

Leptin receptor 陽性細胞の low-density lipoprotein receptor-related protein 1 欠損が骨形成に与える影響

仮 谷 仁 志

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】 レプチン受容体 (leptin receptor, LepR) は、骨芽細胞分化能を有する間葉系幹細胞のマーカーの一つとして注目されている。いっぽう、LepR 陽性間葉系幹細胞 (LepR⁺ 細胞) が発現する low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) は、その発現抑制によって破骨細胞分化が促進し、骨量減少や骨粗鬆症を誘導することが報告されているが、LRP1の役割と骨形成との関係については不明な点が多い。本研究では、LepR⁺ 細胞に発現する LRP1を特異的に欠損させたコンディショナルノックアウト (KO) マウスを作製し、頭頂骨および大腿骨における骨形成能、骨芽細胞分化能、およびリン酸化 receptor-regulated Smad (p-R-Smad) の発現について野生型 (WT) マウスと比較検討した。

【方法】 マウスの頭頂骨と大腿骨をマイクロ CT で撮影し、骨量と骨微細構造を骨形態計測によって評価するとともに、カルセイン標識によって骨形成能を調べた。また、大腿骨における osterix (Osx) と p-R-Smad 発現を免疫組織化学染色によって検討した。

【結果】 KO マウスは、WT マウスと比べて頭頂骨の非薄化、および頭頂骨と大腿骨の骨量減少と骨石灰化速度の低下が示された。また、KO マウスは WT マウスよりも Osx と p-R-Smad の陽性細胞が減少した。

【結論】 LepR⁺ 細胞に発現している LRP1を欠損させた場合、p-R-Smad の発現が阻害され、骨芽細胞分化の抑制、頭頂骨および大腿骨の骨量と骨形成の低下が生じることが明らかになった。

キーワード: low-density lipoprotein receptor-related protein 1, leptin receptor-positive cell, 骨芽細胞分化, 骨形成, 受容体調節型 Smad

Effect of leptin receptor-positive cells lacking low-density lipoprotein receptor-related protein 1 on the bone formation

Hitoshi Kariya

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】 Leptin receptor (LepR) is a marker of mesenchymal stem cells (MSCs) that differentiate into osteoblasts. Recent studies have indicated that LepR-positive MSCs (LepR⁺ cells) expressing low-density lipoprotein-related protein 1 (LRP1) are required for bone formation, mineral deposition and bone mass development in the skeleton. A dysfunction of LRP1 causes bone loss and osteoporosis with the enhancement of osteoclast activity. However, the role of LRP1 on osteoblast differentiation remains unclear. In this study, conditional knockout (KO) mice expressing LepR⁺ cells lacking LRP1 were established, and bone forming activity in parietal bone and femur was examined.

【Methods】 Bone mass and bone microstructure of parietal bone and femur were examined by bone morphometric analysis using micro-CT imaging. The ability of bone forming activity was also evaluated by calcein labeling assay. Furthermore, osterix (Osx) and phosphorylated receptor-regulated Smad (p-R-Smad)-positive cells in a distal portion of femoral metaphysis were determined by immunohistochemical staining.

【Results】 In comparison with wild type (WT) mice, KO mice expressed depressive bone forming activities including thinned parietal bone, decreased bone mass and low mineral apposition rate in parietal bone and femur. Lower number of Osx- and p-R-Smad-positive cells in femur were also detected in KO mice.

【Conclusion】 LepR⁺ cells lacking LRP1 reduces osteogenic potential and osteoblast differentiation through decreasing p-R-Smad expression.

Keywords: low-density lipoprotein receptor-related protein 1, leptin receptor-positive cell, osteoblast differentiation, bone formation, receptor-regulated Smad

(受付: 令和 7 年 1 月 27 日)

責任著者: 仮谷仁志

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: dehi21007@g.nihon-u.ac.jp

緒 言

骨組織では生涯を通して骨吸収と骨形成が繰り返され、骨量のバランスが適切に維持されている^{1,2)}。リモデリングと呼ばれているこうした骨の改造現象には、骨芽細胞や破骨細胞から分泌される様々なサイトカインや成長因子が関わっている¹⁾。例えば、骨芽細胞は破骨細胞分化を活性化する receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) や Wnt5a を分泌するが、同時に破骨細胞前駆細胞に発現する receptor activator of NF- κ B (RANK) に結合して破骨細胞分化を抑制する osteoprotegerin (OPG) も放出する²⁾。いっぽう破骨細胞は semaphorin 4D を分泌することで、間葉系幹細胞の骨芽細胞分化を抑制し³⁾、間葉系幹細胞もまた、破骨細胞分化に関わるサイトカインの macrophage colony-stimulating factor, RANKL, さらに OPG を産生することによって骨吸収を調節している⁴⁾。

マスト細胞から分泌されるペプチドホルモンであるレプチンは、視床下部の弓状核に発現するレプチン受容体 (leptin receptor, LepR) に結合し、糖脂質代謝と食欲を抑制することが知られている⁵⁾。LepR は骨髄間葉系幹細胞に発現することも報告されており、マウスへのレプチン投与によって大腿骨と脛骨の骨形成が促進することが実験的に示されている⁶⁾。また、LepR 陽性間葉系幹細胞 (LepR⁺細胞) は骨形成を担う骨芽細胞の主要な供給源と考えられており、bone morphogenetic protein (BMP) の作用によって骨芽細胞へ分化することが報告されている^{7,8)}。この場合、LepR⁺細胞内で機能する receptor regulated (R)-Smad である Smad1, 5, 9 のリン酸化と核内移行が促進し、様々な標的遺伝子の転写を活性化する^{9,10)}。この R-Smad のリン酸化を介したシグナルの下流には runt-related transcription factor 2 (Runx2) や osterix (Osx) などの骨芽細胞分化関連転写因子が同定されているため、R-Smad のリン酸化は LepR⁺細胞の骨芽細胞分化に深く関わっていると考えられている^{1,9-11)}。

膜貫通型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) はエンドサイトーシス受容体の一つであり、transforming growth factor- β , fibronectin, および lactoferrin などの複数のリガンドと結合し、細胞内シグナルを活性化する¹²⁾。LRP1の役割と骨形成との関係については不明な点が多かったが、最近の研究によって、LRP1 遺伝子の欠損が破骨細胞を活性化させ、骨量減少に密接に関係していることが明らかにされた。例えば、骨芽細胞と破骨細胞に発現する LRP1 を欠損させたマウスは、脛骨、大腿骨、および椎骨において破骨細胞数の増加と著しい骨吸収が観察されている^{13,14)}。また、歯根膜幹細胞に発現する LRP1 を欠損させたマウスは、歯槽骨の骨量減少と破骨細胞数の増加に加えて骨形成の阻害が示されている¹⁵⁾。

しかし、これらの研究は、主に LRP1 欠損によって誘導される骨量減少の分子メカニズムについて探索したものであり、LepR⁺細胞の骨芽細胞への分化過程において LRP1 が果たす役割については詳しく調べられていない。そこで、本研究では、LepR⁺細胞において LRP1 を特異的に欠損させたマウスを作製し、頭頂骨と大腿骨における骨形成能、骨芽細胞分化能、およびリン酸化 (phosphorylated) R-Smad (p-R-Smad) の発現について野生型マウスと比較検討した。

材料および方法

1. 実験動物

LRP1遺伝子が欠損した LepR⁺細胞をもつコンディショナルノックアウトマウスは、cre recombinase (Cre) / locus of X-over P1 (loxP) システムを用いて作成した。B6.129-*LepR^{tm2(Cre)}Rck*/J (LepR^{Cre}) マウス (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, USA)¹⁶⁾ と LRP1遺伝子座に flanked by loxP (floxed) 配列を持った B6.129S7-*Lrp1^{tm2Her}*/J (Lrp1^{flox/+}) マウス (Jackson Laboratory)¹⁷⁾ の雄雌を交配させ LepR^{Cre} Lrp1^{flox/+} マウスを作成した後、再度、雌雄の LepR^{Cre} Lrp1^{flox/+} マウスと Lrp1^{flox/+} マウスの交配によって、LepR⁺細胞の LRP1が欠損した雄性 LepR^{Cre} Lrp1^{flox/flox} (コンディショナルノックアウト, KO) マウスを得た。また、対照群として同じく交配によって得られた雄性 Lrp1^{+/+} (野生型, WT) マウスを使用した。これらの遺伝子改変マウスの Cre と loxP の有無は、マウスの耳介から抽出した DNA を鋳型にした polymerase chain reaction (PCR) によって確認した。Dream Taq Green PCR Master Mix (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA) 使用して、2つの loxP を挟む5'側と3'側の塩基配列は、5'-CAT ACC CTC TTC AAA CCC CTT CCT G-3' と 5'-GCA AGC TCT CCT GCT CAG ACC TGG A-3' をプライマーとして用いて、94℃で2分間の処理後、94℃で20秒、60℃で15秒、さらに72℃で10秒の反応を35回繰り返すことで増幅した。また、Cre の塩基配列は、5'-AAC ATG CTT CAT CGT CGG-3' と 5'-TTC GGA TCA TCA GCT ACA CC-3' を用いて、94℃で3分間の処理後、94℃で30秒、53.5℃で30秒、さらに72℃で60秒の反応を35回繰り返した。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。図1に示すように、Cre と loxP の塩基配列を検出し、マウスの遺伝子型を判別した (図1)。KO マウスと WT マウスの出生率は、それぞれ約15%であった。マウスの飼育期間は、12時間の明暗サイクルを調整できる恒温室 (23℃) で飼育し、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:

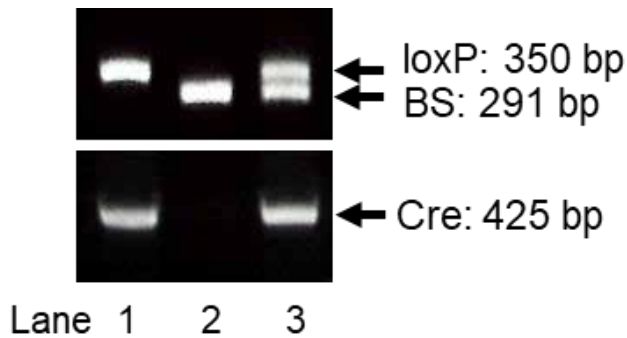


図1 遺伝子改変マウスの判別

マウスの耳介から抽出したDNAを鋳型にしてCreの塩基配列 (Cre: 425 bp) と2つのloxPを挟んだ5'と3'側を含む塩基配列 (loxP: 350 bp) をそれぞれのプライマーを使用したPCRで増幅した。Lane1: $Lrp1^{Cre} Lrp1^{lox/lox}$ マウス (KO マウス) はCreとloxPをもつ。Lane2: $Lrp1^{+/+}$ マウス (WT マウス) はCreとloxPが除かれたB6.129マウス由来の塩基配列 (B6 sequence, BS: 291 bp) をもつ。Lane3: ヘテロ体である $Lrp1^{Cre} Lrp1^{lox/+}$ マウスはCreとloxPの他にloxPが除かれた塩基配列 (BS: 291 bp) をもつ。

AP21DEN022-5, AP21DEN023-5) 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¹⁸⁾ に従って, 動物の処置を行った。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. 頭頂骨由来細胞と骨髄間質細胞の採取

4 mg/kg midazolam (サンド, 東京), 0.3 mg/kg medetomidine hydrochloride (ゼノアック, 福島), および 5 mg/kg butorphanol tartrate (明治製薬ファルマ, 東京) からなる三種混合麻酔薬を使用した過麻酔によって安楽死させた6~8週齢雄性のKOマウスとWTマウス (それぞれ3頭/グループ) から頭頂骨と大腿骨を採取した。頭頂骨を細切後, 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 α minimal essential medium (α MEM, 富士フィルム和光純薬) で, 37°C, 30分間, その後, 37°C, 20分間の酵素処理を4回繰り返して頭頂骨由来細胞 (calvaria 細胞) を回収した¹⁹⁾。骨髄間質細胞 (BMSCs) は, 大腿骨の両端を切断後, シリンジを用いて骨切断面から α MEM を注入して骨髄細胞を回収した¹⁹⁾。ピペッティングによって分散した骨髄細胞を ACK Lysing buffer (ThermoFisher Scientific) で24°C, 5分間の処理を行い, 溶血を確認後, 遠心分離によってBMSCsを回収した。

Calvaria細胞とBMSCsは10% fetal bovine serum (FBS, PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) と1% antibiotic-antimycotic (Invitrogen) を含む α MEM を用いて培養シャーレに播種し, 37°C, 5% 炭酸ガス存在下で培養した。培養液は2~3日毎に交換し, 5日間培養した細胞を実験に供した。

3. Calvaria細胞とBMSCsからのLepR⁺細胞の分離

培養したcalvaria細胞とBMSCsを0.05% trypsin 処理によってシャーレから回収した後, 0.5%FBS および 2 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を含む phosphate-buffered saline (PBS) に懸濁させ, ウサギ抗ヒトLepRポリクローナル抗体 (100倍希釈, Proteintech, Rosemont, IL, USA) で4°C, 30分間, インキュベートした。PBSでの洗浄後, ヤギ抗ウサギIgG microbeads (5倍希釈, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) を加えて, 4°Cで30分間の反応後, 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, calvaria細胞とBMSCsに含まれるLepR⁺細胞をカラムに吸着させた。分離カラムはPBSで洗浄後, 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た。回収したLepR⁺細胞からRNAとタンパクを抽出し, LRP1の発現について調べた。

4. Reverse transcription-PCR (RT-PCR)

RNAの抽出は, NucleoSpin RNA Plus kit (タカラバイオ, 滋賀) を使用した。1 μ gのRNAを鋳型にして, iScript Advanced cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて, cDNA合成を行った。RT-PCRはThermal Cycler Dice Touch (タカラバイオ) を利用し, 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は, 94°Cで5分間の処理後, 94°Cで30秒, 58°Cで30秒, さらに72°Cで30秒の反応を35回, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) は94°Cで5分間の処理後, 94°Cで30秒, 58°Cで45秒, さらに72°Cで60秒の反応を23回繰り返した。使用したプライマーの塩基配列は, LRP1: Forward 5'-CTG AAG GCT CCG AGT ACC AG-3', Reverse 5'-GTA GGA GAT TGT GCC CGT GT-3', GAPDH: Forward 5'-AAC TTT GGC ATT GTG GAA GG-3', Reverse 5'-ACA CAT TGG GGG TAG GAA CA-3'であり, 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で可視化した。

5. Western blot

タンパクの抽出は, 細胞をRIPA buffer (Santa Cruz Biotech, Dallas, TX, USA) で処理して, 14,000 \times gで15分間の遠心分離後に上清を回収した。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) を利用して定量した。1 μ gの細胞抽出物は, 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel (Bio-Rad Laboratories) にアプライし, 電気泳動した後,

nitrocellulose membrane (GE Healthcare Life Sciences, Little Chalfont, UK) に転写した。その後、PVDF blocking reagent (東洋紡, 東京) 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Can Get Signal溶液 (東洋紡) で希釈したウサギ抗ヒトLRP1ポリクロナール抗体 (2,000倍希釈, Abcam, Cambridge, UK), またはマウス抗 β -actin抗体 (2,000倍希釈, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) と、4℃で16時間反応させた。PBSで洗浄後、membraneはCan Get Signal溶液で希釈したhorseradish peroxidase (HRP) 標識2次抗体 (10,000倍希釈, Bio-Rad Laboratories) と24℃で1時間の反応後、chemiluminescence溶液 (GE Healthcare Life Sciences) に浸し、抗体との反応性をImageQuant 800 system (サイティバ, 東京) で可視化した。

6. マイクロCT撮影

三種混合麻酔薬の腹腔内投与によって6週齢雄性KOマウスとWTマウス (それぞれ8頭/グループ) を麻酔し、頭頂骨と大腿骨をマイクロCT (R_mCT, リガク, 東京) で撮影した。撮影条件は、管電流90 μ A, 管電圧110 kV, 撮影時間2分, 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。頭頂骨においては、頭頂骨の中央部ROI (5 × 5 × 2 mm) の骨量と冠状縫合の後方5 mmの部位における骨の厚さを測定した。いっぽう、大腿骨は遠位骨幹端の海綿骨領域における成長板の近位1.0~4.0 mmの部位ROI (1 × 1 × 3 mm) の骨量 (BV/TV), 骨梁表面積 (BS/BV), 骨梁幅 (Tb.Th), 骨梁数 (Tb.N), および骨梁間距離 (Tb.Sp) の値²⁰⁾ を算出した。

7. カルセイン標識による骨形成能評価

6週齢雄性KOマウスとWTマウス (それぞれ8頭/グループ) に、カルセイン (10 mg/kg bw, 富士フィルム和光純薬) を2回にわたって腹腔内投与した (初回の投与42日齢, 2回目投与49日齢)。2回目の投与後, 3日後に、三種混合麻酔薬の過麻酔によってマウスを安楽死させ、頭頂骨と大腿骨を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン液 (富士フィルム和光純薬) で4℃, 16時間の固定後、凍結包埋剤 (Section-Lab, 横浜) で包埋した。クライオフィルム IIc (Section-Lab) を使用して、厚さ10 μ mの非脱灰凍結切片を作製し、カルセイン標識部の分布を蛍光顕微鏡 (オリンパス, 東京) で観察し、骨石灰化速度 (mineral apposition rate : MAR) をImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA) を使用して算出した。ランダムに選択した頭頂骨の冠状縫合から後方5.0 mmに位置する平坦部上面 (flat area, FA, 図2) と矢状縫合の両側隆起部 (sagittal colliculus, SC, 図2), および大腿骨の遠位骨幹端の海綿骨 (trabecular bone, TB) と骨幹部の骨髓

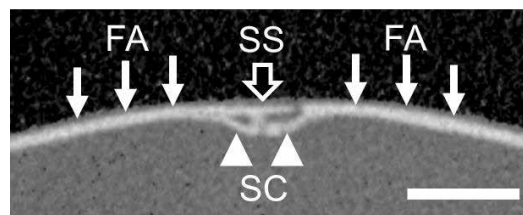


図2 頭頂骨の計測部位

冠状縫合から後方5.0 mmに位置する前頭断面像から、頭頂骨の平坦部上面 (白矢印: flat area, FA) と矢状縫合 (黒抜き矢印: sagittal suture, SS) の両側に位置する隆起部 (矢頭: sagittal colliculus, SC) をカルセインによる二重線状標識の測定対象とした。(スケールバー: 1 mm)

を囲む皮質骨の骨内膜面 (cortical bone, CB) のカルセイン標識間距離をそれぞれ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

6週齢雄性KOマウスとWTマウス (それぞれ5頭/グループ) から大腿骨を摘出し、10% 中性緩衝ホルマリン液に浸漬して4℃で16時間固定した。PBSで洗浄後、10% EDTA (pH 7.4) に2週間浸漬して脱灰後、パラフィンで包埋し、厚さ4 μ mの切片を作製した。切片は、キシレンで脱パラフィンを行い、下降エタノールで親水化した後、BLOXALL (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) で24℃, 30分間の処理によって内因性ペルオキシターゼを不活化した。PBSで洗浄後、切片に3% bovine serum albumin (富士フィルム和光純薬) を滴下して、24℃で60分間のブロッキングを行い、ウサギ抗マウスOsxモノクロナール抗体 (200倍希釈, Abcam), またはウサギ抗ヒトp-Smad1/5/9モノクロナール抗体 (100倍希釈, Abcam) と4℃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) を滴下して24℃で1時間、反応させた。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、LRP1の反応性を可視化し、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, 東京) で封入した。遠位骨幹端の海綿骨領域において無作為に10視野 (1視野あたり380 × 213 μ m) を撮影し、拡大した画像下でImageJを使用して単位面積あたりのOsx陽性 (Osx⁺) 細胞とp-R-Smad陽性 (p-R-Smad⁺) 細胞の割合を計測した。

9. 統計解析

得られたデータの統計分析は、GraphPad Prism 8

(GraphPad Software, 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、unpaired Student t-test 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、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. Calvaria 細胞と BMSCs から分離した LepR⁺ 細胞の LRP1 発現

KO マウスと WT マウスの calvaria 細胞と BMSCs から分離した LepR⁺ 細胞において、LRP1 遺伝子とタンパク発現を確認した (図 3 A, B)。WT マウスでは calvaria 細胞と BMSCs から分離した LepR⁺ 細胞のいずれにおいても、

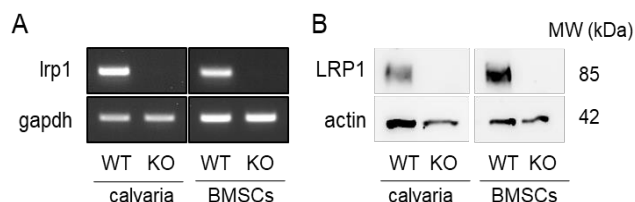


図3 Calvaria 細胞 (calvaria) と骨髄間質細胞 (BMSCs) から分離した LepR⁺ 細胞の LRP1 発現
KO マウスと WT マウスから分離した LepR⁺ 細胞における LRP1 発現。抗 LepR 抗体を用いて MACS システムによって calvaria 細胞と BMSCs から LepR⁺ 細胞を分離して、mRNA 発現 (A) とタンパク発現 (B) を調べた。

LRP1 の遺伝子とタンパク発現を示す明瞭なバンドが観察できた。いっぽう、KO マウスの LepR⁺ 細胞では LRP1 遺伝子とタンパク発現は検出できなかった。

2. 頭頂骨と大腿骨の形態計測的評価

LepR⁺ 細胞の LRP1 欠損が骨形態に及ぼす影響を調べるために、KO マウスと WT マウスの頭頂骨と大腿骨の構造を比較した。マイクロ CT 画像を用いた形態計測によって、KO マウスは WT マウスよりも頭頂骨の菲薄化 (KO: $90.0 \pm 6.2 \mu\text{m}$, WT: $115.3 \pm 12.9 \mu\text{m}$, $p < 0.005$, 図 4 A, B) と骨量の減少 (KO: $2.83 \pm 0.20 \text{ mm}^3$, WT: $3.64 \pm 0.38 \text{ mm}^3$, $p < 0.005$, 図 4 B) が認められた。大腿骨でも同様に、KO マウスは WT マウスと比べて遠位骨幹端部の骨量 (BV/TV) が低下していた (KO: $28.7 \pm 4.54\%$, WT: $36.2 \pm 4.09\%$, $p < 0.005$, 図 4 C, D)。KO マウスと WT マウスの骨表面積 (BS/BV) に有意な差は認められなかったが、WT マウスと比べて KO マウスの骨梁幅 (Tb.Th) の縮小 (KO: $45.5 \pm 2.34 \mu\text{m}$, WT: $51.3 \pm 4.69 \mu\text{m}$, $p < 0.01$, 図 4 D) と骨梁数 (Tb.N) の減少 (KO: $6.22 \pm 0.50 /\text{mm}$, WT: $6.85 \pm 0.56 /\text{mm}$, $p < 0.05$, 図 4 D) がみられ、逆に骨梁間隙 (Tb.Sp) は KO マウスの方が WT マウスより高い値を示した (KO: $109.7 \pm 15.7 \mu\text{m}$, WT: $89.4 \pm 11.7 \mu\text{m}$, $p < 0.01$, 図 4 D)。

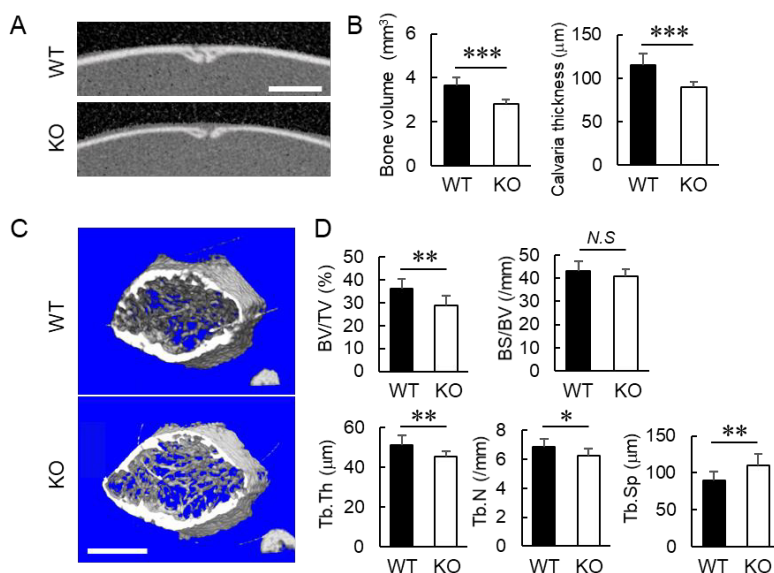


図4 KO マウスと WT マウスの頭頂骨と大腿骨の骨形態計測

マイクロ CT で、KO マウス (KO) と WT マウス (WT) の頭頂骨と大腿骨を撮影し、骨形態を評価した。A: 頭頂骨の冠状縫合後方 5.0 mm に位置するマイクロ CT の前頭断面像 (スケールバー: $1,000 \mu\text{m}$)。B: 頭頂骨の骨量 (bone volume) と頭頂骨厚 (calvaria thickness)。C: 大腿骨遠位骨幹端部の三次元画像 (スケールバー: $1,000 \mu\text{m}$)。D: 骨微細構造のパラメータ。骨量 (BV/TV)、骨表面積 (BS/BV)、骨梁幅 (Tb.Th)、骨梁数 (Tb.N)、および骨梁間隙 (Tb.Sp)。統計学解析は、unpaired Student t-test を行った。 $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.005$ (versus WT, $n = 8$, in each)

3. 頭頂骨と大腿骨における骨石灰化速度 (MAR) の評価

KO マウスと WT マウスの骨形成を比較するために、腹腔内にカルセインを2回投与して、二重の線状標識部間を新生骨とし、これを7日で除することで MAR 値を求めた。頭頂骨では、冠状縫合から後方5.0 mm に位置する平坦部上面 (FA) と矢状縫合の両側隆起部 (SC) に、カルセインの二重標識が観察できた (図5A)。図5B に示すように、MAR 値は WT マウスに比べて KO マウスの FA で減少し (KO: $1.44 \pm 0.12 \mu\text{m/day}$, WT: $1.76 \pm 0.17 \mu\text{m/day}$, $p < 0.05$, 図5B), SC でも低値を示した (KO: $1.56 \pm 0.19 \mu\text{m/day}$, WT: $1.86 \pm 0.12 \mu\text{m/day}$, $p < 0.05$, 図5B)。また、大腿骨では、KO マウスと WT マウスの遠位骨幹端の海綿骨 (TB) と骨幹部の骨髓を囲む皮質骨 (CB) にカルセインの二重の線状標識が検出できた (図5C)。MAR 値は、WT マウスと比較して KO マウスでは TB で減少し (KO: $2.42 \pm 0.14 \mu\text{m/day}$, WT: $3.02 \pm 0.16 \mu\text{m/day}$, $p < 0.005$, 図5D), CB でも低値を示した (KO: $3.65 \pm 0.16 \mu\text{m/day}$, WT: $4.34 \pm 0.33 \mu\text{m/day}$, $p < 0.01$, 図5D)。

4. Osx^+ 細胞と p-R-Smad⁺ 細胞の分布

KO マウスと WT マウスの大腿骨遠位骨幹端部における骨芽細胞と p-R-Smad⁺ 細胞の分布を免疫組織化学染色によって評価した。骨芽細胞である Osx^+ 細胞は、肥大軟骨細胞の遠位端に位置する成長板の近く、海綿骨領域に認められたが、KO マウスの Osx^+ 細胞の数は WT マウスに比べて約70% にまで減少していた (KO: $1.46 \pm 0.20 \times 10^3 \text{ cells/mm}^2$, WT: $2.08 \pm 0.19 \times 10^3 \text{ cells/mm}^2$, $p < 0.005$, 図6A, B)。また、p-R-Smad⁺ 細胞は両マウスともに Osx^+ 細胞の分布と一致して、海綿骨領域に確認できたが、KO マウスの p-R-Smad⁺ 細胞数は、WT マウスよりも少なく78% ほどに減少した (KO: $1.44 \pm 0.13 \times 10^3 \text{ cells/mm}^2$, WT: $1.84 \pm 0.18 \times 10^3 \text{ cells/mm}^2$, $p < 0.005$, 図6C, D)。

考 察

本研究では、 LepR^+ 細胞に発現する LRP1 を特異的に欠損させた KO マウスを作製し、LRP1 発現の有無が骨形成に与える影響を検討した。その結果、WT マウスと比較して LRP1 の KO マウスでは骨量、骨石灰化速度、および Osx^+ 細胞数の減少とともに、LRP1 が欠損している骨芽細胞の R-Smad のリン酸化が抑制されていることが明らかになった。つまり、 LepR^+ 細胞の LRP1 は骨芽細胞分化を促進することによって、骨量を調節していることが考えられた。

LRP1 の機能解明についての研究は、主に Cre/loxP システムを用いて作製したコンディショナルノックアウトマウスを利用して進められており、特定の細胞での LRP1 の欠

損が脛骨、大腿骨、および椎骨における破骨細胞分化を促進し、骨量を減少させることが示されている^{13, 14)}。例えば、Runx2 陽性細胞の LRP1 を欠損させたマウスでは、血小板由来成長因子の投与によって RANKL の発現が誘導され、骨吸収の促進と脛骨および椎骨の骨量を減少させることが報告されている¹⁴⁾。また、今回と同じ LepR^+ 細胞の LRP1 を欠損させた KO マウスでは、歯槽骨の骨吸収が促進し、歯槽骨量の減少が認められている¹⁵⁾。本研究で得られた KO マウスの頭頂骨の菲薄化や大腿骨の骨量低下などの骨形成を阻害する所見と照らし合わせると、 LepR^+ 細胞に発現する LRP1 が全身の骨格形成に影響を及ぼすと考えられた。

KO マウスの骨形成能をカルセイン標識によって調べると、WT マウスと同様に、FA と SC、および TB と CB にカルセインの二重標識が観察できたが、その間隙は WT マウスに比べて狭く、MAR の低下が認められた。これらの所見は、 LepR^+ 細胞の LRP1 が LepR^+ 細胞の骨芽細胞分化と骨形成に密接に関わることを裏付けるものである。しかし、これまでの報告によれば、骨芽細胞に発現する LRP1 を欠損させたマウスは、脛骨と椎骨に骨量低下が生じるが、これは破骨細胞の活性化による骨吸収促進に起因するもので、骨芽細胞の機能には影響がないことが示されている¹⁴⁾。つまり LRP1 は成熟骨芽細胞の骨形成機能に影響を及ぼさず、むしろ間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化過程に作用するため、LRP1 を欠損させることで、間接的に骨芽細胞の骨形成を阻害している可能性が考えられた。したがって LRP1 は間葉系幹細胞の骨芽細胞への分化を促進する因子の一つであると考えるのが妥当であろう。

骨芽細胞である Osx^+ 細胞の分布を免疫組織化学的に調べた結果、WT マウスに比べて KO マウスの Osx^+ 細胞数の減少がみられた。 Osx は成熟した骨芽細胞に強く発現する²¹⁾ ことから、 LepR^+ 細胞の LRP1 を欠損させることで、骨芽細胞分化が抑制されることが裏付けられた。また、KO マウスでは、大腿骨遠位成長板の肥大軟骨細胞周囲に、 Osx^+ 細胞数が減少していたことから、石灰化軟骨の吸収後に骨形成阻害が生じて、軟骨内骨化が抑制されている可能性が示唆された。さらに、 Osx^+ 細胞数の減少とともに p-R-Smad⁺ 細胞数も減少していたことから、 LepR^+ 細胞の LRP1 は、 LepR^+ 細胞の BMP 分泌^{22, 23)} を促進し、R-Smad のリン酸化を誘導することで Runx2、続いて Osx の発現を誘導し、骨芽細胞分化を促進することが考えられた。

LepR^+ 細胞と免疫組織化学染色で検出された Osx^+ 細胞と p-R-Smad⁺ 細胞の関係については、今後、さらなる検討が必要ではあるが、大腿骨遠位骨幹端の海綿骨領域には LepR^+ 細胞が存在し、この細胞が骨芽細胞に分化すること⁷⁾ が示されていることから、本実験の WT マウスで観

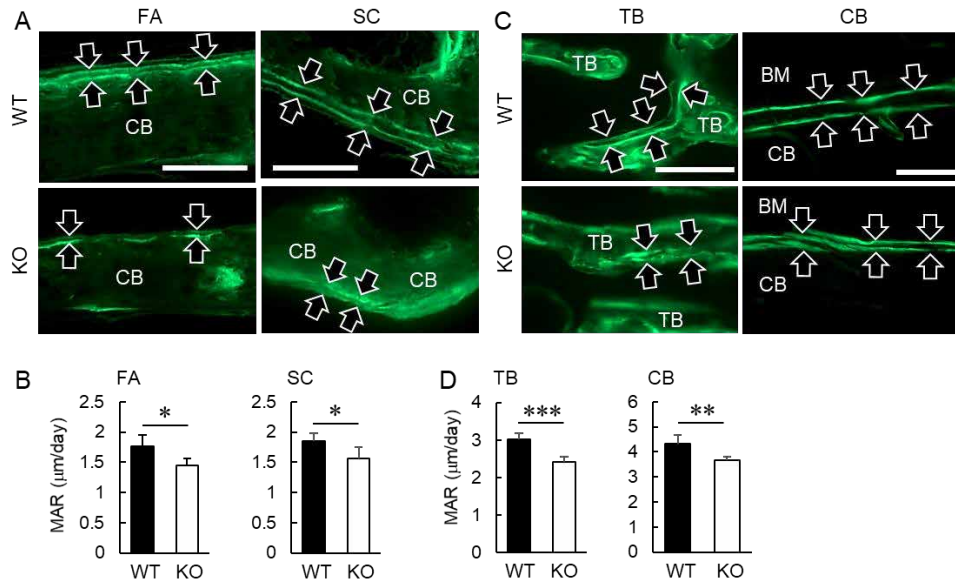


図5 KO マウスと WT マウスの頭頂骨と大腿骨におけるカルセイン二重標識

A: カルセインの二重線状標識によって KO マウス (KO) と WT マウス (WT) の骨形成能を評価した。カルセインは1回目の腹腔内投与後、8日後に2回目を投与した。2回の投与でそれぞれ標識された骨組織を矢印で示す。頭頂骨の冠状縫合後方5.0 mmの平坦部 (flat area, FA) と矢状縫合両側の隆起部 (sagittal colliculus, SC) におけるカルセインの二重線状標識像を示す (皮質骨: cortical bone, CB), (スケールバー: $100\mu\text{m}$)。B: カルセインの二重線状標識像において測定した FA と SC の MAR を示す。C: 大腿骨の遠位骨幹端部海綿骨 (trabecular bone, TB) と骨幹部骨髓 (bone marrow, BM) の皮質骨面 (CB) にみられるカルセイン二重標識像を示す (スケールバー: 左図, $100\mu\text{m}$, 右図, $200\mu\text{m}$)。D: TB と CB の MAR は、カルセイン二重標識像から測定した。統計学解析は, unpaired Student *t*-test を行った。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.005$ (versus WT, $n = 8$, in each)

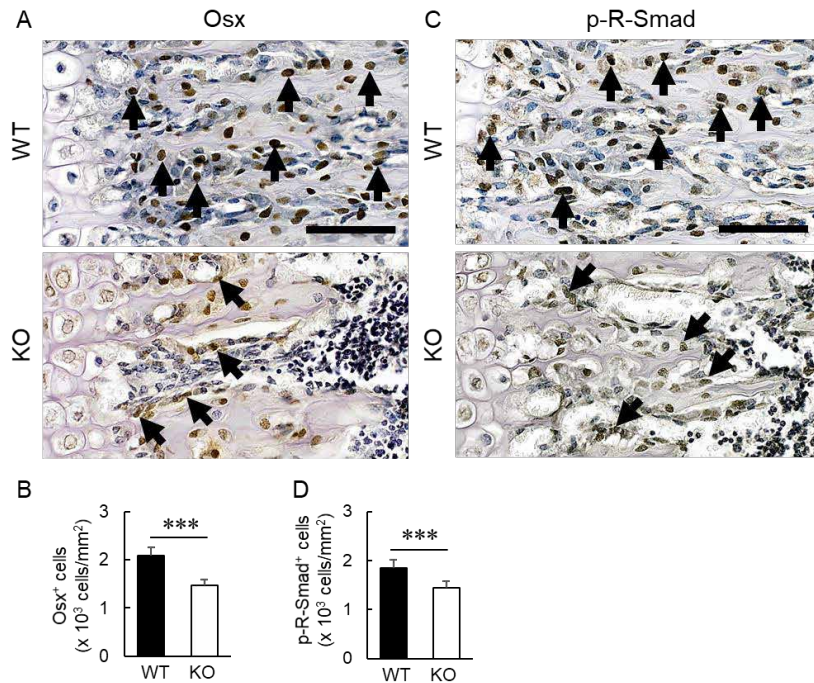


図6 大腿骨における Osx⁺ 細胞と p-R-Smad⁺ 細胞の発現

A: KO マウス (KO) と WT マウス (WT) の Osx⁺ 細胞 (スケールバー: $50\mu\text{m}$), 矢印は Osx⁺ 細胞を示す。B: Osx⁺ 細胞の数は ImageJ ソフトウェアを用いて計測した。C: KO マウス (KO) と WT マウス (WT) の p-R-Smad⁺ 細胞 (スケールバー: $50\mu\text{m}$), 矢印は p-R-Smad⁺ 細胞を示す。D: p-R-Smad⁺ 細胞の数は ImageJ ソフトウェアを用いて計測した。統計学解析は, unpaired Student *t*-test を行った。*** $p < 0.005$ (versus WT, $n = 8$, in each)

察された Osx^+ 細胞は, $LepR^+$ 細胞から分化した骨芽細胞と考えるのが妥当である。つまり KO マウスでは LRP1 の欠損によって, $LepR^+$ 細胞は骨芽細胞分化能を失い, その結果 Osx^+ 細胞が減少したと推察できる。いっぽう, $p-R-Smad^+$ 細胞の検出は, リン酸化 $Smad1$, 5 , 9 に反応する抗体を使用した。これらの $p-R-Smad$ は, BMP2 や BMP4 が骨芽細胞の分化過程に発現している BMP 受容体への結合によって誘導される^{10, 11)} ため, Osx^+ 細胞と $p-R-Smad^+$ 細胞は密接な関係性があり, KO マウスで観察された Osx^+ 細胞数の減少は $p-R-Smad$ の発現抑制によるものと考えられる。

今回の結果に示すように, $LepR^+$ 細胞に発現している LRP1 を欠損させることで頭頂骨と大腿骨の骨量が減少した。いっぽう, $LepR^+$ 細胞を完全に欠失させたラットでは, 頭頂骨や長管骨に骨量減少をとまなう重篤な骨格異常が報告されている²⁴⁾。これらの所見から, $LepR^+$ 細胞は骨芽細胞の供給と骨形成に必要な細胞ソースの一つと推測できる。その反面, $LepR^+$ 細胞の LRP1 が骨芽細胞分化に必須であれば, KO マウスで Osx^+ 細胞と $p-R-Smad^+$ 細胞は消失すると考えられる。しかし, それらの細胞数は WT マウスと比べて有意に減少したものの, 多くの Osx^+ 細胞と $p-R-Smad^+$ 細胞が認められた。間葉系幹細胞のポピュレーションには, $LepR^+$ 細胞以外に C-X-C motif chemokine ligand 12 陽性細胞²⁵⁾, platelet-derived growth factor receptor α 陽性細胞²⁶⁾, および paired related homeobox 1 陽性細胞^{27, 28)} などが知られている。これらの細胞も $LepR^+$ 細胞と同様に, 骨芽細胞や軟骨細胞などに分化し, 骨損傷修復に寄与するとされる²⁵⁻²⁸⁾。つまり, LRP1 のコンディショナルノックアウトマウスでは, $LepR^+$ 細胞以外の間葉系幹細胞も骨芽細胞分化能を有しているため, Osx^+ 細胞と $p-R-Smad^+$ 細胞として検出された可能性が考えられる。

$LepR^+$ 細胞に発現している LRP1 を欠損させただけでは, $LepR^+$ 細胞を完全に欠損させた動物で認められる長管骨の短縮化²⁴⁾を確認することができず, 骨形成の抑制は軽度であった。LRP1 の他に様々な因子によって間葉系幹細胞の骨芽細胞分化が制御されていると考えられ, 今後は YAP²⁹⁾ や ERK5³⁰⁾ などの $LepR^+$ 細胞を含む間葉系幹細胞の骨芽細胞分化に必要な因子と LRP1 との関係について検討する必要がある。

結 論

$LepR^+$ 細胞に発現する LRP1 を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを作製し, 骨形成と骨芽細胞分化に与える影響について検討した。その結果, 以下の結論を得た。

1. 頭頂骨の骨量と厚さが減少した。
2. 大腿骨の BV/TV, Tb.Th, および Tb.N は減少し,

Tb.Sp は増加した。

3. 頭頂骨の平坦部と隆起部, 大腿骨の遠位骨幹端部と骨幹部で計測された MAR 値は減少した。
4. Osx^+ 細胞および $p-R-Smad^+$ 細胞は, 大腿骨遠位骨幹端の成長板付近で観察されたが, その細胞数は WT マウスに比較して, それぞれ 70% と 78% ほどにまで減少した。

以上のことから, $LepR^+$ 細胞に発現している LRP1 を欠損させた場合, $p-R-Smad$ の発現が阻害され, 骨芽細胞分化の抑制, 頭頂骨および大腿骨の骨量と骨形成の低下が生じることが明らかになった。

研究の推進にあたり日本大学歯学部歯科矯正学講座 本吉満教授および同学部解剖学第 I 講座 二宮 禎准教授にご指導いただいた。ここに深甚なる感謝の意を表する。また, 本研究に対して多大なご協力を頂いた歯科矯正学講座ならびに解剖学第 I 講座の皆様は心より感謝申し上げます。

本研究に関する利益相反はない。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Negishi-Koga T, Shinohara M, Komatsu N, Bito H, Kodama T, Friedel RH, Takayanagi H (2011) Suppression of bone formation by osteoclastic expression of semaphorin 4D. *Nat Med* 17, 1473-1480.
- 4) Ma QL, Fang L, Jiang N, Zhang L, Wang Y, Zhang YM, Chen LH (2018) Bone mesenchymal stem cell secretion of sRANKL/OPG/M-CSF in response to macrophage-mediated inflammatory response influences osteogenesis on nanostructured Ti surfaces. *Biomaterials* 154, 234-247.
- 5) Prasad P, Cancelas JA (2024) From marrow to bone and fat: exploring the multifaceted roles of leptin receptor positive bone marrow mesenchymal stromal cells. *Cells* 13, 910.
- 6) Reid IR, Baldock PA, Cornish J (2018) Effects of leptin on the skeleton. *Endocr Rev* 39, 938-959.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Baryawno N, Przybylski D, Kowalczyk MS, Kfoury Y, Severe N, Gustafsson K, Kokkalis KD, Mercier F, Tabaka

- M, Hofree M, Dionne D, Papazian A, Lee D, Ashenberg O, Subramanian A, Vaishnav ED, Rozenblatt-Rosen O, Regev A, Scadden DT (2019) A cellular taxonomy of the bone marrow stroma in homeostasis and leukemia. *Cell* 177, 1915-1932.e16.
- 10) Wu M, Wu S, Chen W, Li YP (2024) The roles and regulatory mechanisms of TGF- β and BMP signaling in bone and cartilage development, homeostasis and disease. *Cell Res* 34, 101-123.
 - 11) 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.
 - 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- κ 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) 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.
 - 16) DeFalco J, Tomishima M, Liu H, Zhao C, Cai X, Marth JD, Enquist L, Friedman JM (2001) Virus-assisted mapping of neural inputs to a feeding center in the hypothalamus. *Science* 291, 2608-2613.
 - 17) Rohlmann A, Gotthardt M, Willnow TE, Hammer RE, Herz J (1996) Sustained somatic gene inactivation by viral transfer of Cre recombinase. *Nat Biotechnol* 14, 1562-1565.
 - 18) Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16, 109-110.
 - 19) Nagashima T, Ninomiya T, Nakamura Y, Nishimura S, Ohashi A, Aoki J, Mizoguchi T, Tonogi M, Takahashi T (2022) p53 deficiency promotes bone regeneration by functional regulation of mesenchymal stromal cells and osteoblasts. *J Bone Miner Metab* 40, 434-447.
 - 20) Dempster WD, Compston JE, Drezner MK, Glorieux FH, Kanis JA, Malluche H, Meunier PJ, Ott SM, Recker RR, Parfitt AM (2013) Standardized nomenclature, symbols, and units for bone histomorphometry: a 2012 update of the report of the ASBMR Histomorphometry Nomenclature Committee. *J Bone Miner Res* 28, 1-16.
 - 21) Blumer MJF (2021) Bone tissue and histological and molecular events during development of the long bones. *Ann Anat* 235, 151704.
 - 22) Zhang B, Yang L, Zeng Z, Feng Y, Wang X, Wu X, Luo H, Zhang J, Zhang M, Pakvasa M, Wagstaff W, He F, Mao Y, Qin K, Ding H, Zhang Y, Niu C, Wu M, Zhao X, Wang H, Huang L, Shi D, Liu Q, Ni N, Fu K, Athiviraham A, Wolf JM, Lee MJ, Hynes K, Strelzow J, Dafrawy ME, Xia Y, He TC (2020) Leptin potentiates BMP9-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through the activation of JAK/STAT signaling. *Stem Cell Dev* 29, 498-510.
 - 23) 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.
 - 24) Micheletti C, Jolic M, Grandfield K, Shah FA, Palmquist A (2023) Bone structure and composition in a hyperglycemic, obese, and leptin receptor-deficient rat: Microscale characterization of femur and calvarium. *Bone* 172, 116747.
 - 25) Matsushita Y, Nagata M, Kozloff KM, Welch JD, Mizuhashi K, Tokovanich N, Hallett SA, Link DC, Nagasawa T, Ono W, Ono N (2020) A Wnt-mediated transformation of the bone marrow stromal cell identity orchestrates skeletal regeneration. *Nat Commun* 11, 332.
 - 26) Morikawa S, Mabuchi Y, Kubota Y, Nagai Y, Niibe K, Hiratsu E, Suzuki S, Miyauchi-Hara C, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Miyawaki A, Nakagawa T, Suda T, Okano H, Matsuzaki Y (2009) Prospective identification, isolation, and systemic transplantation of multipotent mesenchymal stem cells in murine bone marrow. *J Exp Med* 206, 2483-2496.
 - 27) Schiffer C, Tariverdian G, Schiesser M, Thomas MC, Sergi C (2002) Agnathia-otocephaly complex: report of three cases with involvement of two different Carnegie stages. *Am J Med Genet* 112, 203-208.
 - 28) Esposito A, Wang L, Li T, Miranda M, Spagnoli A (2020) Role of Prx-1-expressing skeletal cells and Prx-1-expression in fracture repair. *Bone* 139, 115521.
 - 29) Zhu S, Chen W, Masson A, Li YP (2024) Cell signaling and transcriptional regulation of osteoblast lineage commitment, differentiation, bone formation, and homeostasis. *Cell Discov* 10, 71.
 - 30) Horie T, Fukasawa K, Yamada T, Mizuno S, Iezaki T, Tokumura K, Iwahashi S, Sakai S, Suzuki A, Kubo T, Osumi R, Tomizawa A, Ochi H, Sato S, Kaneda K, Takahashi S, Hinoi E (2022) Erk5 in bone marrow mesenchymal stem cells regulates bone homeostasis by preventing osteogenesis in adulthood. *Stem Cells* 40, 411-422.