

学 位 論 文

骨髓由来間葉系幹細胞からセメント芽細胞様細胞へ
の分化に及ぼす Wnt3a の影響

学位申請者

間 悠介

広島大学大学院医歯薬保健学研究科応用生命科学部門

歯周病態学研究室

(主指導教員：栗原 英見 教授)

2015 年度

謝 辞

本研究の御指導及び御高覧を賜りました本学大学院応用生命科学部門 栗原 英見教授、本学大学院基礎生命科学部門 生体材料学加藤 功一教授に対して謹んで感謝の意を表します。また、研究の遂行並びに本論文作成において、御指導、御鞭撻いただきました本学大学院基礎生命科学部門 生体分子機能学 宿南 知佐教授、応用生命科学部門 津賀 一弘教授、歯科矯正学 谷本 幸太郎教授、統合健康科学部門 柴 秀樹教授に深厚なる謝意を表します。

また、本研究の遂行上及び本論文作成上、御助言と御鞭撻並びに御協力いただきました本学大学院応用生命科学部門歯周病態学分野及び基礎生命科学部門生体材料学の皆様に厚く御礼申し上げます。

最後に、勉学、研究の機会を与えると共に、常に私を支えてくれた両親の克治、洋子、妻の浩子、長女の美貴に心から感謝いたします。

本論文の要旨は以下の学会において発表した。

第141回 日本歯科保存学会2014年度秋季学術大会

(2014年 10月 山形)

第58回 春季日本歯周病学会学術大会

(2015年 5月 千葉)

第48回 広島大学歯学会総会

(2015年 6月 広島)

目次

第1章	序論	6
第2章	ヒト骨髄由来間葉系幹細胞へのWnt3aの効果の検討	9
第1節	緒言	9
第2節	材料及び方法	
1.	ヒト骨髄由来間葉系幹細胞 (hMSC) の培養	9
2.	不死化ヒトセメント芽細胞の培養	10
3.	Real-time PCR法	10
4.	Wnt3a添加後2週間のセメント質・骨関連遺伝子の変化	10
5.	アリザリンレッド染色	11
6.	逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR法)	11
第3節	結果	11
第4節	考察	12

第3章 CEMP-1の遺伝子及びタンパク質の発現に関するシグナル伝達経路

第1節 緒言・・・・・・・・・・15

第2節 材料及び方法

1. セメント芽細胞様細胞の誘導・・・・・・・・15
2. 古典的 β -カテニン/Wnt経路及びMAPK経路の阻害・・・・・・・・16
3. ウェスタンブロッティング法・・・・・・・・16
4. Real-time PCR法・・・・・・・・16

第3節 結果・・・・・・・・17

第4節 考察・・・・・・・・17

第4章 総括・・・・・・・・19

第5章 参考文献・・・・・・・・20

第1章 序 論

歯周炎は歯周病原細菌感染とそれに対する宿主の免疫応答の結果、セメント質、歯周靭帯、歯槽骨といった歯周組織の破壊が起きる疾患であり、歯周炎を放置すると歯の喪失に至る。その結果、咀嚼機能の低下、発音障害、審美障害、といった生活の質（QOL）の低下が生じる。また、歯周炎は糖尿病、早産/低体重児出産、虚血性心疾患などの全身疾患と関係していることが明らかになっている¹⁾。現在の通常の歯周治療は感染組織や炎症組織を除去することが目的である。これによって炎症を消退させることが出来るが、破壊された歯槽骨や歯周靭帯、セメント質の再生は難しい。そのため、歯周組織の構造および機能を回復するためには歯周組織再生療法が必要である。

現在臨床応用されている歯周組織再生療法として、Guided Tissue Regeneration (GTR) 法^{2), 3)}や、ブタのエナメルタンパク質を歯周組織欠損部位に填入するエムドゲイン法 (Emdogain®)⁴⁾が挙げられる。今後の臨床応用が期待される歯周組織再生療法として、サイトカイン療法⁵⁾や細胞移植治療がある。

GTR 法やサイトカイン療法による歯周組織再生は、内在性の細胞の制御によって再生を目指すため、比較的小規模の欠損には適している。しかし、臨床で多くみられる広範囲に渡る水平性の骨吸収や1壁性骨欠損のような大規模な歯周組織破壊では、供給される内在性の細胞数が相対的に不足しており、十分な再生効果が得られない。そのため、再生にかかわる細胞数の不足を補う細胞移植治療が必要と考える。細胞移植治療の特徴は、細胞を生体外で増殖・分化誘導などの加工ができることである。

歯周組織はセメント質、歯周靭帯、歯槽骨、歯肉結合組織、歯肉上皮といった複数の組織から構成されており、これらの複雑な組織を再生するためには多分化能を有する幹細胞が適していると考えられる。多分化能を有する幹細胞として、胚性幹細胞 (embryonic stem cells : ES 細胞)、人工多能性幹細胞 (induced pluripotent stem cells : iPS 細胞)⁷⁾、組織幹細胞が挙げられる。現時点において、ES 細胞や iPS 細胞は倫理面の問題および安全性の問題から歯周組織再生に用いるのは難しい。一方、組織幹細胞は様々な組織に存在している。特に、間葉系幹細胞 (mesenchymal stem cells : MSC) は、骨、軟骨、腱、脂肪組織などの間葉組織や神経細胞に分化することが報告⁸⁾されており、現時点において歯周組織再生のための細胞移植治療の細胞源として有用である。

実際にイヌの根分岐部3級病変モデルに骨髄由来の MSC をアテロコラーゲンゲルと混和して移植したところ、アテロコラーゲンゲル単独移植群と比較してセメント質、歯周靭帯、歯槽骨再生を有意に促進した⁹⁾。また、green

fluorescent protein (GFP) を遺伝子導入した MSC を移植したところ、再生された歯周組織のセメント芽細胞、骨芽細胞、骨細胞、歯周靭帯細胞が GFP 陽性を示した¹⁰⁾。これらの結果は、MSC が歯周組織再生に有効であることを示唆している。

セメント質は歯根を覆っているセメント芽細胞によって形成された薄い石灰化した結合組織であり、歯根象牙質を覆い、機能的には歯肉、歯周靭帯、歯槽骨と歯をつなぐ歯周組織の一部である¹¹⁾。セメント質の形成は歯周組織の発達や歯周組織再生のために重要である^{12), 13)}。

セメント芽細胞の効果的な分化誘導法の確立には、その指標となる分化マーカーの分析が有用である。本研究では、その一つとして、cementum protein 1 (CEMP-1) に着目した。CEMP-1 はセメント芽細胞腫由来のタンパク質として、分離・同定されたものである。CEMP-1 はセメント芽細胞および歯周靭帯細胞の亜集団や歯周組織中の小血管周囲の細胞で発現が認められることが報告されており、セメント芽細胞及びその始原細胞のマーカーになり得ると言われている^{13), 14)}。CEMP-1 の機能は、歯周靭帯細胞に CEMP-1 を強制発現させると、歯周靭帯細胞のマーカーである PLAP-1/aspurin の発現が減少し、cementum attachment protein (CAP) や骨シアロプロテイン (BSP) の発現が増加することや、歯肉線維芽細胞に CEMP-1 を強制発現させると、alkaline phosphatase (ALP)、osteopontin (OPN)、osteocalcin (OCN)、BSP、CAP が発現したという報告^{13), 15)}があり、CEMP-1 がセメント質関連遺伝子発現を誘導することが示されている。また、リコンビナントヒト CEMP-1 を歯周靭帯細胞に添加すると、増殖や遊走を促進することが報告されており、創傷治癒や歯周組織再生のメディエーターである可能性についても報告されている^{16), 17)}。

セメント芽細胞分化について、*in vitro* の実験において、歯周靭帯細胞にリチウムイオンを添加、根尖濾胞幹細胞を低酸素状態にさらすことでセメント芽細胞に分化誘導したことが報告されている^{12), 18), 19)}。また、*in vivo* の実験において、恒常的な β -カテニンの安定化は過剰なセメント質の形成を引き起こし²⁰⁾、 β -catenin/Wnt 経路の中断はセメント芽細胞の分化を停止する²¹⁾ という報告もある。これらの報告は、古典的 β -catenin/Wnt 経路がセメント芽細胞の分化およびセメント質形成に関与していることを示唆している。

古典的 β カテニン/Wnt 経路は、Wnt タンパク質が受容体に結合すると、dishevelled (Dvl) が活性化され、axis inhibition protein (Axin) を複合体から引き離し、glycogen synthase kinase 3 β (GSK-3 β) が β カテニンをリン酸化するのを阻害する。その結果、 β カテニンは分解されず、安定化した β カテニンは細胞質内で蓄積され、核内に移行する。その後、 β カテニンは核内で転写因子であ

る T-cell factor (TCF) / lymphoid enhancer-binding factor (LEF) ファミリーと結合し、標的遺伝子の発現を調節する^{22), 23)}。

現在、歯周組織再生用足場材料として、ハイドロキシアパタイトや β -リン酸三カルシウム (β -TCP) といった人工骨が使用されている。これらの骨移植材は、骨再生を目的とした材料であり、セメント質や歯周靭帯再生に関して有効であるというエビデンスは確立していない。そのため、セメント質、歯周靭帯の再生を促進し、適切な時期に吸収されることで歯周組織再生を阻害せず、成型が容易な生体材料の開発が期待されている¹⁾。

そこで、セメント質、歯周靭帯、歯槽骨に部位特異的に分化する足場材料を設計・開発することで、歯槽骨再生のみでなく、セメント質および歯周靭帯の再生を促進し、歯周組織再生に寄与できるのではないかと考えた。部位特異的に分化する足場材料の開発において、高分子であるタンパク質は足場材料に結合させるなどの組織工学的なアプローチによる加工を行えるメリットがある。MSC から骨芽細胞へ分化誘導するタンパク質は多く報告があるが、MSC からセメント芽細胞へ分化誘導するタンパク質の報告は見られない。そのため、MSC からセメント芽細胞様細胞への分化を促進するタンパク質に関する知見は、細胞機能制御能を有する組織工学用足場材料の分子設計に有益な情報となる。

古典的 β カテニン/Wnt 経路を活性化する Wnt リガンドとして、Wnt1、Wnt3a、Wnt8 が知られている。この中で Wnt3a は、*in vivo* においてヘルトビッチの上皮鞘およびマラッセの上皮遺残で発現していることが報告されている²⁴⁾。また、歯根形成時において、ヘルトビッチの上皮鞘及びマラッセの上皮遺残は上皮間葉相互作用によって歯小囊細胞をセメント芽細胞様細胞に分化させることが知られており^{25), 26)}、Wnt3a はセメント芽細胞分化において重要な因子の一つと考えられる。

これらの報告から、古典的 β カテニン/Wnt 経路を活性化する因子である Wnt3a に着目し、MSC からセメント芽細胞様細胞への分化に及ぼす Wnt3a の効果について詳細に調べることを研究の目的とした。

第2章 セメント芽細胞分化誘導に及ぼすWnt3aの効果

第1節 骨髄由来間葉系幹細胞からセメント芽細胞様細胞への分化に及ぼすWnt3aの影響

1. 緒言

これまでの研究において、セメント芽細胞の始原細胞と言われている歯周靭帯細胞からセメント芽細胞へ分化誘導したという報告^{18), 19), 47)}は少なく、口腔由来でない幹細胞からセメント芽細胞への分化誘導に関する報告は見当たらない。

古典的 β カテニン/Wnt経路の活性化が歯根の形成やセメント質形成に関与することが報告^{20), 21)}されているため、MSCをセメント芽細胞へ分化誘導するために、同経路を活性化することはセメント芽細胞の誘導にとって有効であると考えられる。

部位特異的にセメント芽細胞へ分化する足場材料を設計・開発する際に、今までに報告があるリチウムイオンや低酸素状態^{12), 18), 19)}では、組織工学的手段を用いても部位特異的に環境を維持することが難しいため、これらを足場材料へ応用することは難しい。一方で、タンパク質性因子は組織工学的手法の応用によって目的とする足場材料への加工が可能となる。

古典的 β カテニン/Wnt経路を活性化するタンパク質はWnt1、Wnt3a、Wnt8が挙げられる。この中でも、Wnt3aはヘルトビツヒの上皮鞘及びマラッセの上皮遺残で発現していることが報告²⁴⁾されているため、セメント芽細胞分化に有効と推察される。しかしながら、これまでの報告でWnt3aを用いたセメント芽細胞への分化誘導の報告や、骨髄由来間葉系幹細胞からセメント芽細胞分化の報告はなくその有用性は未知である。

そこで、本章では骨髄由来のMSCからセメント芽細胞様細胞への分化に及ぼすWnt3aの影響について調べた。

2. 材料および方法

1) ヒト骨髄由来間葉系幹細胞及び不死化セメント芽細胞の細胞培養

細胞は、医薬基盤・健康・栄養研究所 JCRB 細胞バンク(大阪)から供与されたヒト不死化間葉系幹細胞株である UE6E7T-3 細胞 (hTERT および HPV の

E6,E7 遺伝子を導入した細胞) (hMSC) を使用した。培養は、Dulbecco's modified Eagle's medium (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) に 10% ウシ胎児血清 (FBS、GIBCO、Buffalo, NY)、100 units/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin、1 ng/ml fibroblast growth factors-2 (FGF-2) を添加したものを使用し、10 cm シャーレ(Corning、Durham、NC) 上で 37°C、5 %CO₂ 雰囲気下で行い、培地交換は 3 日毎に行った。

また、口腔顎顔面病理病態学教室 高田 隆教授から供与いただいた不死化セメント芽細胞の培養には、Minimum Essential Medium Eagle Alpha Modificaton (α-MEM; Sigma-Aldrich) に 10% FBS, 100 units/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin を添加したものを使用し、10 cm シャーレ上で 37°C、5% 雰囲気下で培養した。培地交換は 3 日毎に行った。

2) セメント芽細胞様細胞への分化誘導

hMSC を 12 well dish に 20,000 cells/cm² になるように播種した。播種翌日に、α-MEM に 10% FBS、100 units/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin、0.1 µM dexamethasone (Sigma-Aldrich)、10 mM β-glycerophosphate (WAKO、大阪) 及び 50 µg/mL ascorbic acid (WAKO) を添加した骨誘導培地に変更後、6 日間培養を行った。細胞培養 6 日目に無血清の骨誘導培地に変更し、リコンビナントヒト Wnt3a (R&D、Minneapolis、MN) を添加し、細胞培養 7 日目に細胞を回収した。

3) Real-time PCR法

7日間培養したセメント芽細胞様細胞をphosphate buffered saline (PBS)で洗浄後、SV total RNA isolation system (Promega、Madison、WI) を用いてtotal RNAの精製を行った。cDNAはTranscriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche、Basel-Stadt、Switzerland) を用いて2.5µgのtotal RNAから逆転写して合成し、KAPA SYBR Fast qPCRキット (KAPA BIOSYSTEMS、Wilmington、MA) およびEco Real-Time PCR System (Illumina、San Diego、CA) を用いてmRNA発現を解析した。初期変性 95°Cで3秒間、アニーリングおよび伸長反応 60°Cで30秒、サイクル数40の条件で行った。

セメント質・骨関連遺伝子であるCEMP-1、CAP、ALP、OCN、Axis inhibition protein 2 (Axin2)、β-catenin、bone morphogenetic protein 2 (BMP-2)、brain-derived neurotrophic factor (BDNF) のmRNAの発現量はhousekeeping

geneであるglyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を内部コントロールとして使用し、 $\Delta \Delta Ct$ 法を用いて算出した。用いたプライマーの配列を表 1 に示す。

4) Wnt3a添加後2週間のセメント質・骨関連遺伝子の変化

hMSCを12 well dishに20,000 cells/cm²になるように播種した。播種翌日に、 α -MEMに10% FBS、100 units/mL penicillin、100 μ g/mL streptomycin、0.1 μ M dexamethasone (Sigma-Aldrich)、10 mM β -glycerophosphate (WAKO、大阪) 及び50 μ g/mL ascorbic acid (WAKO)を添加した骨誘導培地に変更後、6日間培養を行った。細胞培養6日目に無血清の骨誘導培地に変更し、リコンビナントヒトWnt3a 200ng/ml (R&D、Minneapolis、MN) を添加し、細胞培養7日目 (Wnt3a添加 1日目)、培養13日目 (Wnt3a添加 7日目) および培養20日目 (Wnt3a添加 14日目) に細胞を回収した。回収した細胞のCEMP-1、CAP、ALP、OCNのmRNA発現量は既述のreal-time PCR法にて解析した。

5) アリザリンレッド染色

石灰化量の測定はNørgaardら²⁷⁾の方法に準じて行った。hMSCを12 well dishに20,000 cells/cm²になるように播種した。播種した細胞がコンフルエントに達した後、骨芽細胞分化培地にWnt3a (200 ng/ml) を添加して20日間培養したものをサンプルとした。サンプルは、99.5% ethanolを用いて室温で10分間固定し、PBSで洗浄後、10%アリザリンレッドS溶液 (Sigma-Aldrich : 2.8%アンモニア水でpH6.4に調整) を添加し1時間染色後、蒸留水で洗浄し、乾燥させた。その後、アリザリンレッド染色性を顕微鏡下 (IX73、Olympus、東京) で観察した。その後、10% cetylpyridium chloride(Sigma-Aldrich)を200 μ l添加してアリザリン色素を抽出し(N=3)、マイクロプレートリーダー(Thermo Scientific、Waltham、MA)を用いて550 nmの吸光度を測定した。

6) 逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR 法)

P75、TrkB、BMPR1a および BMPR2 の mRNA の発現は RT-PCR 法を用いて分析した。Total RNA の精製及び cDNA 合成は既述 [第 2 節 3)] のように行った。その後、cDNA を鋳型として、遺伝子特異的プライマーを用い(表 2)、変性 (94°C 30 秒間)、アニーリング (57°C 30 秒間)、伸長 (72°C 30 秒間)、40 サイクルの条件で PCR を行った。PCR 産物を 2.0 %アガロースゲルに泳動

し、エチジウムブロマイドで染色した後、luminescent image analyzer ChemiDoc XRS Plus (Bio-Rad、Hercules、CA) を用いて発光させ、写真撮影を行った。コントロール遺伝子として GAPDH を使用した。また、陽性対照としてセメント芽細胞を使用した。

3. 結果

図1に示すように骨誘導培地で培養したhMSCにWnt3aを添加した結果、CEMP-1 mRNA発現量はWnt3a濃度依存的および時間依存的に増加した。Wnt3aの濃度は、200 ng/mlでCEMP-1 mRNA発現量はコントロールと比較して統計的に有意 ($p<0.05$) に高い値を示した (図1 A)。また、経時的には6時間から統計的に有意な差を示し、12時間後、24時間後にCEMP-1 mRNA発現量は有意 ($p<0.01$) に高い値を示し約1.8倍になった (図1 B)。

CEMP-1 mRNA発現の結果をもとにしてMSCにWnt3aを添加した結果、図2に示すようにCEMP-1以外のセメント質・骨関連遺伝子や β カテニン/Wnt経路関連遺伝子、増殖因子関連遺伝子のmRNA発現量はコントロールと比較して統計的に有意に高い値を示した。

また、Wnt3a添加後のセメント質・骨関連遺伝子発現の推移を調べるためWnt3aを添加して2週間培養したMSCのセメント質・骨関連遺伝子の発現量の変化について検討した。CEMP-1、CAP、OCN mRNA発現量は時間依存的に増加した。一方、ALPはWnt3a刺激後1日目では発現量は増加したが、その後減少した (図3 A-D)。

Wnt3aのカルシウム沈着に及ぼす効果を、アリザリンレッド染色にて評価したところ、維持培地群及び維持培地にWnt3a添加群では石灰化結節の形成を認めなかった。骨誘導培地群および骨誘導培地にWnt3a添加群では石灰化結節の形成を認め、維持培地群よりも染色性は亢進していた。これらの結果から、維持培地で培養したhMSCにWnt3aを添加しても石灰化が誘導されず、骨誘導培地で培養したhMSCにWnt3aを添加した群では石灰化が誘導された。

hMSC骨誘導培地群でWnt3a添加群とWnt3a非添加群のアリザリンレッド染色を定量化したところ、Wnt3a添加群はWnt3a非添加群に比較して約1.4倍の高い値を示した ($p<0.05$) (図4 A、B)。

BDNFのレセプターであるTrkBおよびBMP-2のレセプターであるBMPR1a、BMPR2いずれもセメント芽細胞、Wnt3a非添加骨誘導培地群 (1日目群、7日目群)、Wnt3a添加骨誘導培地群 (1日目群、7日目群) いずれにおいても発現していた。BDNFのレセプターであるp75は、Wnt3a非添加骨誘導培地7日目群では発現が見られなかったが、セメント芽細胞、Wnt3a非添加骨誘導培地1日

目群、Wnt3a添加骨誘導培地群（1日目群、7日目群）で発現が見られた。また、p75のmRNA発現量に関してはWnt3a非添加骨誘導培地群とWnt3a添加骨誘導培地群で差を認めたが、TrkB、BMPR1a、BMPR2では骨誘導培地群とWnt3a添加群で明らかな差は認めなかった（図5）。

4. 考 察

CEMP-1はセメント芽細胞及びその始原細胞で発現していると言われており、今回用いたMSCにおいてもその発現を認めた（結果を示さず）。また、未分化MSCを移植することでセメント質再生が生じることは、イヌの*in vivo*の実験系で示されている⁹⁾。これらはhMSCがセメント芽細胞の始原細胞になりうる可能性を示唆している。

hMSCにWnt3aを作用させたところ、セメント芽細胞のマーカーとして考えられているCEMP-1やCAPのmRNA発現量が上昇した。また、ALP、OCN、DSPPといったセメント質・骨関連遺伝子とWnt関連遺伝子である β -カテニンやAxin2もmRNA発現量が上昇した。ヒト歯周靭帯細胞にLiClを添加することでCEMP-1、CAP、ALP、OCNのmRNA発現量が増加すること^{12), 18)} およびマウス間葉系幹細胞株であるC3H10T1/2ではWnt3a刺激によって古典的 β カテニン/Wnt経路が活性化され、ALPおよびOCN mRNA発現量が増加する³⁰⁾報告がある。これらのことからセメント質・骨関連遺伝子の発現には β カテニン/Wnt経路の活性化が必要なことが示唆される。

Axin2は、古典的 β カテニン/Wnt経路のターゲット遺伝子であり、古典的 β カテニン/Wnt経路の活性化の最も正確なレポーター遺伝子とされている¹²⁾。また、Wnt3a刺激によって増加したAxin2は、negative feedback loopすると言われている³³⁾。

DSPPは象牙質特異的であると考えられていたが、内耳の組織における発現や歯周靭帯の線維芽細胞や有細胞セメント質表面のセメント芽細胞で発現しているという報告³¹⁾がある。今回セメント芽細胞のマーカーの一つとして、DSPPのmRNA発現量の変化を調べたところ、Wnt3a刺激でhMSCのDSPP mRNA発現量が増加した。

転写因子であるRunx2およびOsterixはセメント芽細胞で発現していること³²⁾、Osterixノックアウトマウスでは有細胞セメント質の形成が減少したという報告³³⁾、歯小囊細胞においてWnt3a刺激がOsterixの発現量を増加したとの報告²⁴⁾がある。OsterixとCEMP-1発現の関係については、Osterixを強制発現やノックアウトすることでCEMP-1発現の変化をさらに詳細に調べる必要がある。

不死化セメント芽細胞株 (OCCM-30) では、古典的 β カテニン/Wnt経路の活性化によってセメント芽細胞の分化が抑制されるという報告がある^{34), 35)}。一方、歯小囊幹細胞や歯周靭帯細胞においては、Wnt3a添加やLiCl添加によってセメント芽細胞様細胞への分化が促進されるという報告がある^{12), 36)}。これらの報告から考えると、古典的 β カテニン/Wnt経路の活性化はとくにセメント芽細胞分化初期段階において重要であると考えられ、本研究で使用したhMSCは、セメント芽細胞に比べて未分化の状態であるため、Wnt3a刺激に対して促進的に反応したのではないかと考えられる。

セメント芽細胞で発現していると報告^{28), 29)} があるBDNFおよびBMP-2のレセプターのmRNA発現を評価した。BDNFのレセプターであるp75の発現は、骨誘導培地Wnt3a非添加群 (1日目群、7日目群) と骨誘導培地Wnt3a添加群 (1日目群、7日目群) 間で差があった。このことは、p75の発現に β カテニン/Wnt経路が関与している可能性を示唆している。また、本研究の結果ではWnt3a刺激によってBMP-2やBDNFといったセメント芽細胞分化に関係する増殖因子の発現量が増加した。また、BMP-2およびBDNFの受容体はWnt3a刺激によってその発現が消失することはなかった。この結果は、増加したBMP-2やBDNFがオートクライン、パラクライン的にhMSCに作用する可能性を示唆する。しかしながら、これらの関与を明らかにするためには、BMP-2受容体もしくはBDNF受容体をノックダウンしてみることやBMP-2もしくはBDNFの阻害剤を用いることで評価する必要があり、今後さらに詳細な検討が必要である。

以上述べてきたように、hMSCをWnt3a刺激することによって得られた細胞は、骨芽細胞で発現していないと言われているCEMP-1やCAP mRNA発現量の増加を認め、セメント芽細胞で発現していると言われているBMP-2受容体やBDNFの受容体を発現していることからセメント芽細胞様細胞に分化したと考えられる。しかし、Wnt3aが骨芽細胞への分化を促進するという報告もあることから、今回得られた細胞が骨芽細胞ではなく、セメント芽細胞様細胞であることを証明するために、*in vivo*に移植してセメント質再生が起きるか検討するなどさらなる検討が必要である。

第3章 CEMP-1の遺伝子及びタンパク質の発現に関与するシグナル伝達経路

古典的βカテニン/Wnt経路およびMitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の活性化がCEMP-1発現に与える影響

1. 緒言

第2章において、hMSCにWnt3aを添加すると、セメント質・骨関連遺伝子、Wnt関連遺伝子及び増殖因子関連遺伝子の発現量が増加した。これらの遺伝子発現には古典的βカテニン/Wnt経路の活性化が関与していると考えられる。ALP、OCN、Runx2 mRNA発現に関しては古典的βカテニン/Wnt経路の活性化が、これらのmRNA発現量増加に関与しているとの報告³⁰⁾があるが、古典的βカテニン/Wnt経路の活性化がセメント芽細胞のマーカーであるCEMP-1の発現量に与える影響については明らかではない。

そこで、Wnt3a刺激hMSCのCEMP-1発現に古典的βカテニン/Wnt経路の活性化が必要であるかを調べることを目的に、古典的βカテニン/Wnt経路の阻害剤を用いて検討した。用いた阻害剤はDickkopf1 (Dkk1) と ICG-001である。DKK-1は、β-カテニン/Wntシグナル伝達経路の阻害分子の1つで、協働受容体LRP5/6に結合することで古典的β-カテニン/Wnt経路の活性を阻害する³⁷⁾。また、ICG-001は、古典的β-カテニン/Wntシグナル経路の阻害剤の1つで、転写補助因子であるCREB binding protein (CBP) と結合することで、CBPとβ-カテニンとの複合体形成を阻害し、古典的β-カテニン/Wnt経路の活性を阻害することが知られている³⁸⁾。

また、古典的β-カテニン/Wnt経路とMAPK経路がクロストークしているとの報告があり^{39) 40) 41)}、古典的βカテニン/Wnt経路の目的遺伝子の発現にErk、p38、Jnkが関与する可能性が考えられる。そこで、MAPK阻害剤を用いてWnt3a刺激hMSCのCEMP-1発現にMAPKが関与するかどうかも検討した。

2. 材料及び方法

1) セメント芽細胞様細胞の誘導

hMSCを12 well dishに20,000 cells/cm²になるように播種した。播種翌日に、α-MEMに10% FBS、100 units/mL penicillin、100 µg/mL streptomycin、

0.1 μM dexamethasone (Sigma-Aldrich)、10 mM β -glycerophosphate (WAKO) 及び 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ascorbic acid (WAKO)を添加した骨誘導培地に変更後、6日間培養を行った。培養6日目に無血清の骨誘導培地に変更し、培養7日目に細胞を回収した。Wnt3a (R&D) 200ng/ml は細胞回収12時間前に添加した。

2) 古典的 β -カテニン/Wnt経路及びMAPK経路の阻害

骨誘導培地でhMSC培養6日目に古典的 β カテニン/Wnt経路の阻害剤であるリコンビナントヒトDKK-1 8nM (Peprotech、Rocky Hill、NJ)、ICG-001 20 μM (Adooq bioscience、Irvine、CA) およびErk阻害剤であるPD98059 50 μM (EMD Millipore、Bikkerica、MA)、p38阻害剤であるSB203580 10 μM (EMD Millipore)、Jnk阻害剤であるSP600125 5 μM (EMD Millipore) をWnt3a (200 ng/ml) 添加30分前に添加した。それぞれの阻害剤の作用部位に関して図6に示す。

3) ウェスタンブロッティング法

Wnt3a添加12時間後、hMSCを1×PBSで3回洗浄した。その後、1×SDS (sodium dodecyl sulfate) で細胞の回収を行い、サンプルとした。回収したサンプルは、氷冷下でホモジナイザー (トミー精工、東京) で10秒間粉碎した後、100°Cで5分間加熱処理を行った。その後、15% SDS-ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動を行い、ゲルに展開したタンパク質をpolyvinylidene fluoride (PVDF) メンブレン (Bio-Rad) に転写した (1時間、100 V)。転写後、PVDFメンブレンを5% スキムミルク含有Tris-buffered saline (TBS) -Tween (TBS-T) で常温下、1時間ブロッキングした。ポリクローナル抗CEMP-1抗体 (Abcam、Cambridge、UK) は1:1,000の倍率になるようにCan Get Signal Solution1 (東洋紡、大阪) で希釈し、一昼夜 4°Cの環境下で反応させた。その後、PVDFメンブレンをTBS-Tで5分間の洗浄を3回繰り返して、horseradish peroxidaseで標識した抗ラビットIgG抗体 (R&D) をTBS-Tで1:6,000に希釈し、メンブレンを1時間浸漬した。次にTBS-Tで15分間の洗浄を3回行った後に、メンブレン上の免疫反応タンパク質を検出試薬 Clarity™ Western ECL Substrate (Bio-Rad) で処理した後に、化学発光シグナルをluminescent image analyzer ChemiDoc XRS Plus (Bio-Rad) によって検出した。

3) リアルタイムPCR法

Wnt3a添加12時間後にhMSCをPBSで洗浄した後に回収した。Total RNAの精製はSV total RNA isolation system (Promega) を用いて行った。cDNAはTranscriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) を用いて2.5 μg のtotal

RNAから逆転写して合成し、KAPA SYBR Fast qPCRキット及びEco Real-Time PCR System (Illumina) を用いてリアルタイムPCRを行った。変性 95°Cで3秒間、アニーリング/伸長反応60°Cで30秒間、40サイクルの条件で反応させた。GAPDHを内部コントロールとして使用し、CEMP-1 mRNAの値は $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて算出した。用いたCEMP-1のプライマーの配列を表1に示す

3. 結果

図7に示すように、コントロールであるWnt3a非添加のhMSC群に比べて、Wnt3a添加hMSC群ではCEMP-1タンパク質の発現量は増加した。このCEMP-1の発現増加は、古典的 β -カテニン/Wnt経路の阻害剤であるDKK-1あるいはICG-001の添加によって抑制された(図7 AおよびB)。

図8 A-Cに示すように、リアルタイムPCRの結果から、コントロールであるWnt3a非添加のhMSC群に比べて、Wnt3a添加hMSC群ではCEMP-1 mRNA発現量が増加した。この系にErk阻害剤であるPD98059、あるいはp38阻害剤であるSB203580を添加すると、CEMP-1 mRNA発現量はいずれも減少した。一方、Jnk阻害剤であるSP600125をWnt3aとともに添加した場合、Wnt3a添加のみの群またはJnk阻害剤のみを添加した群に比べて、CEMP-1 mRNA発現量はさらに増加した。

また、図8 D-Fに示すように、ウエスタンブロッティングの結果においても、コントロール群に比較してWnt3a添加によって増加したCEMP-1タンパク質の発現量は、Wnt3aとともにErk阻害剤であるPD98059、またはp38阻害剤であるSB203580を添加した群で減少した。一方、Jnk阻害剤であるSP600125で処理した場合は、Wnt3a添加によって増加したCEMP-1タンパク質の発現量はさらに増加した。

第3節 考察

古典的 β カテニン/Wnt経路の活性化がCEMP-1発現に関与していることをDKK-1、ICG-001を用いて同経路の上流および下流の制御を行って調べた。結果から、CEMP-1タンパク質の発現は古典的 β -カテニン/Wnt経路の活性化を介する必要があることが示唆される。また、第2章で述べたように、Axin2のmRNA

発現量の増加は、古典的 β カテニン/Wnt経路の活性化を示しており、遺伝子レベルおよびタンパクレベルでWnt3a刺激によって古典的 β カテニン/Wnt経路の活性化が起き、CEMP-1発現に関与することが考えられる。

Erk阻害剤、p38阻害剤でhMSCを処理することで、Wnt3a刺激で増加したCEMP-1 mRNAおよびタンパク質の発現が減少した。NIH3T3細胞株において、Wnt3a刺激によって、Raf-Mek-Erkがリン酸化し、リン酸化Erkは核内に移行することが報告されている⁴⁰⁾。また、リン酸化Erkは転写因子であるactivator protein-1 (AP-1) を活性化することが報告されている⁴⁵⁾。核内に移行したリン酸化ErkやAP-1はCEMP-1遺伝子の転写を調節している可能性が考えられる。

また、マウスF9細胞株においてWnt3a刺激によってp38 MAPKが活性化するとともに、GSK3 β を不活化すること、阻害剤であるSB203580はp38のリン酸化を阻害するだけではなく、 β カテニンが核内に移行することまでも阻害することが報告されている⁴¹⁾。Erkおよびp38の経路の一方を遮断するだけでCEMP-1発現を抑制したことから、Erk経路およびp38経路が関与していると考えられる。

一方、Jnkは非古典的 β カテニン/Wnt経路であるplanar cell polarity (PCP) 経路に関与していることが知られている^{23,42)}。PCP経路に係るWntとしてはWnt5aが知られているが、これは古典的 β カテニン/Wnt経路に対して抑制的に働くことが報告されている^{36,46)}。本研究ではWnt5a発現の変化について調べていないが、マウスの歯小囊細胞株SVF4株はWnt3a刺激によってWnt5a mRNA発現が増加したとの報告²⁴⁾があることから、Wnt3a刺激によって古典的経路が活性化するとともに、内在性のWnt5aによって非古典的 β カテニン/Wnt経路が活性化したことが考えられる。そのため、Jnk阻害剤を用いることで、非古典的 β カテニン/Wnt経路による古典的 β カテニン/Wnt経路の抑制が減少したため、Wnt3aとJnk阻害剤の処理でCEMP-1発現量が増加したと考える。

以上の結果から、CEMP-1 mRNA発現及びタンパク質発現は、古典的 β カテニン/Wnt経路以外にErkおよびp38 MAPKが関与していると考えられる。

歯周靭帯細胞にBMP-7を添加するとCEMP-1の発現が増加したという報告⁴³⁾がある。BMPシグナルとWntシグナルは古典的 β カテニン/Wnt経路に必要なAPCを介して複雑に相互作用しているという報告⁴²⁾もあることから考えると、CEMP-1発現は古典的 β カテニン/Wnt経路の活性化だけではなく、様々な経路が関与すると考えられる。

第4章 総括

本研究では、hMSCをセメント芽細胞様細胞へ分化誘導することを目的として、セメント芽細胞分化誘導因子としてのWnt3aの効果について検討した。

骨分化誘導培地で培養したhMSCにWnt3aを添加することによって、以下の結果を得た。

1) Wnt3aを骨誘導培地で培養したhMSCに添加したところ、CEMP-1、CAPなどのセメント質骨関連遺伝子のmRNA発現量が増加した。

2) セメント芽細胞のマーカであるCEMP-1のhMSCにおける発現は、Wnt3a刺激で活性化する古典的 β カテニン/Wnt経路の影響のみならず、Erkおよびp38といったMAPKの影響も受けていることが示された。

以上のことから、Wnt3aはhMSCがセメント芽細胞様細胞に分化するために必要な刺激の一つであり、セメント芽細胞への分化には古典的 β カテニン/Wnt経路のみではなく様々な経路を介することが示唆された。

第5章 参考文献

1. 吉江弘正 伊藤公一 村上伸也 申基喆 臨床歯周病学, 第1版, 2007, 医歯薬出版, 東京, pp. 2-18, 210-219, 286-293.
2. Christgau M, Bader N, Felden A, Gradl J, Wenzel A, Schmalz G. Guided tissue regeneration in intrabony defects using an experimental bioresorbable polydioxanon (PDS) membrane. A 24-month split-mouth study. *J Clin Periodontol* **29**, 710-723 (2002).
3. Stoller, N. H., Johnson, L. R. & Garrett, S. Periodontal regeneration of a class II furcation defect utilizing a bioabsorbable barrier in a human. A case study with histology. *J Periodontol* **72**, 238-242, (2001).
4. Kalpidis, C. D. & Ruben, M. P. Treatment of intrabony periodontal defects with enamel matrix derivative: a literature review. *J Periodontol* **73**, 1360-1376, (2002).
5. Raja S, Byakod G, Pudakalkatti P Growth factors in periodontal regenerationI. *J Dent Hygiene* **7**, 82-89 (2009).
6. Racz GZ, Kadar K, Foldes A, Kallo K, Perczel-Kovach K, Keremi B, Nagy A, Varga G. Immunomodulatory and potential therapeutic role of mesenchymal stem cells in periodontitis. *J Physiol Pharmacol* **65**, 327-339 (2014).
7. Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **126**, 663-676 (2006).
8. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **284**, 143-147 (1999).

9. Kawaguchi H, Hirachi A, Hasegawa N, Iwata T, Hamaguchi H, Shiba H, Takata T, Kato Y, Kurihara H. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells. *J Periodontol* **75**, 1281-1287 (2004).
10. Hasegawa N, Kawaguchi H, Hirachi A, Takeda K, Mizuno N, Nishimura M, Koike C, Tsuji K, Iba H, Kato Y, Kurihara H. Behavior of transplanted bone marrow-derived mesenchymal stem cells in periodontal defects. *J Periodontol* **77**, 1003-1007 (2006).
11. Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontology 2000*. **67**, 211-233 (2015).
12. Han P, Ivanovski S, Crawford R, Xiao Y. Activation of the canonical Wnt signaling pathway induces cementum regeneration. *J Bone Miner Res* **30**, 1160-1174 (2015).
13. Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Sampath Narayanan A, Izumi Y, Morita I. Cementum protein 1 (CEMP-1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol* **227**, 649-657 (2012).
14. Alvarez-Perez MA, Narayanan S, Zeichner-David M, Rodriguez Carmona B, Arzate H. Molecular cloning, expression and immunolocalization of a novel human cementum-derived protein (CP-23). *Bone* **38**, 409-419 (2006).
15. Carmona-Rodríguez B, Alvarez-Pérez MA, Narayanan AS, Zeichner-David M, Reyes-Gasga J, Molina-Guarneros J, García-Hernández AL, Suárez-Franco JL, Chavarría IG, Villarreal-Ramírez E, Arzate H. Human Cementum Protein 1 induces expression of bone and cementum proteins by human gingival fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* **358**, 763-769 (2007).
16. Hoz L, Romo E, Zeichner-David M, Sanz M, Nunez J, Gaitan L, Mercado G, Arzate H. Cementum protein 1 (CEMP1) induces differentiation by human periodontal ligament cells under three-dimensional culture conditions. *Cell Biol Int* **36**, 129-136 (2012).

17. Wanderley F, Paula-Silva G, Ghosh A, Arzate H, Kapila S, Bezerra da Silva LA, Kapila YL. Calcium hydroxide promotes cementogenesis and induces cementoblastic differentiation of mesenchymal periodontal ligament cells in a CEMP1- and ERK-dependent manner. *Calcif Tissue Int* **87**, 144-157 (2010).
18. Han P, Wu C, Chang J, Xiao Y. The cementogenic differentiation of periodontal ligament cells via the activation of Wnt/ β -catenin signalling pathway by Li ions released from bioactive scaffolds. *Biomaterials* **33**,6370-6379, (2012).
19. Choi H, Jin H, Kim JY, Lim KT, Choung HW, Park JY, Chung JH, Choung PH. Hypoxia promotes CEMP1 expression and induces cementoblastic differentiation of human dental stem cells in an HIF-1-dependent manner. *Tissue Eng Part A* **20**, 410-423 (2014).
20. Kim TH, Lee JY, Baek JA, Lee JC, Yang X, Taketo MM, Jiang R, Cho ES. Constitutive stabilization of β -catenin in the dental mesenchyme leads to excessive dentin and cementum formation. *Biochem Biophys Res Commun* **412**, 549-555 (2011).
21. R. Zhang, G. Yang, X. Wu, J. Xie, X. Yang, T. Li. Disruption of Wnt/beta-catenin signaling in odontoblast and cementoblasts arrests tooth root development in postnatal mouse teeth. *Int J Biol Sci* **9**, 228-236 (2013).
22. 菊池 章. Wnt シグナルネットワークとその異常による病態. 生化学 **81**, 780-792 (2009).
23. 山本英樹. Wnt シグナル伝達経路の活性制御と発がんとの関連. 生化学 **80**, 1079-1093 (2008).
24. Nemoto E, Sakisaka Y, Tsuchiya M, Tamura M, Nakamura T, Kanaya S, Shimonishi M, Shimauchi H. Wnt3a signaling induces murine dental follicle cells to differentiate into cementoblastic/osteoblastic cells via an osterix-dependent pathway. *J Periodontal Res* **50**, <http://dx.doi.org/10.1111/jre.12294>, in press (2015).

25. Jung HS, Lee DS, Lee JH, Park SJ, Lee G, Seo BM, Ko JS, Park JC. Directing the differentiation of human dental follicle cells into cementoblasts and/or osteoblasts by a combination of HERS and pulp cells. *J Mol Hist* **42**, 227-235 (2011).
26. Sonoyama W, Seo BW, Yamaza T, Shi S. Human Hertwig's epithelial root sheath cells play crucial roles in cementum formation. *J Dent Res* **86**, 594-599 (2007)
27. Nørgaard R, Kassem M, Rattan SI. Heat shock-induced enhancement of osteoblastic differentiation of hTERT-immortalized mesenchymal stem cells. *Ann N Y Acad Sci* **1067**, 443-447 (2006).
28. Berry JE, Zhao M, Jin Q, Foster BL, Viswanathan H, Somerman MJ. Exploring the origins of cementoblasts and their trigger factors. *Connect Tissue Res* **44 Suppl 1**, 97-102 (2003).
29. Kajiya M, Shiba H, Fujita T, Ouhara K, Takeda K, Mizuno N, Kawaguchi H, Kitagawa M, Takata T, Tsuji K, Kurihara H. Brain-derived neurotrophic factor stimulates bone/cementum-related protein gene expression in cementoblasts. *J Biol Chem* **283**, 16259-16267 (2008).
30. Hongliang H, Hilton MJ, Tu X, Yu K, Ornitz DM, Long F. Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development. *Development* **132**, 49-60 (2005).
31. Baba O, Qin C, Brunn JC, Wygant JN, McIntyre BW, Butler WT. Colocalization of dentin matrix protein 1 and dentin sialoprotein at late stages of rat molar development. *Matrix Biol* **23**, 371-379 (2004).
32. Hirata A, Sugahara T, Nakamura H. Localization of Runx2, Osterix, and Osteopontin in tooth root formation in rat molars. *J Histochem Cytochem* **57**, 397-403 (2009).
33. Cao Z, Zhang H, Zhou X, Han X, Ren Y, Gao T, Xiao Y, de Crombrughe B, Somerman MJ, Feng JQ. Genetic evidence for the vital function of osterix in cementogenesis. *J Bone Miner Res* **27**, 1080-1092 (2012).

34. Cao Z, Liu R, Zhang H, Liao H, Zhang Y, Hinton RJ, Feng JQ. Osterix controls cementoblast differentiation through downregulation of Wnt-signaling via enhancing DKK1 expression. *Int J Biol Sci* **11**, 335-344 (2015) .
35. Nemoto E, Koshikawa Y, Kanaya S, Tsuchiya M, Tamura M, Somerman MJ, Shimauchi H. Wnt signaling inhibits cementoblast differentiation and promotes proliferation. *Bone* **44**, 805-812 (2009).
36. Sakisaka Y, Tsuchiya M, Nakamura T, Tamura M, Shimauchi H, Nemoto E. Wnt5a attenuates Wnt3a-induced alkaline phosphatase expression in dental follicle cells. *Exp Cell Res* **33**, 685-693 (2015).
37. Tian E, Zhan F, Walker R, Rasmussen E, Ma Y, Barlogie B, Shaughnessy Jr. JD. The role of the Wnt-signaling antagonist DKK1 in the development of osteolytic lesions in multiple myeloma. *N Engl J Med* **349**, 2483-2494 (2003).
38. McMillan M, Kahn M. Investigating Wnt signaling: a chemogenomic safari. *Drug Discov Today* **10**, 1467-1474 (2005).
39. Kamesh Bikkavilli R, Malbon CC. Mitogen-activated protein kinases and Wnt signaling. *Communicative & Integrative Biol* **2**, 46-49 (2009).
40. Yun MS, Kim SE, Jeon SH, Lee JS, Choi KY. Both ERK and Wnt/ β -catenin pathways are involved in Wnt3a-induced proliferation. *J Cell Sci* **118**, 313-322 (2005).
41. Kamesh Bikkavilli R, Feigin ME, Malbon CC. p38 mitogen-activated protein kinase regulates canonical Wnt- β -catenin signaling by inactivation of GSK3 β . *J Cell Sci* **121**, 3598-3607 (2008).
42. Huelsken J, Behrens J. The Wnt signaling pathway. *J Cell Sci* **115**, 3977-3978 (2002).
43. Torii D, Tsutsui TW, Watanabe N, Konishi K. Bone morphogenetic protein 7 induces cementogenic differentiation of human periodontal ligament-derived

mesenchymal stem cells. *Odontology*.

<http://link.springer.com/article/10.1007/s10266-014-0182-1> [Epub] (2014).

44. Miclea RL, van der Horst G, Robanus-Maandag EC, Löwik CWGM, Oostdijk W, Wit JM, Karperien M, Apc bridges Wnt/ β -catenin and BMP signaling during osteoblast differentiation of KS483 cells. *Exp Cell Res* **317**, 1411-1421 (2011).
45. Zhang Y, Pizzute T, Pei M. A review of crosstalk between MAPK and Wnt signals and its impact on cartilage regeneration. *Cell Tissue Res* **358**, 633-649 (2014).
46. Kim JH, Park S, Chung H, Oh S. Wnt5a attenuates the pathogenic effects of the Wnt/ β -catenin pathway in human retinal pigment epithelial cells via down-regulated β -catenin and Snail. *BMBRep* **48**, 525-530 (2015).
47. Jin H, Choung HW, Lim KT, Jin B, Jin C, Chung JH, Choung PH. Recombinant human plasminogen activator inhibitor-1 promotes cementogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Tissue Eng Part A* **21**, 2817-2828 (2015).

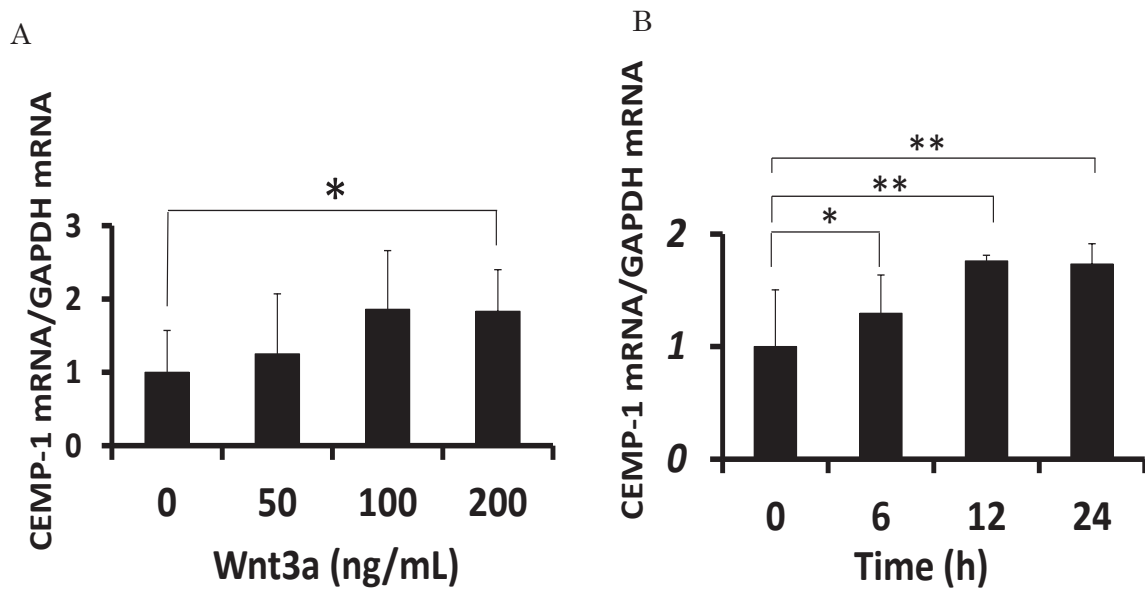


図1. Wnt3aがhMSCのCEMP-1 mRNA発現量に与える影響. hMSCをセメント芽細胞様細胞への誘導1週間後, total RNAを抽出し、real time-PCR 法によりCEMP-1 mRNA発現量を解析した. (A) CEMP-1 mRNA発現量に与えるWnt3a濃度の影響. (B) CEMP-1 mRNA発現量に与えるWnt3a作用時間の影響. 同様の実験を3回繰り返して行い, その平均値±標準偏差で示した. 統計学的検定はStudent's t-testを行った. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

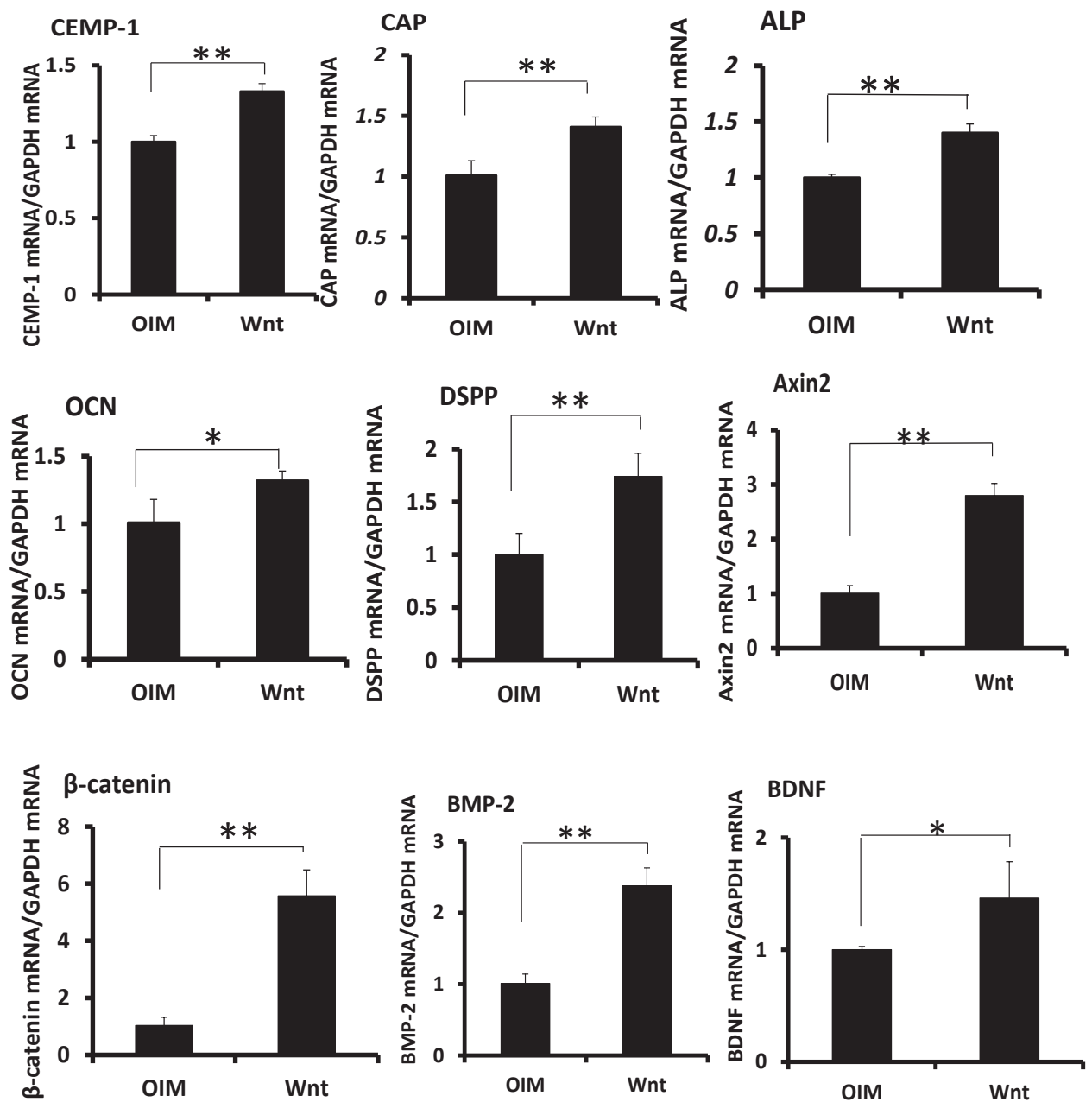


図2 セメント質・骨関連タンパク質遺伝子、βカテニン/Wnt関連遺伝子および増殖因子関連遺伝子のmRNA発現に及ぼすWnt3a添加の影響. hMSCをセメント芽細胞様細胞への誘導1週間後,total RNAを抽出し, real time-PCR 法によりセメント質・骨関連遺伝子, βカテニン/Wnt関連遺伝子および増殖因子関連遺伝子の発現量を解析した. 同様の実験を3回繰り返して行い, その平均値±標準偏差で示した. 統計学的検定はStudent's t-testを行った. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

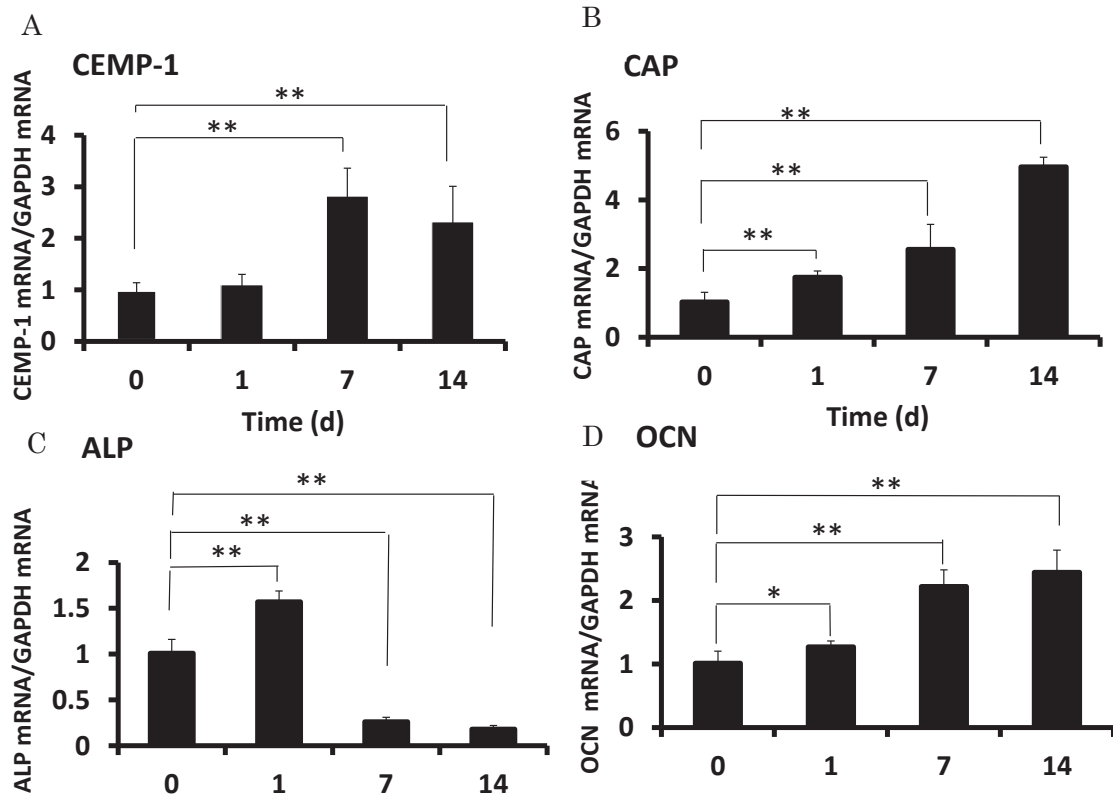


図3 Wnt3a添加後、14日間培養を行った時のセメント質・骨関連タンパク質遺伝子 mRNA発現に及ぼす影響. Wnt3aをhMSCに添加1日後,7日後及び14日後にtotal RNAを抽出し, real time-PCR 法によりセメント質・骨関連遺伝子の発現量を解析した. 同様の実験を3回繰り返して行い, その平均値±標準偏差で示した. 統計学的検定は Student's t-testを行った. * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$

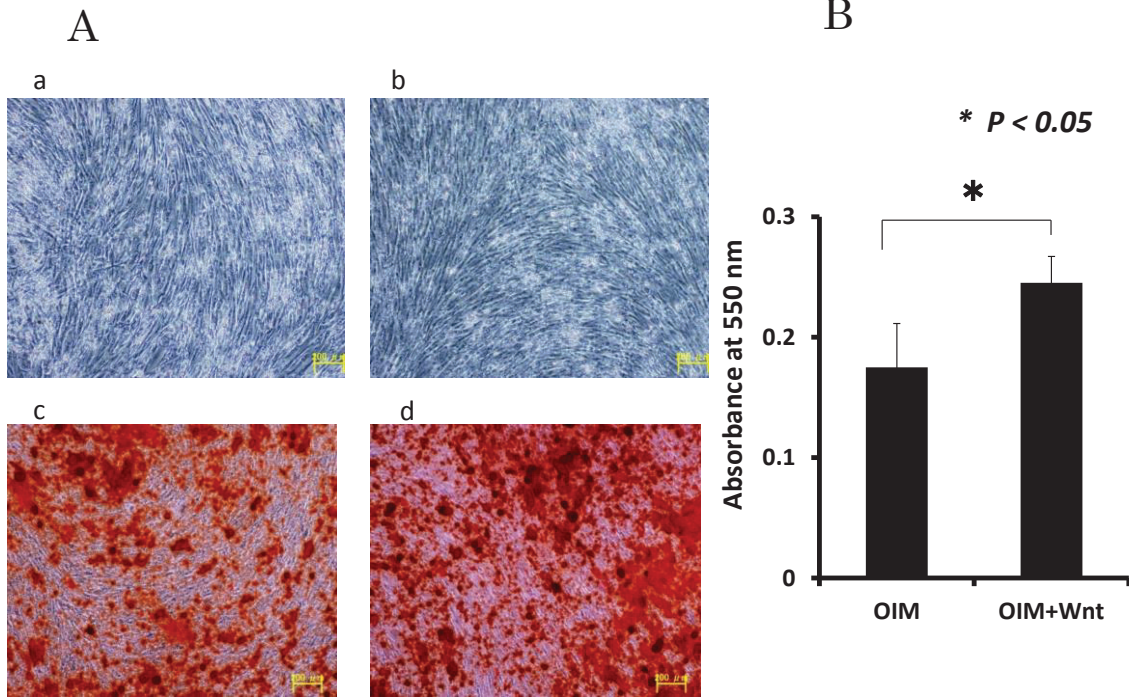
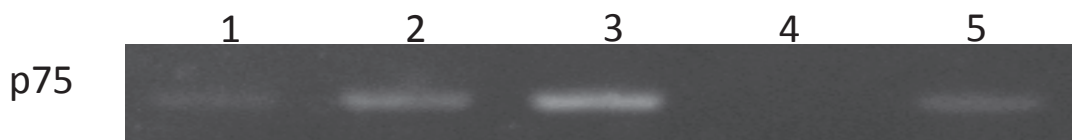


図4 カルシウム沈着に及ぼす Wnt3a の効果. (A) アリザリンレッド染色像. a : Wnt3a (200 ng/ml) 非添加維持培地群, b : Wnt3a 添加維持培地群. c : Wnt3a 非添加骨分化誘導培地群, d : Wnt3a 添加骨分化誘導培地群. (B) Wnt3a 非添加骨分化誘導培地群と Wnt3a 添加骨誘導培地群をアリザリンレッド染色後, 10% cetylpyridium chloride で色素を抽出し, 550 nm の吸光度を測定した. 棒グラフは平均値と標準偏差を示す (n = 3). 統計学的検定は Student's t-test を行った. * : $p < 0.05$



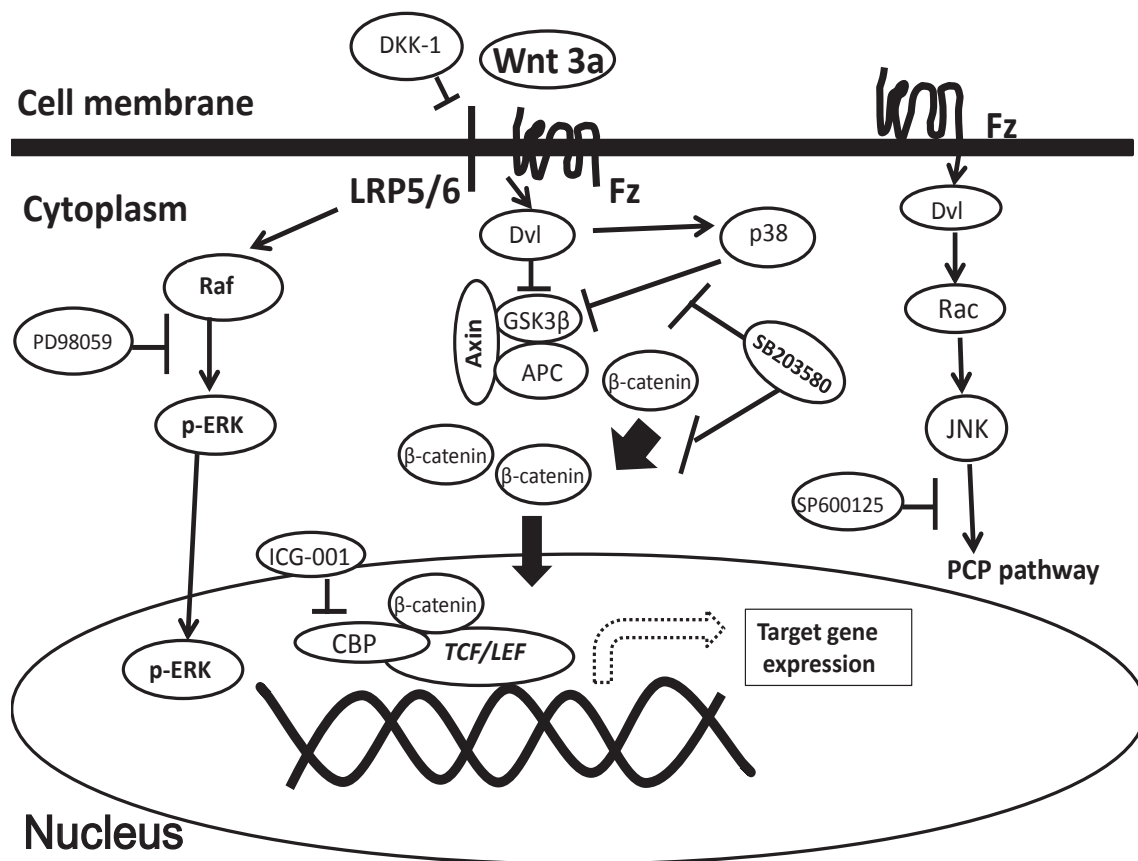


図6 古典的 β -catenin/Wnt 経路および MAPK 経路の模式図。

古典的 β カテニン/Wnt 経路の阻害剤である DKK-1, ICG-001 および MAPK 経路の阻害剤である PD98059, SB203580, SP600125 の作用部位についても示している。

表 1 リアルタイムPCR分析に用いたプライマーの配列

Gene	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	5'-TCAGCAATGCCTCCTGCAC-3'	5'-TCTGGGTGGCAGTGATGGC-3'
CEMP-1	5'-AGAACCTCACCTGCCTCTCC-3'	5'-GATACCCACCTCTGCCTTGA-3'
CAP	5'-CTGCGCGCTGCACATGG-3'	5'-GCGATGTCGTAGAAGGTGAGCC-3'
ALP	5'-TCAGAAGCTAACACCAACG-3'	5'-TTGTACGTCTTGGAGAGGGC-3'
OCN	5'-GCAAAGGTGCAGCCTTTGTG-3'	5'-GGCTCCCAGCCATTGATACAG-3'
DSPP	5'-AGTGACAGCCAGAGCCAAG-3'	5'-CCTATCCCATTACCAAAC-3'
β -catenin	5'-GCTACTGTTGGATTGATTGAAATC-3'	5'-CCCTGCTCACGCAAAGGT-3'
Axin2	5'-CCCCAAAGCAGCGGTGC-3'	5'-GCGTGGACACCTGCCAG-3'
BMP-2	5'-CCGCTGTCTTCTAGCGTTGC-3'	5'-CCTGAAGCTCTGCTGAGGTG-3'
BDNF	5'-GGATGAGGACCAGAAAGT-3'	5'-AGCAGAAAGAGAAGAGGAG-3'

表 2 RT-PCR分析に用いたプライマー配列

Gene	Forward primer	Reverse primer
GAPDH	5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3'	5'-AGGGGAGATTCAGTGTGGTG-3'
p75	5'-CTGGACAGCGTGACGTTCTCC-3'	5'-CTGCCACCGTGCTGGCTATGA-3'
TrkB	5'-CATGTTACCAATCACACGGAGTA-3'	5'-CCATCCAGTGGGATCTTATGAAA-3'
BMPR1a	5'-TTATTCAGCTGCCTGTGGTCTGTGC-3'	5'-GGATTGTGGGCCAGCATTCT-3'
BMPR2	5'-CTGGCCAAACAACCAACATAGT-3'	5'-CGCCACCGCTTAAGAGAATAG-3'