

学位論文内容の要旨

愛知学院大学

論文提出者

酒徳 晋太郎

論文題目

Wnt10a は再生歯髄における象牙芽細胞分化に関与する

I. 緒言

幹細胞応用による歯髄再生療法は、幹細胞の増幅期間や費用から、救急処置を要することの多い小児歯科領域への応用は難しい。そのため、幹細胞を用いない歯髄再生誘導薬の開発は急務であると言え、その達成には発生を模倣することが必要と考えられる。

歯の発生過程において、Wnt シグナルが非常に深く関与していることが明らかにされてきている。代表例として Wnt10a とそのアンタゴニストである DKK1 の相互作用による象牙質の発生の制御などが報告されている。さらに修復過程においても象牙芽細胞への Wnt10a の関与が示唆されている。従って、象牙芽細胞制御による象牙質誘導能が備えるべき作用の一つと考えられる非細胞性歯髄再生誘導薬の開発には再生歯髄内での Wnt10a の動態を解明することが必要であると考えられる。

異所性歯根移植による再生歯髄は、歯髄マーカー TRH-DE を発現し、血管と結合組織に富み、象牙細管内に細胞突起を伸展した象牙芽細胞が象牙質壁に配列するといった形態学的特徴を備えていた。従って、異所性歯根移植モデルによる再生歯髄は、象牙芽細胞動態を観察し安定して評価ができることが証明されている。そこで本実験では、Wnt10a が再生誘導薬となり得るかを評価するために、歯髄幹細胞の象牙質誘導における Wnt10a の動態を解析する。さらに異所性歯根移植を用いて、再生歯髄内で Wnt10a および象牙芽細胞が経時的にどのように変化するのか検討した。

II. 材料および方法

1. ヒト歯髄幹細胞の分取とヒト歯髄幹細胞培養上清の調製

ヒト歯髄幹細胞(hDPSC)は愛知学院大学歯学部附属病院小児歯科を受診し、抜歯を行った4名の患者の永久歯から回収した歯髄を、Hayashi et al.の方法に基づいて酵素消化法にて分取した。分取したhDPSCは70%コンフルエントの状態にて無血清培地に交換し、24時間後、上清(Conditioned Media、CM)として回収、濃縮し、 -80°C で保存した。

本研究の細胞採取は愛知学院大学歯学部の倫理委員会の承認(承認番号: 639)を得て実施した。

2. 象牙質誘導に対する分子生物学的解析

hDPSC 5×10^4 cells を象牙質誘導培地にて3日、7日培養した。

象牙質誘導開始3日、7日後にhDPSCを回収し、直ちにRNAを分離、回収した。

回収したRNAは*Wnt10a*、*DKK1*及び*DSPP*のmRNA発現解析を目的としてqPCRを行い、 $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法によりmRNAの相対的な発現量を得た。

3. マウス異所性歯根移植モデル製作

異所性歯根移植モデルを用いたCMの組織再生能を検討した。CMを終濃度 $10\mu\text{g/ml}$ となるようコラーゲンと混合してヒト永久歯歯根に注入し移植片とした。その後、移植3日、7日目に回収し、パラフィン切片を製作し、移植切片とした。

本研究の動物実験は愛知学院大学歯学部動物実験実施規則に基づいて、動物実験倫理委員会の承認(承認番号：AGUD487)を得て実施した。

4. 組織再生量解析

異所性歯根移植により再生した歯髄組織量を評価するために、移植切片をHE染色し、光学顕微鏡にて観察した。根管面積に対する再生歯髄面積の比率をカウントし、平均値を求めた。

5. 再生組織に対する DSPP、Wnt10a、DKK1 の免疫組織学的解析

再生した組織の DSPP、Wnt10a、DKK1 の組織内発現を評価するために、移植切片を各々の抗体で免疫組織染色を行った。異所性移植 3 日、7 日後の組織内発現を光学顕微鏡で観察し評価した。また、再生組織内の DSPP 陽性細胞数をカウントし、さらに Wnt10a、DKK1 は全細胞数に対する陽性細胞率を算出した。

6. 再生組織に対する DSPP、Wnt10a の局在性解析

再生した組織の DSPP、Wnt10a の局在性を評価するために、移植切片を DSPP および Wnt10a にて二重免疫染色した。各々の抗体で反応後、Hoechst33342 により核染色を行い、蛍光顕微鏡にて観察した。

7. 再生組織に対する分子生物学的解析

再生した歯髄組織の *DSPP*、*Wnt10a*、*DSPP* の遺伝子発現量を解析するために、異所性歯根移植後の組織を回収し、直ちに RNA を分離した。

分離した RNA は *DSPP*、*Wnt10a*、*DKK1* の mRNA 発現解析を目的とし

て qPCR を行い、 $\Delta\Delta Ct$ 法により mRNA の相対的な発現量を得た。

8. 統計学的解析

得られたデータは平均±標準偏差で表した。統計処理には T 検定を用い、統計学的有意差の有意水準は 5%未満とした。

III .結果

1. 象牙質誘導における歯髄幹細胞の *DSPP*、*Wnt10a*、*DKK1* との発現

DSPP の発現は象牙質誘導 3 日目の発現量を基準として比較したところ、7 日目は有意に高かった。ついで、*Wnt10a* の発現は誘導 3 日目を基準として比較したところ、7 日目は有意に高かった。さらに、*DKK1* の発現は誘導 3 日目の発現量を基準として比較したところ、7 日目は有意に低かった。

2. 歯髄幹細胞培養上清の異所性歯根移植による歯髄再生

3 日目および 7 日目の根管内への細胞流入部には脂肪細胞と上皮様細胞とが入り込んだ組織像を認めた。その上部には稠密な細胞群と微小な血管構造が観察された。3 日目の再生組織は象牙芽細胞が根管内壁に伸展した突起を認めず、並列していないことを確認した。7 日目では細胞密度が増し、線維芽細胞に富んでおり、閉鎖側に向かった血管の走行を認めた。さらに、根管内壁には細胞突起が侵入し、並列した象牙芽細胞を認め、歯髄の特徴的な構造が観察された。移植 3 日目の再生歯髄量は

平均 11%、移植 7 日目は平均 22%であった。しかし両者の再生量に有意な差は認められなかった。

3. 再生組織に対する免疫組織学的解析

DSPP 陽性細胞は移植 7 日目の歯根内壁に並列しており、象牙細管内に突起を伸展させており象牙芽細胞といえる。DSPP 陽性象牙芽細胞は移植 3 日目から 7 日目にかけて有意に増加した。Wnt10a 陽性細胞数は移植 3 日目から 7 日目にかけて有意に増加、移植 3 日目には象牙質壁近傍に存在し、加えて 7 日目には象牙芽細胞の近傍にも存在を認めた。

DKK1 陽性細胞は移植 3 日目および 7 日目の歯根内壁付近には認めなかった。DKK1 陽性細胞数は移植 3 日目と 7 日目の間に有意な差は認めなかった。

4. 再生歯髓組織に対する分子生物学的解析

DSPP の発現は象牙質誘導 3 日目の発現量を基準として比較したところ、7 日目は有意に低かった。ついで、Wnt10a の発現は異所性移植 3 日目を基準として比較したところ、7 日目は有意に低かった。さらに、DKK1 の発現は移植 3 日目と 7 日目の発現量に有意な差は認めなかった。

IV. 考察

歯髓幹細胞を象牙質へと分化誘導し、DSPP、Wnt10a、DKK1 の遺伝子発現を解析したところ、DSPP の発現が上昇する 7 日目において Wnt10a の発現も上昇していた。一方、Wnt10a のアンタゴニストである DKK1 の発

現は減少していた。象牙質形成に対する *Wnt10a* の作用として象牙芽細胞分化および石灰化を正に制御すると報告があり、また *DKK1* が canonical *Wnt* シグナルを阻害することによる石灰化の負の制御が報告されている。それらの報告と一致していることから、*DKK1* が発現を抑えられ *Wnt10a* が発現した結果 *DSPP* が発現することが再生歯髄幹細胞の象牙質分化メカニズムの可能性であると考えられる。

次いでこの推定される象牙質分化メカニズムが *in vivo* においても生じているかを確認した。異所性移植 3 日目から根管内部に組織が再生し、これらの組織は血管を含む線維性の組織であり、象牙芽細胞マーカー *DSPP* 陽性細胞の根管壁への並列も見られた。これは幹細胞を移植した場合に生じる組織と同様であり、歯髄組織および象牙芽細胞と言える。また移植 3 日目と 7 日目における歯髄の量は有意な差はないが、*DSPP* 陽性の象牙芽細胞数は増加しており、移植後日数経過により歯髄が成熟したと考えられる。また、再生歯髄内の *Wnt10a* 陽性細胞数は移植後 3 日目より 7 日目のほうが有意に増加していた。加えて再生歯髄内において、*DSPP* 陽性細胞は *Wnt10a* を同時に発現していた。移植後 3 日目から 7 日目の再生量が有意に変化しなかったが *DSPP* 陽性細胞数は増加した結果とあわせて考察すると、この時点で *Wnt10a* は象牙芽細胞の分化に関与していることが示唆された。しかし、再生歯髄内の *Wnt10a* と *DSPP* は 3 日から 7 日目へ移植日数が経過すると遺伝子発現量が減少した。一方、*Wnt10a* のアンタゴニストである

DKK1 の発現量に有意な差はないものの、移植3日から7日目にかけて増加傾向にある。組織の発生には複数シグナルの相互作用を通じて形態形成と細胞分化が時間的・空間的に制御されながら進行する。歯髄組織は象牙質の他、血管や神経、線維等により構成され、それぞれの分化に関与するシグナルを有する。我々は過去に再生量が増加した歯髄組織は、多くの血管を含むと報告している。また、*DSPP* は象牙芽細胞だけではなく線維組織にも発現すると報告されている。つまり、再生歯髄量の増加に伴い、*Wnt10a* と *DSPP* の発現に関与しない血管等の組織の分化により、本研究で移植3日から7日にかけて *Wnt10a* と *DSPP* の発現量は相対的に減少したと考察される。また、*Wnt10a* ノックアウトマウスにおいては、同一個体の中にあっても異なる組織であればそれぞれで再生促進あるいは抑制と異なる結果が示されており、組織ごとに異なった影響がでることを示唆している。本研究では、再生歯髄組織内において *DKK1* 陽性細胞数は有意に変化してはいないものの、移植後3日目より7日目にかけて増加していた。歯の発生において *Wnt10a* と *DKK1* の相互作用による石灰化の厳密な制御が報告されており、本研究でも歯髄幹細胞の象牙質誘導において *DKK1* 発現量の減少、*Wnt10a* 発現量の増加と *DSPP* 発現の増加のタイミングとが一致していた。そのため、遊走した幹細胞に起因する再生歯髄内においても *Wnt10a* と *DKK1* が相互作用を持つことは十分に考えられる。以上から移植後日数の長期経過による *Wnt10a*、*DKK1* の再生歯髄内発現を確認し、

再生歯髄内における相互作用メカニズムを検索する必要があると考えられた。

V. 結論

本研究より、再生歯髄内において再生量の増加に伴って象牙芽細胞が増加することに加え、象牙芽細胞は Wnt10a を発現していることが明らかとなった。また、歯髄再生における Wnt10a を介した象牙質分化誘導メカニズムとして DKK1 が発現を抑えられ Wnt10a が発現した結果 DSPP が発現することが想定された。従って、Wnt10a は象牙質誘導能を持つ非細胞性歯髄再生誘導薬の候補であることが示された。