

学位論文の全文に代えてその内容を要約したもの

愛知学院大学

甲 第 号	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

再生医療は疾患や障害によるダメージを受けた組織や器官を、それらがもつ本来の機能にまで回復させることを目的としている<sup>1)</sup>。従って、“特定の患者群に適した治療効果の高い個別化医療”を実現させることで、多様化した健康・医療ニーズに応えうる医療システムとして期待されている<sup>2)</sup>。これまで幅広い医療分野において臨床応用が実現されている再生医療技術として、部分的に障害を受けた組織や器官に組織幹細胞を移入させ再生を促進させる幹細胞移入療法が挙げられ、現在歯科領域でも歯髄再生の臨床試験が行われている<sup>3,4)</sup>。その結果から、幹細胞応用による歯髄再生療法の治療効果が非常に高いことは証明されているが、その増幅、保存期間や免疫拒絶の問題さらには費用の問題から、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と考えられる。そのため、幹細胞を用いない非細胞性歯髄再生誘導薬の開発は急務であると言える。

歯は上皮性幹細胞と間葉系幹細胞の相互作用により誘導される歯胚から発生する。その過程には、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<sup>5,6)</sup>。歯胚の形成不全が認められる代表的な疾患に、常染色体劣性遺伝形式を示す外胚葉形成不全症である Odonto-onychodermal dysplasia (ODDD) や Schopf-SchulzPassarge syndrome (SSPS) が挙げられ、これは Wnt10a 欠損によるものであると知られている<sup>7)</sup>。また、動物実験においては、 $\beta$ -catenin の直接的な阻害あるいはそのアンタゴニストである Dickkopf-1 (DKK1) の過剰発現といった canonical Wnt シグナル障害による歯根の菲薄化などの形成異常や歯胚発生初期での停止などが報告されている<sup>8-10)</sup>。さらに、断髄後の修復象牙質直下の象牙芽細胞と象牙質細胞の核には  $\beta$ -catenin 発現が認められ<sup>11)</sup>、歯髄内のマクロファージが Wnt10a を発現していると報告されており<sup>12)</sup>、発生と同様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、象牙芽細胞の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。しかし再生歯髄組織内での、Wnt10a の動態および象牙芽細胞への関与はほとんど報告されていない。

異所性歯根移植(ectopic tooth root transplantation model)は抜去歯をスライスし、筒状になっ

た歯根に幹細胞を充填、一方をセメントで封鎖し、マウス腹腔に移植する。そのことで移植した歯根内部に歯髄を再生することができる。Hayashi et al.<sup>12)</sup>は異所性歯根移植にて、歯髄、骨髄、脂肪幹細胞またはそれぞれに由来する培養上清の移植を行った。その結果いずれを移植した場合でも、歯髄マーカーThyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme (TRH-DE)を発現する歯髄組織を再生することに成功している。さらにその再生歯髄は、血管と結合組織に富んでおり、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していた。従って、異所性歯根移植モデルは再生歯髄組織内の象牙芽細胞の動態を観察し安定して評価できることを証明している。

そこで本実験では、Wnt10a が非細胞性歯髄再生誘導薬の候補となり得るかを明らかにすることを目的に、歯髄幹細胞の象牙質誘導における Wnt10a の動態を解析し、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形態学的、分子生物学的に検討した。

## 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.<sup>12)</sup>の方法に基づいて酵素消化法にて分取した。まず、回収した歯髄を細断し 0.2%コラゲナーゼ(和光、大阪)を添加して細胞分散した。このことによって異なる4個人由来のhDPSCを樹立した。分取したhDPSCは3代まで継代後、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)として回収した。回収した上清を、Amicon Ultra-15 Centrifugal Filters Ultracel®-3K(Merck Millipore, NJ, USA)にて濃縮し、Protease Inhibitor(Halt™ Protease Inhibitor single-use cocktail,Thermo Scientific, Rockford, IL, USA)を添加し-80℃で保存した。CM中のタンパク濃度はQubit® Assays kit(Thermo Fisher Scientific, Tokyo)により定量した。

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

3代まで継代した hDPSC $5 \times 10^4$  cells を 24well プレートの各 well に同量播種し、100%コンフルエント状態まで培養した。その後、象牙質誘導培地として、50  $\mu$ l/ml アスコルビン酸(和光)、4mol/l Pi(Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)、10  $\mu$ g/ml BMP-2(コスモバイオ、東京)、10%FBS 含有の培地(Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM, Thermo Fisher Scientific)にて3日、7日培養した。培地交換は3日ごとに行った。

象牙質誘導開始3日、7日後に hDPSC を回収し、直ちに RNA を分離した。RNA の分離は、QuickGene RNA cultured cell Kit S(Kurabo, Tokyo) を用いた加圧法により行った。分離した total RNA 合成液は-80°Cで保存した。

分離した RNA は高速リアルタイム PCR システム(GF-Q150, Kurabo)を用い、*Wnt10a*、*DKK1* 及び *Dentin sialophosphoprotein(DSPP)* の mRNA 発現解析を目的として qPCR を行った。はじめに、分離した total RNA から 2  $\mu$ l、逆転写酵素を含む蛍光試薬(Quick One-step RT-PCR Master Mix, Kurabo)5  $\mu$ l、解析する遺伝子の Primer(DSPP 及び Periostin)3  $\mu$ l 添加し、計 10  $\mu$ l の試薬を作製した。試薬に気泡の混入がないことを確認し、Quick PCR Chip (Kurabo)に添加後高速リアルタイム PCR システムにセットした。45 サイクルの伸長反応として、得られたサンプルの Ct 値を、ハウスキーピング遺伝子である  $\beta$ -actin の Ct 値との差( $\Delta$ Ct)及びコントロールサンプルの  $\Delta$ Ct 値を基準とした割合を算出することによる  $\Delta \Delta$ Ct 法により目的の mRNA の相対的な発現量を得た(表 1)。

## 3. マウス異所性歯根移植モデル製作

Hayashi et al.<sup>12)</sup>の方法に基づき、CM の組織再生能を検討するために異所性歯根移植モデルを用いた。6mm 幅にカットしたヒト永久歯の根管を  $\Phi$ 2mm まで拡大し、残存歯髄及び歯根膜を全て除去した。さらにその一方を水硬性セメントで閉鎖し、その根管内に 1. で調整した CM を終濃度 10  $\mu$ g/ml となるようコラーゲン TE(新田ゼラチン、東京)と混合して注入し移植片とした。移植片内部の CM は異なる個人由来のものとし、各 4 本ずつ作製した。移植片を 4 本ずつ 5 週齢の SCID マウス 4 匹(日本 SLC、静岡)の腹腔に移植した。その後、移植後 3 日、7 日に回収し、

4%パラホルムアルデヒド(Nakarai Tesque, Kyoto)にて4°Cで一晩浸漬固定した。その後、4°Cでkalkitox(和光)にて1週間脱灰の後、縦断面5 $\mu$ mのパラフィン切片を製作し、移植切片とした。

(n=4)

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BX53(Olympus)にて移植切片の全体画像撮影を行い再生歯髄を観察した。各4lot、上清を移植した根管の内部面積をCellSens Imaging Software(Olympus)にて解析、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、移植切片をリン酸緩衝生理食塩水(PBS, Thermo Fisher Scientific)で希釈したマウス抗DSPP(sc-73632, Santa Cruz Biotechnology, Texas, USA)(1:400)、ウサギ抗Wnt10a(NBP1-76916, Funakoshi, Tokyo, Japan)(1:400)、ロバ抗DKK1(ab188597, Abcam, Cambridge, UK)(1:50)を4°Cで一晩反応させた。各々の抗体で反応後、ImmPACT® DAB(Funakoshi)により免疫組織染色を行い、異所性移植3日、7日後の抗体による組織内発現の評価を行った。また、撮影した組織の抗体発現細胞数を画像解析ソフトImageJ(National Institute of Health, Maryland, USA)にてカウントし、さらにWnt10a、DKK1は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1次抗体としてマウス抗DSPP(sc-73632, Santa Cruz Biotechnology)(1:400)を用い4°C一晩免疫反応を行い、2次抗体としてヤギ抗マウスAlexa488(ab150129, abcam)(1:200)を常温で1時間反応させた。さらに1次抗体としてウサギ抗Wnt10a(NBP1-76916)(1:400)を用い4°C一晩免疫反応を行

い、2次抗体としてロバ抗ウサギ Alexa594(ab150076, abcam)(1:200)を常温で1時間反応させた。各々の抗体で染色後、Hoechst33342により核染色を行った。二重染色を行った細胞は蛍光顕微鏡 CKX53(Olympus)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。RNA 分離は、QuickGene RNA tissue Kit S II (Kurabo)を用いた加圧法による核酸分離システムにて行った。

分離した RNA は高速リアルタイム PCR システムを用い、*DSPP*、*Wnt10a*、*DKK1* の mRNA 発現解析を目的として qPCR を行った。得られたサンプルの Ct 値を、ハウスキーピング遺伝子である  $\beta$ -actin の Ct 値との差( $\Delta$ Ct)及びコントロールサンプルの  $\Delta$ Ct 値を基準とした割合を算出することによる  $\Delta\Delta$ Ct 法により目的の mRNA の相対的な発現量を得た(表 2)。

#### 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。なお、統計学的分析には統計解析ソフト SPSS® ver27.0.1 (IBM, NY, USA)を用いた。

### III 結果

#### 1. 象牙質誘導における歯髄幹細胞の *DSPP*、*Wnt10a*、*DKK1* の遺伝子発現

*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 10.3 倍の発現であり、有意に高かった。次いで、*Wnt10a* の発現は象牙質誘導 3 日目を基準として比較したところ、7 日目は 4.4 倍であり有意に高かった。さらに、*DKK1* 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 0.3 倍であり、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滴を含む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。ま

た、その閉鎖側でコラーゲンの残存物が観察された。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。また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日目の再生歯髓量は平均11%であった。移植7日目の再生歯髓量は平均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 DSPP、Wnt10a、DKK1 の免疫組織学的解析

DSPP 陽性細胞は移植3日目では根管内壁に発現を認めなかったが、移植7日目の歯根内壁に並列して発現を認めた。DSPP 抗体に反応した象牙芽細胞は移植3日目から7日目にかけて有意に増加した。Wnt10a 陽性細胞は移植3日目および7日目の歯根内壁に接した象牙芽細胞およびその近傍の細胞に認めた。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した。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. 再生組織に対する DSPP、Wnt10a の局在性解析

移植3日の DSPP は根管内壁付近に疎に発現を認めるが、象牙細管内への突起の伸展を認めなかった。また、移植3日、7日目に Wnt10a は組織内発現を認めた。2重染色像では DSPP に反応した象牙芽細胞の近傍に Wnt10a 陽性細胞を認めた。移植7日の DSPP は根管内壁付近に並列しており、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。2重染色像では DSPP に反応した象牙芽細胞、近傍の細胞および象牙細管内に Wnt10a 陽性細胞を認めた。

### 5. 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0.18倍の発現であり、有意に低かった。次いで、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0.4倍であり有意に低かった。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

歯は歯髄幹細胞・象牙芽細胞・血管・神経などの複数種の機能的な分化した細胞及び幹細胞が細管構造をもった硬組織内に立体的に配置され、複雑な生体内相互作用によって固有の機能を発現している。つまり、他の臓器や器官と同じく化学的、物理的微小環境によって制御されているといえる。発生における細胞運命の決定、成熟、分化など異なる段階に関与し、生涯を通じて生体内相互作用を調整するシグナル経路として、Wnt signaling pathwayが挙げられる<sup>13-15)</sup>。Wntは分泌型糖タンパクのファミリーであり、現在、哺乳類において19種類が同定されている。canonical Wntシグナルの主なリガンドとして、Wnt1、Wnt2、Wnt3a、Wnt10aなどが報告されており、*DKK1*がそのアンタゴニストとして報告されている<sup>8,11)</sup>。canonical Wntシグナル経路においてリガンドは細胞膜上のFrizzled受容体(Fz)およびlow-density lipoprotein共受容体(LRP)-5、-6と結合し、 $\beta$ -cateninのユビキチン化を抑制することで、細胞内への蓄積と核内移行を制御する<sup>16)</sup>。核内に入った $\beta$ -cateninはT-cell factor(Tcf)およびlymphoid enhancer factor(Lef)と結合して転写因子として働き、標的遺伝子の発現を促進する<sup>17)</sup>。また、Wntシグナルは組織損傷に応答して活性化されることも広く知られている<sup>18)</sup>。損傷後のWnt経路の再活性化の例として、複数の方法で心臓前駆細胞に影響を与えることが報告されており<sup>19)</sup>、その影響は心臓発生中の心臓前駆細胞におけるWntの役割と一致していると報告されている<sup>20,21)</sup>。肺や腎臓においては同様に、一過性のcanonical Wntシグナルの活性化が幹/前駆細胞による再生を誘導する可能性があることを示唆されている<sup>22,23)</sup>。特にWnt10aの歯の発生への関与は大きいと考えられ、6歯以上の先天性無歯症家系においての遺伝子シーケンスをおこなったところ、その欠損が報告されており、先天欠損の原因遺伝子の1つとされている<sup>24)</sup>。また、Wnt10a補充療法による無歯症マウス、イヌの歯胚形成が報告され<sup>21)</sup>、さらには臨床研究が開始されており、歯科再生医療領域への応用が期待されている。現在取り組まれている歯科再生療法としては、歯根膜由来幹細胞シートを用いた歯周組織再建<sup>25)</sup>や智歯歯髄由来幹細胞移植による歯髄再生療法



<sup>26)</sup>に対する安全性試験と有効性試験を経た事業化などが挙げられる。しかし、その増幅、保存期間や免疫拒絶の問題から、救急処置を要する小児歯科領域への応用は難しく、非細胞性歯髄再生誘導薬の開発は急務と言え、その具備すべき条件として象牙芽細胞の制御による象牙質誘導能が挙げられる。そこでまず、歯髄幹細胞を象牙質へと分化誘導し、誘導 3 日目、7 日目で 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 の作用としては直接カノニカル経路の下流にある Runx2 の発現を調整し、象牙芽細胞分化および石灰化を正に制御すると報告されており<sup>37)</sup>、DKK1 では Wnt シグナルと LRP6 との相互作用を阻害することにより canonical Wnt シグナルを遮断することが報告されている<sup>27)</sup>。それらの報告と一致して、DKK1 が発現を抑えられ Wnt10a が発現すると同時に DSPP が発現することから、これらが歯髄幹細胞の象牙質分化メカニズムの鍵である可能性がある。

次いでこの推定される象牙質分化メカニズムが *in vivo* においても起こっているかを確認した。幹細胞の運命決定は微小環境によってなされることが知られている<sup>28)</sup>。そのため、組織再生は移植した組織由来ではなく移植した先の微小環境に依存することが明らかにされてきている<sup>29)</sup>、<sup>30)</sup>。この現象を応用し近年では、骨欠損や脊髄損傷、糖尿病などに対し、歯髄、骨髓、脂肪由来間葉系幹細胞といった、それらの再生治療を行う部位の組織由来ではない幹細胞を異所性に移植する方法<sup>31-33)</sup>による良好な結果が報告され、根治療法として期待されている。従って今後組織再生医療を発展させるためには、生体内での物理的、化学的微小環境を把握し、再現することが重要であると考えられる<sup>34)</sup>、<sup>35)</sup>。本研究での移植に用いたのは幹細胞そのものではなく幹細胞セクレトームの集積物である細胞培養時上清であったが、3 日目から根管内部に組織が再生した。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<sup>36)</sup>、歯髄組織および象牙芽細胞と言え。また 3 日目と 7 日目における歯髄の量は有意な差はないが、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。本研究において再生歯髄内の 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おり、同様の変

化を DSPP も起こしていた。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 は歯髄再生量の増加に関与するのではなく、象牙芽細胞の分化に関与していることが示唆された。象牙質形成に対する Wnt10a の作用としては象牙芽細胞分化および石灰化を正に制御すると報告されており<sup>37)</sup>、本実験の結果と一致している。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。*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。組織の発生には単一シグナルではなく、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<sup>10)</sup>。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<sup>38)</sup>。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<sup>12)</sup>。また、DSPP は象牙芽細胞や線維組織に発現すると報告されている<sup>39)</sup>。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骨・筋肉・脂肪と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<sup>40)</sup>。歯髄組織は象牙芽細胞の他にも血管や神経線維等多くの組織が見られるため、それらと *Wnt10a* の関係性を継続して解明していく必要があると考えられる。さらに分化において、Wnt シグナル伝達の強度や細胞種、細胞の分化度が違えば同一の細胞であっても、反対の生物学的機能を示すことが報告されている<sup>41, 42)</sup>。また象牙芽細胞分化時に、*Wnt10a* と同じく canonical Wnt signal である *Wnt6* の発現増加に伴っての *DKK1* の増加が報告されている。つまり、Wnt のもつ時空間的特異性と Wnt とそのアゴニストの構成や分布といったバランスが重要であり相互作用を持つことが示唆されている。本研究では、再生歯髄組織内において *Wnt10a* のアンタゴニストである *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<sup>37)</sup>、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。このことから、移植後日数長期経過による 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。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、懇切なるご指導ならびにご高閲を賜りました愛知学院大学歯学部小児歯科学講座名和弘幸特殊診療科教授に深い感謝の意を評します。さらに、本研究に多大なるご指導を賜りました林勇輝講師に深謝いたします。また研究にご協力いただきました愛知学院大学歯学部小児歯科学講座の医局員皆さまに心から御礼申し上げます。

## 参考文献

1. Nakashima M and Iohara K. Recent progress in translation of pulp/dentin regenerative therapy. *Regenerative Medicine*, **18**:34-39, 2019
2. D Harris. Stem Cell Banking for Regenerative and Personalized Medicine. *Biomedicines*, **2**: 50-79, 2014
3. Ogawa M and Tsuji T. Fully functional salivary gland regeneration as a next-generation regenerative therapy. *Jpn. J. Clin. Immunol*, **38**:93-100, 2015

4. J Sorrell and A Caplan, Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. *Stem Cell Res Ther*, **1**:30, 2010
5. Marika S and Irma T. Patterns of Wnt pathway activity in the mouse incisor indicate absence of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in the epithelial stem cells. *Dev Dyn*, **239**:364-372, 2010
6. Järvinen E, Salazar-Ciudad I, Birchmeier W, Taketo MM, Jernvall J and Thesleff I. Continuous tooth generation in mouse is induced by activated Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci*, **103**: 18627–18632, 2006
7. Ran Z, Jingting L, Yang L, Shurong Y, Qi He, Liang Z, Xiao Y and Guan Y. Transforming Growth Factor- $\beta$  Signaling Regulates Tooth Root Dentinogenesis by Cooperation With Wnt Signaling. *Front Cell Dev Biol*, **9**:687099, 2021
8. Aurrekoetxea M, Irastorza I, García-Gallastegui P, Jiménez-Rojo L, Nakamura T, Yamada Y, Ibarretxe G and Unda FJ. Wnt/ $\beta$ -Catenin Regulates the Activity of Epiprofin/Sp6, SHH, FGF, and BMP to Coordinate the Stages of Odontogenesis. *Front Cell Dev Biol*, **4**:25, 2016
9. Bae CH, Lee JY, Kim TH, Baek JA, Lee JC, Yang X, Taketo MM, Jiang R and Cho ES. Excessive Wnt/ $\beta$ -catenin signaling disturbs tooth-root formation. *J Periodontal Res*, **48**:405-410, 2012
10. Nakamura Y, Ide Y, Suzuki E, Ueda T, Kusaka Y and Yokose S. Histological Demonstration of Regeneration of Dentin-Pulp Complex Induced by Mineral Trioxide Aggregate. *Jpn. j. conserv. Dent*, **59**: 370-380, 2016
11. Hara M, Horibe K, Mori H and Nakamura H. The role of canonical Wnt signaling in dentin bridge formation. *J Oral Biosci*, **63**:199-209, 2021
12. Hayashi Y, Murakami M, Kawamura R, Ishizaka R, Fukuta O and Nakashima M. CXCL14 and MCP1 are potent trophic factors associated with cell migration and angiogenesis leading to higher regenerative potential of dental pulp side population cells. *Stem Cell Res Ther*, **26**:111, 2015
13. Naito A. Stem cell regulation by Wnt signal. *Experimental medicine*, **34**: 2814 -2819, 2016

14. Ai D. Fu X. Wang J. Lu MF. Chen L. Baldini A. Klein WH and Martin JF. Canonical Wnt signaling functions in second heart field to promote right ventricular growth. *Proc Natl Acad Sci*, **104**: 9319-24, 2007
15. Kishida S. Yamamoto H and Kikuchi A. Wnt-3a and Dvl induce neurite retraction by activating Rho-associated kinase. *Mol Cell Biol*, **10**:4487-4501, 2004
16. Yamamoto H. Regulation of Wnt signaling pathway and its relationship with tumorigenesis. *Seikagaku*, **12**:1079-1093, 2008
17. Mikels AJ and Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol*, **4**:570-582, 2006
18. Lu J. Duan Y. Zhang M. Wu M and Wang Y. Expression of Wnt3a, Wnt10b,  $\beta$ -catenin and DKK1 in periodontium during orthodontic tooth movement in rats. *Acta Odontol Scand*, **74**:217-223, 2015
19. Duan J. Gherghe C. Liu D. Hamlett E. Srikantha L. Rodgers L. Regan JN. Rojas M. Willis M. Leask A. Majesky M and Deb A. Wnt1/ $\beta$ catenin injury response activates the epicardium and cardiac fibroblasts to promote cardiac repair. *Embo J*, **31**:429-442, 2012
20. Ito M. Yang Z. Andl T. Cui C. Kim N. Millar SE and Cotsarelis G. Wnt-dependent de novo hair follicle regeneration in adult mouse skin after wounding. *Nature*, **447**:316-320, 2007
21. McMahon AP and Bradley A. The Wnt-1 (int-1) proto-oncogene is required for development of a large region of the mouse brain. *Cell*, **62**:1073-1085: 1990
22. Kunugi S and Fukuda Y. Morphological changes in fetal developing lung ; approach to adult respiratory disease. *The Lung perspectives*, **12**:15-18
23. Kuraoka S and Nishinakamura R. Reconstruction of the kidney based on embryology. *Ishoku*, **52**:318-324, 2017
24. Machida J. Goto H. Tatematsu T. Shibata A. Miyachi H. Takahashi K. Izumi H. Nakayama A. Shimozato K and Tokita Y. WNT10A variants isolated from Japanese patients with congenital tooth agenesis. *Hum Genome Var*, **4**:17047, 2017

25. Hu L. Zhao B. Gao Z. Xu J. Fan Z. Zhang C. Wang J and Wang S. Regeneration characteristics of different dental derived stem cell sheets. *J Oral Rehabil*, **47**: 66-72, 2019
26. Nakashima M. Iohara K. Murakami M. Nakamura H. Sato Y. Arijii Y and Matsushita K. Pulp regeneration by transplantation of dental pulp stem cells in pulpitis: a pilot clinical study. *Stem Cell Res Ther*, **8**:61, 2017
27. Zhan T. Rindtorff N and Boutros M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, **36**: 1461-1473, 2016
28. Murphy MB. Moncivais K and Caplan AI. Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med*, **45**: e54
29. Voga M. Adamic N. Vengust M and Majdic G. Stem Cells in Veterinary Medicine-Current State and Treatment Options. *Front Vet Sci*, **7**:278, 2020
30. Sorrell JM and Caplan AI. Topical delivery of mesenchymal stem cells and their function in wounds. *Stem Cell Res Ther*, **12**:220, 2021
31. Lee CC. Hirasawa N. Garcia KG. Ramanathan D and Kim KD. Stem and progenitor cell microenvironment for bone regeneration and repair. *Regen Med*, **14**: 693-702, 2019
32. Parke S and Illes J. In delicate balance: stem cells and spinal cord injury advocacy. *Stem Cell Rev Rep*, **7**: 657-663, 2011
33. Naruse K. Schwann Cells as Crucial Players in Diabetic Neuropathy. *Adv Exp Med Biol*, **1190**:345-356, 2019
34. Ocansey DKW. Wang L. Wang J. Yan Y. Qian H. Zhang X. Xu W and Mao F. Mesenchymal stem cell-gut microbiota interaction in the repair of inflammatory bowel disease: an enhanced therapeutic effect. *Clin Transl Med*, **8**:31, 2019
35. Brokesh AM and Gaharwar AK. Inorganic Biomaterials for Regenerative Medicine. *ACS Appl Mater Interfaces*, **12**:5319-5344, 2020
36. Ishizaka R. Hayashi Y. Iohara K. Sugiyama M. Murakami M. Yamamoto T. Fukuta O and Nakashima M. Stimulation of angiogenesis, neurogenesis and regeneration by side population cells from dental pulp. *Biomaterials*, **34**: 1888-1897, 2012

37. Matsumoto K. Kato Y. Kunoki K. Nakagomi M. Ishida Y and Yokose S. Effects of Wnt10a and Ectodin KO on Dentinogenesis in Rat Dental Pulp Cells. *J. Meikai Dent. Med*, **50**:137-145, 2021
38. Kornsuthisopon C. Photichailert S. Nowwarote N. Tompkins KA and Osathanon T. Wnt signaling in dental pulp homeostasis and dentin regeneration. *Arch Oral Biol*, **134**: 105322, 2022
39. Baba O. Qin C, Brunn JC. Jones JE. Wygant JN. McIntyre BW and Butler WT. Detection of dentin sialoprotein in rat periodontium. *Eur J Oral Sc*, **114**: 163-170, 2004
40. Tsukamoto M. Wang KY. Tasaki T. Murata Y. Okada Y. Yamanaka Y. Nakamura E. Yamada S. Izumi H. Zhou Q. Azuma K. Sasaguri Y. Kohno K and Sakai A. Findings as a starting point to unravel the underlying mechanisms of in vivo interactions involving Wnt10a in bone, fat and muscle. *Bone*, **120**:75-84, 2019
41. Miller JR. The Wnts. *Genome Biol*, **3**:3001, 2001
42. Wang J and Feng JQ. Signaling Pathways Critical for Tooth Root Formation. *J Dent Res*, **96**: 1221-1228, 2017