

平成 21 年 4 月 17 日現在

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19592380

研究課題名 (和文) セメント芽細胞の分化誘導における wnt シグナルの解析

研究課題名 (英文) Analysis of Wnt signaling in cementoblast differentiation

研究代表者

根本 英二 (NEMOTO EIJI)

東北大学・大学院歯学研究科・講師

研究者番号：40292221

研究成果の概要：

セメント芽細胞において canonical Wnt シグナルが機能的に作動していることを明らかにした。Wnt3a で刺激したところ、アルカリフォスファターゼ、骨シアロ蛋白、そしてオステオカルシン遺伝子の発現が抑制された。さらに、Wnt3a は細胞サイクルの調節因子である Cyclin D1 遺伝子の発現を誘導するとともに、細胞増殖活性を亢進した。以上の知見から Wnt シグナルはセメント芽細胞の分化を抑制し、そして増殖反応を亢進することが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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

歯周組織再生医療の究極の目標は、歯周病で失われた歯周組織、すなわち、セメント質、骨、および歯根膜に対して、確実かつ高い必然性を持つ再生療法を確立することである。歯小嚢は歯の発生過程におけるエナメル器および歯乳頭を取り囲む組織である。現在までの知見から、歯小嚢細胞は適切な刺激を受けることによりセメント芽細胞、歯根膜線維芽細胞、および骨芽細胞へ分化することが示されている。従って、歯小嚢細胞の分化を規

定する因子を明らかにすることは歯周組織再生学において決定的な意味を持つと考えられる。特に、セメント質は歯根の結合組織性付着の再生に関わることからセメント芽細胞への分化機構を明らかにすることは非常に重要である。近年、Wnt/ β -catenin 経路は骨芽細胞の分化誘導において重要なシグナルであることが報告されてきた。同シグナルは骨芽細胞を中心に研究が進んでいるが、歯小嚢細胞/セメント芽細胞の分化における Wnt/ β -catenin の研究の報告は皆無で

ある。また、歯小囊細胞の分化の機構は骨髄由来間質細胞のそれとは異なることが示唆されていることから、歯周組織における Wnt/ β -catenin シグナルの研究を急ぐ必要があった。

2. 研究の目的

「歯小囊細胞は Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路を用いてセメント芽細胞に分化する。そして、セメント芽細胞の石灰化物形成機構に Wnt/ β -catenin シグナルが関与する。」という作業仮説を検証するために2つの研究目的を設定した。

(1)歯小囊細胞の *in vitro* 分化モデルにおいて、Wnt/ β -catenin シグナルが分化調節にどのように関与しているか解析する。

(2)セメント芽細胞の *in vitro* 石灰化モデルにおいて、Wnt/ β -catenin シグナルが石灰化誘導にどのように関与しているか解析する。

3. 研究の方法

マウスセメント芽細胞 (OC-CM30) は M. Somerman (ワシントン大) らにより不死化細胞として樹立されたものを使用する。また、全ての実験の対照細胞としてマウス骨芽細胞株 MC3T3-E1 細胞 (ATTC) を用いる。

(1)セメント芽細胞細胞の *in vitro* 分化モデル

OC-CM30 はアスコルビン酸の存在下で骨形成関連遺伝子が発現され、そして石灰化ノジュールが形成される。本分化誘導モデルにおいて Wnt/ β -catenin シグナルが関与しているかを次の2点から解析する。

①細胞内の β -catenin の発現量の測定：定量性リアルタイム RT-PCR 法およびウェスタンブロット法にて解析する。

② β -catenin/TCFs/LEF 複合体の転写活性の測定：TCFs/LEF consensus sequence を含む TOPFLASH reporter を用いてその転写活性をルシフェラーゼアッセイにて測定する。

(2)骨形成関連遺伝子群の発現誘導に対する Wnt/ β -catenin シグナルの作用

骨形成関連遺伝子の発現を定量性リアルタイム RT-PCR で解析する。

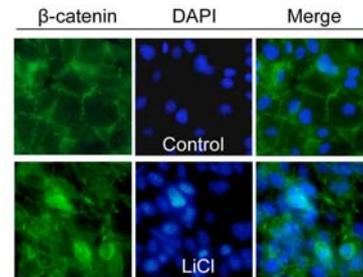
(3)細胞分化過程における Wnt シグナル転写因子の解析

細胞分化過程において TCF-1, -3, -4, および LEF-1 の発現を定量性リアルタイム RT-PCR およびウェスタンブロット法を用いて解析する。

4. 研究成果

セメント芽細胞は機能的な歯周組織を形成する上で不可欠なセメント質を形成し、*in vitro* において骨芽細胞と比較して多くの共通のフェノタイプを有する。Wnt シグナルは間葉系幹細胞や骨芽細胞の機能を制御す

ることによって骨形成に関与することが知られている。セメント芽細胞の分化における Wnt シグナルの関与ならびにその役割はほとんど知られていないが、これらの報告から Wnt シグナルはセメント芽細胞の機能を制御する重要なシグナル伝達経路であることが示唆される。本研究において、Wnt シグナルを形成する分子群がセメント芽細胞に発現していることを RT-PCR 法で明らかにした。LiCl は GSK-3 β を抑制することによって canonical Wnt シグナルを活性化するが、細胞を LiCl で刺激することにより β -catenin の核内移行と標的遺伝子の転写活性が誘導された。このことからセメント芽細胞において canonical Wnt シグナルが機能的に作動していることが示唆された。LiCl によって canonical Wnt シグナルを活性化したところアルカリフォスファターゼ



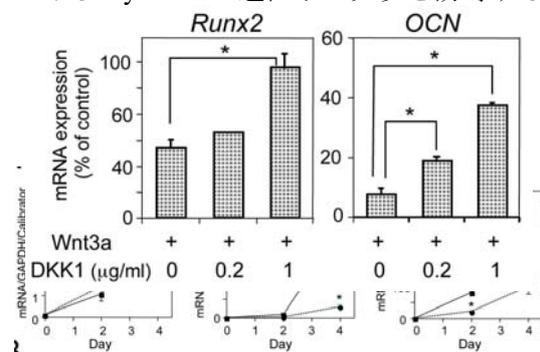
(alkaline phosphatase; ALP)活性の抑制がみられた。さらに、ALP、骨シアロ蛋白 (bone sialoprotein; BSP)、そして オステオカルシン (osteocalcin; OCN) 遺伝子の発現が抑制された。canonical Wnt シグナルの代表的な Wnt メンバーである Wnt3a で刺激したところ、同様に ALP、BSP、ならびに OCN 遺伝子が抑制された。

さらに、分化に対してポジティブに作用する転写因子 Runx2/Osterix 遺伝子発現が抑制され、また、ネガティブに作用する転写因子 Lef1 遺伝子発現が亢進された。

Dickkopf (Dkk)-1 は Wnt コレセプターである低比重リポタンパク様受容体 (LRP5/6) に結合する canonical Wnt アンタゴニストであるが、Dkk-1 存在下で同様の実験を行ったところ Wnt3a による Runx2 遺伝子ならびに OCN 遺伝子に対する発現抑制作用が解除された。

これらの知見から、Wnt3a によるセメント芽細胞の分化抑制作用は canonical Wnt シグナルを介した反応であること、そして、これら転写因子の発現調節によって制御されている可能性があることが示唆された。

さらに、Wnt3a は細胞サイクルの調節因子である Cyclin D1 遺伝子の発現を誘導する



とともに、細胞増殖活性を亢進した。以上の知見からWntシグナルはセメント芽細胞の分化を抑制し、そして増殖反応を亢進することが示唆された。セメント芽細胞の機能調節機構におけるWntシグナルの役割を解明することは、歯周組織再生学を進展させる上で重要であると考えられる。

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 6件)

- ① Nemoto, E., Y. Koshikawa, S. Kanaya, M. Tsuchiya, M. Tamura, M. J. Somerman, and H. Shimauchi. Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. *Bone*, 44 (5), 805-812, 2009 (査読あり)
- ② Kanaya, S., E. Nemoto, T. Ogawa, and H. Shimauchi. *Porphyromonas gingivalis* fimbriae induce unique dendritic cell subsets via Toll-like receptor 2. *J. Periodontal Res.* 2009, in press (査読あり)
- ③ Ebina H, Hatakeyama J, Onodera M, Honma T, Kamakura S, Shimauchi H, Sasano Y. Micro-CT analysis of alveolar bone healing using a rat experimental model of critical-size defects. *Oral Dis.* 2009, in press (査読あり)
- ④ Nemoto, E., T. Honda, S. Kanaya, H. Takada, and H. Shimauchi. Expression of functional Toll-like receptors and NODs in murine cementoblasts and their up-regulation during cell differentiation. *J. Periodontal Res.* 43, 585-593, 2008 (査読あり)
- ⑤ Shimauchi H, Mayanagi G, Nakaya S, Minamibuchi M, Ito Y, Yamaki K, Hirata H. Improvement of periodontal condition by probiotics with *Lactobacillus salivarius* WB21: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J. Clin. Periodontol.* 35, 897-905, 2008 (査読あり)
- ⑥ Anada T, Kumagai T, Honda Y, Masuda T, Kamijo R, Kamakura S, Yoshihara N, Kuriyagawa T, Shimauchi H, Suzuki O. Dose-dependent osteogenic effect of octacalcium phosphate on mouse bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A.* 14, 965-978, 2008 (査読あり)

[学会発表] (計 9件)

- ① E. Nemoto, Y. Koshikawa, S. Kanaya, M. Tsuchiya, M. Tamura, M. J. Somerman, and

H. Shimauchi. Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. Tohoku-Forsyth Symposium 2009, March 10-11, 2009, Boston, USA

- ② N. Hamaji, S. Kanaya, E. Nemoto and H. Shimauchi. Elevated extracellular Ca^{2+} induces bone morphogenetic protein-2 in human dental pulp cells. 3rd International Symposium for interface Oral Health Science. January 15-16, 2009, Sendai, Japan
- ③ E. Nemoto, Y. Koshikawa, S. Kanaya, M. Tsuchiya, M. Tamura, M. J. Somerman, and H. Shimauchi. Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. 3rd International Symposium for interface Oral Health Science. January 15-16, 2009, Sendai, Japan
- ④ 濱地希 金谷聡介 根本英二 島内英俊 ヒト歯髓細胞における細胞外 Ca^{2+} 刺激による bone morphogenetic protein-2 発現誘導 第 129 回日本歯科保存学会総会 2008 年 11 月 6, 7 日、富山
- ⑤ S. Kanaya, E. Nemoto, MJ Somerman and H. Shimauchi. Elevated extracellular Ca^{2+} induces fibroblast growth factor-2 mRNA in cementoblasts. 86th International Association for Dental Research. July 2-5, 2008, Toronto, Canada
- ⑥ E. Nemoto, Y. Koshikawa, S. Kanaya, M. Tsuchiya, M. Tamura, MJ Somerman and H. Shimauchi. Wnt/ β -catenin inhibits cementoblast differentiation, in vitro. 86th International Association for Dental Research. July 2-5, 2008, Toronto, Canada
- ⑦ 金谷聡介、根本英二、島内英俊 マウスセメント芽細胞における細胞外 Ca^{2+} 刺激による Fibroblast growth factor 2 発現誘導 第 51 回春季日本歯周病学会 2008 年 4 月 25-26 日、さいたま
- ⑧ 越川洋平、根本英二、金谷聡介、島内英俊 セメント芽細胞分化に対する wnt/ β -cateninシグナルの影響 第 127 回日本歯科保存学会総会 2007 年 11 月 8, 9 日、岡山
- ⑨ 本田徹、根本英二、金谷聡介、島内英俊 セメント芽細胞における pattern-recognition receptors の発現および細胞分化によるその変動 第 127 回日本歯科保存学会総会 2007 年 11 月 8, 9 日、岡山

[図書] (計 0件)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0件）

○取得状況（計 0件）

〔その他〕（計 0件）

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・講師

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

(3) 連携研究者

なし