

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 6 月 8 日現在

機関番号：32703

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21791869

研究課題名（和文）歯髄硬組織形成調節機序における Wnt シグナルの役割解明に関する研究

研究課題名（英文）Wnt signal plays a role in formation of mineralized tissue in dental pulp.

研究代表者

武藤徳子（MUTOH NORIKO）

神奈川歯科大学・歯学部・講師

研究者番号：40510433

研究成果の概要（和文）：ウイント（Wnt）は細胞間相互作用を仲介し形態形成過程において多様な役割を果たすことが知られている。しかしながら、歯胚形成における *Wnt5a* の機能的な役割は十分に明らかになっていない。本実験では、歯の発生過程において間葉組織に特異的に発現している *Wnt5a* 遺伝子発現を胎生期から生後の歯髄形成期まで *in situ* ハイブリダイゼーション法で解析した。また WNT5A の機能獲得実験として胎性 14 日齢マウスの臼歯歯胚を摘出し、器官培養系で WNT5A ビーズを用いた過剰発現実験と細胞死阻害剤（z-VAD-fmk）を組み合わせ、*Wnt5a* シグナル阻害が歯胚形成に与える影響を検索することにより *Wnt5a* の役割を解析した。結果として、WNT5A の過剰発現により歯胚の形成遅延が生じ、歯の大きさは小さく、咬頭の高さが低くなっていた。*Wnt5a* は、周囲の非歯胚領域の細胞死を誘導するが、歯胚領域の細胞死は誘導しなかった。歯胚領域では、*Wnt5a*、*Fgf10*、*Bmp4*、*Shh* 間相互作用により細胞死をレスキューすることにより、歯胚形成過程における細胞死のバランスを調整し、咬頭形成および歯の大きさの調節に関与することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：Wnt signaling is important in organogenesis. Among differentially expressed *Wnts* during tooth development, only *Wnt5a* is expressed in the dental mesenchyme. The present study aims to clarify the expression pattern of *Wnt5a* in developing tooth germs and the role of *Wnt5a* in the regulation of tooth size by treatment of exogenous WNT5A with/without apoptosis inhibitor on *in vitro* tooth germs combined with the transplantation into the kidney capsule. *Wnt5a* was expressed in both the dental epithelium and mesenchyme during E14-17 overlapped partly with both *Shh* and *Bmp4* expressions. Moreover, WNT5A retarded the development of tooth germs by inducing cell death severely in the non-dental epithelium and mesenchyme, but not severely in the dental region, where the epithelial-mesenchymal gene interactions among *Wnt5a*, *Fgf10*, *Bmp4*, and *Shh* might partly rescue the cell death in the WNT5A-treated tooth germ. Taken together, WNT5A-induced cell death inhibited overall development of tooth germ, resulting in smaller size of teeth with blunter cusps after tooth germ transplantation. Thus, *Wnt5a* is suggestive to be involved in regulating cell death in non-dental regions, while *Wnt5a* in the dental region acts as a regulator of other genes to rescue the cell death of tooth germ.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・保存治療系歯学

キーワード：Wnt・歯髄・歯学・免疫学・シグナル伝達・発生学

1. 研究開始当初の背景

ウイント (Wnt) は、マクロファージが細菌からの刺激を受けることで血管内皮細胞から産生されるタンパク質で、血管外へ遊走した T 細胞からのサイトカイン (IL-4) を受けて樹状細胞は、新たな Wnt タンパク質 (Wnt-5A) を産生することで、ヘルパー T 細胞にインターフェロン (INF-) などの炎症性サイトカインの産生を誘導する働きがある。これは、B 細胞、NK 細胞には発現が見られない (Nature Rev immunol 8:581-91,2008) ことから TLRs の関与が示唆され、歯髄が治癒傾向を示す場合、つまり象牙質の再形成が起こる場合と壊死に向かう場合での指標になると考えられた。さらに、歯髄組織には抗原提示細胞として多数の樹状細胞が存在しており、歯髄組織内での免疫応答のみならず、その局在位置から象牙芽細胞を介しての象牙質再形成メカニズムへの関与が示唆されているが、その詳細は解明されていない。そこで本研究は、Wnt シグナルを調節することにより歯髄治癒を促進することが可能になると考え、歯の形成過程において明らかになっていない Wnt シグナルに着目した。

2. 研究の目的

歯胚間葉には *Bmp2*, *Bmp4*, *Fgf3*, *Fgf10*, *Lef1*, *Wnt5a* などの遺伝子発現が見られるが、Wnt は、細胞間相互作用を仲介し形態形成過程において多様な役割を果たすことが知られている。しかしながら、歯胚形成における *Wnt5a* の機能的な役割は十分に明らかになっていない。本実験では、歯の発生過程における *Wnt5a* 発現を検索すると共に、機能獲得実験を用いて、歯の発生における *Wnt5a* の機能的役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

歯の発生において間葉組織に特異的に発現している *Wnt5a* 遺伝子発現を胎生期から生後の歯髄形成期まで *in situ* ハイブリダイゼーション法で解析するとともに、WNT5A タンパク質の機能的役割を明らかにするために、歯胚培養に WNT5A ビーズ実験と腎被膜下歯胚移植実験を組み合わせ、歯の形成過程に及ぼす影響を解析した。

4. 研究成果

Wnt5a は胎生期歯胚の上皮・間葉に強発現していたが、ソニックヘッジホッグ (*Shh*)

と骨形態形成タンパク質 (*Bmp*) の発現と部分的に重なっていた。さらに、WNT5A ビーズ実験において、歯胚領域には影響がないものの非歯胚上皮・間葉の著明な細胞死が誘導され歯胚発生の遅延が生じたが、*Wnt5a*、線維芽細胞増殖因子 (*Fgf*) 10、*Bmp4*、*Shh* 間の上皮間葉遺伝子相互作用により WNT5A で処理した歯胚の細胞死を部分的にレスキューすることが明らかとなった。結果として、WNT5A で誘導された細胞死は歯胚の発生を阻害し、低い咬頭をもつ小さな歯を惹起した。以上より、*Wnt5a* は、周囲の非歯胚領域周囲の細胞死を誘導するが、歯胚領域の細胞死は誘導しなかった。歯胚領域では、*Wnt5a*、*Fgf10*、*Bmp4*、*Shh* 間相互作用により細胞死をレスキューすることにより、歯胚形成過程における細胞死のバランスを調整し、咬頭形成および歯の大きさの調節に関与す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4件)

Mutoh N, Nakatomi M, Ida-Yonemochi H, Nakagawa E, Tani-Ishii N, Ohshima H: Responses of BrdU label-retaining dental pulp cells to allogenic tooth transplantation into mouse maxilla. *Histochemistry Cell Biology*.136 (6) 2011. 649-661.

Cai J*, Mutoh N*, Shin JO, Tani-Ishii N, Ohshima H, Cho SW, Jung HS (*印は同等の貢献を示す): *Wnt5a* plays a crucial role in the determination of tooth size during murine tooth development. *Cell and Tissue Research*.345 (3) .2011.367-377.

Mutoh N, Tani-Ishii N: A biocompatible model for evaluation of the responses of rat periapical tissue to a new zinc oxide-eugenol sealer. *Dental Material Journal*.30 (2) .2011.176-182.

Mutoh N, Watabe H, Chieda K, Tani-Ishii N. Expression of Toll-Like Receptor 2 and 4 in inflamed Pulp in Severe Combined Immunodeficiency Mice. *Journal of Endodontics*.36.2009. 975-980.

[学会発表](計6件)

武藤徳子, 石井信之,大島勇人.サテライトシンポジウム 3 Considerable aspects in dental stem cells(歯の幹細胞を考える) Differentiation capacity of BrdU label-retaining dental pulp cells following tooth replantation/transplantation (歯の再植・移植後の BrdU ラベル歯髓細胞の分化能と細胞増殖・アポトーシスとの関連). 第 53 回歯科基礎医学会 (招待講演). 2011.9.30, 岐阜
武藤徳子, 石井信之,大島勇人.歯の他家移植後の歯髓・歯周組織治癒過程と組織幹細胞の動態. 日本歯科保存学会 2011 年春季学術大会(第 134 回)2011.6.10, 浦安市
武藤徳子, 石井信之,大島勇人.歯の他家移植後の歯髓 BrdU label-retaining cells の分化能とホストドナー相互作用について. 第 32 回日本歯内療法学会.2011.7.29, 長崎市
武藤徳子, 石井信之,大島勇人. 歯の他家移植後の歯髓治癒過程における BrdU-label-retaining cells の分化能とホスト・ドナー相互作用について. 神奈川歯科大学学会第 46 回総会. 2011.12.3, 神奈川歯科大学
武藤徳子, 石井信之. 歯の他家移植後の歯髓・歯周組織再生過程について. 神奈川歯科大学学会第 137 回例会. 2012.1.12, 神奈川歯科大学
Muto N, Tani-Ishii N, Pulp infection induced TLR-positive osteoblasts and osteoclasts in periapical periodontitis. 第 39 回日本免疫学会総会・学術集会.2009 年 12 月 2 4 日, 大阪国際会議場

〔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

武藤 徳子 (MUTOH NORIKO)
神奈川歯科大学・歯学部・講師
研究者番号：40510433

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者

()

研究者番号：