

令和元年6月3日現在

機関番号：32404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11562

研究課題名(和文) Canonical Wnt経路と歯髄創傷治癒

研究課題名(英文) Effects of canonical Wnt pathway on dental pulp wound healing

研究代表者

門倉 弘志 (Kadokura, Hiroshi)

明海大学・歯学部・講師

研究者番号：60343456

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：歯の象牙質形成にcanonical Wnt経路がどのように作用するかを目的にラット切歯由来の培養細胞を用いて研究を行った。Canonical Wnt経路の拮抗作用を持つectodinの発現を抑制させた培養細胞では象牙質の形成が減少した。これら細胞において培養初期ではcanonical Wnt関連因子の発現が上昇したが、培養後期ではこれら関連因子とWntの発現は抑制された。これらの結果からcanonical Wnt経路は象牙質形成を調節し、その作用にはcanonical Wnt経路自体の負の調節機構が存在することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

8020運動に代表されるように歯の保存はQOLに深くかかわっている。歯の保存治療では歯髄組織を保護し修復象牙質の形成を促進させる新たな治療法の開発が待ち望まれている。学術的意義として本研究によりcanonical Wnt経路が修復象牙質形成を調節していること、そしてその作用にはcanonical Wnt経路自体による負の制御機構が存在することが示唆されたことにある。社会的意義としてはcanonical Wnt経路の活性を調節し歯髄組織の修復象牙質形成を促進させる新たな歯科保存治療の開発の一助になると考える。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to research effects of canonical Wnt pathway in dentinogenesis using cultured rat dental pulp cells. Reduce the expression of Ectodin which is antagonist of canonical Wnt pathway decreased dentinogenesis in dental pulp cells. Expression of canonical Wnt pathway relating factors were promoted in these cells at early culture period but the expression of these factors and Wnt were decreased at late culture period. These results suggest that canonical Wnt pathway regulate dentinogenesis and there is a possible that canonical Wnt pathway has negative feedback regulations of itself.

研究分野：歯科保存治療学

キーワード：象牙質形成 象牙芽細胞分化 Canonical Wnt経路 ectodin

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

口腔の健康の維持・向上がQOLに大きな影響を与えることは周知の事実である。齲蝕治療において歯髄組織保存の可否は、その歯の予後に大きな影響を与え、抜歯後の根尖性歯周疾患や歯根破折など予後不良の場合は抜歯の原因と成りうる。このような理由から、歯髄組織の創傷治癒や修復象牙質形成のメカニズムを研究、解明することは、新たな歯髄保存治療の発展に役立ち、国民のQOLの向上に多大な貢献を果たすと考える。一方で、分泌型糖タンパク質のWntファミリーは個体発生や形態形成において重要な働きがあることが分かってきた。Wntの細胞内情報伝達経路の一つであるcanonical Wnt経路の活性化は様々な遺伝子発現をコントロールし、未分化な細胞の運命付けに作用していると考えられている。歯髄組織内にも未分化な外胚葉性間葉細胞が存在し、それら細胞は歯髄が損傷を受けた場合には、象牙芽細胞へ分化し、修復象牙質を形成する。しかし、歯髄創傷治癒におけるcanonical Wnt経路の作用は未だ不明な点が多く、歯科保存治療のさらなる発展や新たな歯髄保護法の開発の為にその作用についての詳細な解明が期待されている。

2. 研究の目的

本研究の目的はラット歯髄由来初代培養細胞を用いてcanonical Wnt経路が歯髄創傷治癒にどのように影響するかを調べることであり、具体的目的を以下に示す。

ラット臼歯部歯髄組織におけるcanonical Wnt経路関連因子の発現の確認を行う。また、ラット歯髄由来初代培養細胞において、Wnt10aのmRNAとcanonical Wnt経路に対するアンタゴニストである分泌タンパク質のectodinのmRNA遺伝子をknock downし、canonical Wnt経路の活性化と活性阻害を図ることによって象牙芽細胞分化と象牙質形成について対照群と比較解析を行う。

目的1. ラット下顎臼歯のパラフィン切片を作成し、歯髄組織におけるcanonical Wnt経路関連因子の発現について組織学的検索を行う。

目的2. Wnt10aならびにectodin遺伝子をknock downし、培養歯髄細胞の象牙芽細胞様細胞分化と象牙質様石灰化結節形成に及ぼす影響を解析する。

目的3. Wnt10aならびにectodin遺伝子をknock downし、canonical Wnt経路の下流で働く因子の発現状況を確認する。

目的4. Wnt10aならびにectodin遺伝子をknock downし、Wntならびにectodinの発現を解析し、同経路のnegative feedback機構の歯髄創傷治癒における役割を調べる。

以上の結果からcanonical Wnt経路と歯髄の創傷治癒について考察する。

3. 研究の方法

組織学的実験として歯髄組織でのectodinの発現を確認するため7週齢のラット下顎骨を中性ホルマリンにて固定したのちエタノールによる脱脂、EDTAによる脱灰を経て、通法に従い臼歯のパラフィン顕微鏡切片を作成した。これらパラフィン切片に対し通法に従いヘマトキシリン-エオジン染色と一次抗体に抗ectodin抗体を用いた免疫組織学的染色法を行い歯髄組織におけるectodinの局在を確認した。

培養細胞を用いた実験ではラット雌7週齢5匹から下顎切歯歯髄組織を取り出し、トリプシンとコラゲナーゼを含む酵素液にて細胞を分離し初代歯髄培養細胞として用いた。これらの細胞を10%牛血清、アスコルビン酸(50 µg/ml)、グリセロリン酸(300 µg/ml)ならびに抗菌薬(ペニシリンとストレプトマイシン)を含むMEMにて培養を行った。これらの細胞に対して、Wnt10aならびにectodin mRNAに対するsiRNAを作成して発現ベクターに組み込み培養細胞

に遺伝子導入して knock down 実験を行った。コントロールとしてシャッフルした siRNA を発現ベクターに組み込んだものを実験群と同様に培養細胞に遺伝子導入して比較・検討を行った。培養期間は 21 日間として培養開始から 7 日目（培養初期）、21 日目（培養後期）にコントロール群と実験群のサンプリングを行った。形態学的観察として培養 21 日目における培養細胞の von Kossa 染色とアルカリフォスファターゼ染色を行い象牙質様石灰化結節の形成量についての観察を行った。また、培養初期ならびに培養後期における各サンプルから total RNA を抽出し reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)法により cDNA を作成して Real Time PCR 法を用いて Wnt10a, ectodin, dentin sialo phosphoprotein (DSPP), Axin2, Runx2 の遺伝子発現を解析し象牙芽細胞分化と象牙質形成に及ぼす影響を調べ、canonical Wnt 経路の活性化とそのフィードバック機構についての解析を行った。

4 . 研究成果

ラット下顎臼歯の脱灰パラフィン顕微鏡用切片を用いた組織学的実験ではヘマトキシリン-エオジン染色において臼歯の歯髄に修復象牙質形成の盛んな象牙芽細胞集団が認められ、免疫組織学的染色法ではその修復象牙質形成の盛んな象牙芽細胞集団に一致して抗 ectodin 抗体の陽性反応が認められた。また象牙細管や象牙芽細胞突起にも陽性反応が認められた。これらの実験結果から canonical Wnt 経路と修復象牙質ならびに象牙芽細胞の機能には深い関与があることが示唆された。

ラット歯髄培養細胞を用いた実験ではコントロール群の ectodin 発現は培養初期から培養後期を通じて認められた。Ectodin knock down(ectodin-KD)群の ectodin mRNA 発現は培養初期、培養後期共にコントロールに対して 30%程度となり、ectodin の knock down 効果が real time PCR 法により確認できた。Ectodin-KD 群では、培養初期、培養後期共に DSPP mRNA の発現と象牙質様石灰化結節の形成がコントロールに比較して有意に抑制され、象牙芽細胞様細胞への分化が強く抑制された。また、ectodin-KD 群の Axin2 発現は培養初期では促進されたが培養後期ではその発現は逆に抑制された。一方で ectodin-KD 群の Wnt10a 発現は培養初期ではコントロールと差はなく培養後期では優位に抑制された。これら実験結果からか ectodin の遺伝子を knock down することによる canonical Wnt 経路の活性化は培養歯髄細胞の象牙芽細胞様細胞分化と象牙質様石灰化結節形成を抑制することが示唆された。また、canonical Wnt 経路の下流で働き、canonical Wnt 経路の活性化を意味する Axin2 発現は実験群ではコントロール群と比較して培養初期では上昇したが培養後期では抑制されたことと、ectodin-KD 群の Wnt10a 発現は培養初期ではコントロール群と変化がなく、培養後期でコントロール群に比較して抑制されたことを考えると ectodin knock down によって培養初期では canonical Wnt 経路が活性化されて Axin2 発現が上昇し、培養後期では逆に canonical Wnt 経路の活性化を抑制しようとするネガティブフィードバック機構が働いている可能性が示唆された。個体発生や形態形成において canonical Wnt 経路の活性化は未分化間葉細胞の増殖や分化の運命付けに作用することが報告されており無秩序な canonical Wnt 経路の活性化は生体の正常な発育や機能に問題を起こすことが考えられ、過剰な canonical Wnt 経路の活性化を抑制するために、このような負の調節機構が存在することが示唆された。これらの実験結果から canonical Wnt 経路は歯髄の創傷治療過程で象牙芽細胞分化ならびに修復象牙質形成を調節していることが示唆された。

一方で Wnt10a knock down(Wnt10a-KD)群の Wnt10a 発現は対照群に比較して有意に減少し、knock down の効果が確認出来た。Wnt10a-KD 群では象牙質石灰化結節の形成が抑制され、Runx2、DSPP の発現も対照群に比較して有意に抑制された。しかし、Wnt10a KD 群では ectodin の発現

も抑制されたが、ectodin KD 群では Wnt10a 発現の変化は認められなかった。これら結果から Wnt10a と ectodin は象牙質形成に重要な作用を及ぼすことがわかった。また、Wnt10a の作用は歯髄細胞の ectodin 発現に影響を与えるが、ectodin は歯髄細胞の Wnt10a の発現に影響しないことが示唆された。また、Runx2 は DSPP の発現を調節しており、その Runx2 の発現は Wnt10a により誘導されることから、Wnt10a は Runx2 を介して DSPP の発現を調節していることが考えられる。一方で、ectodin KD 群でも Runx2、DSPP の発現が抑制されたが Wnt10a の発現は影響を受けなかったことから考えると Wnt10a は ectodin の上流で象牙質形成を調節していることが示唆された。本実験結果の結論として Wnt10a と ectodin は象牙芽細胞分化と象牙質形成をコントロールしていることが示唆された。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kadokura Hiroshi, Yamazaki Takahide, Masuda Yoshiko, Kato Yuka, Hasegawa Akihiko, Sakagami Hiroshi, Yokose Satoshi: Establishment of a primary culture system of human periodontal ligament cells that differentiate into cementum protein 1-expressing cementoblast-like cells. *in vivo* 33: 349-352, 2019. DOI: 10.21873/invivo.11480

門倉 弘志, 山崎 崇秀, 上田 堯之, 日下 洋平, 横瀬 敏志:

ラット頭蓋骨由来初代培養細胞系の骨細胞様細胞分化について. *日本歯科保存学雑誌* 60 巻 3 号 Page128-134 2017 年

〔雑誌総説〕(計 1 件)

横瀬敏志、門倉弘志: 歯髄組織と Ectodin. *日本歯科保存学雑誌*, 59 巻 4 号、Page 305-310、2016.

〔学会発表〕(計 6 件)

増田宜子、門倉弘志、山崎崇秀、上田堯之、加藤邑佳、横瀬敏志.

GSK-3 アンタゴニスト(Tideglusib)による培養歯髄細胞の修復象牙質産生への影響の解明
特定非営利活動法人日本歯科保存学会学術大会プログラムおよび講演抄録集 149 回 Page111、
2018 年 10 月

加藤邑佳、上田堯之、矢野結、山崎崇秀、門倉弘志、増田宜子、横瀬敏志.

Oxytocin が培養歯髄細胞の dentinogenesis に及ぼす影響について
特定非営利活動法人日本歯科保存学会学術大会プログラムおよび講演抄録集 148 回 Page124、
2018 年 5 月

門倉弘志、山崎崇秀、上田 堯之、横瀬敏志.

ラット歯髄培養細胞の象牙質形成における Wnt10a と Ectodin の作用について
日本歯内療法学会学術大会プログラム・抄録集 38 回 page122、2017 年 7 月

門倉弘志、ogenesis と Dentinogenesis におよぼすレーザーの作用 -エピジェネティクスから
レーザーの作用を考える- . 第 20 回 Er : YAG レーザー臨床研究会記念大会プログラム . 特別講演

2017年7月

上田堯之、山崎崇秀、門倉弘志、横瀬敏志。

ラット歯髄培養細胞の分化に及ぼす Wnt10a と Ectodin の作用について

特定非営利活動法人日本歯科保存学会学術大会プログラムおよび講演抄録集 146回 Page113、
2017年5月

上田堯之、門倉弘志、山崎崇秀、鈴木瑛子、高橋淳哉、石岡和仁、藤原ひかり、横瀬敏志。

ラット培養歯髄細胞の dentinogenesis における ectodin と wnt シグナルの影響について

特定非営利活動法人日本歯科保存学会学術大会プログラムおよび講演抄録集 144回 Page127、
2016年6月

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

無し

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：無し

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：無し

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。