

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

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

西村 調

(指導：本吉 満 教授，二宮 禎 准教授)

## 目次

概要	-----2
緒言	-----6
材料および方法	-----8
結果	-----16
考察	-----20
結論	-----23
参考文献	-----24
図および表	-----28

## 概要

歯根膜細胞 (periodontal ligament cells, PDLs) は、様々な細胞群から構成されており、歯周組織の形成や再生に深く関わる歯根膜幹細胞 (periodontal ligament stem cells, PDLSCs) が含まれている。これまでにPDLSCsについての多くの研究が行われてきたが、最近になってPDLsに含まれるleptin receptor陽性 (LepR<sup>+</sup>) 細胞が、骨芽細胞に分化して抜歯窩を修復することが明らかにされた。また、歯根部のPDLsにみられるLepR<sup>+</sup> 細胞は、骨芽細胞の他にセメント芽細胞を経てセメント細胞へ分化することから、歯周組織を形成するPDLSCsとして考えられている。

LepR<sup>+</sup> 細胞の骨芽細胞分化は、bone morphogenetic protein (BMP) シグナルの活性化とともに発現するrunx-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<sup>+</sup> 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、LepR<sup>+</sup> 細胞においてBMPや転写因子の発現を誘導する因子は解明されていない。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、破骨細胞分化と骨吸収が優位になることから、LRP1は骨吸収を抑制する機能を持つと考えられている。しかし、骨形成に影響を及ぼすLRP1の機能は未明な点が多いため、LepR<sup>+</sup> 細胞のLRP1遺伝子を欠損させたconditional knockoutマウスを作製し、歯槽骨形成に与える影響について検討した。

LepR-cre<sup>+/+</sup>マウスとLrp1<sup>fl/+</sup>マウスとLRP1-floxマウスを交配させることで、

LepR<sup>+</sup> 細胞のLRP1遺伝子を欠損させた6週齢雄性LepR-cre<sup>+/+</sup> Lrp1<sup>fl/fl</sup> (conditional knockout, cKO) マウスと, LRP1を恒常的に発現している同じく6週齢雄性LepR-cre<sup>-/-</sup> Lrp1<sup>+/+</sup> (wild type, WT) マウスを得た。マイクロCTを利用して, WTマウスとcKOマウスの歯槽骨量と歯根膜幅 (PDL幅) を測定した。同時にWTマウスとcKOマウスの腹腔内にカルセインを7日ごとに2回投与後, 摘出した上顎骨から厚さ約10 μmの非脱灰凍結切片を作製し, 蛍光顕微鏡によって石灰化速度を計測した。厚さ約4 μmのパラフィン切片も作製し, Runx2とOsx抗体を用いた免疫組織化学染色によって, 根間中隔 (interradicular septum, IRS) の歯根膜にみられるRunx2陽性 (Runx2<sup>+</sup>) 細胞とOsx陽性 (Osx<sup>+</sup>) 細胞の数を計測した。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領域の歯槽骨に出現した破骨細胞の割合と破骨細胞接着面を計測した。培養実験にはWTマウスとcKOマウスの上下顎大白歯部歯根膜から採取したWTマウスPDLs (WT PDLs) とcKOマウスPDLs (cKO PDLs) を使用した。WT PDLsとcKO PDLsの骨芽細胞分化能を調べるために, 両細胞を48-wellと6-well plateに播種した後, 100 ng/mlのBMP2を添加した培地で5日間培養した。その後, 48-well plateの細胞は10% ホルマリン溶液で固定後, NBT/BCIP液でalkaline phosphatase (ALP) 活性を調べた。同時に6-well plateの細胞からRNAを抽出しqPCRによってALP, RUNX2, OSX, bone sialoprotein (BSP), およびosteocalcin (OCN) の発現レベルを確認した。また, PDLsを48-well plateに播種して, 5 mM β-グリセロリン酸, 0.5 mM アスコルビン酸, および100 nM デキサメタゾンを含む培地 (osteogenic medium, OGM) で10日間培養した。培

養終了後、細胞を10%ホルマリン溶液で固定し、アリザリンレッド染色によってPDLsの石灰化能を調べた。さらにWT PDLsとcKO PDLsの*BMP2*, *BMP4*, *osteoprotegerin (OPG)*, およびreceptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand (*RANKL*)の発現レベルも検討した。一方、加齢に伴う変化を調べるために、5カ月齢雄性WTマウスとcKOマウスの上顎大臼歯部歯槽骨量とPDL幅を測定した。

マイクロCT撮影によってcKOマウスの上顎大臼歯部歯槽骨の骨髓腔側海綿骨内に大小不同の類円形を呈した透過像が確認でき、歯槽骨量の低下が認められた。しかし、cKOマウスにみられた歯槽骨量の低下は、PDL幅の拡大には影響しなかった。また、WTマウスとcKOマウスの上顎大臼歯部歯槽骨IRS領域の皮質骨にカルセインの二重標識が観察できたが、cKOマウスでは石灰化速度の低下が認められた。上顎大臼歯部歯根膜における骨芽細胞の分布を免疫組織化学染色によって調べた結果、特に髓床底に近接するIRS領域のRunx2<sup>+</sup>細胞数とOsx<sup>+</sup>細胞数がcKOマウスではWTマウスよりもそれぞれ17%と20%の減少がみられ、全細胞数に対するRunx2<sup>+</sup>細胞数とOsx<sup>+</sup>細胞数の割合も、WTマウスよりも低値であった。TRAP染色の結果、両マウスでIAS領域の近心側歯槽骨頂部とIRS領域の骨髓腔側海綿骨に破骨細胞が観察できた。cKOマウスで計測されたIAS領域とIRS領域の破骨細胞数は、WTマウスと比較してそれぞれ124%と36%の増加を示した。また、cKOマウスの破骨細胞接着面もWTマウスと比較してIAS領域では65%、IRS領域で52%の増加を示した。cKO PDLsを用いた培養実験では、BMP2を添加してもALP活性は増加せず、OGMで培養しても石灰化は誘導できなかった。遺伝子発現を調べた結果、BMP2を添加したcKO PDLsの*ALP*, *RUNX2*, およ

び*OSX*の発現レベルは、*BMP2*非添加のWT PDLsと同レベルにあり、*BSP*と*OCN*の発現も変化は認められなかった。さらに、骨代謝関連因子について調べると、cKO PDLsの*BMP2*、*BMP4*、および*OPG*の発現レベルは、WT PDLsに比べて著しく低く、*RANKL*の発現レベルは高かった。一方、5カ月齢雄性WTマウスとcKOマウスの上顎大臼歯部歯槽骨をマイクロCTで観察した結果、cKOマウスの歯槽骨量はWTマウスに比べて低い値を示したが、同種マウス間では差は認められなかった。

以上の結果から、LRP1が欠損したLepR<sup>+</sup>細胞は*BMP2*と*BMP4*の発現が抑制されることで骨芽細胞への分化能が低下し、反対に*RANKL*の発現を介した破骨細胞分化が促進することによって、加齢とは関係なく歯槽骨量が低下することが示唆された。

本論文は、Archives of Oral Biology に掲載された論文（Nishimura S, Kariya H, Gakiya Y, Shinohara R, Nakamura Y, Mizoguchi T, Ohashi A, Motoyoshi M, Ninomiya T (2024) LRP1-deficient leptin receptor-positive cells in periodontal ligament tissue reduce alveolar bone mass by inhibiting bone formation. Arch Oral Biol 158, 105853.）を基幹論文とし、LepR<sup>+</sup>細胞のLRP1欠損が加齢変化に与える影響を示すデータ（図9）を加えて総括したものである。

## 緒言

歯根膜は多種類の細胞で構成されており、歯周組織の恒常性を維持している。特に、歯根膜細胞（periodontal ligament cells, PDLs）に含まれている歯根膜幹細胞（periodontal ligament stem cells, PDLSCs）は歯周組織の維持と再生において重要な役割を演じている<sup>1)</sup>。これまでに、Seoら<sup>2)</sup>はstro-1抗体によって分離したヒト由来PDLSCsが、骨髄由来間葉系幹細胞（mesenchymal stem cells, MSCs）の特異的マーカーであるCD146/MUC18を発現し、特定の条件下でセメント芽細胞様細胞、脂肪細胞、線維芽細胞に分化することを示した。それ以降、多くの研究者によってPDLSCsの特性が調べられ、PDLSCsが、CD29, CD73, CD90, CD146, stro-1などのMSCsと同様な細胞膜表面分子を発現していることが明らかにされた<sup>1, 3)</sup>。近年、遺伝子工学の進歩によって、PDLsに含まれるleptin receptor陽性（LepR<sup>+</sup>）細胞が、歯周組織の維持と再生に必要なPDLSCsの機能をもつことが証明された<sup>4, 5, 6)</sup>。実際、LepR<sup>+</sup>細胞が骨芽細胞に分化して抜歯窩を修復し、またセメント芽細胞を経てセメント細胞にも分化することから、LepR<sup>+</sup>細胞が歯周組織を形成するPDLSCsとして位置付けされている<sup>6)</sup>。

骨芽細胞分化は、bone morphogenetic protein（BMP）シグナルの活性化やrun-related transcription factor 2（Runx2）やosterix（Osx）などの転写因子が発現することによって促進する<sup>7, 8)</sup>。逆に、骨芽細胞が分泌するreceptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B（RANK）ligand（RANKL）は、マクロファージのRANKに結合することで破骨細胞前駆細胞から破骨細胞への分化を誘導する<sup>9)</sup>。つまり骨芽細胞と破骨細胞の相互作用によって骨の恒常性が保たれている訳だが、LepR<sup>+</sup>細胞がど

のようにBMPシグナルを介して、骨芽細胞分化を誘導し、かつ破骨細胞とクロストークしているかは定かではない。

最近の研究から、低密度リポタンパク質受容体ファミリーに属するlow-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) が、骨格系における骨塩量や骨量の低下と密接に関係していることが明らかになった<sup>10, 11)</sup>。複数のリガンドと高い親和性をもつLRP1が細胞膜上でリガンドと結合することで、細胞分化、細胞遊走、エンドサイトーシスなどの様々な生物学的機能を活性化させる<sup>12)</sup>。また、骨芽細胞と破骨細胞から特異的にLRP1を欠損させたマウスを使用した研究から、LRP1が破骨細胞の分化を抑制し、骨吸収を阻害することが示されている<sup>13, 14)</sup>。しかし、骨形成に影響を及ぼすLRP1の機能は未だ不明な点が多いため、本研究ではLepR<sup>+</sup> 細胞のLRP1遺伝子を欠損させたconditional knockout (cKO) マウスを作製し、LRP1の歯槽骨形成に与える影響について検討した。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

B6.129-LepRtm2 (cre) Rck/J (LepR-cre<sup>+/+</sup>) と B6.129S7-Lrp1tm2Her/J (Lrp1<sup>fl/+</sup>) マウスは Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) から供与された。LepR<sup>+</sup> 細胞のLRP1を欠損させたLepR-cre<sup>+/+</sup> Lrp1<sup>fl/fl</sup> (conditional knockout, cKO) マウスと対照となるLepR-cre<sup>-/-</sup> Lrp1<sup>+/+</sup> (wild type, WT) マウスは、雌雄のLepR-cre<sup>+/-</sup> Lrp1<sup>fl/+</sup> マウスを交配することでそれぞれ得られた。マウスは全て12時間の明暗サイクル、恒温室 (23°C) の環境下で飼育した。なお、実験に使用した6週齢雄性WTマウスとcKOマウスの大きさや行動に違いは認められなかった。飼育期間中は、ラット・マウスMF固形飼料 (オリエンタル酵母工業, 東京) と水を自由に摂取させた。本研究は、日本大学動物実験委員会の承認 (承認番号: AP21DEN022-3, AP21DEN023-3) を得て、米国国立予防衛生研究所および国際疼痛学会のガイドライン<sup>15)</sup>に従って、動物を処置した。また、全ての実験において、実験動物の苦痛軽減と使用動物数の低減に努めた。

### 2. 細胞の採取

三種混合麻酔薬 [4 mg/kg midazolam (サンド, 山形), 0.3 mg/kg medetomidine hydrochloride (日本全薬, 福島), 5 mg/kg butorphanol tartrate (明治製菓ファルマ, 東京)] を使用した過麻酔で安楽死させたWTマウスとcKOマウスから上下顎臼歯を歯根膜が付着した状態で採取し, 3.75 mg/ml kanamycin sulfate solution (明治製菓ファルマ) を添加したphosphate buffer saline (PBS) で, 4°Cで2時間

インキュベートした。その後、PBSで洗浄し、2 mg/ml collagenase（富士フィルム和光純薬、大阪）と0.25% trypsin（Invitrogen, Waltham, MA, USA）を含んだ血清非添加 $\alpha$ -minimal essential medium ( $\alpha$ -MEM) で、37°C、20分間の処理をした。この操作はさらに4回繰り返され、2~5回目に採取したWTマウスのPDLs（WT PDLs）とcKOマウスのPDLs（cKO PDLs）を培養シャーレへ播種し、10% fetal bovine serum（FBS, PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany）と1% antibiotic-antimycotic（Invitrogen）を含む $\alpha$ -MEMを使用し、37°C、5% 炭酸ガス存在下で培養した。培地交換は2~3日ごとに行い、10日間培養したPDLsを実験に使用した。

### 3. フローサイトメトリー

WT PDLsを0.05% trypsin-EDTA溶液（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）で処理後、培養シャーレから回収し、40  $\mu$ mナイロンメッシュフィルターに通して単一細胞からなる懸濁液を得た。その後、ヤギ抗マウスLepR抗体（100倍希釈, R&D systems, Minneapolis, MN, USA）、または正常ヤギIgG（100倍希釈, R&D systems）と4°Cで30分間インキュベートした。PBSで洗浄した後、二次抗体のalexa fluor 647標識ロバ抗ヤギIgG（100倍希釈, Thermo Fisher Scientific）と4°Cで30分間反応させた。フローサイトメトリーは、FACSCorusソフトウェア（BD Biosciences, San Jose, CA, USA）を備えたFACSMelodyを使用した。なお、生細胞のみの蛍光を検出するために、ヨウ化プロピジウム（PI）染色と光照射による前方散乱光と側方散乱光によって死細胞や残骸を除外した。

4. 磁気細胞分離 (magnetic cell sorting, MACS) 装置による  $LepR^+$  細胞の単離

WT PDLs と cKO PDLs を 0.5% FBS と 2 mM EDTA を含む PBS にウサギ抗ヒト  $LepR$  抗体 (100倍希釈, Proteintech Group, Rosemont, IL, USA) を加えて, 4°C で 30分間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 (5倍希釈, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を加えて, 4°C で 30分間の反応を行い, 磁気ビーズで細胞を標識した。PBS で洗浄後, 細胞浮遊液は磁石に設置した分離カラム (MACS MS, Miltenyi Biotec) へアプライし, WT PDLs と cKO PDLs に含まれる  $LepR^+$  細胞をカラムに吸着させた。分離カラムを磁石から取り外し, 吸着した  $LepR^+$  細胞をシリンジで押し出して回収した。また, カラムに吸着しなかった細胞も同時に回収し, flow through cells (FTCs) とした。回収された  $LepR^+$  細胞と FTCs 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。

#### 5. Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) と quantitative real-time PCR (qPCR)

PDLs からの RNA の抽出は, NucleoSpin RNA Plus (タカラバイオ, 草津) を使用した。10  $\mu$ g の RNA を鋳型にして, iScript advanced cDNA synthesis kit for RT-PCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) と反応させ, cDNA を合成した。RT-PCR は Thermal Cycler Dice Touch (タカラバイオ) を使用し, GoTaq Green Master Mix (Promega, Madison, WI, USA) と混合した cDNA から次の条件で遺伝子を増幅した。*LRP1* と *LepR* は, 94°C で 5分間の反応後, 94°C [30秒], 58°C [30秒],

72°C [30秒]をそれぞれ35回と32回, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) は94°Cで5分の反応後, 94°C [30秒], 58°C [45秒], 72°C [60秒]を23回, 繰り返した。使用した*LRP1*, *LepR*および*GAPDH*のプライマー配列を表1に示す。反応産物は, 臭化エチジウム含有2% アガロースゲルで電気泳動後, UVトランスイルミネーター (BioDoc-It, UVP, Jena, Germany) で可視化した。qPCRは, TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ) とCFX connect system (Bio-Rad Laboratories) を使用した。95°C [30秒]の前処理後, 95°C [5秒]と60°C [30秒]のサイクルを40回繰り返すことで, DNAを増幅した。測定データは, CFX maestro software (Bio-Rad Laboratories) を利用して,  $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法によって解析した<sup>16)</sup>。使用したプライマーの塩基配列を表2に示す。

## 6. マイクロCT撮影

WTマウスとcKOマウス (8頭/グループ) 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 (R\_mCT, リガク, 東京) で撮影した。撮影条件は, 管電圧110 kV, 管電流90  $\mu$ A, 撮影時間2分, および撮影倍率10倍とした。撮影データは, 画像解析ソフトウェア (TRI/3D-BON, ラトックシステムエンジニアリング, 東京) で分析した。歯根を含む関心領域 (region of interest, ROI) の2 × 1 × 1 mm (図1, 矩形で囲まれた領域) を抽出した。歯と歯根膜組織を除いた組織領域 (tissue volume, TV) (図1, 矩形内の黄色で示された領域) 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。歯根膜幅 (PDL幅) は, ランダムに選択し

た10枚の矢状断面像から根間中隔（interradicular septum, IRS）のPDL幅を計測し、それらの平均値から算出した。さらに、加齢に伴うLRP1の影響を調べるために、5カ月齢雄性WTマウスとcKOマウス（5頭/グループ）をマイクロCTで撮影し、BMとPDL幅を測定した。

#### 7. カルセイン標識による骨形成能評価

5週齢雄性WTマウスとcKOマウスの腹腔内に、カルセイン（10 mg/kg body weight, 富士フィルム和光純薬）を1日目と8日目に投与した（8頭/グループ）。さらに3日後、三種混合麻酔薬の過麻酔によって安楽死させ、上顎骨を採取し、4%パラホルムアルデヒド（PFA）で4°C、16時間固定後、凍結包埋剤（SCEM; Section-Lab, 広島）で包埋した。クライオフィルムIIc（SCEM; Section-Lab）を使用した川本法<sup>17)</sup>に従って、厚さ10 μmの非脱灰凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡（Olympus, 東京）で観察した。石灰化速度（mineral apposition rate: MAR）は、ImageJ（National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA）を使用して、ランダムに選択したIRS領域のカルセイン標識間距離を10か所測定し、平均値として算出した。

#### 8. 免疫組織化学染色

WTマウスとcKOマウス（5頭/グループ）から上顎骨を摘出し、4°C、16時間、4% PFAで固定した。10% エチレンジアミン4酢酸（EDTA, pH7.4）に4週間浸漬して脱灰後、パラフィン包埋し、厚さ4 μmのパラフィン切片を作製した。パラフィン切片は、キシレンで脱パラフィン後、下降エタノールに浸漬させて

親水化した。その後、切片を BLOXALL (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, USA) で 25°C, 30 分間の処理を行い、内因性ペルオキシターゼを不活化した。PBS で洗浄後、3% bovine serum albumin (富士フィルム和光純薬) を使用して、室温で 60 分間のブロッキングを行い、一次抗体のマウス抗 Runx2 モノクローナル抗体 (100 倍希釈, MBL, 東京), またはウサギ抗マウス Osx モノクローナル抗体 (100 倍希釈, Abcam, Cambridge, UK) と 4°C で 16 時間の反応を行った。PBS で洗浄後、二次抗体である horseradish peroxidase (HRP) 標識抗ウサギ IgG (ヒストファインシンプルステインマウス MAX-PO, ニチレイバイオサイエンス, 東京) と室温で 1 時間, 反応させた。切片は洗浄後, ヒストファイン DAB 基質キット (ニチレイバイオサイエンス) 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 (武藤化学, 東京) 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 (MGK-S, 松浪硝子工業株式会社, 東京) で封入した。IRS 領域の歯根膜を撮影した画像 (10 枚, 380 × 213 μm) から全細胞数と Runx2<sup>+</sup> 細胞と Osx<sup>+</sup> 細胞を計測し, さらに ImageJ を用いて, その画像の歯根膜の面積を測定することで, 単位面積あたりの Runx2<sup>+</sup> 細胞と Osx<sup>+</sup> 細胞の割合を算出した。

## 9. 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染色キット (オリエンタル酵母工業) によって破骨細胞を同定し, ヘマトキシリン溶液 (武藤化学) 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 (Olympus, 東京) で観察し、それぞれ4枚と6枚の画像 (380 × 213 μm) を得た。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。

#### 10. 骨芽細胞分化能と石灰化能の評価

WT PDLsとcKO PDLsを48-wellまたは6-well plateに、それぞれ $2 \times 10^4$ または $2 \times 10^5$  cells/wellの細胞密度で播種し、培地に100 ng/mlのBMP2を添加して培養した。2日ごとに培地交換を行い、5日間の培養後、48-well plateの細胞をNBT/BCIP液 (Roche Diagnostics GmbH, IN, USA) で染色し、alkaline phosphatase (ALP) 活性を調べた。一方、6-well plateの細胞は、RNAの抽出に使用した。さらに、石灰化能を評価するために、collagen (新田ゼラチン, 大阪) で処理をした48-well plateに $2 \times 10^4$  cells/wellの細胞密度でPDLsを播種し、5 mM β-グリセロリン酸 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 0.5 mM アスコルビン酸 (Sigma-Aldrich), および100 nM デキサメタゾン (富士フィルム和光純薬) を含む石灰化誘導培地 (osteogenic medium, OGM) で培養した。培養10日目に、PDLsを10% 中性緩衝ホルマリン (富士フィルム和光純薬) で20分間固定し、PBSで洗浄後、1% アリザリンレッド溶液 (武藤化学) で染色した。

## 11. 統計学的解析

得られたデータの統計分析は、GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA) を使用した。Shapiro-Wilk testによって、実験データの正規性が検定され、正規分布に従っていることが確認された。2つのグループ間の比較には、Mann-Whitney testで、複数のグループ間の比較は一元配置分散分析後、post-hoc Tukey検定を使用した。実験は、少なくとも3回繰り返し、結果を平均値と標準偏差で示し、有意差水準を $\alpha = 0.05$ とした。

## 結果

### 1. WT PDLsにおけるLepR<sup>+</sup> 細胞の検出

ヤギ抗マウスLepR抗体とWT PDLsを反応させることによって、LepRの強い発現を示す細胞集団が検出できた（PDLsの約2.3%，図2A）。MACSシステムでWT PDLsからFTCsとLepR<sup>+</sup> 細胞を分離し、*LRP1*の発現レベルを調べた結果、LepR<sup>+</sup> 細胞はFTCsに比べて611%の高い値を示した（図2B）。

### 2. LepR<sup>+</sup> 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WT PDLsとcKO PDLsからLepR<sup>+</sup> 細胞（WT LepR<sup>+</sup>とcKO LepR<sup>+</sup>）を分離し、*LepR*と*LRP1*の発現レベルを比較した。両細胞ともに*LepR*の発現レベルは同等であったが、*LRP1*はcKO LepR<sup>+</sup>では検出できなかった（図3A, B）。また、WTマウスとcKOマウスの上顎大白歯部歯槽骨をマイクロCTで撮影すると、cKOマウスの海綿骨に大小不同の透過像が確認できた（図3C）。同部位のBMを算出した結果、cKOマウスはWTマウスよりも12%の減少を示した（図3D）。cKO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（図3E）。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、cKO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（図3E）。このカルセイン二重標識からMARを算出すると、cKO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（図3F）。しかし、PDL幅は、WT

マウスとcKOマウスの間には差は認められなかった（図3G）。

### 3. LepR<sup>+</sup> 細胞のLRP1欠損が骨芽細胞分化に及ぼす影響

WTマウスとcKOマウスの歯根膜に分布するLepR<sup>+</sup> 細胞の骨芽細胞分化能を比較するため、Runx2<sup>+</sup> 細胞とOsx<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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（図4A-C）。このうち髄床底に近接した歯根膜にみられるcKOマウスのRunx2<sup>+</sup> 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（図4D）。両マウスのOsx<sup>+</sup> 細胞も歯根膜の全体に検出できたが（図5A-C）、Runx2<sup>+</sup> 細胞の分布と同様に、髄床底に近接した歯根膜におけるcKOマウスのOsx<sup>+</sup> 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（図5D）。

### 4. LepR<sup>+</sup> 細胞のLRP1欠損が破骨細胞形成に及ぼす影響

TRAP染色によって上顎大臼歯部歯槽骨における破骨細胞の分布を調べた。WTマウスとcKO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（図6A-C）。近心歯槽骨頂部におけるcKO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（図6D）。同じく骨髓腔側海綿骨で計測したcKO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（図6E）。

### 5. 培養PDLsにおける骨芽細胞分化能の検討

上下顎大白歯部歯根膜から分離したWT PDLsとcKO PDLsを培養し、*LRPI*の発現レベルを確認した。cKO PDLsの*LRPI*の発現レベルは、WT PDLsに比べて低く、81%の減少を示した(図7A)。続いてPDLsにBMP2を添加して5日間培養し、骨芽細胞分化能の違いを検討した。BMP2非添加のWT PDLsとcKO PDLsにおいて軽度なALP活性が確認できたが、BMP2添加によってWT PDLsのALP活性が増加した。しかし、cKO PDLsのALP活性はBMPを添加しても変化は認められなかった(図7B)。次にPDLsをOGMで10日間培養し、石灰化誘導能の違いについて調べた。WT PDLsは培養面全体にアリザリンレッド陽性の石灰化基質が確認できたが、cKO PDLsの石灰化は認められなかった(図7C)。またPDLsを5日間培養し、骨芽細胞分化マーカーの発現レベルを調べた。BMP2添加あるいは非添加に関わらず、*ALP*、*RUNX2*、および*OSX*の発現レベルは、WT PDLsに比べてcKO PDLsで低かった。BMP2を添加することでcKO PDLsの*ALP*の発現レベルは511%、*OSX*は161%の増加を示したが、同じくBMP2を添加したWT PDLsと比べると低い値であった(図7D)。さらに*RUNX2*の発現レベルはBMP2非添加のWT PDLsに比べて、cKO PDLsでやや低く、この値はBMP2を添加してもほとんど変わらず、WT PDLsよりも低値を示した。一方、WT PDLsの*BSP*と*OCN*の発現レベルはBMP2を添加することで、それぞれ688%と1,280%の増加を示したが、cKO PDLsではBMP2を添加しても*BSP*と*OCN*の発現レベルは低いままであった(図7D)。

## 6. 培養PDLsにおける骨代謝関連遺伝子発現

WT PDLsとcKO PDLsを5日間培養し、*BMP2*、*BMP4*、osteoprotegerin (*OPG*)

および*RANKL*の発現レベルを調べた。*cKO* PDLsの*BMP2*と*BMP4*の発現レベルはWT PDLsよりもそれぞれ77%と33%の減少を示した。また、*OPG*の発現レベルはWT PDLsに比べて*cKO* PDLsは43%減少したが、*RANKL*は*cKO* PDLsで150%増加した（図8）。

#### 7. *LepR*<sup>+</sup> 細胞のLRP1欠損が加齢に伴う骨量変化に与える影響

5カ月齢のWTマウスと*cKO*マウスを使用して歯槽骨量の変化を比較した。マイクロCT撮影の結果、*cKO*マウスにおける上顎臼歯部歯槽骨の海綿骨に比較的大型で不定形をした透過像が観察できた（図9A）。*cKO*マウスのBMは69%で、WTマウスの82%と比較すると低値を示したが、PDL幅には有意な差は認められなかった（図9B）。また、6週齢及び5カ月齢の同種マウス間のBMとPDL幅にも変化はみられなかった（図9B, C）。

## 考察

WTマウスのPDLsに含まれるLepR<sup>+</sup>細胞の割合を計測した結果、抗LepR抗体と反応を示す約2.3%の細胞集団が確認できた。この値は骨髄細胞中のLepR<sup>+</sup>細胞の占める値とほぼ一致しており<sup>18,19,20</sup>、PDLs中にも骨髄MSCsとほぼ同じ割合でPDLSCsの特徴をもつ細胞集団が存在することが確認できた。しかし、PDLsに含まれるLepR<sup>+</sup>細胞の数は極めて少なく、十分な量のLepR<sup>+</sup>細胞を採取することが困難であったことから、LepR<sup>+</sup>細胞を含むPDLsに着目して培養実験を行った。一方、cKOマウスのPDLsから採取した僅かなLepR<sup>+</sup>細胞の遺伝子発現を調べた結果、LRP1の遺伝子発現が完全に欠損していたことから、LepR-creマウスとLRP1-floxマウスの交配によってcKOマウスの樹立が確認できた。

現在までにLRP1 knockoutマウスを利用し、骨形成に与える影響を調べた研究は幾つかある。例えば、cathepsin K (Ctsk) promoter下で発現するCreリコンビナーゼマウスとLrp1<sup>fl/fl</sup>マウスの交配によって得られたLRP1ノックアウトマウスは、大腿骨の骨量減少と骨幹端部の骨吸収促進が認められている<sup>13</sup>。また、CRISPR-Cas9を利用したLRP1ノックアウトマウスのヘテロ体は、寛骨臼と大腿骨頭の形成不全を特徴にもつ<sup>21</sup>。つまり、LRP1の欠損が全身の骨格形成に障害を引き起こすことが、これらの研究から推測できる。今回得られたLepR<sup>+</sup>細胞のLRP1を特異的に欠損させたノックアウトマウスでは、歯槽骨皮質骨の形成不全と海綿骨の吸収が認められたことから、顎顔面領域の骨格形成にもLRP1が関与することが明らかになった。cKOマウスではIRS領域の形成不全によってPDL幅が増加すると推測したが、WTマウスとcKOマウスのPDL幅には有意な差は認

められなかった。今回の実験に供した6週齢のWTマウスとcKOマウスはもともとLepR<sup>+</sup>細胞数が少なかったため、cKOマウスでみられた皮質骨の減少量は、PDL幅を増加させるまでには至らなかったと考える。また、PDLsのLepR<sup>+</sup>細胞の割合は加齢に伴い増加する<sup>6)</sup>ことから、5カ月齢のWTマウスとcKOマウスのPDL幅を測定したが、PDL幅に有意な差はなかった。一般的なマウスは生後5～8週で、歯根完成期を迎えるため、それ以降は著しい歯槽骨形成は生じない<sup>22,23)</sup>。つまり、加齢によって歯槽骨における骨代謝が減退し、5カ月齢cKOマウスでもPDL幅には影響がみられなかったと考える。

cKOマウスは歯根膜の部位によって違いはあるものの、歯根膜に分布するRunx2<sup>+</sup>細胞とOsx<sup>+</sup>細胞の減少がみられた。また、BMP2添加あるいは非添加で培養したcKO PDLsは、同じくBMP2添加あるいは非添加のWT PDLsと比べてALP、RUNX2、およびOSXの発現レベルが低かった。さらに、cKO PDLsのBSPとOCNについても発現レベルが低く、BMP2を添加しても顕著な変化は認められなかった。本来、BMP2は骨芽細胞分化促進因子で、骨芽細胞は転写因子のRunx2とOsxの発現を増しながらALP活性を高め、OCNやBSPなどの細胞外基質を分泌することで、石灰化を誘導する<sup>24)</sup>。すなわち、BMP2によって骨芽細胞分化が促進されなかったcKO PDLsはWT PDLsに比べて、Smadなどのリン酸化タンパクを介したBMP2シグナル伝達<sup>11)</sup>が減弱しており、その結果、Runx2とOsxの発現が抑制され、石灰化基質の分泌が阻害されたと考える。

BMPは石灰化誘導能を有する骨芽細胞への分化に重要な役割を演じている。BMP2とBMP4は骨芽細胞から分泌され、オートクラインに機能して、骨芽細胞

分化と基質の石灰化を促進する<sup>25,26,27)</sup>。cKO PDLsを培養してBMP2とBMP4の発現を調べた結果、WT PDLsと比べて、これらの発現レベルが減少したことから、LRP1を欠損したLepR<sup>+</sup>細胞はBMP2とBMP4の分泌が抑制され、骨芽細胞分化が低下したと考えられる。一方、破骨細胞の分化過程において、骨芽細胞が産生するRANKLは、RANKと結合することで破骨細胞分化を促進し、逆にOPGはRANK-RANKLシグナルを阻害することで破骨細胞分化を抑制する<sup>28)</sup>。この2つの因子の発現レベルを調べた結果、cKO PDLsはWT PDLsと比べてOPGは低く、RANKLは高かった。実際に、cKOマウスの上顎歯槽骨では骨髓腔側海綿骨と近心歯槽骨頂部に比較的多くの破骨細胞が観察できた。つまり、cKOマウスの骨髓腔側海綿骨内に出現した破骨細胞は、骨髓内の低い骨芽細胞分化能をもったLepR<sup>+</sup>細胞が、RANKLを盛んに分泌しながら、破骨細胞の前駆細胞と相互作用することによって形成されたものと考えられる。一方、cKOマウスの近心歯槽骨頂部に出現した破骨細胞は、LepR<sup>+</sup>細胞から分泌されたRANKLが、血管を介して侵入した破骨細胞の前駆細胞に作用することで破骨細胞形成を促したと推測できる。また、歯根膜のLepR<sup>+</sup>細胞は、血管近傍に分布しているため、血球系細胞に作用しやすい環境が構築されている<sup>6)</sup>。このことから、LRP1が欠損されたLepR<sup>+</sup>細胞によるRANKLが、近心歯槽骨頂部の破骨細胞分化を促進したと考える。

本研究から、cKOマウス歯槽骨の骨量減少は、PDLsの骨芽細胞分化の阻害と破骨細胞形成の促進に起因するもので、LepR<sup>+</sup>細胞に発現しているLRP1が、BMP2とBMP4の分泌を促進し、逆にRANKLの発現を抑制することで、加齢とは関係なく歯槽骨の形成と維持のために機能していることが示唆された。

## 結論

LRP1遺伝子が欠損されたLepR<sup>+</sup>細胞を有するcKOマウスを作製し、歯槽骨形成に及ぼす影響を調べるとともに、cKOマウスのPDLsを採取し、骨芽細胞への分化能についてWTマウスと比較検討した結果、cKOマウスについて以下の結論を得た。

1. 上顎大臼歯部IRS領域歯槽骨の皮質骨形成量低下と海綿骨の骨吸収促進によって、歯槽骨のBMが減少したが、PDL幅には差は認められなかった。
2. 髄床底に近接した上顎大臼歯部IRS領域の歯根膜で、Runx2<sup>+</sup>細胞とOsx<sup>+</sup>細胞が減少した。
3. PDLsの骨芽細胞分化が抑制され、石灰化誘導能が低下した。また、BMP2、BMP4、およびOPGの発現が減少し、RANKLの発現が増加した。
4. 一方、5カ月齢の上顎大臼歯部歯槽骨のBMは低い値を示したが、PDL幅には差は認められなかった。

以上のことから、LepR<sup>+</sup>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。

## 参考文献

- 1) Tomokiyo A, Wada N, Maeda H (2019) Periodontal ligament stem cells: regenerative potency in periodontium. *Stem Cells Dev* 28, 974-985.
- 2) Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364, 149-155.
- 3) Trubiani O, Pizzicannella J, Caputi S, Marchisio M, Mazzon E, Paganelli R, Paganelli A, Diomedede F (2019) Periodontal ligament stem cells: current knowledge and future perspectives. *Stem Cells Dev* 28, 995-1003.
- 4) Hsu YC (2015) Theory and practice of lineage tracing. *Stem Cells* 33, 3197-3204.
- 5) 中村純基 (2022) 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. *日大歯学* 96, 35-44.
- 6) Oka H, Ito S, Kawakami M, Sasaki H, Abe S, Matsunaga S, Morita S, Noguchi T, Kasahara N, Tokuyama A, Kasahara M, Katakura A, Yajima Y, Mizoguchi T (2023) Subset of the periodontal ligament expressed leptin receptor contributes to part of hard tissue-forming cells. *Sci Rep* 13, 1-13.
- 7) Nishimura R, Hata K, Matsubara T, Wakabayashi M, Yoneda T (2012) Regulation of bone and cartilage development by network between BMP signalling and transcription factors. *J Biochem* 151, 247-254.
- 8) Hojo H, Chung UI, Ohba S (2017) Identification of the gene-regulatory landscape in skeletal development and potential links to skeletal regeneration. *Regen Ther* 6, 100-

107.

- 9) Elson A, Anuj A, Barnea-Zohar M, Reuven N (2022) The origins and formation of bone-resorbing osteoclasts. *Bone* 164, 116538.
- 10) Cao H, Lei S, Deng HW, Wang YP (2012) Identification of genes for complex diseases using integrated analysis of multiple types of genomic data. *PLoS One* 7, 1-8.
- 11) Sims AM, Shephard N, Carter K, Doan T, Dowling A, Duncan EL, Eisman J, Jones G, Nicholson G, Prince R, Seeman E, Thomas G, Wass JA, Brown MA (2008) Genetic analyses in a sample of individuals with high or low BMD shows association with multiple Wnt pathway genes. *J Bone Miner Res* 23, 499-506.
- 12) Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK (2008) LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol Rev* 88, 887-918.
- 13) Lu D, Li J, Liu H, Foxa GE, Weaver K, Li J, Williams BO, Yang T (2018) LRP1 suppresses bone resorption in mice by inhibiting the RANKL-stimulated NF- $\kappa$ B and p38 pathways during osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res* 33, 1773-1784.
- 14) Bartelt A, Behler-Janbeck F, Beil FT, Koehne T, Müller B, Schmidt T, Heine M, Ochs L, Yilmaz T, Dietrich M, Tuckermann JP, Amling M, Herz J, Schinke T, Heeren J, Niemeier A (2018) *Lrp1* in osteoblasts controls osteoclast activity and protects against osteoporosis by limiting PDGF-RANKL signaling. *Bone Res* 6, 1-10.
- 15) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain

- in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.
- 16) Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 25, 402-408.
- 17) Kawamoto T, Shimizu M (2000) A method for preparing 2- to 50-micron-thick fresh-frozen sections of large samples and undecalcified hard tissues. *Histochem Cell Biol* 113, 331-339.
- 18) Mizoguchi T, Pinho S, Ahmed J, Kunisaki Y, Hanoun M, Mendelson A, Ono N, Kronenberg HM, Frenette PS (2014) Osterix marks distinct waves of primitive and definitive stromal progenitors during bone marrow development. *Dev Cell* 29, 340-349.
- 19) Zhou BO, Yue R, Murphy MM, Peyer JG, Morrison SJ (2014) Leptin-receptor-expressing mesenchymal stromal cells represent the main source of bone formed by adult bone marrow. *Cell Stem Cell* 15, 154-168.
- 20) Yue R, Zhou BO, Shimada IS, Zhao Z, Morrison SJ (2016) Leptin receptor promotes adipogenesis and recedes osteogenesis by regulating mesenchymal stromal cells in adult bone marrow. *Cell Stem Cell* 18, 782-796.
- 21) Yan W, Zheng L, Xu X, Hao Z, Zhang Y, Lu J, Sun Z, Dai J, Shi D, Guo B, Jiang Q (2022) Heterozygous LRP1 deficiency causes developmental dysplasia of the hip by impairing triradiate chondrocytes differentiation due to inhibition of autophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 119, e2203557119.
- 22) Lav R, Krivanek J, Anthwal N, Tucker AS (2023) Wnt signaling from Gli1-

- expressing apical stem/progenitor cells is essential for the coordination of tooth root development. *Stem Cells Reports* 18, 1015-1029.
- 23) Huang X, Bringas Jr P, Slavkin HC, Chai Y (2009) Fate of HERS during tooth root development. *Dev Biol* 334, 22-30.
- 24) Takeda S, Karsenty G (2001) Central control of bone formation. *J Bone Miner Metab* 19, 195-198.
- 25) Francis P, Richardson M, Brickell P, Tickle C (1994) Bone morphogenetic proteins and a signalling pathway that controls patterning in the developing chick limb. *Development* 120, 209-218.
- 26) Ye Y, Jiang Z, Pan Y, Yang G, Wang Y (2022) Role and mechanism of BMP4 in bone, craniofacial, and tooth development. *Arch Oral Biol* 140, 105465.
- 27) Han Y, You X, Xing W, Zhang Z, Zou W (2018) Paracrine and endocrine actions of bone-the functions of secretory proteins from osteoblasts, osteocytes, and osteoclasts. *Bone Res* 6, 1-11.
- 28) Udagawa N, Koide M, Nakamura M, Nakamichi Y, Yamashita T, Uehara S, Kobayashi Y, Furuya Y, Yasuda H, Fukuda C, Tsuda E (2021) Osteoclast differentiation by RANKL and OPG signaling pathways. *J Bone Miner Metab* 39, 19-26.

図および表

表1 PCRに使用したプライマーの塩基配列

Name	Primer sequence		Size (bp)
<i>GAPDH</i>	Forward	5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'	223
	Reverse	5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'	
<i>LepR</i>	Forward	5'-ACGTGGTGAAGCATCGTACT-3'	472
	Reverse	5'-TGCTTGTCGATAGCATCTTTGG-3'	
<i>LRP1</i>	Forward	5'-CTGAAGGCTCCGAGTACCAG-3'	194
	Reverse	5'-GTAGGAGATTGTGCCCGTGT-3'	

表2 qPCRに使用したプライマーの塩基配列

Name	Primer sequence	
<i>Actin</i>	Forward	5'-TGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3'
	Reverse	5'-AAGAAGGAAGGCTGGAAAAGAG-3'
<i>LRP1</i>	Forward	5'-GGACCACCATCGTGGAAA-3'
	Reverse	5'-TCCCAGCCACGGTGATAG-3'
<i>ALP</i>	Forward	5'-CGGATCCTGACCAAAAACC-3'
	Reverse	5'-TCATGATGTCCGTGGTCAAT-3'
<i>Runx2</i>	Forward	5'-CCAGCCACCGAGACCAACC-3'
	Reverse	5'-GTTTGACGCCATAGTCCCTCC-3'
<i>OSX</i>	Forward	5'-AGAGATCTGAGCTGGGTAGAGG-3'
	Reverse	5'-AAGAGAGCCTGGCAAGAGG-3'
<i>BSP</i>	Forward	5'-GAAAATGGAGACGGCGATAG-3'
	Reverse	5'-CATTGTTTTCTCTTCGTTTGA-3'
<i>OCN</i>	Forward	5'-AGACTCCGGCGCTACCTT-3'
	Reverse	5'-CTCGTCACAAGCAGGGTTAAG-3'
<i>BMP2</i>	Forward	5'-CGGACTGCGGTCTCCTAA-3'
	Reverse	5'-GGGGAAGCAGCAACACTAGA-3'
<i>BMP4</i>	Forward	5'-GAGGAGTTTCCATCACGAAGA-3'
	Reverse	5'-GCTCTGCCGAGGAGATCA-3'
<i>OPG</i>	Forward	5'-GTTTCCCGAGGACCACAAT-3'
	Reverse	5'-CCATTCAATGATGTCCAGGAG-3'
<i>RANKL</i>	Forward	5'-AGCCATTTGCACACCTCAC-3'
	Reverse	5'-CGTGGTACCAAGAGGACAGAGT-3'

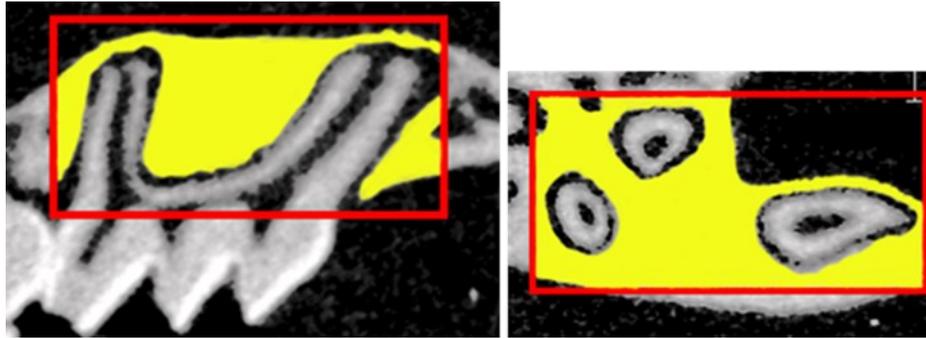


図1 骨形態計測解析に用いた測定範囲

歯槽骨量の測定にあたり，歯根を含む骨領域（赤の矩形領域，ROI）を抽出した。歯と歯根膜組織を除いた組織の領域（黄色で示した領域，TV）を測定し，TVにおける骨量（BV）の割合（BV/TV）をbone mass（BM）として算出した。測定は画像解析ソフトウェアを利用した。

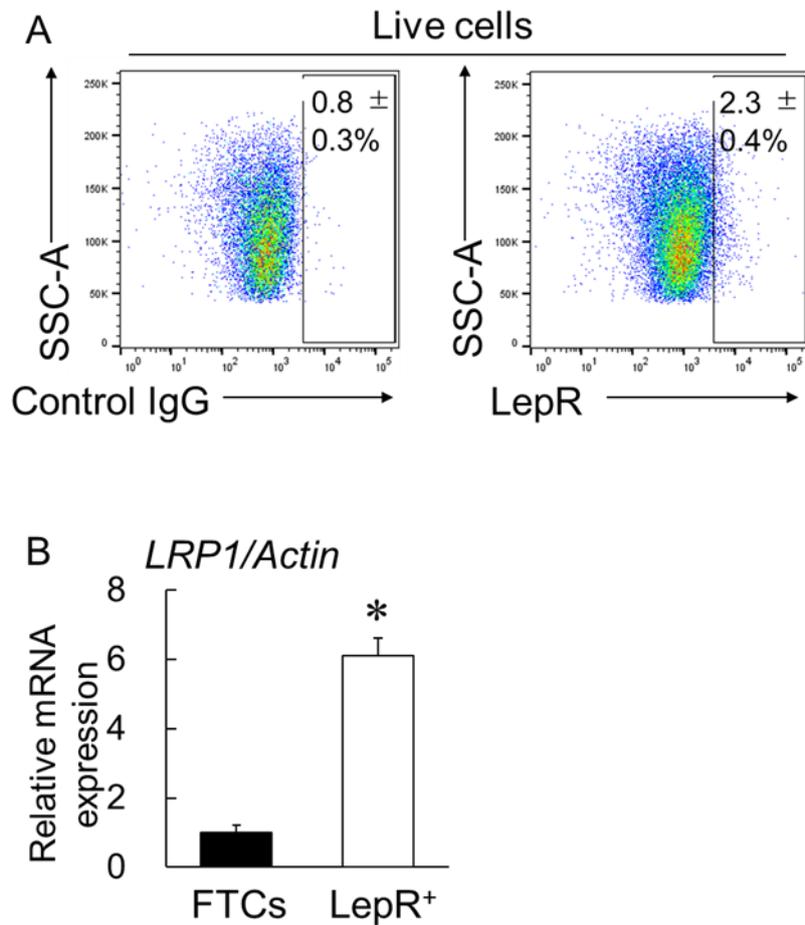


図2 PDLsに含まれるLepR<sup>+</sup>細胞

A：フローサイトメトリーによるLepR<sup>+</sup>細胞の検出，PDLsを正常ヤギIgG（Control IgG：左図）とヤギ抗マウスLepR抗体（右図）によって染色した細胞から蛍光プロットを得た。B：MACSカラムを通過したflow-through cells（FTCs）とカラムに吸着したLepR<sup>+</sup>細胞のLRP1の発現レベルを調べた。\* $p < 0.001$ （versus FTCs,  $n = 5$ , in each）

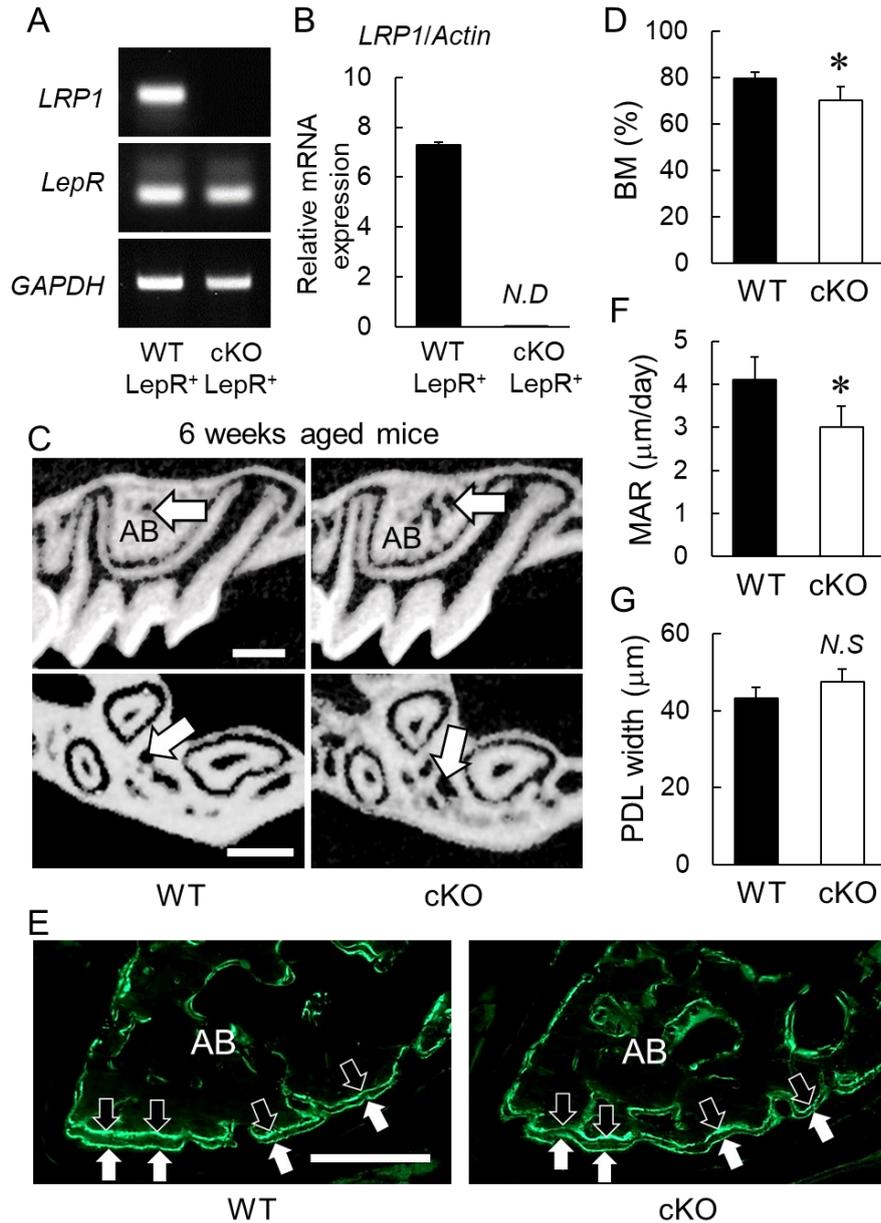


図3 cKOマウスの歯槽骨量と骨形成能の評価

A, B : WT PDLsとcKO PDLsに含まれるLepR<sup>+</sup>細胞 (WT LepR<sup>+</sup>とcKO LepR<sup>+</sup>) の*LRP1*と*LepR*の発現をRT-PCR (A) で、また*LRP1*の発現レベルをqPCR (B) によって調べた。C : マイクロCTでWTマウス (WT) とcKOマウス (cKO) の上顎臼歯部歯槽骨を撮影した。上段は矢状面、下段は水平面を示す (スケールバー : 400 μm) , 矢印 : 透過部位。D : WTマウス (WT) とcKOマウス (cKO) のマイクロCT画像から歯槽骨量 (BM) を計測した。E : カルセイン二重標識によってWTマウス (WT) とcKOマウス (cKO) の骨形成能を評価した。カルセインは7日間隔で2回、腹腔内に投与して骨組織を標識した (黒矢印は1回目投与, 白矢印は2回目投与による標識, スケールバー : 400 μm)。F : WTマウス (WT) とcKOマウス (cKO) のカルセイン二重標識からIRS領域の石灰化速度 (MAR) を測定した。G : WTマウス (WT) とcKOマウス (cKO) のマイクロCT画像からIRS領域のPDL幅 (PDL width) を計測した。ABは歯槽骨を示す。\* $p < 0.05$  (versus WT,  $n = 8$ , in each) , N.D : not detected, N.S : not significant

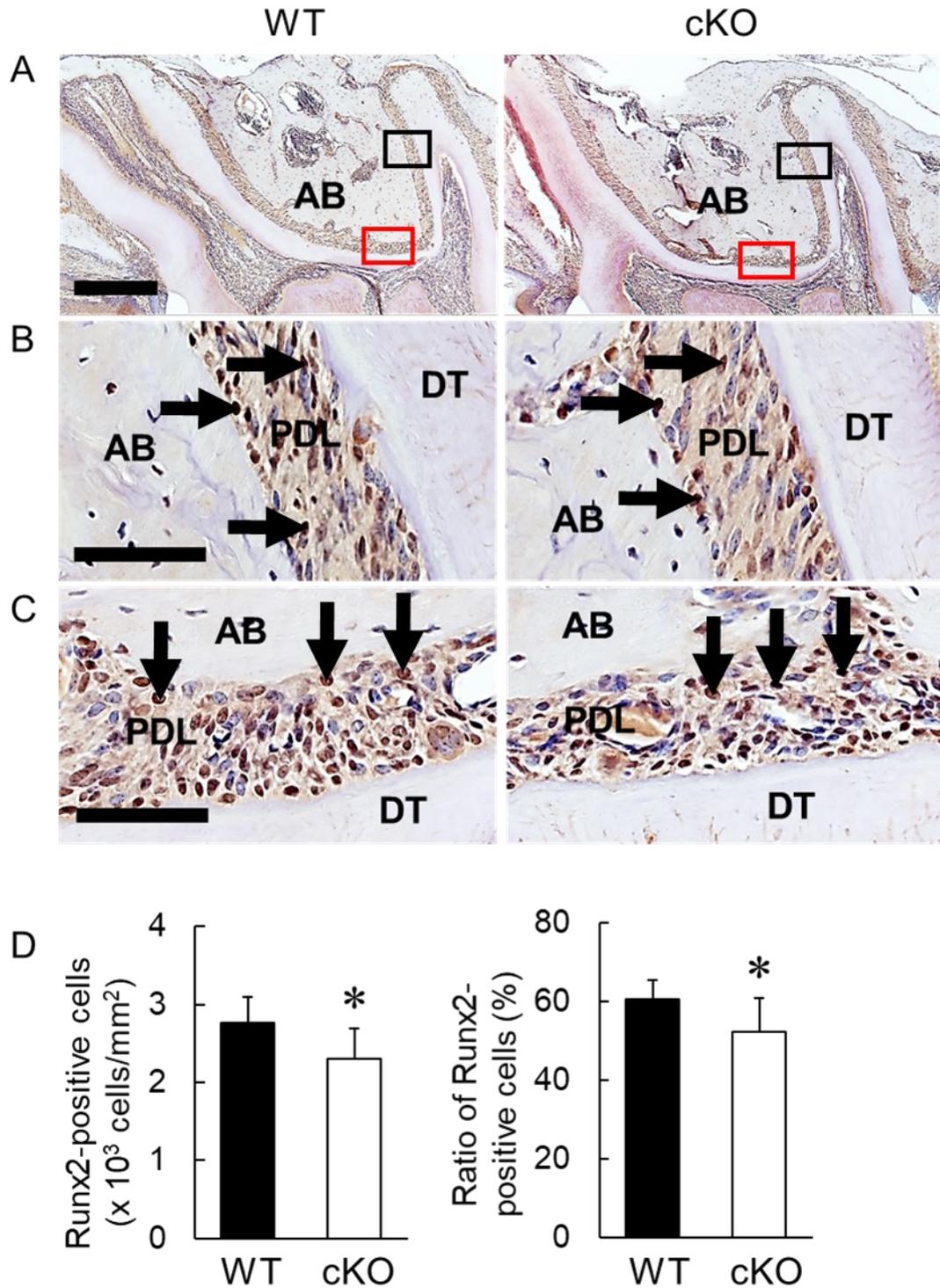


図4 上顎大白歯部IRS領域の歯根膜にみられるRunx2<sup>+</sup>細胞

A : WTマウス (WT) とcKOマウス (cKO) のRunx2<sup>+</sup>細胞の分布 (スケールバー : 300 μm) , B : Aに示す黒矩形の拡大像 (スケールバー : 50 μm) , C : Aに示す赤矩形の拡大像 (スケールバー : 50 μm) , 矢印はRunx2<sup>+</sup>細胞を示す。D : WTマウス (WT) とcKOマウス (cKO) のRunx2<sup>+</sup>細胞の数 (左) と全細胞に対する比率 (右) を計測した。ABは歯槽骨, PDLは歯根膜, DTは象牙質を示す。\**p* < 0.05 (versus WT, *n* = 5, in each)

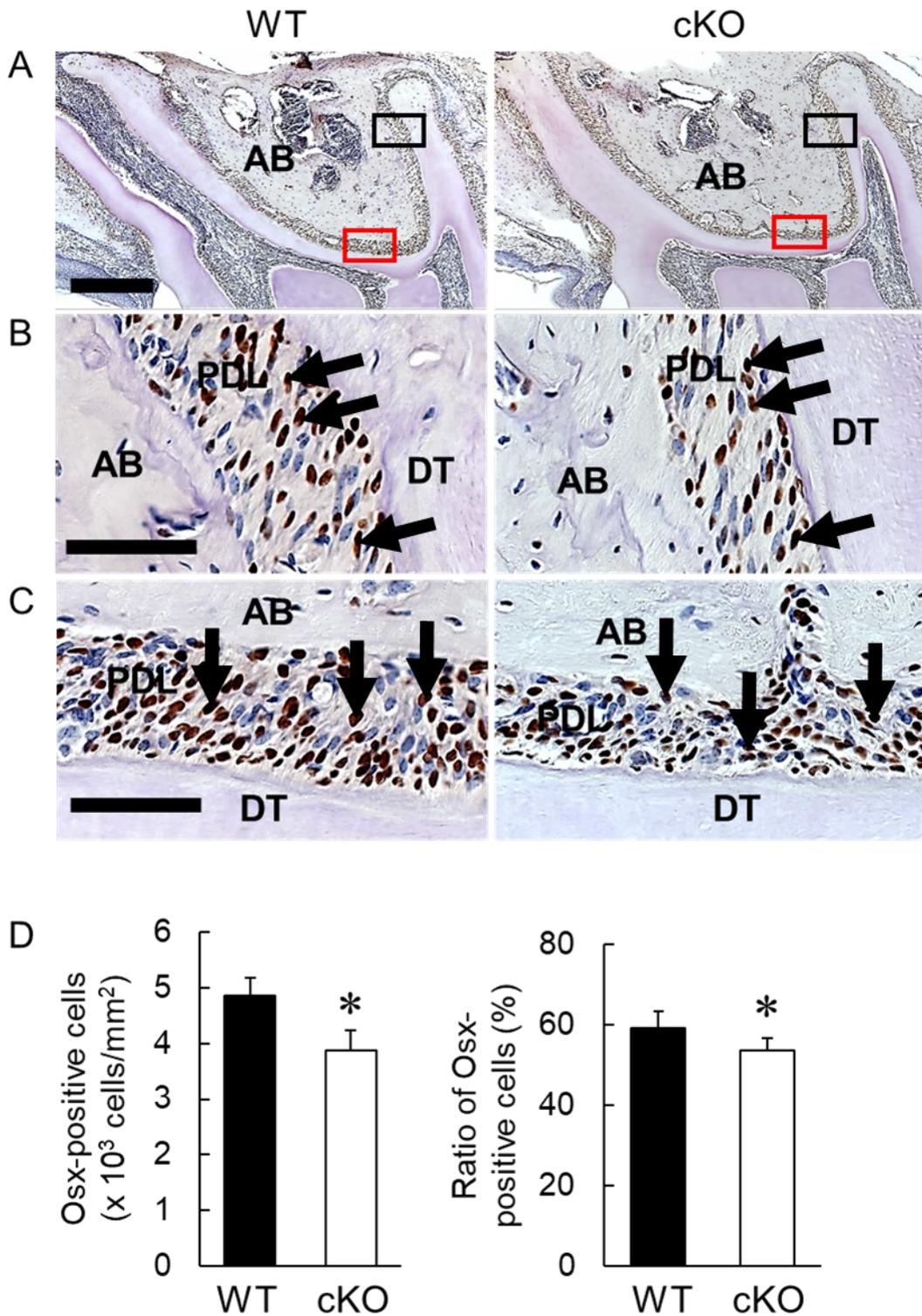


図5 上顎大白歯部IRS領域の歯根膜にみられるOsx<sup>+</sup>細胞

A: WTマウス (WT) とcKOマウス (cKO) のOsx<sup>+</sup>細胞の分布 (スケールバー: 300  $\mu$ m),  
 B: Aに示す黒矩形の拡大像 (スケールバー: 50  $\mu$ m), C: Aに示す赤矩形の拡大像 (スケールバー: 50  $\mu$ m), 矢印はOsx<sup>+</sup>細胞を示す。D: Osx<sup>+</sup>細胞の数 (左) と全細胞に対する比率 (右) を計測した。ABは歯槽骨, PDLは歯根膜, DTは象牙質を示す。\* $p < 0.05$  (versus WT, n = 5, in each)

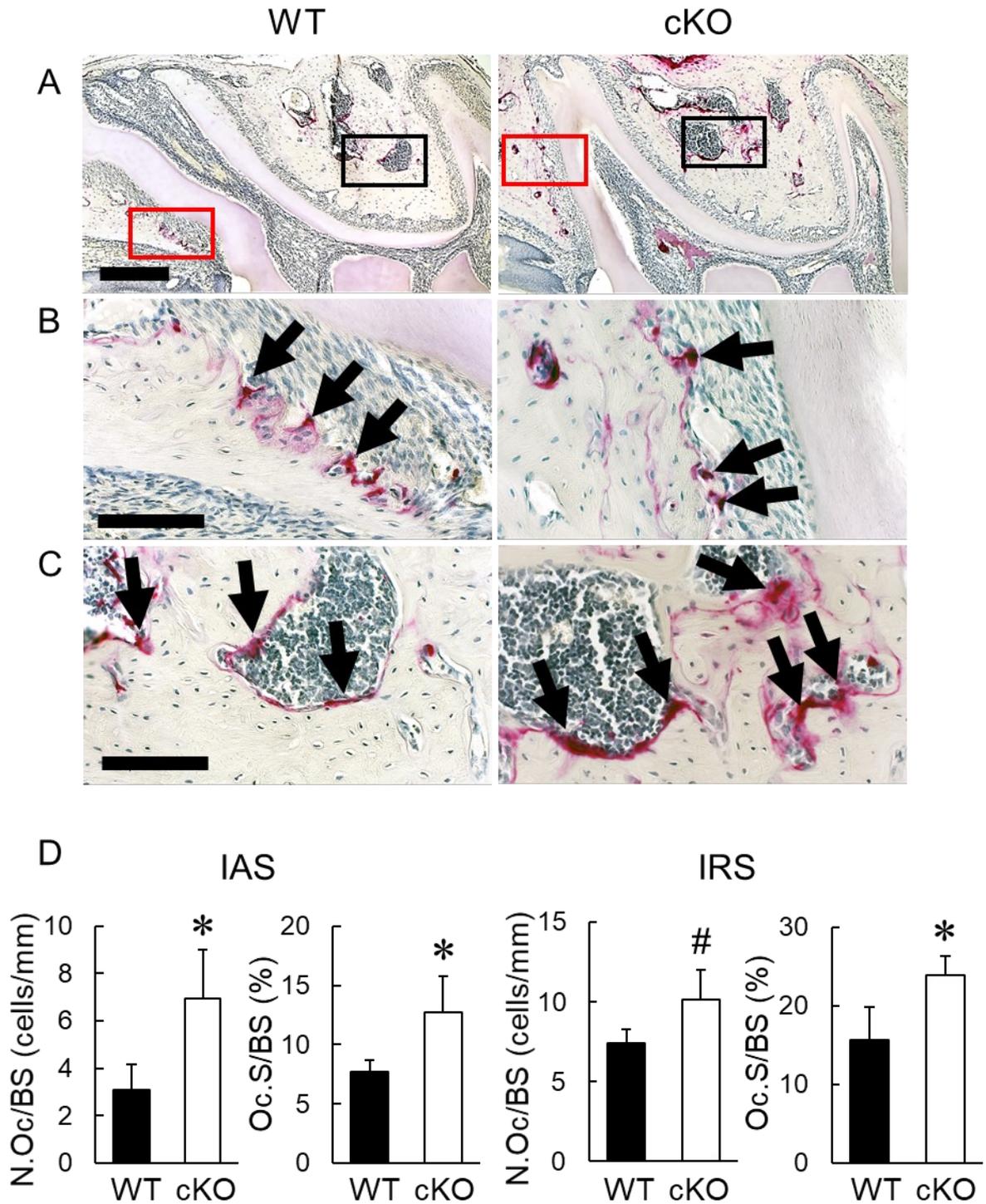


図6 上顎大白歯部IASとIRS領域における破骨細胞の同定

A : WTマウス (WT) と cKOマウス (cKO) のTRAP染色 (スケールバー : 300  $\mu$ m) , B : AのIAS領域における赤矩形の拡大像 (スケールバー : 100  $\mu$ m) , C : AのIRS領域における黒矩形の拡大像 (スケールバー : 100  $\mu$ m) , 矢印は破骨細胞を示す。D, E : IAS領域 (D) とIRS領域 (E) の骨表面 (BS) に対する破骨細胞数 (N.Oc) と, 骨表面 (BS) に対する破骨細胞接着面 (Oc.S) をそれぞれ算出した。# $p < 0.05$ , \* $p < 0.01$  (versus WT, n = 5, in each)

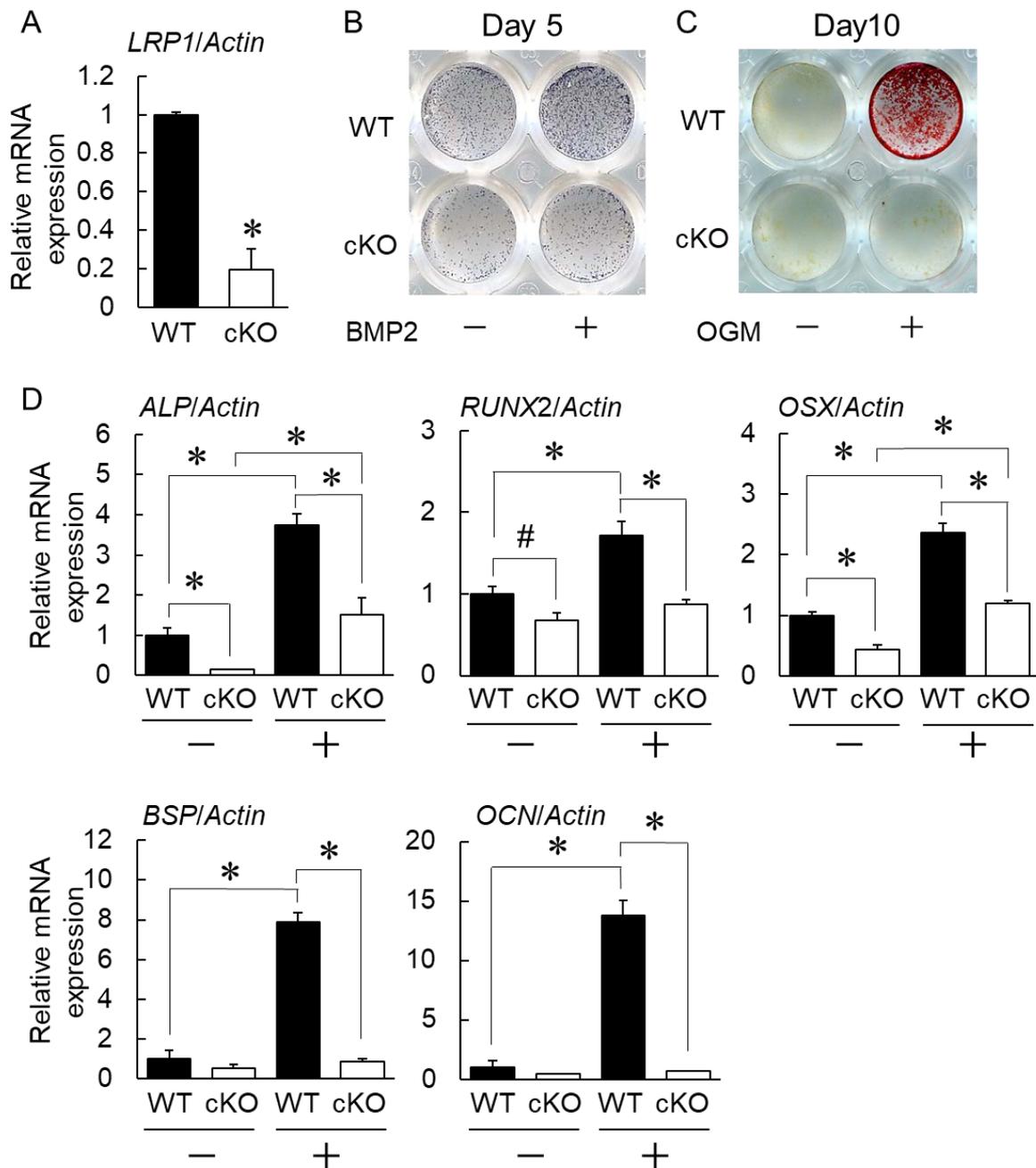


図7 PDLsの骨芽細胞分化能と石灰化能の評価

A : WT PDLs (WT) と cKO PDLs (cKO) の *LRP1* 発現レベルを比較した。B : BMP2 添加 (+) あるいは非添加 (-) で 5 日間培養した WT PDLs と cKO PDLs を NBT/BCIP 液で染色して ALP 活性の変化を比較した。C : OGM (+) あるいは通常培地 (-) で 10 日間培養した WT PDLs と cKO PDLs をアリザリンレッド染色し、基質の石灰化について評価した。D : BMP2 添加 (+) あるいは非添加 (-) で 5 日間培養した WT PDLs と cKO PDLs から RNA を抽出して、qPCR によって、*ALP*、*RUNX2*、*OSX*、*BSP*、および *OCN* の発現レベルを比較した。# $p < 0.05$ , \* $p < 0.01$  (versus WT,  $n = 3$ , in each)

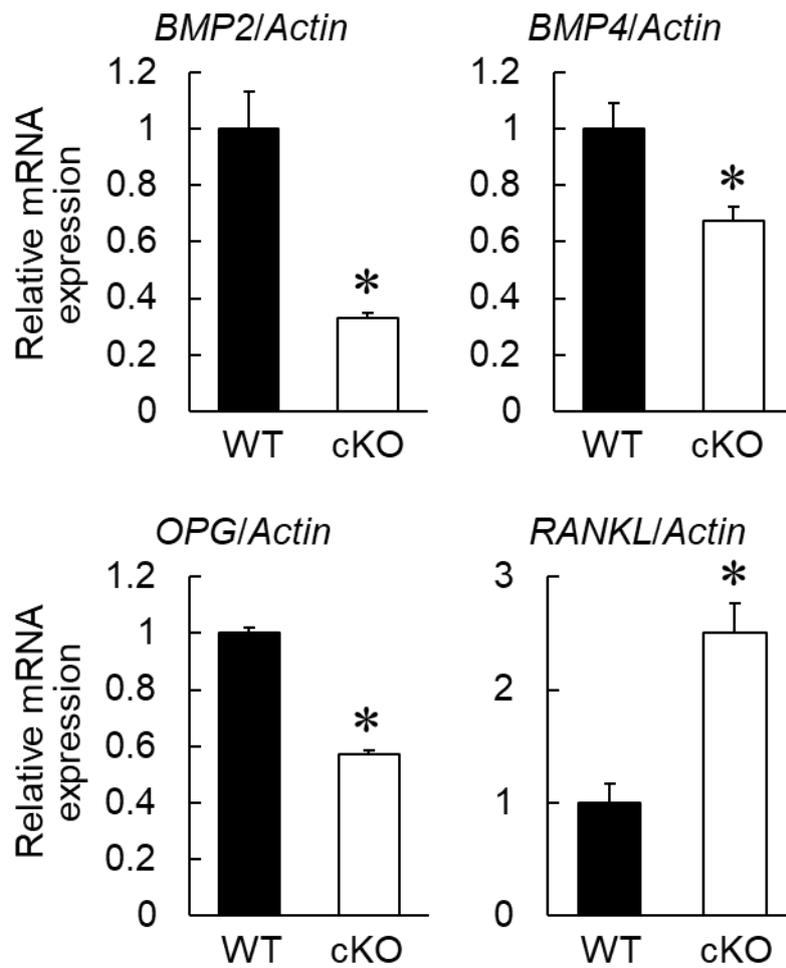


図8 骨代謝関連因子の遺伝子発現

通常培地で10日間培養したWT PDLs (WT) とcKO PDLs (cKO) から抽出したRNAを用いて、*BMP2*、*BMP4*、*OPG*、および*RANKL*の発現レベルをqPCRによって測定した。  
\* $p < 0.01$  (versus WT PDLs,  $n = 3$ , in each)

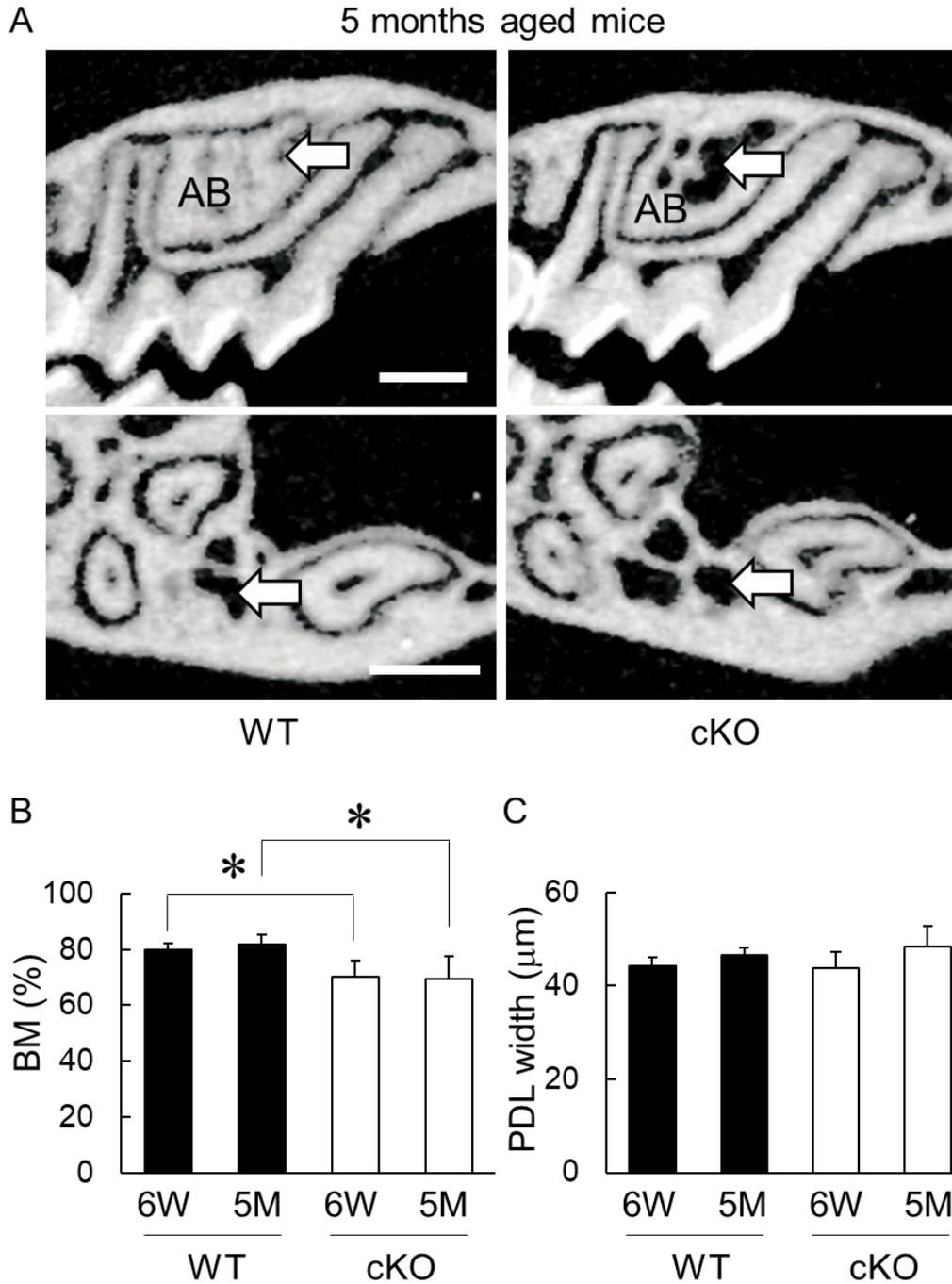


図9 5カ月齢マウスにおける歯槽骨形成の評価

A : 5カ月齢のWTマウス (WT) とcKOマウス (cKO) の上顎大白歯部歯槽骨をマイクロCTで撮影した。上段は矢状面, 下段は水平面を示す (スケールバー : 400  $\mu\text{m}$ ), 矢印 : 透過部位。B : cKOマウス (cKO) のマイクロCT画像から歯槽骨量 (BM) を計測した。図3Dのデータを用いて, 6週齢マウス (6W) と5カ月齢 (5M) を比較した。C : 得られたWTマウス (WT) とcKOマウス (cKO) のマイクロCT画像からIRS領域のPDL幅 (PDL width) を計測した。図3Gのデータを用いて, 6週齢マウス (6W) と5カ月齢 (5M) を比較した。ABは歯槽骨を示す。\* $p < 0.05$  (versus WT,  $n = 6$ , in each)