

# 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

中 村 純 基

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻 口腔構造機能学分野

日本大学歯学部歯科矯正学講座

(指導: 本吉 満 教授, 二宮 禎 准教授)

## 要旨:

目的: 歯根膜幹細胞(PDLSCs)は、歯根膜および骨の再生に重要な細胞である。Leptin receptor(Lepr)は間葉系幹細胞(MSCs)のマーカーの一つで、PDLSCsにもその発現がみられる。本研究では、歯根膜細胞(PDLs)からLepr陽性細胞を分離し、その幹細胞性と多分化能を検証し、またlow-density lipoprotein receptor-related protein1(LRP1)陽性細胞の役割について検討した。

方法: マウス臼歯からPDLsを採取し、Lepr陽性細胞を分離した。幹細胞マーカーの発現と多分化能はreal-time RT-PCRとoil red O染色によって調べた。また、抜歯窩におけるPDLSCsとLRP1の関係は免疫組織化学的に、LRP1の役割はsiRNAをPDLsへ導入することで検討した。

結果: Lepr陽性細胞はMSCsマーカーを発現し、骨芽細胞と脂肪細胞へ分化した。また、LRP1陽性のPDLsは抜歯後早期に出現し、その後、骨形成を誘導した。PDLsのLRP1 mRNAを発現抑制すると、*bmp-2*, *bmp-4*, *opg*の発現減少と*rankl*の発現増加が認められた。

結論: Lepr陽性細胞はPDLSCsの特徴をもち、LRP1は骨形成の調節に関わることが示唆された。

キーワード: 歯根膜細胞, 幹細胞, 骨芽細胞分化, leptin receptor, low-density lipoprotein receptor-related protein 1

## Multipotency of leptin receptor-positive cells and function of LRP1 positive-cells in the mouse periodontal ligament

Yoshiki Nakamura

Nihon University Graduate School of Dentistry, Major in Oral structural and Functional Biology

Department of Orthodontics, Nihon University School of Dentistry

(Directors: Prof. Mitsuru Motoyoshi and Assoc. Prof. Tadashi Ninomiya)

**Abstract:** Purpose: Periodontal ligament stem cells (PDLSCs), which differentiate into osteoblasts, cementoblasts and fibroblasts, are included in periodontal ligament cells (PDLs) and play a role in periodontal tissue regeneration. Leptin receptor (Lepr), a marker of mesenchymal stem cells, is expressed in PDLSCs. However, the function of Lepr-positive PDLs is not well understood. To investigate the characteristics of Lepr-positive PDLs, experiments using mouse-derived PDLs were designed *in vivo* and *in vitro*.

Methods: Lepr-positive PDLs were isolated from PDLs in mouse molars and analyzed by real-time RT-PCR and immunohistochemical staining. To define the effect of low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) on PDLs in tooth socket, functional examination was performed using siRNA technique.

Results: Lepr-positive PDLs expressed the stem cell markers and differentiated into osteoblasts and adipocytes. Immunohistochemical staining on tooth socket revealed that LRP1-positive PDLs were first detected in the socket at 3 days after tooth extraction, increased in the granulation tissues at 5 days, and differentiated into osteoblasts and osteocytes with bone formation at 7 days. Furthermore, the expression of *bmp-2*, *bmp-4*, and *opg* decreased, whereas *rankl* expression increased in LRP1 siRNA-introduced PDLs.

Conclusion: Lepr-positive PDLs has multipotency similar to PDLSCs, and LRP1 is involved in bone regeneration in tooth socket by regulating the interaction between osteoblasts and osteoclasts.

(受付: 令和4年1月15日)

責任著者連絡先: 中村純基

日本大学歯学部歯科矯正学講座

〒101-8310 東京都千代田区神田駿河台 1-8-13

TEL : 03-3219-8105

FAX : 03-3219-8312

E-mail : deyo18032@gnihon-u.ac.jp

**Keywords:** periodontal ligament cells, stem cells, osteoblast differentiation, leptin receptor, low-density lipoprotein receptor-related protein 1

## 緒 言

抜歯窩の修復は、骨折の修復と同様に、炎症期、増殖期および骨形成期の過程を辿る<sup>1,2)</sup>。炎症期は、炎症性細胞が抜歯窩に浸潤し、血管内皮細胞や未熟な線維芽細胞とともに肉芽組織を形成する。その後、増殖期に移行し、幹細胞から分化した骨芽細胞によって幼弱な骨が作られる。そして、骨形成期では骨芽細胞と破骨細胞の相互作用による骨のリモデリングが繰り返され、抜歯窩は成熟した骨によって埋められるようになる。

抜歯窩修復の分子メカニズムを解明するには、歯根膜細胞(PDLs)に含まれる歯根膜幹細胞(PDLSCs)の特性を調べる必要がある。これまでに、Hosoyaら<sup>3)</sup>は、green fluorescent protein(GFP)で標識したラット臼歯を野生型ラット背部へ皮下移植した結果、GFP標識PDLsが骨芽細胞に分化し、骨組織を形成することを示した。また、Seoら<sup>4)</sup>は、PDLsに存在するCD146とStro-1陽性の細胞がセメント芽細胞、骨芽細胞および線維芽細胞に分化することを明らかにしている。Yuanら<sup>5)</sup>も、Wntに反応するPDLsが抜歯窩修復の骨再生に関与することを報告している。これらの研究成果は、PDLsに含まれるPDLSCsが歯槽骨の形成に重要な役割を演じていることを示すものである。

PDLSCsの特性を詳細に解明するには、PDLSCsの分離ならびに解析が必須である。PDLSCsは、CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146, CD166およびStro-1などの間葉系幹細胞(MSCs)と同じ細胞膜抗原をもつことが知られている<sup>4,6)</sup>。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<sup>7)</sup>、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、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<sup>8,9)</sup>。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、これらの幹細胞性と分化能を検証することとした。

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<sup>10)</sup>。また、前駆骨芽細胞やPDLSCsから分泌されたBMP-2は、オートクリンに作用し、これらの細胞から骨芽細胞への分化を促す<sup>11)</sup>。

BMP-2と同様にreceptor activator of the NF- $\kappa$ 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<sup>12,13)</sup>。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では、RANKL産生が増加し、破骨細胞分化が促進する<sup>14)</sup>。このLRP1は、transforming growth factor- $\beta$ 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<sup>15)</sup>。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<sup>16)</sup>。しかし、抜歯窩の骨再生に関する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。

## 材料および方法

### 1. 実験動物

雄性 ddy マウス(6 週齢, 日本エスエルシー, 浜松)は、12 時間の明暗サイクルを調整できる恒温室(23℃)で飼育した。また、飼育期間は、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、日本大学歯学部動物実験委員会の承認(承認番号: AP18DEN037-3)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>17)</sup>に従って、動物の処置を行い、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. PDLs の調製

5% isoflurane(大日本住友製薬, 大阪)吸入および5 mg/kg butorphanol tartrate(Meiji Seika ファルマ, 東京)を使用し、深麻酔下で心臓からの全採血によって安楽死させたマウス上下顎の臼歯を抜歯し、3.75 mg/ml kanamycin sulfate solution(Meiji Seika ファルマ, 東京)に4℃, 2時間浸漬した。その後、phosphate buffer saline(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℃, 20分間インキュベートした後、PDLsを回収した。この操作は4回繰り返され、毎回の酵素処理後に採取したPDLsは、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 を用いて、37°C、5% 炭酸ガス存在下で培養した。なお、PDLs は凍結保存することなく、その都度抜去臼歯から採取・調製し実験に供した。

### 3. Lepr 強発現細胞 (Lepr<sup>hi</sup> PDLs) の分離

培養した PDLs を 0.05% trypsin 処理によってシャーレから回収した後、PBS に懸濁させ、ウサギ抗 Lepr ポリクロナール抗体 (100 倍希釈, プロテインテック・ジャパン, 東京) で、4°C、30 分間、インキュベートした。その後、PBS で洗浄し、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、30 分間の反応を行い、細胞を磁気ビーズで標識した。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、PDLs に含まれる Lepr 強発現 PDLs (Lepr<sup>hi</sup> PDLs) をカラムに吸着させた。分離カラムを PBS で洗浄後、磁石から取り外し、吸着した Lepr<sup>hi</sup> PDLs をシリンジで押し出し回収した。また、分離カラムに吸着しなかった flow through も同時に回収し Lepr<sup>ft</sup> PDLs として、比較対象にした。回収された Lepr<sup>hi</sup> PDLs と Lepr<sup>ft</sup> PDLs は培養シャーレで、7 日間培養してから実験に供した。

### 4. Lepr<sup>hi</sup> PDLs と Lepr<sup>ft</sup> PDLs の分化能

Lepr<sup>hi</sup> PDLs と Lepr<sup>ft</sup> PDLs をそれぞれ 48-well plate に播種し ( $5 \times 10^4$  cells/well), 10%FBS を含む  $\alpha$ -MEM で 16 時間培養した後、100 ng/ml BMP-2 (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を添加し、骨芽細胞へ分化させた。培地交換は 2~3 日毎に実施し、7 日目に RNA を抽出した。得られた RNA から cDNA を合成し、*alkaline phosphatase (alp)*, *osterix (osx)*, *osteocalcin (ocn)* の遺伝子発現について検討した。

同様に、24-well plate に播種した Lepr<sup>hi</sup> PDLs と Lepr<sup>ft</sup> PDLs ( $1 \times 10^5$  cells/well) を 48 時間培養した後、脂肪細胞分化因子 (0.5 mM isobutyl-1-methyl xanthine, 100 nM dexamethasone, 0.1 mM indomethacin, 10  $\mu$ g/ml insulin) を添加することで脂肪細胞へ分化させた。培地交換は 2~3 日毎に実施し、21 日目に 10% 中性ホルマリン溶液によって細胞を固定し、oil red O 溶液で染色した。染色後の細胞は 1 ml isopropanol を加えて、色素を溶出させ、マイクロプレート吸光分光光度計 (SpectraMax ABS Plus, モレキュラーデバイスジャパン, 東京) を利用して、波長 492 nm の吸光度を計測した。さらに、培養 21 日目の細胞から RNA を抽出し、cDNA の合成後、*adiponectin* と *c/ebp* の遺伝子発現について調べた。

### 5. RNA 抽出と real-time RT-PCR

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、PrimeScript reverse transcriptase (タカラバイオ) と反応させ、cDNA を合成した。Real-time RT-PCR は、TB Green Premix Ex Taq II (タカラバイオ) と CFX connect system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を使用した。95°C、30 秒間の前処理後、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>18)</sup>。使用したプライマーの塩基配列を表 1 に示す。

表 1 Real-time RT-PCR 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'-AAGAAGGAAGGCTGAAAAGAG-3'
<i>lepr</i>	Forward	5'-TCAGAATTTTGGGTGGAAAA-3'
	Reverse	5'-GTCCAGGTGAGGAGCAAGAG-3'
<i>cd29</i>	Forward	5'-TGGCAACAATGAAGCTATCG-3'
	Reverse	5'-ATGTCGGGACCAGTAGGACA-3'
<i>cd44</i>	Forward	5'-CTCCTCTTTATCCGGAGCAC-3'
	Reverse	5'-TGGCTTTTGTAGTGCACAGT-3'
<i>cd73</i>	Forward	5'-ATGAACATCCTGGGCTACGA-3'
	Reverse	5'-GTCCTCCACACCGTTATCAA-3'
<i>cd90</i>	Forward	5'-AACTCTTGGCACCATGAACC-3'
	Reverse	5'-TCGGGACACCTGCAAGAC-3'
<i>cd105</i>	Forward	5'-CATTGCACTTGGCCTACGA-3'
	Reverse	5'-GATGTTACTCTTGGCTGTCC-3'
<i>cd106</i>	Forward	5'-TCTTACCTGTGCGCTGTGAC-3'
	Reverse	5'-ACTGGATCTTCAGGGAATGAGT-3'
<i>cd146</i>	Forward	5'-AAACTGGTGTGCGTCTTCTTG-3'
	Reverse	5'-CTTTCTCTCCTGGCACAC-3'
<i>cd166</i>	Forward	5'-CTTCAGTGTGGGGAATGG-3'
	Reverse	5'-TTATGCCTTCAGGCTGTCC-3'
<i>alp</i>	Forward	5'-CGGATCCTGACCAAAAACC-3'
	Reverse	5'-TCATGATGTCCGTGGTCAAT-3'
<i>osx</i>	Forward	5'-AGAGATCTGAGCTGGGTAGAGG-3'
	Reverse	5'-AAGAGAGCCTGGCAAGAGG-3'
<i>ocn</i>	Forward	5'-AGACTCCGGCGCTACCTT-3'
	Reverse	5'-CTCGTCAACAAGCAGGGTTAAG-3'
<i>adiponectin</i>	Forward	5'-GGAGAGAAAGGAGATGCAGGT-3'
	Reverse	5'-CTTCTGCCAGGGGTTTC-3'
<i>c/ebp</i>	Forward	5'-AAACAACGCAACGTGGAGA-3'
	Reverse	5'-GCGGTCATTGTCACTGGTC-3'
<i>bmp2</i>	Forward	5'-CGGACTGCGGTCTCCTAA-3'
	Reverse	5'-GGGGAAGCAGCAACTAGA-3'
<i>bmp4</i>	Forward	5'-GAGGAGTTCCATCAGGAAGA-3'
	Reverse	5'-GCTCTGCCGAGGAGATCA-3'
<i>opg</i>	Forward	5'-GTTTCCCAGGACCACAAT-3'
	Reverse	5'-CCATTCAATGATGTCCAGGAG-3'
<i>ranks</i>	Forward	5'-AGCCATTGACACCTCAC-3'
	Reverse	5'-CGTGGTACCAAGAGGACAGAGT-3'



## 6. マウス臼歯の抜歯と組織切片作成

2% isoflurane 吸入 および 5 mg/kg butorphanol tartrate (Meiji Seika ファルマ, 東京) により, マウスを麻酔し, 上顎第一臼歯を鉗子によって抜歯した。抜歯後, 1, 3, 5, 7 および 10 日目に上顎骨を摘出し, 4% paraformaldehyde で 4℃, 16 時間固定した。採取した上顎骨は 10% EDTA 溶液に 4 週間浸漬して脱灰後, パラフィン包埋し, 厚さ約 4  $\mu$ m の切片を作成した。

## 7. Micro-CT 撮影

抜歯後 5, 7 および 10 日目に, 2% isoflurane 吸入 および 5 mg/kg butorphanol tartrate (Meiji Seika ファルマ, 東京) により, マウスを麻酔し, 上顎第一臼歯の抜歯窩を micro-CT (R\_mCT, リガク, 東京) で撮影した。撮影条件は, 管電圧 100 kV, 管電流 160  $\mu$ A, 撮影時間 2 分 および撮影倍率 10 倍とした。撮影データの解析は, 画像処理ソフトの i-VIEW (モリタ, 東京) を使用した。

## 8. 免疫組織化学

PDLs を 35 mm glass base dish (イワキ, 東京) に播種し ( $1 \times 10^3$  cells/dish), 16 時間の培養後, 4% paraformaldehyde で固定し, 0.2% triton-X 100 で透過処理を施した。PBS で洗浄後, ヤギ抗マウス Lepr ポリクロナール抗体 (100 倍希釈, R&D system) で, 4℃, 16 時間の反応を行い, PBS で洗浄後, 二次抗体の alexa fluor 555 標識ロバ抗ヤギ IgG (Invitrogen) と室温で, 1 時間反応させた。PBS で洗浄後, Hoechst 33342 溶液 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) で核染色を行った後, 蛍光顕微鏡 (オリンパス, 東京) で観察した。

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性にした。0.3% 過酸化水素水で, 内因性ペルオキシターゼを失活させ, PBS で洗浄後, 3% bovine serum albumin (富士フィルム和光純薬) によって室温で 1 時間のブロッキングを行った。ウサギ抗 LRP1 ポリクロナール抗体 (100 倍希釈, Abcam, Cambridge, UK) で, 4℃, 16 時間の反応後, PBS で洗浄し, 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) を滴下して, さらに室温で 1 時間, 静置した。PBS で洗浄後, 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) を用いて, LRP1 の局在を可視化し, hematoxylin solution (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ることで脱水し, キシレンで透徹後, 標本用封入剤 (MGK-S, 松浪硝子工業, 大阪) で封入した。

## 9. siRNA を使用した LRP1 発現の抑制

PDLs を 6-well plate に播種 ( $7 \times 10^4$  cells/well) した後, Lipofectamine RNAiMAX transfection reagent (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) と 10 nM の LRP1 siRNA (終濃度: 8 pmol/well, Qiagen, Hilden, Germany) を添加し, 3 日間培養した。使用した LRP1 siRNA 1~4 と negative control siRNA (Qiagen) の塩基配列を表 2 に示す。LRP1 siRNA 1~4 を導入した PDLs をそれぞれ siPDL1~4 とし, negative control siRNA を cPDL, また siRNA 非処理の PDLs を iPDL とした。

## 10. Western blot

siPDL1~4, iPDL, cPDL は細胞溶解液 (0.1% NP-40 lysis buffer, 20 mM Tris (pH7.5), 50 mM  $\beta$ -glycerophosphate, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 25 mM NaF, 1 mM  $\text{Na}_2\text{VO}_4$ , セリン/システイン/アスパラギン酸/サーモリシン様プロテアーゼ阻害剤 (Sigma Aldrich)) でそれぞれ処理し, 14,000 $\times$ g, 15 分間の遠心分離によって, 上清を回収した。得られた上清のタンパク量は, protein assay rapid kit Wako II (富士フィルム和光純薬) によって定量した。30  $\mu$ g のタンパクを含むそれぞれの上清は SDS sample buffer と混和後, 95℃ で 5 分間加熱し, 12% polyacrylamide gel (Bio-Rad Laboratories) へアプライし, 電気泳動で分画した。泳動終了後, nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) に転写し, PVDF blocking reagent (東洋紡, 大阪) に浸漬させることで非特異的反応のブロッキングを行った。PBS で洗浄後, membrane はウサギ抗 LRP1 ポリクロナール抗体 (2,000 倍希釈, Abcam) または, マウス抗  $\beta$ -actin 抗体 (10,000 倍希釈, Sigma Aldrich) と混和した Can Get Signal 溶液 (東洋紡) で, 4℃, 16 時間反応させた。洗浄後, membrane は, HRP 標識 2 次抗体 (Bio-Rad Laboratories) と混和した Can Get Signal 溶液中に室温で 1 時間反応させてから, ECL 溶液 (GE Healthcare Life Sciences) に浸し, その発光を ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories) で撮影した。取り込んだ画像は ImageJ (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) を利用し, LRP1 および  $\beta$ -actin のバンドのデンストメトリ処理から得たグラフの面積を計算することで, タンパクの発現強度を解析した。

## 11. 統計学的解析

得られたデータの統計分析には, GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) を用いた。

表 2 LRP1 の発現抑制に使用した siRNA の塩基配列

Name	Target sequence
Negative control	5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3'
siLRP1 1	5'-CACGTTGGTTATGCACATGAA-3'
siLRP1 2	5'-CTGCCGGGTGTACAAATGTAA-3'
siLRP1 3	5'-TGGCAGATGTATTAACATCAA-3'
siLRP1 4	5'-CGGAGTCACTTACATCAATAA-3'

2つのグループ間の比較は unpaired Student *t*-test, また複数のグループ間の比較は, 一元配置分散分析を行った後に, *post hoc* テストとして Tukey 検定を行った。実験は, 3回繰り返し, 得られた結果を平均値と標準偏差で示すとともに, 有意水準を 0.05 とした。

## 結 果

### 1. Lepr 強発現細胞の幹細胞性について

培養した PDLs に対する Lepr 抗体の特異性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(図1)。MACSによって分離した Lepr<sup>hi</sup> PDLs にみられる Lepr の発現レベルを, real time RT-PCR で検討した。その結果, Lepr<sup>hi</sup> PDLs は分離カラムに吸着しなかった Lepr<sup>fl</sup> PDLs よりも約 1.8 倍高い Lepr 遺伝子発現を示した(図2A)。また, Lepr<sup>hi</sup> PDLs では, MSCs の細胞膜抗原である *cd44*, *cd73*, *cd90*, *cd105*, *cd146* の発現が Lepr<sup>fl</sup> PDLs と比べて強かった(図2B)。次に, BMP-2 を Lepr<sup>hi</sup> PDLs の培養系に加えて骨芽細胞へ分化誘導した結果, Lepr<sup>hi</sup> PDLs は, 骨芽細胞マーカーである *alp*, *osx*, *ocn* の発現が Lepr<sup>fl</sup> PDLs よりも強かった(図2C)。同様に, 脂肪細胞分化誘導因子を Lepr<sup>hi</sup> PDLs の培養系に加えて, 脂肪細胞への分化能について調べた。その結果, Lepr<sup>hi</sup> PDLs と Lepr<sup>fl</sup> PDLs のどちらにも oil red O 陽性細胞が観察できたが, Lepr<sup>hi</sup> PDLs では成熟脂肪細胞の特徴である脂肪滴(図2D)と脂肪細胞マーカーの *adiponectin* と *c/ebp* の発現が強かった(図2E)。

### 2. 抜歯窩の骨再生と LRP1 陽性細胞の動態

抜歯窩の骨再生を観察するために, 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(図3A)。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日目になると抜歯窩全体は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(図3B)。5日目になると, 抜歯窩には未熟な骨組織の形成が始まり, LRP1 陽性細胞が窩内の広範囲に認められた(図3B)。7日目の抜歯窩は骨組織によってほとんど置換され, LRP1 の発現も再生骨周辺の骨芽細胞や骨小腔内の骨細胞に確認できた(図3B)。しかし, 10日目になると, LRP1 の発現は弱まり, 一部の骨芽細胞や骨細胞のみに発現がみられた(図3B)。

### 3. LRP1 の PDLs における役割

Lepr 陽性細胞に発現している LRP1 の機能を明らかにするため, PDLs に siRNA (siLRP1 1~4) を導入して LRP1 mRNA の発現を抑制した。その結果, 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, 顕著に低かった(図4A, B)。特に LRP1 の発現抑制が確認できた siPDL1 と siPDL4 から RNA を抽出して, 骨代謝関連因子の発現について調べた。その結果, siPDL1 と siPDL4 は, コントロール(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(図4C)。

## 考 察

本研究によって, PDLs から分離した Lepr<sup>hi</sup> PDLs が幹細胞としての細胞膜抗原マーカーを発現していること, また誘導培地によって Lepr<sup>hi</sup> PDLs が骨芽細胞および脂肪細胞へ分化することが示された。すなわち, 歯根膜の Lepr 陽性細胞は多分化能を有する幹細胞であることを実験的に検証することができた。具体的には, Lepr<sup>hi</sup> PDLs において, Lepr<sup>fl</sup> PDLs よりも有意に高い *cd44*, *cd73*, *cd90*, *cd105* および *cd146* の発現が認められた。これらの細胞膜抗原は, 骨髄由来の MSCs だけでなく, PDLSCs でも高い発現レベルを示すことが報告されており<sup>6,19,20</sup>, なかでも CD73, CD90, CD105 は, MSCs として同定するために必要な細胞膜抗原とされている<sup>20</sup>。

多分化能については, PDLSCs がセメント芽細胞, 脂肪細胞, そして線維芽細胞へ分化することを Seo ら<sup>4</sup>が報告して以降, PDLSCs の同定において, 間葉系細胞への分化能を実際に示すことが求められるようになった。このため, PDLs の side population や限界希釈によって得られたクローンについても, MSCs の細胞膜抗原を発

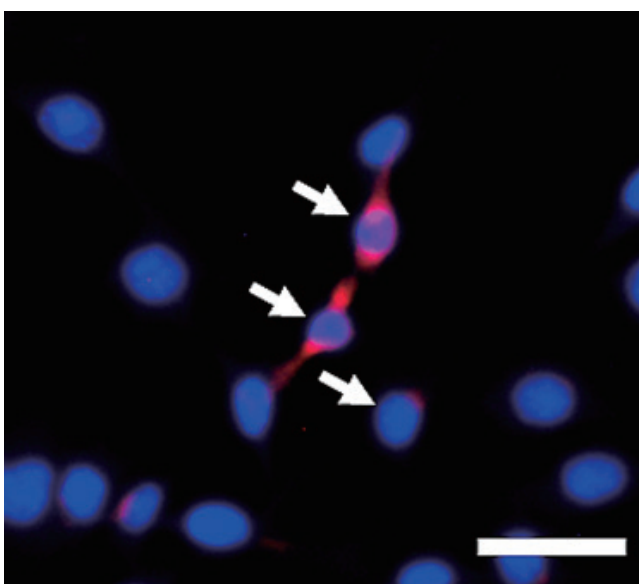


図1 PDLs の免疫組織化学による Lepr 陽性細胞の同定  
矢印は Lepr 陽性細胞を示す(スケールバー: 30  $\mu$ m)。

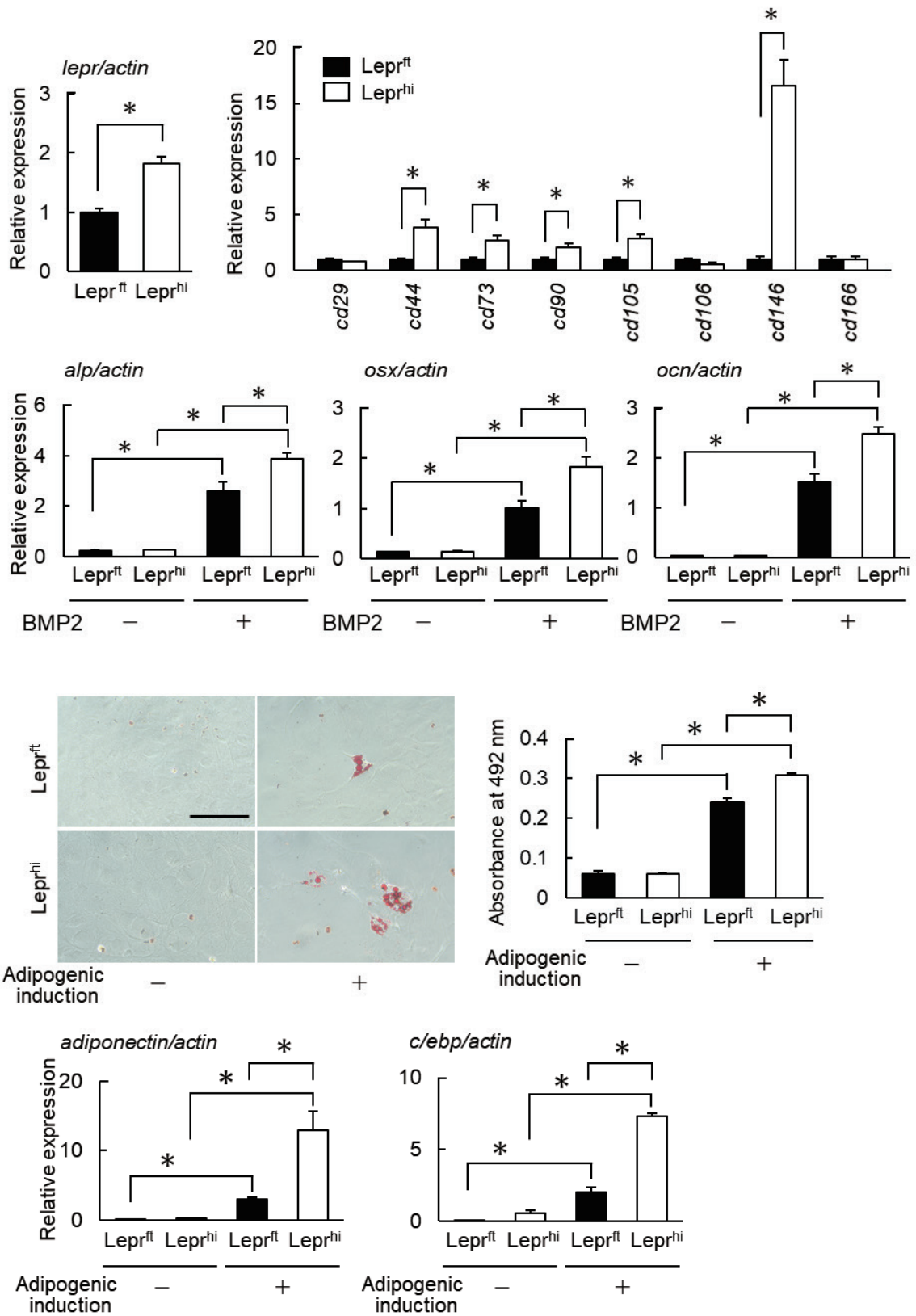


図 2 Lepr<sup>hi</sup> PDLs の幹細胞性の検討

A : Lepr 強発現 PDLs (Lepr<sup>hi</sup> PDLs) と flow through PDLs (Lepr<sup>ft</sup> PDLs) における Lepr の遺伝子発現, B : Lepr<sup>hi</sup> PDLs と Lepr<sup>ft</sup> PDLs の細胞膜抗原 (幹細胞抗原) の遺伝子発現, C : Lepr<sup>hi</sup> PDLs と Lepr<sup>ft</sup> PDLs の骨芽細胞マーカーの遺伝子発現, D : Oil red O 染色による Lepr<sup>hi</sup> PDLs と Lepr<sup>ft</sup> PDLs の脂肪細胞分化能の評価 (スケールバー : 100 μm), E : Lepr<sup>hi</sup> PDLs と Lepr<sup>ft</sup> PDLs の脂肪細胞マーカーの遺伝子発現, \**p* < 0.01, 統計学解析は A と B では unpaired Student *t*-test を, C と D では一元配置分散分析と Tukey 検定を使用した (*n* = 3)。



現し、かつ骨芽細胞と脂肪細胞へ分化するということから PDLSCs と認知されるに至っている<sup>11,21)</sup>。本研究では、BMP-2 で刺激した *Lepr<sup>hi</sup>* PDLs では *alp*, *osx*, *ocn* の強い発現が認められ、脂肪細胞への分化誘導によって脂肪滴をみる成熟脂肪細胞への分化が生じることを示した。これらの結果は、*Lepr<sup>hi</sup>* PDLs が骨芽細胞と脂肪細胞のそれぞれに分化できる能力をもち、*Lepr<sup>hi</sup>* PDLs が PDLSCs であることを明確に支持する知見だと考えられる。

本研究では、抗 *Lepr* 抗体による分取で flow through とした *Lepr<sup>fl</sup>* PDLs においても、*Lepr<sup>hi</sup>* PDLs よりも有意に低レベルだが、骨芽細胞と脂肪細胞の分化マーカーが検出された。培養 PDLs には、弱い *Lepr* 陽性を示す細胞が散見されたことから、使用した抗 *Lepr* 抗体に対して affinity の低い *Lepr* 陽性細胞が flow through に含まれている可能性があり、また、その *Lepr* 陽性細胞と陰性細胞の存在比がマーカー発現量の検出に影響を及ぼ

した可能性もある。本研究の結果が示すように、*Lepr* は、PDLSCs の分離に有用であるが、他の細胞膜抗原との組み合わせで用いることも検討することも必要と考えられる。

本研究は、LRP1 陽性細胞が抜歯後 3 日目に抜歯窩内に現れ、その後、抜歯窩内の骨再生に関わることを明らかにした。PDLSCs として考えられている *Lepr* 陽性細胞や *axin2* 陽性細胞もまた、抜歯後 3 日で、窩内に動員されて骨組織を再生する細胞として働く<sup>5,9)</sup>。LRP1 陽性細胞は、*Lepr* 陽性細胞および *axin2* 陽性細胞と類似した出現パターンや分布<sup>5)</sup>を示したことから、PDLSCs であり、かつ、LRP1 の発現が PDLSCs の細胞分化および抜歯窩再生に関わっている可能性がある。しかし、本研究では、LRP1 陽性細胞が PDLSCs である所見を得ておらず、この仮説を立証するためには、さらなる検討が必要である。

PDLSCs の細胞分化は、BMP シグナルによって調節

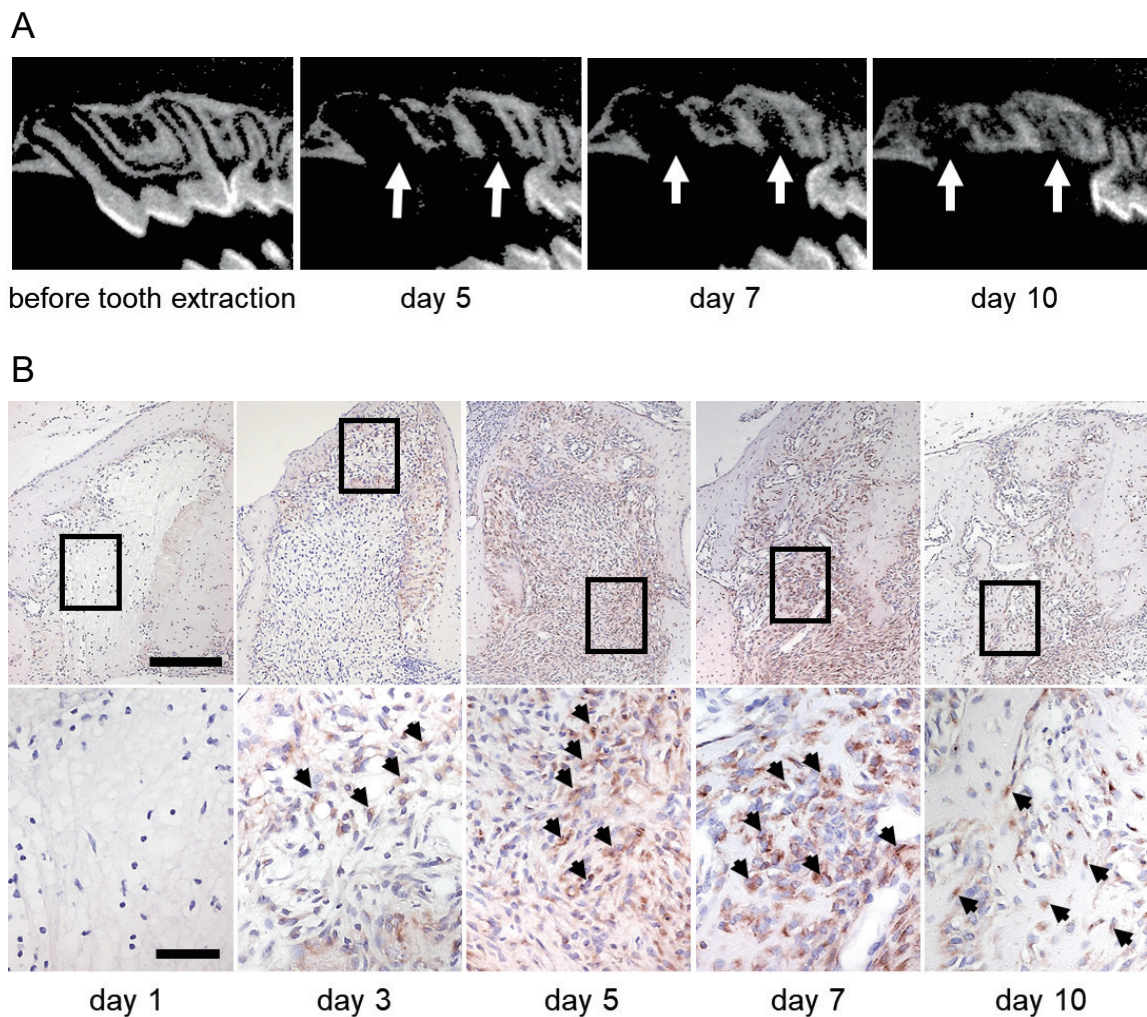


図3 抜歯窩の骨再生と LRP1 発現の経日的観察  
 A : Micro-CT による抜歯窩の経日的観察, 矢印は抜歯窩を示す。B : 免疫組織化学による抜歯窩の LRP1 陽性細胞, 下段は上段の囲線の拡大像, 矢印は LRP1 陽性細胞を示す。スケールバー : 200  $\mu$ m(上段), 50  $\mu$ m(下段)

されており<sup>22)</sup>, Katagiriら<sup>23)</sup>は, BMP-2とレチノイン酸の共刺激が, マウス多分化性細胞株C3H10T1/2のALP発現を誘導することを報告した。その後, 脊椎動物の四肢形成に関わるBMP-4も, 前駆骨芽細胞の骨芽細胞への分化を誘導する因子として報告された<sup>24,25)</sup>。本研究において, LRP1 siRNAのPDLsへの導入は, *bmp-2*と*bmp-4*およびRANKLのデコイレセプターである*opg*の発現レベルを抑制し, 破骨細胞分化に必要な*rankl*の発現を促進した。これらの結果は, PDLsに発現しているLRP1が, PDLSCsの骨芽細胞分化を誘導するとともに, その一方で, PDLSCsのOPGの発現増加を介して前駆破骨細胞の破骨細胞への分化を阻害することを意味

している。これまでの報告によれば, PDLSCsはBMP-2を分泌することによって, 自らの骨芽細胞分化を促し<sup>11,26)</sup>, またMSCsのRANKL発現は前駆破骨細胞の破骨細胞分化を誘導する<sup>26)</sup>と考えられている。

本研究で得られた結果から, PDLSCsは, エンドサイトーシス型の受容体膜タンパクLRP1の関与のもとに, BMP-2やRANKL, さらにはBMP-4やOPGを産生して, オートクリンおよびパラクリン的な作用によって, 骨芽細胞および破骨細胞の分化を調節している可能性があることが示唆された。

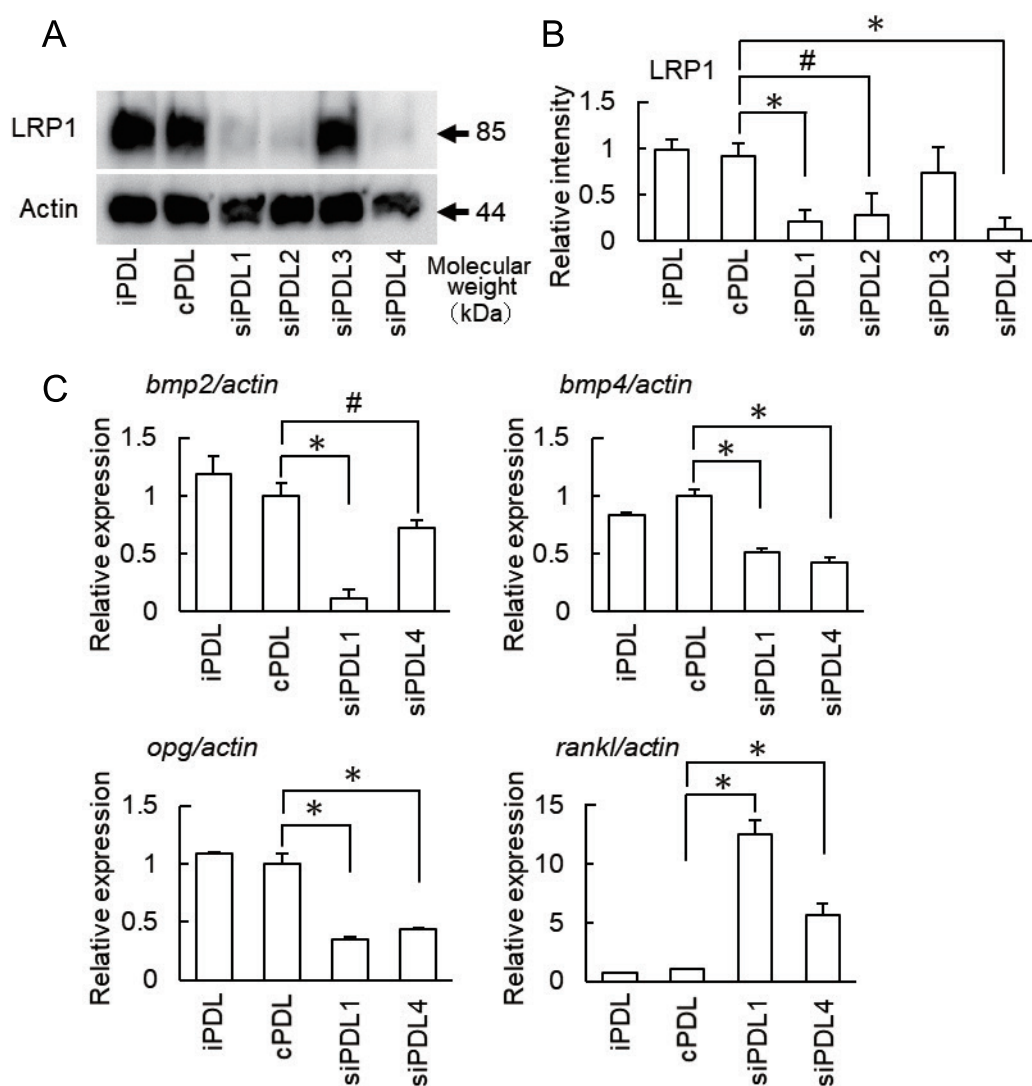


図4 PDLsにおけるLRP1の発現抑制と遺伝子発現

A: siRNAによるLRP1の発現抑制, Western blotによってLRP1の発現レベルを調べた。siLRP1 1~4を導入したPDLsをそれぞれ, siPDL1, 2, 3, 4とした。また, controlとしてsiRNA非処理のPDLsをiPDLとし, negative control siRNAを導入したPDLsをcPDLと表した。B: LRP1の発現, C: siLRP1 1と4をそれぞれ導入したsiPDL1と4の*bmp-2*, *bmp-4*, *opg*, および*rankl*発現, real-time RT-PCRによって, それぞれの遺伝子発現を調べた。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , 統計学解析は一元配置分散分析の後, Tukey検定を行った( $n=3$ )。



## 結 論

本研究では、PDLs にみられる Lepr 陽性細胞の幹細胞性と LRP1 陽性細胞の機能について検討し、その結果、以下の結論を得た。

1. PDLs に Lepr 陽性細胞の存在を確認した。
2. Lepr<sup>hi</sup> PDLs に幹細胞マーカーの *cd44*, *cd73*, *cd90*, *cd105* および *cd146* の発現を認め、骨芽細胞および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* および *opg* の発現が抑制され、*rankl* の発現が亢進した。

本研究遂行にあたり、格別たるご指導およびご校閲を賜りました日本大学歯学部歯科矯正学講座 本吉 満 教授、日本大学歯学部解剖学第 I 講座 二宮 禎 准教授に謹んで深く感謝を申し上げます。また、本研究を通じ、多大なるご協力を賜りました日本大学歯学部歯科矯正学講座および日本大学解剖学第 I 講座の皆様にも感謝申し上げます。

なお、本研究では開示すべき利益相反はない。

## 文 献

- 1) Araújo MG, Silva CO, Misawa M, Sukekava F (2015) Alveolar socket healing: What can we learn?. *Periodontol* 2000 68, 122-134.
- 2) Einhorn TA, Gerstenfeld LC (2015) Fracture healing: mechanisms and interventions. *Nat Rev Rheumatol* 11, 45-54.
- 3) Hosoya A, Ninomiya T, Hiraga T, Zhao C, Yoshida K, Yoshida N, Takahashi M, Okabe T, Wakitani S, Yamada H, Kasahara E, Ozawa H, Nakamura H (2008) Alveolar bone regeneration of subcutaneously transplanted rat molar. *Bone* 42, 350-357.
- 4) Seo BM, Miura M, Gronthos S, Mark Bartold P, Batouli S, Brahimi J, Young M, Gehron Robey P, Wang CY, Shi S (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 364, 149-155.
- 5) Yuan X, Pei X, Zhao Y, Tulu US, Liu B, Helms JA (2018) A Wnt-responsive PDL population effectuates extraction socket healing. *J Dent Res* 97, 803-809.
- 6) Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM (2006) Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Dis* 12, 358-363.
- 7) Yue R, Zhou BO, Shimada IS, Zhao Z, Morrison SJ (2016) Leptin receptor promotes adipogenesis and reduces osteogenesis by regulating mesenchymal stromal cells in adult bone marrow. *Cell Stem Cell* 18, 782-796.
- 8) 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.
- 9) Zhang D, Zhang S, Wang J, Li Q, Xue H, Sheng R, Xiong Q, Qi X, Wen J, Fan Y, Zhou BO, Yuan Q (2020) LepR-expressing stem cells are essential for alveolar bone regeneration. *J Dent Res* 99, 1279-1286.
- 10) Matsubara T, Kida K, Yamaguchi A, Hata K, Ichida F, Meguro H, Aburatani H, Nishimura R, Yoneda T (2008) BMP2 regulates osterix through Msx2 and Runx2 during osteoblast differentiation. *J Biol Chem* 283, 29119-29125.
- 11) Ninomiya T, Hiraga T, Hosoya A, Ohnuma K, Ito Y, Takahashi M, Ito S, Asashima M, Nakamura H (2014) Enhanced bone-forming activity of side population cells in the periodontal ligament. *Cell Transplant* 23, 691-701.
- 12) Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20, 345-357.
- 13) Lacey DL, Timms E, Tan HL, Kelley MJ, Dunstan CR, Burgess T, Elliott R, Colombero A, Elliott G, Scully S, Hsu H, Sullivan J, Hawkins N, Davy E, Capparelli C, Eli A, Qian YX, Kaufman S, Sarosi I, Shalhoub V, Senaldi G, Guo J, Delaney J, Boyle WJ (1998) Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. *Cell* 93, 165-176.
- 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) 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.
- 16) Kohara Y, Haraguchi R, Kitazawa R, Kitazawa S (2020) Knockdown of Lrp1 in RAW264 cells inhibits osteoclast differentiation and osteoclast-osteoblast interactions *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 523, 961-965.
- 17) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.
- 18) 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.
- 19) Chen SC, Marino V, Gronthos S, Bartold PM (2006) Location of putative stem cells in human periodontal ligament. *J Periodontol Res* 41, 547-553.
- 20) Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause DS, Deans RJ, Keating A, Prockop DJ, Horwitz EM (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- 21) Hasegawa D, Hasegawa K, Kaneko H, Yoshida S, Mitarai H, Arima M, Tomokiyo A, Hamano S, Sugii H, Wada N, Kiyoshima T, Maeda H (2020) MEST regulates the stemness of human periodontal ligament stem cells. *Stem Cells Int* 2020, 9672673.
- 22) Hakki SS, Bozkurt B, Hakki EE, Kayis SA, Turac G,

- Yilmaz I, Karaoz E (2014) Bone morphogenetic protein-2, -6, and -7 differently regulate osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 102, 119-130.
- 23) Katagiri T, Yamaguchi A, Ikeda T, Yoshiki S, Wozney JM, Rosen V, Wang E, Tanaka H, Omura S, Suda T (1990) The non-osteogenic mouse pluripotent cell line, C3H10 T1/2, is induced to differentiate into osteoblastic cells by recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Biochem Biophys Res Commun* 172, 295-299.
- 24) 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.
- 25) Chen D, Harris MA, Rossini G, Dunstan CR, Dallas SL, Feng JQ, Mundy GR, Harris SE (1997) Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 60, 283-290.
- 26) 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.