総	説
---	---

口腔再生医学の確立を目指した歯・歯周組織関連細胞の 分化制御の分子機構

根本 英二

東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座歯内歯周治療学分野

Molecular mechanism of differentiation of the tooth and periodontium-related cells :
Approach to oral regenerative medicine

Eiji Nemoto

Department of Periodontology and Endodontology, Tohoku University Graduate School of Dentistry

1. はじめに

2011 年度に行われた歯科疾患実態調査結果によると、30～40 歳代の約 80% が軽度の歯肉炎（プロービング時の出血を指標）に罹患しており、そのうちの約 30% 弱の人に 4 mm 以上の歯周ポケットが存在することが明らかとなった。年齢の上昇とともに罹患率はさらに高くなり、歯周病の進行は歯の喪失だけでなく、全身疾患の引き金になる。歯周病の治療においては原因除去療法である歯周基本治療、およびその後の病変の進行や再発を抑制するための supportive periodontal therapy を含めた予防対策が最も大切なことである。この治療概念は、害的環境を除去することにより創傷部位の治癒を促すという外科的医療の基本理論に則るものであり、そこには自己再生能力に委ねられた

自然治癒という基本前提が存在する。しかしながら、組織破壊の程度が進み不可逆の状態に至った場合には原因除去療法には限界が存在する。ここ数十年間、破壊された歯周組織を再生しようという試みが行われてきた。そして、近年の再生医療の発展に伴い、現在本邦では歯周組織再生療法として「GTR 膜」および「エムドゲイン[®]ゲル」が承認されるに至っている。

2. 歯周病と再生医学

細胞の再生能力を引き出しながら臓器・組織を再生させる組織工学（tissue engineering）は 1990 年代に米国の Joseph Vacanti と Robert Lange らにより、①細胞、②シグナルおよび③スキャフォールドという 3 つの要素により再生できると提唱¹⁾されてから四半世紀がたち、広く認知されるようになった。歯・歯周組

連絡先：根本英二

〒980-8575 仙台市青葉区星陵町 4 丁目 1 番

東北大学大学院歯学研究科口腔生物学講座歯内歯周治療学分野

Eiji Nemoto

4-1, Seiryō-machi, Aoba-ku, Sendai 980-8575, Japan

Department of Periodontology and Endodontology, Tohoku University Graduate School of Dentistry

E-mail : e-nemoto@dent.tohoku.ac.jp

組織の再生医学においても、歯根膜組織には骨芽細胞、セメント芽細胞、線維芽細胞および血管内皮細胞などへの分化能を有する未分化間葉系細胞が存在することが明らかとされ²⁾、また歯髓組織に存在する未分化間葉系細胞は象牙芽細胞への分化能をはじめとして多分化能を有することが明らかにされた³⁾。歯周組織の再生においては、特に歯槽骨やセメント質の再生誘導は現在の歯周治療学において重要課題であり、骨芽細胞やセメント芽細胞の分化制御の分子メカニズムの解明を目指した研究が国内外で活発に進められている。一方、歯・歯周組織は他の生体臓器・組織とは異なり、機械的および化学的刺激に常に晒され、また外界と接していることから細菌感染など数多くの環境因子が存在している。従って、機能的な歯・歯周組織再生誘導法を確立するためには、これら再生医学の3つの要素に加えて、さらに口腔特異的な環境因子との相互作用を含めた包括的なアプローチが必要であると考えられる(図1)。

3. 細胞を活性化させるシグナル機能を付与した多機能リン酸カルシウム系生体材料を目指して

現在、代表的なスキャフォールドの1つとして骨組織に対して高い生体適合性と骨伝導性を有するリン酸カルシウム系セラミックスが骨補填材として臨床応用されている。ハイドロキシアパタイト(hydroxyapatite; HA)リン酸三カルシウム(β -tricalcium phosphate; β -TCP)およびリン酸オクタカルシウム(octacalcium phosphate; OCP)などのリン酸カルシウム系セラミックスは歯周組織再生療法や骨組織再生療法において幹細胞に足場を提供するスキャフォールドとして用いられているが、さらに多機能性の付与を目指して、多孔性(porosity)、表面性状(surface chemistry)および表面形状(surface topography)などの研究開発が進められている。リン酸カルシウム系セラミックスは、生体内においては周囲の微小環境にカルシウムイオンとリン酸イオンを溶出する(溶出度: OCP>TCP>HA)。近年、細胞外カルシウム⁴⁾および細胞外リン酸⁵⁾は1次メッセンジャーシグナル分子として機能することが明らかとなり、骨芽細胞⁶⁻¹¹⁾を始めとして本稿で紹介する歯・歯周組織関連細胞¹²⁻¹⁵⁾などさまざまな細胞に対して組織再生誘導に有利な反応を引き出すことが明らかとなってきた。これらの細胞が有する細胞外カルシウム感知システムやその反応の分子メカニズムに関する全貌はまだ明らかにされていないが、セラミックスの溶解性を材料工学的に制御す

図1 組織工学の3要素と環境因子

①シグナル(増殖因子): アメロジェニンを主成分としたエムドゲイン[®]ゲルが承認されている。また、本邦では現在、塩基性線維芽細胞増殖因子を用いた歯周組織再生療法が臨床治験第Ⅲ相まで進行している。米国では血小板由来成長因子 PDGF-BB (GEM21S[®])が臨床応用されている。②細胞⁵⁷⁾: 歯根膜に内在する歯周組織幹細胞を幹細胞源としたアプローチが中心である。幹細胞移植を目指した研究報告では、骨髄由来間葉系幹細胞や脂肪組織由来間葉系幹細胞を骨欠損部へ移植することにより歯周組織の再生を誘導する。最近、ラット歯周組織欠損部に対して induced pluripotent stem cells (iPS 細胞)の移植による歯周組織再生誘導の報告⁵⁸⁾がある。③スキャフォールド⁵⁷⁾: 天然・合成高分子化合物、リン酸カルシウム系セラミックス、およびハイドロゲルなど開発が進んでいる。スペースメーカー能力を有しかつ適度の賦形性と骨伝導性を有するスキャフォールド、特に水平性の歯周組織破壊を伴う重度の症例に応用できるスキャフォールドの開発が喫緊の課題である。④歯周組織に特異的な環境因子である咬合(メカニカル)や細菌感染: メカニカルストレスは歯根膜細胞に対して骨形成性あるいは骨吸収性の表現型を誘導する⁵⁹⁾。細菌感染による炎症シグナルは RANKL (receptor activator of nuclear factor- κ B ligand) の発現を誘導⁶⁰⁾したり、好中球から分泌されるエラスターゼは PDGF 受容体を特異的分解したりする⁶¹⁾。再生が阻害される反応の可及的制御が課題である。

ることで細胞機能に帰着した多機能性生体材料の開発につながるものと考えられる。本稿の第1部では、細胞外カルシウムがもつ歯周組織再生誘導能のポテンシャルについて我々の研究を概説する(図2右側)。一方、リン酸カルシウム系セラミックスはナノサイズ化することにより、比表面積効果により種々の機能的転換が生じる。それらの転換の多くは組織再生誘導能の獲得につながる事が報告されている。本稿の第2部では、ナノサイズハイドロキシアパタイトがもつ歯周

図2 細胞を活性化させるシグナル機能を付与した多機能リン酸カルシウム系生体材料を目指して。

組織再生誘導能のポテンシャルについて我々の研究を概説する(図2中央)。近年、リン酸カルシウム系セラミックスは無機イオンを溶出することを利用して、骨再生に対して促進的な作用を有する無機イオンをリン酸カルシウム系セラミックスに組み込み、再生反応を促進させようとする試みがなされている。これまでにストロンチウム、ケイ素、マグネシウムおよびリチウムなどの無機イオン¹⁶⁻¹⁸⁾が骨形成調節機能を有することが明らかにされている。本稿の第3部では、リチウムイオンがもつ歯周組織再生誘導能のポテンシャルについて我々の研究を概説する(図2左側)。

4. 【第1部】細胞外カルシウム(Ca^{2+})がもつ歯周組織再生誘導能のポテンシャル

血中における細胞外 Ca^{2+} は約1 mmol/Lという狭い範囲の濃度で厳密に制御されている。しかし、骨の微小環境においては、骨のリモデリングに伴って生じる破骨細胞による骨吸収過程の結果として、細胞外に Ca^{2+} が高濃度(8~40 mmol/L)で存在する¹⁹⁾。1993年に Ca^{2+} 感知受容体(calcium sensing receptor; CaSR)が副甲状腺から初めてクローニングされ⁴⁾、生体内 Ca^{2+} の恒常性維持の本体であることが証明された。骨芽細胞においても細胞走化性、細胞増殖および細胞分化に対する機能調節に関与しているとの報告がある⁶⁻⁸⁾。しかし一方で、CaSRノックアウトマウスから得られた細胞においても細胞外 Ca^{2+} に対する反応が認められることから、骨芽細胞にはCaSR以外の細胞外 Ca^{2+} 感知機構が存在するものと考えられている⁹⁻¹¹⁾。セメント質や象牙質では、リモデリングは非常に限られているためこれら硬組織での生理学的な吸収プロセスはまれである。しかしながら、セメント芽細胞は歯根膜組織を介して骨組織に近接していることから、生理的にも病理的にも細胞外 Ca^{2+} 濃度が大き

く変動し得る環境に晒されているものと考えられる。また、歯髓組織の前象牙質周囲の細胞外 Ca^{2+} 濃度は50 mmol/Lにも高まることが報告されている²⁰⁾。我々はセメント芽細胞に細胞外 Ca^{2+} の感知機構が存在するかを調べるために、不死化マウスセメント芽細胞(OCCM-30)を用いて10 mmol/L CaCl_2 を6時間セメント芽細胞に作用させたところ塩基性線維芽細胞成長因子(*Fgf-2*)の遺伝子発現が亢進することを見出した¹²⁾。この反応はプロテインキナーゼA(PKA)シグナル依存的であった。さらに細胞内のサイクリックAMP(cAMP)レベルの上昇作用をもつForskolinを用いてPKAのシグナルを増強させることにより*Fgf-2*の発現がさらに亢進された。細胞外 Ca^{2+} で刺激を行うと、Cyclooxygenase(*Cox*)-2遺伝子→プロスタグランジン E_2 (PGE_2)→*Fgf-2*遺伝子の発現が時間的推移をもって誘導された¹³⁾(図3)。そこで、*Fgf-2*遺伝子の発現に*Cox-2*/ PGE_2 経路が関与しているか検討したところ、*Cox-2*酵素活性阻害剤(NS589)の添加により*Fgf-2*の発現誘導が抑制されたこと、その抑制は外因的 PGE_2 を加えることにより解除されたことから、細胞外 Ca^{2+} による*Fgf-2*の発現には、*Cox-2*の誘導が関与していることが明らかとなった¹³⁾。同細胞は PGE_2 受容体であるEP-1、-2、-3、および-4を発現しているが、各受容体特異的なアゴニストおよびアンタゴニスト(小野薬品工業より供与)を用いた実験によりEP-4が関与していることがわかった¹³⁾。細胞外 Ca^{2+} による*Cox-2*、EP-4、および*Fgf-2*の発現誘導は全てNF- κ B阻害剤であるBMS-345541で抑制されたことから、これら分子の発現はNF- κ Bシグナルによって制御されていることがわかった。以上、図4のようにまとめることができるが、細胞外 Ca^{2+} 非存在下では、EP-4特異的アゴニスト刺激のみで*Fgf-2*の発現を誘導することはできなかったことから図4の太線で示したシグナル経路の存在が*Fgf-2*の誘導には必須であり、COX-2/ PGE_2 /EP-4経路は正の調節因子として働いていることが示唆された¹³⁾。次に、セメント芽細胞は細胞外 Ca^{2+} からのシグナルをどのようなシステムで感知しているのか検討した。現在最も解析が進んでいるCaSRは、細胞内cAMP合成酵素であるアデニル酸シクラーゼを抑制するGiサブユニットとホスホリパーゼC(Phospholipase C; PLC)を刺激するGqサブユニットに共役したG蛋白質共役受容体である²¹⁾。しかし、細胞外 Ca^{2+} による*Fgf-2*発現誘導のシグナルはPKAの活性化を必要とすることから、CaSRを介したシグナルとは明らかに異なる。さらに、セメント芽細胞OCCM-30にはCaSRの遺伝子発現は検出されず、CaSR特異的アゴニストである

図3 細胞外カルシウムによる *Fgf-2* 遺伝子, *Cox-2* 遺伝子および PGE₂ の発現誘導^{12,13)}。

マウスセメント芽細胞を 10 mmol/L CaCl₂ で刺激し、遺伝子発現と PGE₂ 産生をそれぞれリアルタイム PCR 法および ELISA 法で解析した。

NPS-R568 (協和発酵キリンより供与) を用いても *Fgf-2* の発現には影響を与えなかった¹²⁾ ことから、*Fgf-2* の亢進に CaSR の関与はないものと思われる。セメント芽細胞における感知機構は、CaSR と同様に Ca²⁺ 以外にもストロンチウム、ガドリニウムおよびアルミニウムなどの無機陽イオンに対しても反応した¹²⁾ ことから分子構造的には CaSR と類似していることが推測される。これまでの in vitro 実験の研究報告において、細胞外 Ca²⁺ は骨芽細胞やセメント芽細胞以外にもマクロファージ²²⁾ や骨髄由来間葉系幹細胞²³⁾ など種々の細胞に対して骨形成の正の方向に影響を与えることが報告されている。そこで、ヒト歯根膜由来細胞およびヒト歯髄由来細胞に対して同様に検討を加えてみたところ、骨形成蛋白 (Bone morpho-

図4 細胞外カルシウムによる *Fgf-2* 発現誘導のメカニズム¹³⁾

細胞外カルシウムは NF-κB シグナルを活性化し、*Cox-2* および *Ep-4* の発現を誘導する。それにより PGE₂/EP-4 シグナルが活性化し、*Fgf-2* の発現レベルが増強される。太線のシグナル経路は NF-κB シグナル依存性であり、de novo 蛋白合成が介在する。

genetic protein-2; BMP-2) 遺伝子の発現誘導が認められた¹⁴⁾ (図5)。しかし、ヒト歯肉線維芽細胞ではその発現誘導のレベルは極めて低かった。同細胞はヒト歯根膜細胞やヒト歯髄細胞とは異なり、硬組織形成のポテンシャルを有さないことが知られていることから、それらの違いが BMP-2 発現誘導能に反映されたと思われる。歯周組織は4つの複合組織 (骨、セメント質、歯根膜および歯肉) であることから本メカニズムを将来臨床的応用する上で各組織における反応性の相違を理解することは重要であろう。これらの細胞にはどれも CaSR の遺伝子発現は検出されず、またマウスセメント芽細胞同様にストロンチウムなどの無機陽イオンに対して BMP-2 の発現誘導能を示した¹⁴⁾ ことから、これらの受容体はマウスセメント芽細胞の感知システムと類似した分子構造を有するものと推測される。

5. 【第2部】ナノハイドロキシアパタイトがもつ歯周組織再生誘導能のポテンシャル

HA は高い生体適合性と骨伝導性を有するため骨組

図5 ヒト歯・歯周組織関連細胞に対する細胞外カルシウムの影響¹⁴⁾

ヒト歯髓由来細胞 (hDP cells), ヒト歯根膜由来細胞 (hPDL cells) およびヒト歯肉線維芽細胞 (hGF) に対して 10 mmol/L CaCl_2 で 6 時間刺激を行い, BMP-2 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法で解析した。

組織置換材料として広く使用されているが, 生体内で吸収されずに自家骨に置換されない。しかし, 粒径をナノオーダーまで小さくしたナノサイズ HA (nano-HA) は, 体内で吸収され骨置換性を獲得する²⁴⁾。また, 薬物の徐放能を有する治療物質として, 加えては遺伝子デリバリーシステムとしての有用な生体材料であることが示されている。さらに, DNA の損傷や突然変異を誘導しやすいと言われる多くのナノ金属粒子とは異なり, nano-HA は安全な生体ナノ材料と分類されている。最近の研究では, nano-HA がヒト歯根膜線維芽細胞 (hPDL 細胞) の細胞接着能や増殖能を亢進することが報告されている²⁵⁾。我々は hPDL 細胞に対して nano-HA (粒径 < 200 nm, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下で 3 日間培養を行ったところ, BMP-2 の発現が遺伝子および蛋白レベルで誘導されることを明らかにした²⁶⁾ (図 6A と B)。これまでに, nano-HA はエンドサイトーシスを介して細胞内に取り込まれ²⁷⁾, リソソーム内で溶解されて細胞質中でカルシウムバーストを引き起こす²⁸⁾ことが報告されている。同細胞は細胞外 Ca^{2+} および細胞外リン酸濃度の上昇に対しても BMP-2 発現が誘導される (図 6C)。しかしながら, nano-HA を添加し, 72 時間共培養しても上清中の Ca^{2+} とリン酸濃度は変化しなかった。このことから, BMP-2 発現メカニズムとして nano-HA が細胞外に Ca^{2+} またはリン酸を放出する可能性は低く, nano-HA が粒子として細胞に対して作用していると考えられる。このことは, ナノサイズ金粒子が間葉系幹細胞との相互作用によって細胞内に取り込まれていることにより BMP-2 遺伝子の発現が誘導される²⁹⁾という報告からも支持される。nano-HA に

図6 ヒト PDL 細胞に対する nano-HA, Ca^{2+} (CaCl_2) およびリン酸 (Pi; $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) の影響²⁶⁾

BMP-2 遺伝子発現 (A と C) はリアルタイム PCR 法で, BMP-2 蛋白発現 (B) は免疫蛍光染色法 (青色は核を示す) で解析した。

よる BMP-2 発現誘導は, p38 の阻害剤である SB203580 の処理群において濃度依存的に抑制されたが, Extracellular signal-regulated protein kinases 1/2 (ERK1/2) の阻害剤である PD98059 処理群ではその抑制は見られなかった。エナメルマトリックス蛋白を主成分とするエムドゲイン®は同細胞に作用して BMP-2 の発現を誘導することが報告されている³⁰⁾が, その誘導には p38 シグナル経路は関与せず ERK1/2 依存的な反応であることから, nano-HA はエムドゲイン®とは異なったメカニズムで BMP-2 を誘導していると考えられる。

図7 古典的 Wnt シグナルとその構成分子

6. 【第3部】無機イオンと骨代謝：リチウムイオンが持つ歯周組織再生誘導能のポテンシャル

ストロンチウム、マグネシウム、ケイ素、亜鉛およびリチウムなどの無機イオンを組込んだリン酸カルシウム系セラミックスの研究開発の試みが行われている¹⁶⁻¹⁸⁾。リチウムイオン (Li^+) は末梢神経の再ミエリン化作用を有すると考えられ、過去 50 年間、双極性障害やうつ病に対する精神安定薬として用いられてきた³¹⁾。近年、 Li^+ は glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β) 活性を抑制することにより (図 7)、骨代謝調節に大きく関与する古典的 Wnt シグナルを活性化することが知られている³²⁾。Wnt は 19 種類の分泌型糖タンパクのファミリーで、細胞増殖、分化あるいはアポトーシスなどを調整することにより初期発生や成体組織の機能維持に至るさまざまな局面に対して機能する分子である³³⁾。古典的 Wnt シグナルである β -catenin 経路において、Wnt は細胞表面上の Frizzled 受容体と低比重リポタンパク様受容体 (low-density lipoprotein receptor related receptors; LRP5/6) の複合体に結合し、その結果 GSK-3 β が抑制される。 β -catenin は GSK-3 β の基質の一つであり、転写因子である T-cell factor (TCF) や lymphoid enhancer factor (LEF) のアクチベーターとして作用する。Wnt シグナル非存在下では β -catenin は axin, adenomatous polyposis coli (APC) および GSK-3 β と細胞質内で複合体を形成し、GSK-3 β は β -catenin をリン酸化することによりユビキチン化と分解に導く。Wnt がその受容体に結合することにより GSK-3 β の抑制により β -catenin の細胞質内の蓄積、核内への移行が誘

導され、転写因子 TCF/LEF に作用し、Wnt の標的遺伝子の活性化を行う。古典的 Wnt シグナルは主に骨の増生に関与していることが知られている³⁴⁾。LRP5 の機能阻害は骨量減少による骨折を主徴とする偽神経膠症候群様の症状を引き起し³⁵⁾、LRP5 の機能亢進は高骨密度を呈する³⁶⁾。歯の発生過程において、古典的 Wnt シグナルは歯の形態形成の様々な段階で作用している³⁷⁾。LEF1 遺伝子のノックアウトあるいは Wnt アンタゴニストである Dickkopf-1 の過剰発現させることで Wnt シグナルを抑制すると蕾状期後半で歯の形態形成が停止することや^{38,39)}、 β -catenin を構成的に発現させた口腔上皮細胞を腎皮膜下に移植すると複数の歯を形成させる⁴⁰⁾。これらの知見を考えると、Wnt シグナルの活性化は歯周組織再生において促進的に作用する可能性が示唆される。我々は Li^+ および古典的 Wnt シグナルのリガンドである Wnt3a を用いて、セメント芽細胞 (OCCM-30) の分化に与える Wnt シグナルの役割を検討した⁴¹⁾。セメント芽細胞を Li^+ で刺激を行うと細胞質に局在している β -catenin が核内に移行するとともに β -catenin 依存性 TCF/LEF 転写活性が亢進し⁴¹⁾、セメント芽細胞において古典的 Wnt シグナルは機能的に作動していることがわかった。 Li^+ 存在下で同細胞を in vitro で分化を誘導すると、アルカリフォスファターゼ (ALP) およびオステオカルシン (OCN) の遺伝子発現の誘導が抑制される (図 8) ことから、Wnt シグナルはセメント芽細胞の分化に対して抑制的に作用していた。また、転写因子 Runx2 やその下流で機能する転写因子 Osterix の発現誘導も強く抑制されていたことから Wnt シグナルがこれらの転写制御因子の発現抑制を介して細胞の分化を抑制していることが示唆された。一方、転写因子 LEF-1 の発現は亢進した。LEF-1 とセメント芽細胞の分化との関連を示す報告はないが、LEF-1 は Runx2 依存性の OCN プロモーター活性を阻害する⁴²⁾ ことから、Wnt シグナルによる分化抑制に関与しているものと思われる。細胞周期調節する転写因子である Cyclin D1 の発現は Wnt3a 刺激により一過性の強い誘導とともに、細胞の増殖能も亢進していた (図 8)。古典的 Wnt シグナルはマウス多能性間葉系細胞株である C3H10T1/2、C2C12 あるいはマウス前骨芽細胞株である MC3T3-E1 において ALP 遺伝子や Runx2 遺伝子を誘導することからも骨芽細胞系の分化に対してポジティブに作用する^{43,44)}。一方、ヒト間葉系細胞^{45,46)} や C3H10T1/2⁴⁶⁾ においてデキサメタソンで誘導される石灰化ノデュールの形成は Wnt3a あるいは Li^+ で抑制される。また、C2C12 と MC3T3-E1 において、BMP-2 で誘導される Runx2, Osterix, ALP ある

図8 古典的 Wnt シグナルによるマウスセメント芽細胞の分化抑制⁴¹⁾

細胞を LiCl あるいはレコンビナント Wnt3a (Wnt3a-CM) 存在下で培養した。遺伝子発現はリアルタイム PCR 法で、細胞増殖能は細胞数計測によりで解析した。

いは OCN などの遺伝子発現は Li^+ によって抑制される⁴⁸⁾。これら作用の違いは、細胞の種類や分化段階に依存して Wnt 標的遺伝子の転写における遺伝子特異的アクチベーターやレプレッサーが異なることに起因している可能性が考えられる⁴⁹⁾。歯小囊細胞は BMP-2 で刺激することによりセメント芽細胞様の細胞に分化することが報告されている⁵⁰⁾。ラット歯小囊細胞を Li^+ で刺激すると本研究で示した反応とは逆の反応、すなわち ALP, OCN および Runx2 の発現が亢進することが報告されている⁵¹⁾。またヒト歯根膜由来細胞に対しても Li^+ は Runx2 や Osterix 等の発現を亢進されることが報告されている⁵²⁾。我々もマウス歯小囊細胞 (SVF4) を用いて Li^+ あるいは Wnt3a で刺激を行ったところ、ALP 遺伝子および活性の誘導を確認している (未発表)。このことから、セメント芽細胞はその分化度によって古典的 Wnt シグナルに対する反応性が異なると考えられる。最近の報告では、BMP-2 による歯小囊細胞 (SVF4) の分化誘導には、古典的 Wnt シグナルの活性化が必須ではあるものの同誘導系に外来的 (exogenously) に Wnt3a を添加すると細胞分化は抑制される⁵³⁾。このことは BMP-2 シグナルによる分化誘導では、古典的 Wnt シグナルの活性化の程度が厳密に制御されていることを示唆している。図 9 に示すように、Cementogenesis

図9 Cementogenesis における古典的 Wnt シグナルの作用

古典的 Wnt シグナルは分化度の低い歯小囊細胞に対しては分化促進に作用する。一方、分化度の高いセメント芽細胞に対しては分化誘導を抑制し、細胞増殖能を促進する。

において古典的 Wnt シグナルは細胞の分化段階に依存した作用をもつと考えられる。このことは歯牙萌出後の歯根膜組織を想定した場合、古典的 Wnt シグナルは歯根膜に存在する未分化間葉系細胞に対して前セメント芽細胞レベルまでの分化を誘導し、同細胞の増殖能を亢進させる作用をもつことが示唆され、セメント質の再生においては非常に有利に作用するものと期待できる。

7. おわりに

再生組織の 3 次元組織においては、細胞の増殖、生理活性物質の産生および細胞外マトリックスの分泌などによって分化制御シグナルスイッチのオン・オフが切り換えられ、また組織内部の応力状態が時空間的に変化している。組織発生や創傷治癒の分子メカニズムの研究の進展によって再生誘導のポテンシャルをもつシグナル経路の解明が進み、現在、いくつかの生理活性物質が歯周組織再生医療に应用されている (図 1)。一方で、マトリックスの弾力性⁵⁴⁾、細胞接着面の topology (表面性状)⁵⁵⁾、単層状細胞における張力⁵⁶⁾など、スキャフォールドの材料力学的な性質や細胞内の張力バランスなどによっても、幹細胞の分化が大きく制御されていることも知られている。このように生体材料は幹細胞の足場としての役割に加えて、分化・増殖シグナルの制御に果たす役割は今後益々期待されるものと思われる。

謝 辞

稿を終えるにあたり、本研究を遂行するにあたり終始、最先端の研究環境を提供してくださいました島内 英俊教授に厚くお礼申し上げます。また、本研究を支援していただきました本学歯学研究科、学外ならびに国外の多くの研究者に厚くお礼申し上げます。

本論文の要旨は第 55 回春季日本歯周病学会学術大会 (2012 年 5 月 18 日札幌) において発表した。

文 献

- 1) Langer R, Vacanti JP : Tissue engineering. *Science*, 260 : 920-926, 1993.
- 2) Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahimi J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S : Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 364 : 149-155, 2004.
- 3) Gronthos S, Mankani M, Brahimi J, Robey PG, Shi S : Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97 : 13625-13630, 2000.
- 4) Brown EM, Gamba G, Riccardi D, Lombardi M, Butters R, Kifor O, Sun A, Hediger MA, Lytton J, Hebert SC : Cloning and characterization of an extracellular Ca^{2+} -sensing receptor from bovine parathyroid. *Nature*, 366 : 575-580, 1993.
- 5) Beck Jr GR, Zerler B, Moran E : Phosphate is a specific signal for induction of osteopontin gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97 : 8352-8357, 2000.
- 6) Yamauchi M, Yamaguchi T, Kaji H, Sugimoto T, Chihara K : Involvement of calcium sensing receptor in osteoblastic differentiation of mouse MC3T3-E1 cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 288 : E608-616, 2005.
- 7) Yamaguchi T, Chattopadhyay N, Kifor O, Butters Jr RR, Sugimoto T, Brown EM : Mouse osteoblastic cell line (MC3T3-E1) expresses extracellular calcium (Ca^{2+})-sensing receptor and its agonists stimulate chemotaxis and proliferation of MC3T3-E1 cells. *J Bone Miner Res*, 13 : 1530-1538, 1998.
- 8) Dvorak MM, Siddiqua A, Ward DT, Carter DH, Dallas SL, Nemeth EF, Riccardi D : Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101 : 5140-5145, 2004.
- 9) Quarles LD, Hartle 2nd JE, Siddhanti SR, Guo R, Hinson TK : A distinct cation sensing mechanism in MC3T3-E1 osteoblasts functionally related to the calcium receptor. *J Bone Miner Res*, 12 : 393-402, 1997.
- 10) Pi M, Garner SC, Flannery P, Spurney RF, Quarles LD : Sensing of extracellular cations in CasR-deficient osteoblasts. Evidence for a novel cation-sensing mechanism. *J Biol Chem*, 275 : 3256-3263, 2000.
- 11) Pi M, Faber P, Ekema G, Jackson PD, Ting A, Wang N, Fontilla-Poole M, Mays RW, Brunden KR, Harrington JJ, Quarles LD : Identification of a novel extracellular cation-sensing G-protein-coupled receptor. *J Biol Chem*, 280 : 40201-40209, 2005.
- 12) Kanaya S, Nemoto E, Ebe Y, Somerman MJ, Shimauchi H : Elevated extracellular calcium increases fibroblast growth factor-2 gene and protein expression levels via a cAMP/PKA dependent pathway in cementoblasts. *Bone*, 47 : 564-572, 2010.
- 13) Kanaya S, Nemoto E, Sakisaka Y, Shimauchi H : Calcium-mediated increased expression of fibroblast growth factor-2 acts through NF- κ B and PGE₂/EP4 receptor signaling pathways in cementoblasts. *Bone*, in press, 2013.
- 14) Tada H, Nemoto E, Kanaya S, Hamaji N, Sato H, Shimauchi H : Elevated extracellular calcium increases expression of bone morphogenetic protein-2 gene via a calcium channel and ERK pathway in human dental pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 394 : 1093-1097, 2010.
- 15) Tada H, Nemoto E, Foster BL, Somerman MJ, Shimauchi H : Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells. *Bone*, 48 : 1409-1416, 2011.
- 16) Yamada Y, Ito A, Kojima H, Sakane M, Miyakawa S, Uemura T, LeGeros RZ : Inhibitory effect of Zn^{2+} in zinc-containing beta-tricalcium phosphate on resorbing activity of mature osteoclasts. *J Biomed Mater Res A*, 84 : 344-352, 2008.
- 17) Bose S, Tarafder S, Banerjee SS, Davies NM, Bandyopadhyay A : Understanding in vivo response and mechanical property variation in MgO, SrO and SiO₂ doped β -TCP. *Bone*, 48 : 1282-1290, 2011.
- 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) Silver IA, Murrills RJ, Etherington DJ : Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts. *Exp Cell Res*, 175 : 266-276, 1988.
- 20) Nicholson WA, Ashton BA, Höhling HJ, Quint P, Schreiber J, Ashton IK, Boyde A : Electron microprobe 400 investigations into the process of hard tissue formation. *Cell Tissue Res*, 177 : 331-345, 1977.
- 21) Hofer AM, Brown EM : Extracellular calcium

- sensing and signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 4 : 530-538, 2003.
- 22) Honda Y, Anada T, Kamakura S, Nakamura M, Sugawara S, Suzuki O : Elevated extracellular calcium stimulates secretion of bone morphogenetic protein 2 by a macrophage cell line. *Biochem Biophys Res Commun*, 345 : 1155-1160, 2006.
- 23) Barradas AM, Fernandes HA, Groen N, Chai YC, Schrooten J, van de Peppel J, van Leeuwen JP, van Blitterswijk CA, de Boer J : A calcium-induced signaling cascade leading to osteogenic differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stromal cells. *Biomaterials*, 33 : 3205-3215, 2012.
- 24) Uskoković V, Uskoković DP : Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates : chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 96 : 152-191, 2011.
- 25) Kasaj A, Willershausen B, Junker R, Stratul SI, Schmidt M : Human periodontal ligament fibroblasts stimulated by nanocrystalline hydroxyapatite paste or enamel matrix derivative. An in vitro assessment of PDL attachment, migration, and proliferation. *Clin Oral Investig*, 16 : 745-754, 2012.
- 26) Suto M, Nemoto E, Kanaya S, Suzuki R, Tsuchiya M, Shimauchi H : Nanohydroxyapatite increases BMP-2 expression via a p38 MAP kinase dependent pathway in periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol*, 58 : 1021-1028, 2013.
- 27) Sage AP, Lu J, Tintut Y, Demer LL : Hyperphosphatemia-induced nanocrystals upregulate the expression of bone morphogenetic protein-2 and osteopontin genes in mouse smooth muscle cells in vitro. *Kidney Int*, 79 : 414-422, 2011.
- 28) Ewence AE, Bootman M, Roderick HL, Skepper JN, McCarthy G, Epple M, Neumann M, Shanahan CM, Proudfoot D : Calcium phosphate crystals induce cell death in human vascular smooth muscle cells : a potential mechanism in atherosclerotic plaque destabilization. *Circ Res*, 103 : e28-34, 2008.
- 29) Yi C, Liu D, Fong CC, Zhang J, Yang M : Gold nanoparticles promote osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells through p38 MAPK pathway. *ACS Nano*, 4 : 6439-6448, 2010.
- 30) Nokhbehsaim M, Deschner B, Winter J, Bourauel C, Rath B, Jäger A, Jepsen S, Deschner J : Interactions of regenerative, inflammatory and biomechanical signals on bone morphogenetic protein-2 in periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*, 46 : 374-381, 2011.
- 31) Makoukji J, Belle M, Meffre D, Stassart R, Grenier J, Shackelford G, Fledrich R, Fonte C, Branchu J, Goulard M, de Waele C, Charbonnier F, Sereda MW, Baulieu EE, Schumacher M, Bernard S, Massaad C : Lithium enhances remyelination of peripheral nerves. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109 : 3973-3978, 2012.
- 32) Hedgepeth CM, Conrad LJ, Zhang J, Huang HC, Lee VM, Klein PS : Activation of the Wnt signaling pathway : a molecular mechanism for lithium action. *Dev Biol*, 185 : 82-91, 1997.
- 33) Logan CY, Nusse R : The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 20 : 781-810, 2004.
- 34) Tamura M, Nemoto E, Sato MM, Nakashima A, Shimauchi H : Role of the Wnt signaling pathway in bone and tooth. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2 : 1405-1413, 2010.
- 35) Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Jüppner H, Kim CA, Keppeler-Noreuil K, Kohlschütter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Lettboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML; Osteoporosis-Pseudoglioma Syndrome Collaborative Group : LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell*, 107 : 513-523, 2001.
- 36) Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP : High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N Engl J Med*, 346 : 1513-1521, 2002.
- 37) Liu F, Chu EY, Watt B, Zhang Y, Gallant NM, Andl T, Yang SH, Lu MM, Piccolo S, Schmidt-Ullrich R, Taketo MM, Morrissey EE, Atit R, Dlugosz AA, Millar SE : Wnt/beta-catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis. *Dev Biol*, 313 : 210-224, 2008.
- 38) van Genderen C, Okamura RM, Fariñas I, Quo RG, Parslow TG, Bruhn L, Grosschedl R : Development of several organs that require inductive epithelial-mesenchymal interactions is impaired in LEF-1-deficient mice. *Genes Dev*, 8 : 2691-2703, 1994.

- 39) Andl T, Reddy ST, Gaddapara T, Millar SE : WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Dev Cell*, 2 : 643–653, 2002.
- 40) Jarvinen E, Salazar-Ciudad I, Birchmeier W, Taketo MM, Jernvall J, Thesleff I : Continuous tooth generation in mouse is induced by activated epithelial Wnt/beta-catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103 : 18627–18632, 2006.
- 41) 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.
- 42) Kahler RA, Westendorf JJ : Lymphoid enhancer factor-1 and beta-catenin inhibit Runx2-dependent transcriptional activation of the osteocalcin promoter. *J Biol Chem*, 278 : 11937–11944, 2003.
- 43) Gaur T, Lengner CJ, Hovhannisyan H, Bhat RA, Bodine PV, Komm BS, Javed A, van Wijnen AJ, Stein JL, Stein GS, Lian JB : Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J Biol Chem*, 280 : 33132–33140, 2005.
- 44) Rawadi G, Vayssiere B, Dunn F, Baron R, Roman-Roman S : BMP-2 controls alkaline phosphatase expression and osteoblast mineralization by a Wnt autocrine loop. *J Bone Miner Res*, 18 : 1842–1853, 2003.
- 45) de Boer J, Siddappa R, Gaspar C, van Apeldoorn A, Fodde R, van Blitterswijk C : Wnt signaling inhibits osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Bone*, 34 : 818–826, 2004.
- 46) Boland GM, Perkins G, Hall DJ, Tuan RS : Wnt 3a promotes proliferation and suppresses osteogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem*, 93 : 1210–1230, 2004.
- 47) van der Horst G, van der Werf SM, Farihi-Sips H, van Bezooijen RL, Lowik CW, Karperien M : Downregulation of Wnt signaling by increased expression of Dickkopf-1 and -2 is a prerequisite for late-stage osteoblast differentiation of KS483 cells. *J Bone Miner Res*, 20 : 1867–1877, 2005.
- 48) Vaes BL, Decherling KJ, van Someren EP, Hendriks JM, van de Ven CJ, Feijen A, Mummery CL, Reinders MJ, Olijve W, van Zoelen EJ, Steegenga WT : Microarray analysis reveals expression regulation of Wnt antagonists in differentiating osteoblasts. *Bone*, 36 : 803–811, 2005.
- 49) Eijken M, Meijer IM, Westbroek I, Koedam M, Chiba H, Uitterlinden AG, Pols HA, van Leeuwen JP : Wnt signaling acts and is regulated in a human osteoblast differentiation dependent manner. *J Cell Biochem*, 104 : 568–579, 2008.
- 50) Zhao M, Xiao G, Berry JE, Franceschi RT, Reddi A, Somerman MJ : Bone morphogenetic protein 2 induces dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype. *J Bone Miner Res*, 17 : 1441–1451, 2002.
- 51) Du Y, Ling J, Wei X, Ning Y, Xie N, Gu H, Yang F : Wnt/ β -catenin signaling participates in cementoblast/osteoblast differentiation of dental follicle cells. *Connect Tissue Res*, 53 : 390–397, 2012.
- 52) Heo JS, Lee SY, Lee JC : Wnt/ β -catenin signaling enhances osteoblastogenic differentiation from human periodontal ligament fibroblasts. *Mol Cells*, 30 : 449–454, 2010.
- 53) Silvério KG, Davidson KC, James RG, Adams AM, Foster BL, Nociti FH Jr, Somerman MJ, Moon RT : Wnt/ β -catenin pathway regulates bone morphogenetic protein (BMP2)-mediated differentiation of dental follicle cells. *J Periodontal Res*, 47 : 309–319, 2012.
- 54) Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE : Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*, 126 : 677–689, 2006.
- 55) Seo CH, Jeong H, Furukawa KS, Suzuki Y, Ushida T : The switching of focal adhesion maturation sites and actin filament activation for MSCs by topography of well-defined micropatterned surfaces. *Biomaterials*, 34 : 1764–1771, 2013.
- 56) Ruiz SA, Chen CS : Emergence of patterned stem cell differentiation within multicellular structures. *Stem Cells*, 26 : 2921–2927, 2008.
- 57) Chen FM, Sun HH, Lu H, Yu Q : Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration. *Biomaterials*, 33 : 6320–6344, 2012.
- 58) Duan X, Tu Q, Zhang J, Ye J, Sommer C, Mostoslavsky G, Kaplan D, Yang P, Chen J : Application of induced pluripotent stem (iPS) cells in periodontal tissue regeneration. *J Cell Physiol*, 226 : 150–157, 2011.
- 59) Pavasant P, Yongchaitrakul T : Role of mechanical stress on the function of periodontal ligament cells. *Periodontol 2000*, 56 : 154–165, 2011.
- 60) Wada N, Maeda H, Yoshimine Y, Akamine A : Lipopolysaccharide stimulates expression of osteoprotegerin and receptor activator of NF- κ B ligand in periodontal ligament fibroblasts through the induction of interleukin-1 beta and tumor necrosis factor- α . *Bone*, 35 : 629–635, 2004.
- 61) Nemoto E, Kanaya S, Minamibuchi M, Shimauchi H : Cleavage of PDGF receptor on periodontal ligament cells by elastase. *J Dent Res*, 84 : 629–633, 2005.