胞面も IAS 領域で 52%、IRS 領域では 65%の増加が認められた。培養実験では、培地に BMP2 を添加しても cKO PDLs は ALP 活性が増加せず、さらに OGM で培養しても石灰化は誘導されなかった。遺伝子発現について調べた結果、BMP2 の非存在下でも、cKO PDLs の *ALP*、*RUNX2*、および *OSX* の発現レベルは WT PDLs よりも低かった。cKO PDLs の培地に BMP2 を添加しても、これらの発現は BMP2 非存在下にある WT PDLs と同じレベルであり、*BSP* と *OCN* の発現に関しては増加がみられなかった。骨代謝関連因子の発現を調べると、cKO PDLs の *BMP2*、*BMP4*、および *OPG* の発現は、WT PDLs に比べて著しく低かったのに対し、*RANKL* の発現レベルは高くなった。一方、5 カ月齢マウスの上顎骨をマイクロ CT で撮影した結果、cKO マウスの歯槽骨量は WT マウスと比較して 15%の減少がみられた。しかし、WT マウスと cKO マウスのいずれも、歯槽骨量と PDL 幅に加齢による変化はみられなかった。

以上の結果から、*LepR*⁺ 細胞が発現する *LRP1* は骨吸収を阻害しながら、*BMP2* と *BMP4* の発現を増加させ、骨芽細胞分化を促進することによって加齢とは関係なく歯槽骨量を維持していると考えられた。