

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20458

研究課題名(和文) Wnt5aシグナルによる効果的な歯根膜組織再生を用いた次世代型意図的再植法の開発

研究課題名(英文) Establishment of the next-generation intentional replantation by using of Wnt5a signaling-induced effective periodontal ligament tissue regeneration

研究代表者

長谷川 大学 (Hasegawa, Daigaku)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：20757992

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究において、Wnt5aがRor2およびJNKを介して、ヒト歯根膜細胞のコラーゲン線維形成の促進ならびに石灰化の抑制に働くことが明らかとなった。また、Ror2は歯根膜マーカーの発現が高いヒト歯根膜細胞株において高発現することも示された。以上のことから、Wnt5a/Ror2/JNKシグナルが歯根膜組織が石灰化することなく線維性結合組織を維持するメカニズムに関与することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was revealed that Wnt5a acts on promoting the collagen-formation and suppression of the calcification in human periodontal ligament (PDL) cells via Ror2 and JNK. It was also shown that Ror2 is highly expressed in human PDL cell line with high expression of PDL-related markers. These results suggest that Wnt5a/Ror2/JNK signaling is involved in the mechanism by which PDL tissue maintains fibrous connective tissue without calcification.

研究分野：医歯薬学

キーワード：歯根膜 Wnt5a Ror2 JNK コラーゲン線維形成促進 石灰化抑制

1. 研究開始当初の背景

垂直性歯根破折歯や通常の根管治療では治癒しない歯に対して用いられる効果的な保存治療法として意図的再植法が実施されているが、その問題点として、歯根膜組織の広範な損傷を伴う場合には、うまく生着しない、あるいは骨性癒着(アンキロシス)が発生する点が挙げられる。したがって、これらの治療法のさらなる成功率向上のためには、効果的な歯根膜組織の再生ならびにアンキロシスの抑制が必要と考えられる。

歯根膜組織に存在する細胞集団には、主体をなす線維芽細胞だけでなく、骨芽細胞、セメント芽細胞、歯根膜前駆(幹)細胞など、石灰化能を有する細胞が混在しているが、歯根膜組織は生理的状況下では石灰化せず、線維性結合組織を維持している。申請者は最近、増殖や分化、遊走など様々な細胞機能に關与する分泌タンパク“Wnt5a”が、歯根膜組織に強発現しており、ヒト歯根膜細胞において、歯根膜組織の主体成分であるコラーゲン線維の形成を促進すること、さらに、石灰化を抑制することを明らかにした(Hasegawa et al., J Cell Physiol, 2015)。このことから、Wnt5a が生体内において歯根膜組織の形成促進ならびに石灰化抑制に作用することで、歯根膜組織の恒常性維持に關与する可能性が示唆され、Wnt5a が効果的な歯根膜組織の再生ならびに再植時におけるアンキロシスの抑制に対して有効なツールになりうるのではないかと考えるに至った。

Wnt5a は、Wnt シグナルのうち、主に非古典的(ノンカノニカル)Wnt シグナルを活性化することが知られている。また、Frizzled (Fzd) 2、Fzd4、Fzd5 および receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2 (Ror2) などの多様なレセプターと結合し、結合するレセプターおよびその下流のシグナルにより様々な異なる機能を発揮することが報告されている(Mikels and Nusse. PLoS Biol, 2006; Sato et al., J Biol Chem, 2010; Blumenthal et al., Blood, 2006; Oishi et al., Genes Cells, 2003)。しかしながら、Wnt5a によるコラーゲン線維形成に關与するレセプターおよび細胞内シグナル因子に關する報告は未だなく、硬組織形成に關しても Wnt5a/Ror2 シグナルが抑制的に作用することが報告されている(Maeda et al., Nat Med, 2012; Lin et al., Dev Dyn, 2011)ものの、ヒト歯根膜細胞においては未だ明らかにされていない。

そこで本研究では、ヒト歯根膜細胞のコラーゲン線維形成促進ならびに石灰化抑制に關与する Wnt5a シグナルのメカニズムについて詳細な検討を行い、さらには、Wnt5a シグナルの活性化がこれらの作用に及ぼす影響について検討することとした。

2. 研究の目的

本研究では、ヒト歯根膜細胞のコラーゲン線維形成促進ならびに石灰化抑制に關与

するレセプターおよび細胞内シグナル因子の解析を行うこと、さらには、このシグナルの活性化がヒト歯根膜細胞のコラーゲン線維形成促進ならびに石灰化抑制に及ぼす影響について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) マイクロアレイ解析による網羅的レセプター発現解析

まず、当研究室にて樹立したヒト不死化歯根膜細胞から作製した約 80 種類のクローン(細胞株)を用いて、RT-PCR 法により、各種歯根膜マーカー(Col-1, Periostin, ACTA2)の顕著に高い細胞株と、顕著に低い細胞株という、性質の大きく異なる 2 種類の細胞株を抽出した。次に、それらの mRNA サンプルを用いてマイクロアレイ解析を行い、Wnt 関連レセプターの網羅的発現解析を行った。

(2) siRNA を用いたノックダウンアッセイによるレセプター解析

Wnt5a のコラーゲン線維形成促進ならびに石灰化抑制に關与するレセプターを同定するため、(ヒト歯根膜細胞株において高発現する Wnt 関連レセプターである) Ror2 の siRNA を用いて、Ror2 発現をノックダウンしたヒト歯根膜細胞株におけるコラーゲン線維形成能ならびに石灰化能について、以下の方法にて解析した。

コラーゲン線維形成解析

Wnt5a (50 ng/ml) 添加培地にてヒト歯根膜細胞株を一定期間培養し、各種歯根膜関連マーカー(Col-1, Periostin, ACTA2)の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法にて解析した。また、コラーゲン線維形成能についてコラーゲンアッセイおよびピクロシリウスレッド染色にて評価した。

石灰化解析

Wnt5a (50 ng/ml) 添加石灰化誘導培地にてヒト歯根膜細胞株を一定期間培養し、各種骨関連マーカー(ALP, Osterix, BSP)の遺伝子発現を定量的 RT-PCR 法にて解析した。また、アリザリンレッド S 染色により石灰化能を評価した。

(3) 各種細胞内シグナル因子の阻害剤を用いたシグナル解析

まず、Wnt5a 刺激によりリン酸化の亢進する細胞内シグナル因子をウェスタンブロット法にて検討する。次に、それらのシグナル因子の阻害剤を Wnt5a とともに添加した培地にてヒト歯根膜細胞株を一定期間培養し、コラーゲン線維形成能ならびに石灰化能について、(2)と同様の方法にて評価した。

(4) Wnt5a シグナルの活性化がヒト歯根膜細胞のコラーゲン線維形成ならびに石灰化に及ぼす影響の検討

分泌タンパク Cthrc1 は Wnt5a と Ror2 の結合を促進し、ノンカノニカル Wnt シグナルを

選択的に活性化することが報告されている (Yamamoto et al., Dev Cell, 2008)。そこで、Cthrc1 タンパクを Wnt5a とともに添加した培地を用いて、Cthrc1 が Wnt5a によるコラーゲン線維形成促進ならびに石灰化抑制に及ぼす影響について、(2)と同様の方法にて評価した。

4. 研究成果

(1) マイクロアレイ解析による網羅的レセプター発現解析

我々はまず、約 80 種類のヒト歯根膜細胞株の中から、RT-PCR 法により、歯根膜マーカーを高発現するヒト歯根膜細胞株 (Line 2-23) と、歯根膜マーカーの発現が顕著に低い細胞株 (Line 2-52) という、性質の大きく異なる 2 種類の細胞株を抽出した。次に、それらの mRNA サンプルを用いてマイクロアレイ解析を行い、Line 2-23 において高発現する Wnt 関連レセプターを探索した。その結果、興味深いことに、Wnt5a と結合することが多数報告されている Ror2 が、Line 2-23 において顕著に高発現することが明らかとなった。また、抗 Ror2 抗体を用いた免疫蛍光染色法により、Line 2-23 において強い陽性反応が認められた。これらのことより、Ror2 がヒト歯根膜細胞の機能に与える可能性が示唆された。

(2) siRNA を用いたノックダウンアッセイによるレセプター解析

Wnt5a のコラーゲン線維形成促進ならびに石灰化抑制に Ror2 が関与するかどうかを検証するため、Ror2 の siRNA を用いて、Ror2 発現をノックダウンした Line 2-23 におけるコラーゲン線維形成能ならびに石灰化能について解析した。その結果、siRNA により Ror2 の発現をノックダウンした Line 2-23 において、Wnt5a により促進された各種歯根膜マーカー発現、コラーゲン分泌量、およびピクロシリウスレッド陽性反応 (線維性コラーゲン形成量) が低下した。また、同様に、Ror2 の発現をノックダウンした Line 2-23 において、Wnt5a により低下した各種骨関連マーカー発現 (図 1) およびアリザリンレッド S 陽性反応が上昇した。これにより、Wnt5a のコラーゲン線維形成促進ならびに石灰化抑制に、レセプター Ror2 が深く関与することが示唆された。

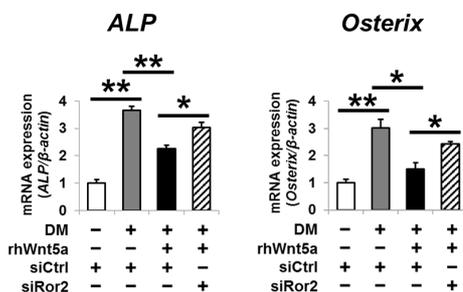


図1

(3) 各種細胞内シグナル因子の阻害剤を用いたシグナル解析

次に、Wnt5a のコラーゲン線維形成促進ならびに石灰化抑制に与えるシグナルについて検討するため、各種細胞内シグナル因子のリン酸化反応についてウェスタンブロット法にて解析した。その結果、Wnt5a 存在下で培養した Line 2-23 において、ERK、JNK および AKT のリン酸化反応が亢進した。また、Ror2 をノックダウンした Line 2-23 を Wnt5a 含有培地で培養すると、AKT のリン酸化には影響しなかった一方で、ERK ならびに JNK のリン酸化反応は低下した (図 2)。

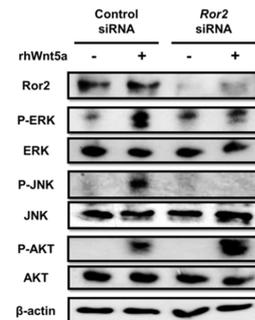


図2

そこで、ERK ならびに JNK の阻害剤である U0126 ならびに SP600125 が、Line 2-23 のコラーゲン線維形成能ならびに石灰化能に及ぼす影響について検討した。その結果、阻害剤による JNK のリン酸化抑制は、Wnt5a により低下した各種骨関連マーカー発現 (図 3) およびアリザリンレッド S 陽性反応 (図 4) を回復させたが、ERK のリン酸化抑制では影響は認められなかった。これにより、Wnt5a のコラーゲン線維形成促進ならびに石灰化抑制には JNK が介在することが示唆された。

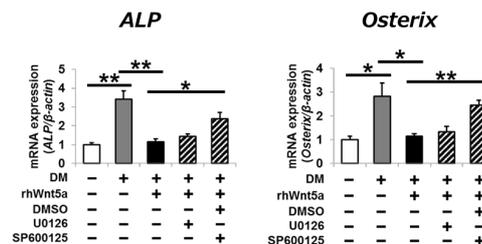


図3

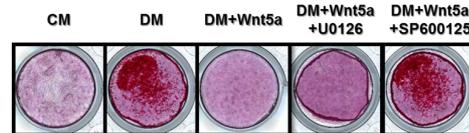


図4

(4) Wnt5a シグナルの活性化がヒト歯根膜細胞のコラーゲン線維形成ならびに石灰化に及ぼす影響の検討

Cthrc1 タンパクを Wnt5a とともに添加した培地を用いて、Cthrc1 が Wnt5a によるコラーゲン線維形成促進ならびに石灰化抑制に及ぼす影響について検討した結果、Cthrc1 は Wnt5a によるコラーゲン線維形成にわずかに影響を認めたものの、石灰化には影響を及ぼさなかった。したがって、本研究では Cthrc1 の Wnt5a のシグナルおよび機能への影響は認められなかった。今後、濃度設定や刺激時間など培養条件の再検討が必要と思われる。

以上の結果より、Wnt5a はレセプターRor2に結合しJNKを介して、ヒト歯根膜細胞のコラーゲン線維形成の促進ならびに石灰化の抑制に働くことが明らかとなった。このことから、セメント質と歯槽骨という二つの硬組織に挟まれた歯根膜組織が、石灰化することなく線維性結合組織を維持するメカニズムに、Wnt5a/Ror2/JNKシグナルが関与することが示唆された。本研究から得られた知見より、Wnt5aとそのシグナルをターゲットとした効果的な歯根膜組織再生による、より成功率の高い“次世代型意図的再植法”の開発に繋がることが期待される。

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5件)

Hasegawa D, Wada N, Yoshida S, Mitarai H, Arima M, Tomokiyo A, Hamano S, Sugii H, Maeda H. Wnt5a suppresses osteoblastic differentiation of human periodontal ligament stem cell-like cells via Ror2/JNK signaling. *J Cell Physiol.* 233(2):1752-1762, 2018.

doi:10.1002/jcp.26086.

Hamano S, Tomokiyo A, Hasegawa D, Yoshida S, Sugii H, Mitarai H, Fujino S, Wada N, Maeda H. Extracellular Matrix from Periodontal Ligament Cells Could Induce the Differentiation of Induced Pluripotent Stem Cells to Periodontal Ligament Stem Cell-Like Cells. *Stem Cells Dev.* 15;27(2):100-111, 2018.

doi:10.1089/scd.2017.0077.

Mitarai H, Wada N, Hasegawa D, Yoshida S, Sonoda M, Tomokiyo A, Hamano S, Serita S, Mizumachi H, Maeda H. Transgelin mediates transforming growth factor- β 1-induced proliferation of human periodontal ligament cells. *J Periodontol Res.* 52(6):984-993, 2017.

doi:10.1111/jre.12466.

Yoshida S, Yamamoto N, Wada N, Tomokiyo A, Hasegawa D, Hamano S, Mitarai H, Monnouchi S, Yuda A, Maeda H. GDNF From Human Periodontal Ligament Cells Treated With Pro-Inflammatory Cytokines Promotes Neurocytic Differentiation of PC12 Cells. *J Cell Biochem.* 118(4):699-708, 2017.

doi:10.1002/jcb.25662.

Tomokiyo A, Wada N, Hamano S, Hasegawa D, Sugii H, Yoshida S, Maeda H. Periodontal Ligament Stem Cells in Regenerative Dentistry for Periodontal Tissues. *J Stem Cell Res Ther.* 1(3):00019, 2016.

[学会発表](計8件)

長谷川大学、御手洗裕美、長谷川佳那、有馬麻衣、濱野さゆり、吉田晋一郎、友清淳、杉井英樹、和田尚久、清島保、前田英史. ヒト歯根膜幹細胞における新規幹細胞特性制御因子としてのMESTの可能性. 第17回日本再生医療学会総会. パシフィコ横浜(横浜市). 2018年3月22日

Arima M, Hasegawa D, Yoshida S, Mitarai H, Tomokiyo A, Hamano S, Sugii H, Wada N, Maeda H. R-spondin2 promotes osteoblastic differentiation of immature human periodontal ligament cells through the canonical Wnt signaling pathway. *Kyudai Oral Bioscience 2018 -12nd International Symposium-*, Fukuoka Recent Hotel, Fukuoka, Japan, 2018.2.11.

有馬麻衣、長谷川大学、吉田晋一郎、御手洗裕美、友清淳、濱野さゆり、杉井英樹、和田尚久、前田英史. R-spondin2はカノニカルWntシグナルを介して未分化なヒト歯根膜細胞の骨芽細胞様分化を促進する. 第147回日本歯科保存学会秋季学術大会. マリオス(盛岡市). 2017年10月27日

長谷川大学、和田尚久、有馬麻衣、吉田晋一郎、友清淳、濱野さゆり、御手洗裕美、前田英史. Tenomodulinがヒト歯根膜細胞の機能維持に及ぼす影響について. 第146回日本歯科保存学会春季学術大会. リンクステーションホール青森(青森市). 2017年6月9日

Mitarai H, Wada N, Hasegawa D, Yoshida S, Sonoda M, Tomokiyo A, Hamano S, Maeda H. Transgelin mediates TGF- β 1-induced Human Periodontal Ligament Cell Proliferation. 95th General Session & Exhibition of the IADR. Moscone West (San Francisco). 2017.3.24.

園田麻衣、長谷川大学、和田尚久、吉田晋一郎、御手洗裕美、友清淳、濱野さゆり、前田英史. R-spondin2が未分化なヒト歯根膜細胞の線維芽細胞様分化に及ぼす影響. 第145回日本歯科保存学会秋季学術大会. キッセイ文化ホール(松本市). 2016年10月28日

Hasegawa D, Wada N, Hamano S, Tomokiyo A, Yoshida S, Mitarai H, Sonoda M, Sugii H, Maeda H. Identification of a novel periodontal ligament stem cell marker. 94th General Session & Exhibition of the IADR. COEX Convention & Exhibition Center (Seoul). 2016.6.25.

長谷川大学、和田尚久、濱野さゆり、友清淳、吉田晋一郎、御手洗裕美、園田麻衣、杉井英樹、前田英史. MESTはヒト歯根膜幹細胞における幹細胞特性の維持に関与する. 第144回日本歯科保存学会春季学術大会. 栃木県総合文化センター(宇都宮市). 2016年6月10日

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

長谷川大学 (HASEGAWA, Daigaku)
九州大学・大学病院・助教
研究者番号：20757992

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()