

## 歯根膜組織の恒常性維持におけるWnt5aの機能に関する研究

長谷川, 大学

<https://hdl.handle.net/2324/1500648>

---

出版情報：九州大学, 2014, 博士（歯学）, 課程博士  
バージョン：  
権利関係：やむを得ない事由により本文ファイル非公開（3）

氏 名 : 長谷川 大学

論 文 名 : 歯根膜組織の恒常性維持における Wnt5a の機能に関する研究

区 分 : 甲

## 論 文 内 容 の 要 旨

分泌タンパク質である Wnt ファミリー分子とそのシグナル経路は、細胞増殖・分化、発生過程での組織形成や癌の浸潤・転移などにおいて重要な役割を担っている。Wnt シグナルには  $\beta$  カテニン依存的経路 (Canonical 経路) と  $\beta$  カテニン非依存的経路 (Non-canonical 経路) が存在する。その Non-canonical 経路のリガンドの 1 つである Wnt5a は、様々な組織の発達や細胞機能において重要な役割を果たしていることが知られている。しかしながら、Wnt5a がヒト歯根膜細胞に及ぼす影響については殆ど報告がない。そこで本研究では、歯根膜組織における Wnt5a の局在および機能について解析した。

抗 Wnt5a 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った結果、ラット歯根膜組織全体に陽性反応が認められた。また、半定量的 RT-PCR 法ならびにウエスタンブロット法により、ヒト歯根膜細胞において Wnt5a とそのレセプター (Ror2、Fzd2 および Fzd5) が発現していることが分かった。さらに、10%の伸展刺激を 24 時間負荷したヒト歯根膜細胞において、Wnt5a、Ror2、Fzd2 および Fzd5 の遺伝子発現量が有意に増加し、一方、咬合負荷喪失モデルラットにおいて、咬合機能を喪失させた実験側の歯根膜組織における Wnt5a の発現は、対照側と比較して減弱していた。

次に、Wnt5a 刺激がヒト歯根膜細胞に及ぼす影響について検討した。まず、ヒト歯根膜細胞に Wnt5a 刺激を行った結果、細胞増殖能および遊走能が有意に上昇した。また、歯根膜線維関連遺伝子 (Periostin、Type-1 collagen および Fibrillin-1) の発現量ならびに可溶性コラーゲン産生量、線維性コラーゲン形成量が有意に増加した。しかしながら、Periostin siRNA または TGF $\beta$ 1 中和抗体を用いた阻害実験により、その増加は有意に抑制された。一方で、TGF $\beta$ 1 中和抗体添加によって、Wnt5a による Periostin 発現上昇は抑制されたのに対し、Periostin siRNA を導入しても、Wnt5a によって上昇した TGF $\beta$ 1 発現に影響が認められなかった。これらのことから、Wnt5a はヒト歯根膜細胞において、TGF $\beta$ 1 の発現上昇を介して Periostin の発現を上昇させ、歯根膜線維関連遺伝子発現やコラーゲン産生を促進していることが明らかになった。

さらに、Wnt5a がヒト歯根膜幹細胞の骨芽細胞様分化に及ぼす影響について検討した。多分化能を持つ未分化なヒト不死化歯根膜細胞クローン 2-23 を Wnt5a 含有石灰化誘導培地にて培養すると、非含有群と比較してアリザリンレッド S 陽性反応ならびに骨関連遺伝子 (OPN、BSP、BMP2 および Osterix)

の発現量が有意に減少し、一方で ERK、JNK および AKT のリン酸化が亢進した。定量的 RT-PCR 法により 2-23 細胞において、Wnt5a のレセプターの 1 つである Ror2 の発現が高かったことから、Wnt5a 含有石灰化誘導培地で培養した 2-23 細胞に対し Ror2 siRNA を導入した結果、Wnt5a 刺激によって減少した骨関連遺伝子の発現量が回復し、ERK および JNK のリン酸化が低下した。一方で、阻害剤を用いた JNK のリン酸化の抑制は、Wnt5a 刺激によって減少したアリザリンレッド S 陽性反応ならびに骨関連遺伝子の発現量を回復させたが、ERK のリン酸化を抑制しても影響は認められなかった。これらのことから、Wnt5a は Ror2-JNK シグナル伝達経路を介してヒト歯根膜幹細胞の骨芽細胞様分化を抑制することが明らかになった。

以上の結果より、Wnt5a はヒト歯根膜細胞のコラーゲン線維形成を促進する一方で、骨芽細胞様分化および石灰化を抑制することにより、歯根膜が石灰化することなく線維性結合組織を維持するメカニズムに関与している可能性が示唆された。また、咬合機能の喪失により Wnt5a の発現が低下し、一方で伸展刺激を加えることで発現が上昇したことから、咬合力が常時作用している歯根膜の恒常性維持に Wnt5a が関与している可能性が考えられた。