

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861589

研究課題名(和文) 歯髄幹細胞の分化におけるWntシグナルネットワークの包括的解析と歯髄再生への展望

研究課題名(英文) Analysis of Wnt signal network in the differentiation of dental pulp stem cells and clinical dental pulp regeneration by Wnt-signal modified dental pulp stem cells

研究代表者

小泉 悠 (Koizumi, Yu)

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：70635549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Wntシグナルは多くの組織・細胞の発生および分化に深く関わっているが、歯髄を含む歯の発生においても重要な役割を担っていると考えられており、歯の発生初期よりWntの発現が認められている。今回、歯髄幹細胞におけるWntシグナルとBMPシグナルのクロストークについて検討を行った。BMPシグナルは歯髄幹細胞の象牙芽細胞分化を誘導するが、その過程でWntの発現を誘導し、Wntシグナルを増強することが明らかになった。BMPおよびWntシグナルを誘導することで、再生歯髄組織における歯髄幹細胞からの象牙芽細胞を効率的に誘導できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Wnt signaling is involved in virtually every aspect of embryonic development, and it is also involved in tooth development including dental pulp tissue. In this project, a crosstalk between Wnt signaling and BMP signaling in the dental pulp stem cells (DPSCs). BMP signaling induces odontoblastic differentiation of DPSCs, and it also stimulates Wnt expression and promotes Wnt signaling. Crosstalk between BMP and Wnt signaling may be essential for odontoblastic differentiation from DPSCs, and effective induction of crosstalk between BMP and Wnt signaling in DPSCs may be a key to promote odontoblastic differentiation in clinical pulp regeneration by DPSCs application.

研究分野：歯内療法学

キーワード：歯髄幹細胞 Wnt シグナルネットワーク 分化誘導 歯髄再生 BMP2

1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナルは多くの組織・細胞の発生および分化に深く関わっているが、歯の発生においても重要な役割を担っていると考えられており、歯の発生初期より発現が認められている¹。特に重要なのは、歯の発生のみならず多くの細胞・組織発生・分化においても必須の因子である、BMPs、FGFs、shh と相互に発現を調節している点である¹。近年、Wnt とその他の因子とのクロストークを詳細に解析した結果、歯の発生においては、Wnt シグナルがまずその起点となりうる可能性が示唆された²。すなわち、歯の発生を制御している中心的な因子の一つは Wnt であると考えられる。

ところで、歯髓組織は未分化間葉系の組織であり、歯乳頭がそのオリジンである。歯胚の間葉系細胞から歯乳頭細胞がどのような経緯で分化し、さらに歯髓細胞および象牙芽細胞に分化するのかについて、いまだ十分な知見は得られていない。歯の発生過程から推察して、歯髓の分化においても Wnt シグナルは中心的な働きを担っている可能性は高い。本研究においては、ヒト歯髓幹細胞の分化における Wnt シグナルの包括的な解明を目指すとともに、その臨床的な展望について検討する。

2. 研究の目的

Wnt シグナルは全ての動物の発生、組織の再生等において重要な役割を持っており、歯胚発生の過程において Wnt および Wnt 関連因子の発現が報告されている。歯髓幹細胞の分化に Wnt シグナルが関わ

っている可能性は高いと考えられるが、Wnt ファミリーを包括的に検討し、そのシグナルカスケードについて検討した報告はまだない。本研究の目的は、歯髓幹細胞から象牙芽細胞分化にかかわる Wnt シグナルの包括的解析である。歯髓幹細胞から象牙芽細胞分化における Wnt シグナルの詳細を明らかにすることで、象牙芽細胞分化のメカニズムの一端が明らかになると期待される。本結果さらに推し進め、臨床において象牙芽細胞を誘導する手法についても検討する。

3. 研究の方法

(1) ヒト歯髓幹細胞分化に関与する Wnt ファミリーの包括的な解析

申請者はこれまでにマウス由来株化歯乳頭細胞 MDP を用い、それを BMP2 にて象牙芽細胞へ分化誘導する実験系を確立した。その過程で変動する Wnt ファミリーを検討し、これまで報告のある Wnt5a 以外にも数種の Wnt が動いていることを確認した。

今回ヒト歯髓幹細胞（東京医科歯科大学倫理審査番号#948）を用い、BMP2 にて象牙芽細胞へ分化誘導する過程における Wnt ファミリーの発現を RT-rPCR にて検討した。ヒト歯髓幹細胞は、新鮮抜去歯より歯髓組織を摘出し、物理的に細断した後、リベラーゼにて分解し、セルストレーナを介してディッシュ（直径 90mm）に播種した。メディアムは MEM を使用し、FBS を 10% 添加した。その後、コロニー形成細胞を選択し、歯

髄幹細胞として実験に供した。
 BMP-2は100ng/mlの濃度でヒト歯髄細胞に添加した。添加後3日後に細胞よりRNAを抽出し、逆転写を行い、特異的プライマーを用いた rPCR に供した。

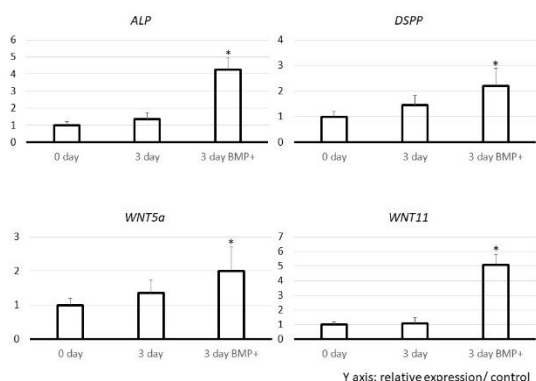
(2) ヒト歯髄幹細胞分化に関与する Wnt シグナルの解析

Wnt シグナル阻害剤である IWR1-endo を添加し、ヒト歯髄幹細胞における象牙芽細胞マーカー発現を rPCR にて解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト歯髄幹細胞における Wnt 発現

ヒト歯髄幹細胞に BMP2 を添加することで、ALP、DSPP の発現が亢進した(図1)。また、Wnt5a および Wnt11 の発現が、増加した (* : $p < 0.05$, one way ANOVA, Tukey-Kramer)。すなわち、BMP2により誘導される象

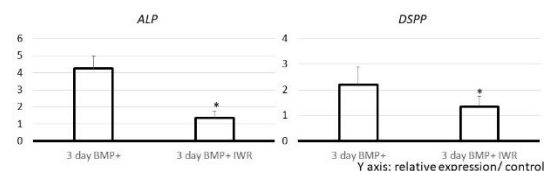


象牙芽細胞分化において Wnt 産生が誘導され、産生された Wnt が象牙芽細胞分化をさらに誘導している可能性が示唆された。しかし、Wnt 産生が象牙芽細胞分化とは無関係に

BMP2 により誘導された可能性も否定はできない。

(2) ヒト歯髄幹細胞における Wnt シグナル

ヒト歯髄細胞を BMP にて分化誘導した後、Wnt インヒビターを添加したところ、象牙芽細胞マーカーの発現が抑制された (* : $p < 0.05$, student's t)。



以上の結果は、Wnt が象牙芽細胞分化において、重要な働きを担っていることを示唆している。今回 BMP2 による象牙芽細胞分化に Wnt シグナルが促進的に作用している可能性が示唆されたが、象牙質分化において TGFb および TGFb シグナルが重要であるとの報告 3 もあり、TGFb と Wnt シグナルの関連についてさらに検討していく必要がある。

< 引用文献 >

1. Thesleff I. et al., Developmental biology and building a tooth. Quintessence Int. 2003 Sep; 34(8): 613-20
2. O'Connell. et.al., A Wnt-bmp feedback circuit controls intertissue signaling dynamics in tooth organogenesis. Sci Signal. 2012 Jan 10;5(206):ra4.
3. Oka S, et al, Cell autonomous requirement for TGF-beta signaling during

odontoblast differentiation and dentin matrix formation. Mech Dev. 2007 Jul;124(6):409-15. Epub 2007 Mar 12.

東京医科歯科大学・歯学部・非常勤
講師

研究者番号：70635549

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

K Takimoto, N Kawashima, N Suzuki, Y Koizumi, M Yamamoto, M Nakashima, H Suda, Down-regulation of Inflammatory Mediator Synthesis and Infiltration of Inflammatory Cells by MMP-3 in Experimentally-induced Rat Pulpitis, J Endod. 査読あり 2014 Sep;40(9):1404-9.

〔学会発表〕(計2件)

川島伸之、山本弥生子、橋本健太郎、Alumddin Bakhit、小泉悠、大井智恵、鈴木規元、三次元培養による歯髄・歯肉幹細胞の生物学的特性、第14回日本再生医療学会総会、2015年3月19-21日、パシフィコ横浜(神奈川県、横浜市)

川島伸之、山本弥生子、橋本健太郎、Alumddin Bakhit、小泉悠、辺見浩一、大井智恵、鈴木規元、興地隆史、歯髄組織および歯肉組織より得られた間葉系幹細胞の硬組織形成細胞への分化能の比較、第142回日本歯科保存学会春季大会、2015年6月25日、26日、西日本総合展示場・北九州国際会議場(小倉、北九州市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小泉 悠 (KOIZUMI Yu)