

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390552

研究課題名（和文）

Wnt シグナル制御を軸としたセメント質再生法の基盤構築

研究課題名（英文）

Study of cementogenesis and Wnt signaling

研究代表者

根本 英二（NEMOTO EIJI）

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：40292221

研究成果の概要（和文）：

Wnt 蛋白は、個体の発生や生体組織の機能維持に至る様々な局面で機能する分泌型の糖タンパク分子である。Wnt5a を代表とする非古典的経路のシグナルはどのような機能を有するかどうか未だ不明な点が多く残されている。本研究において、実験動物および培養細胞を用いて解析を行なったところ、未分化な細胞が骨を作る細胞に分化するにつれて Wnt5a が強く発現してくることを明らかにした。さらに、その遺伝子の発現を消失させたところ、骨の成長が抑制されることを証明した。

研究成果の概要（英文）：

Wnts are secreted glycoproteins that mediate developmental and post-developmental physiology through canonical and noncanonical pathway. Although it appears that Wnt5a signaling supports normal bone physiology, the biological significance of noncanonical Wnts in osteogenesis is essentially unknown. In this study, we identified the expression of Wnt5a in osteoblasts in the tibial growth plate as well as bone marrow of rat tibia. Silencing gene expression of Wnt5a in cultured pre-osteoblast cells results in suppression of osteoblastic differentiation, suggesting that Wnt5a signaling are of substantial importance for osteoblastic differentiation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	6,700,000	2,010,000	8,710,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・歯周治療系歯学

キーワード：Wnt シグナル、セメント芽細胞、細胞分化

1. 研究開始当初の背景

Wnt は初期発生や生体組織の機能維持に至る様々な局面で機能する分子であり、Canonical Wnt シグナル経路（代表分子：Wnt3a）と Non-canonical Wnt シグナル経路（代表分子：Wnt5a）の2種類に大別される。これまでに Canonical Wnt シグナルは骨の増生に関与する重要なシグナルであることが多くの研究から明らかとなっている。さらに、細胞の種類や分化度に依存して分化抑制作用を示すことも知られている。一方、Non-canonical Wnt シグナルに関する解析はあまり進んでいなかったが、同シグナル（Wnt5a）が Canonical Wnt シグナルに対して抑制作用を示すことが示唆され、骨の生物学における Wnt5a の役割に大きな注目が集まっている。申請者らはこれまでに、不死化マウスセメント芽細胞において Wnt3a シグナルが骨形成性転写因子の発現調節を介して細胞分化を抑制し、さらに細胞増殖を誘導することを明らかにしてきた。また、同細胞は Wnt5a 遺伝子を発現していることから、Wnt3a シグナルとのクロストークが存在しているものと考えられ、それを解析することはセメント質再生の機序解明につながると考えられた。

2. 研究の目的

歯周組織の再生において、セメント質は歯根と歯周組織の付着に最も重要な役割を果たす。従って、セメント芽細胞の分化と機能を規定する因子を明らかにすることは歯周組織再生医学の発展に大きな意味を持つと考える。我々は、「Wnt3a シグナルはセメント芽細胞の分化誘導経路を遮断し、細胞増殖を促進する。一方、Wnt5a シグナルは細胞の分化誘導を促進させる。この2つの Wnt シグナルはクロストークしており、そのバランスと量によりセメント芽細胞の機能が規定される」という仮説を立てた。本研究はこの仮説の証明を行い、

Wnt シグナル制御によるセメント質再生誘導法の基盤を構築することを目的とする。

3. 研究の方法

使用する細胞はマウスセメント芽細胞（OC-CM30、M. Somerman (NIDCR) より供与）および、マウス前骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞（ATTC）を用いる。

(1) 細胞分化過程における Wnt5a の発現の解析（免疫組織化学法、リアルタイム RT-PCR 法）

(2) Wnt5a シグナルによるセメント芽細胞および前骨芽細胞の機能調節（in vitro）。レコンビナント蛋白による刺激あるいは Wnt5a 遺伝子ノックダウン（siRNA 法）により分化マーカーの発現を解析（リアルタイム RT-PCR 法）

(3) 細胞内シグナル伝達の解析

特に Ror2 経路について Ror2 のリン酸化の検討（Western blot 法）および、Ror2 遺伝子ノックダウン法を用いて解析を進める。

(4) Wnt3a と Wnt5a シグナルのクロストーク作用の解析（in vitro）

Wnt3a による Wnt5a/Ror2 シグナル伝達に与える影響を、細胞内シグナル伝達レベル（Western blot 法）での解析を行なうとともに BMP-2/Smad シグナルと Wnt5a シグナルのクロストークの可能性について解析を広げる（Western blot 法）。

4. 研究成果

本研究において、Wnt5a がラット脛骨成長板の石灰化部の骨芽細胞ならびにラット脛骨骨髄の骨芽細胞に発現していることを免疫組織化学によって証明した。さらに、培養前骨芽細胞（MC3T3-E1 細胞）を用いて、BMP-2（bone morphogenetic protein-2）刺激により誘導される分化モデルにおいて、細胞分化に伴い Wnt5a および Ror2 の発現

が亢進することをリアルタイム PCR 法によって明らかにした。この BMP-2 刺激による同細胞の分化モデルを用いて解析を進めたところ、siRNA 法により Wnt5a およびその受容体である Ror2 の遺伝子発現をノックダウンすることにより、アルカリホスファターゼおよびオステオカルシン遺伝子発現、ならびにアルカリホスファターゼ活性が抑制されることが明らかとなった。これらの知見は、BMP-2 刺激による骨芽細胞の分化においては、Wnt5a/Ror2 シグナルが重要な役割を担っていることが示唆されるものである。さらに、BMP-2/Smad シグナルをウェスタンブロット法で解析したところ、同細胞の Wnt5a 遺伝子のノックダウンの有無にかかわらず、Smad1/5/8 のリン酸化が同程度に誘導された。このことから、Wnt5a シグナリングは BMP-2/Smad シグナリングとは独立して機能していることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

1. Wnt5a signaling is a substantial constituent in bone morphogenetic protein-2-mediated osteoblastogenesis. Nemoto, E., Y. Ebe, S. Kanaya, M. Tsuchiya, T. Nakamura, M. Tamura, and H. Shimauchi. Biochem. Biophys. Res. Commun. (in press) 2012 (査読あり)
2. Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells. Tada, H., E. Nemoto, B. L. Foster, M. J. Somerman, and H. Shimauchi. Bone. 48 (6), 1409-1416, 2011 (査読あり)
3. Elevated extracellular calcium increases fibroblast growth factor-2 gene and protein expression levels via a cAMP/PKA dependent pathway in cementoblasts. Kanaya, S., E. Nemoto, Y. Ebe, M. J. Somerman, and H. Shimauchi. Bone. 47 (3), 564-572, 2010 (査読あり)
4. Role of the Wnt signaling pathway in bone and tooth. Tamura, M., E. Nemoto, M. M. Sato, A. Nakashima, and H. Shimauchi. Front. Biosci. E2: 1405-1413, 2010 (査読あり)
5. Elevated extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells. Tada, H., E. Nemoto, S. Kanaya, N. Hamaji, H. Sato, and H. Shimauchi. Biochem. Biophys. Res. Commun. 394 (4), 1093-1097, 2010 (査読あり)
6. Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. Nemoto, E., Y. Koshikawa, S. Kanaya, M. Tsuchiya, M. Tamura, M. J. Somerman, and H. Shimauchi. Bone. 44 (5), 805-812, 2009 (査読あり)
7. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae induce unique dendritic cell subsets via Toll-like receptor 2. Kanaya, S., E. Nemoto, T. Ogawa, and H. Shimauchi. J. Periodontal Res. 44 (4), 543-549, 2009 (査読あり)

[学会発表] (計 12 件)

1. 根本英二、細胞外 Ca^{2+} と歯根膜組織～細胞の分化制御因子としての役割～ (招待講演)、第 60 回東北大学歯学会、2011 年 12 月 9 日、仙台
2. 根本英二、非外科的療法を行った広汎型侵襲性歯周炎患者の 12 年経過症例、第 54 回秋季日本歯周病学会、2011 年 9 月 34 日、下関
3. E. Nemoto, H. Tada, and H. Shimauchi, Extracellular phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression in human dental pulp cells and human periodontal ligament cells. 4th International Symposium for interface Oral Health Science March 7-8, 2011, Sendai
4. M. Tsuchiya, T. Kiyama, S. Tsuchiya, H. Takano, E. Nemoto, K. Sasaki, S. Sugawara, Y. Endo and M. Watanabe, Roles of IL-6 in mastication in mice and effects of training and food hardness. 4th International Symposium for interface Oral Health Science, March 7-8, 2011, Sendai
5. 江部由佳梨、根本英二、金谷聡介、土谷昌広、多田浩之、島内英俊、Non-Canonical Wnt シグナルによる骨芽細胞の分化抑制作用について、第 57 回東北大学歯学、2010 年 6 月 18 日、仙台
6. 多田浩之、根本英二、島内英俊、細胞外リン酸は Pit1 および ERK1/2 を介してヒト歯髄細胞から bone morphogenetic protein-2 を誘導する、第 132 回日本歯科保存学会、2010 年 6 月 4, 5 日、熊本
7. 金谷聡介、根本英二、後藤和宏、島内英俊、セメント芽細胞におけるプロテインキナーゼ C 依存性 Fibroblast growth factor 2 発現増強作用、第 132 回日本歯科保存学会、2010 年 6 月 4, 5 日、熊本
8. 後藤和宏、根本英二、金谷聡介、多田浩之、島内英俊、細胞外 NAD^{+} によるマトリックスメタロプロテアーゼの発現抑制作用、第 132 回日本歯科保存学会、2010 年 6 月 4, 5 日、熊本
9. 根本英二、「歯周組織への感染とそれに対する免疫応答の特異性とは？」歯周組織構成細胞による炎症反応制御システム—細胞膜表面酵素を中心に— (シンポジウム講演)、第 53 回春季日本歯周病学会、2010 年 5 月 14, 15 日、盛岡
10. 金谷聡介、根本英二、江部 由佳梨、島内英俊、セメント芽細胞において細胞外カルシウム刺激は cAMP/PKA 依存性に Fibroblast growth factor 2 の発現を誘導する、第 53 回春季日本歯周病学会、2010 年 5 月 14, 15 日、盛岡
11. 江部 由佳梨、根本英二、金谷 聡介、多田浩之、島内英俊、Non-Canonical WNT シグナルが骨芽細胞の分化に与える影響について、第 53 回春季日本歯周病学会、2010 年 5 月 14, 15 日、盛岡
12. 多田浩之、根本英二、金谷聡介、島内英俊、細胞外リン酸によるヒト歯髄細胞からの bone morphogenetic protein-2 発現誘導、第 131 回日本歯科保存学会、2009 年 10 月 29, 30 日、仙台

[図書] (計 2 件)

1. E. Nemoto, H. Tada, H. Shimauchi: Extracellular phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression in human dental pulp cells and human periodontal ligament cells. Interface Oral Health Science 2011 (K. Sasaki, O. Suzuki and N. Takahashi

- eds.), Springer, Tokyo, 2012, 143-144.
2. M. Tsuchiya, T. Kiyama, S. Tsuchiya, H. Takano, E. Nemoto, K. Sasaki, S. Sugawara, Y. Endo, M. Watanabe: Role of IL-6 in mastication in mice and effects of training and food hardness. Interface Oral Health Science 2011 (K. Sasaki, O. Suzuki and N. Takahashi eds.), Springer, Tokyo, 2012, 104-106.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

根本 英二 (NEMOTO EIJI)

東北大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：40292221

(2) 研究分担者

島内 英俊 (SHIMAUCHI HIDETOSHI)

東北大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：70187425

田村 正人 (TAMURA MASATO)

北海道大学・大学院歯学研究科・教授

研究者番号：30236757

多田 浩之 (TADA HIROYUKI)

東北大学・大学院歯学研究科・大学院非常勤

講師

研究者番号：70431632

(3) 連携研究者

なし