

学 位 論 文

論文題目 デンティンブリッジ形成過程における古典的
Wnt シグナルの役割

原 弥革力

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座
(主指導教員: 中村 浩彰 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

Title The role of canonical Wnt signal in the formation
process of dentin bridge

Miroku Hara

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine
(Chief Academic Advisor : Professor Hiroaki Nakamura)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

論文題目 デンティンブリッジ形成過程における古典的
Wnt シグナルの役割

原 弥革力

大学院歯学独立研究科 硬組織疾患制御再建学講座
(主指導教員: 中村 浩彰 教授)

松本歯科大学大学院歯学独立研究科博士(歯学)学位申請論文

Title The role of canonical Wnt signal in the formation
process of dentin bridge

Miroku Hara

Department of Hard Tissue Research, Graduate School of Oral Medicine
(Chief Academic Advisor : Professor Hiroaki Nakamura)

The thesis submitted to the Graduate School of Oral Medicine,
Matsumoto Dental University, for the degree Ph.D. (in Dentistry)

【目的】

歯科臨床では齲蝕が歯髄深部に到達すると多くの場合は抜髄処置が施される。しかし、抜髄によって歯髄を失った歯は、破折のリスクが高くなり結果的に歯の寿命は短くなってしまう。したがって、直接覆髄法により象牙質を効率よく修復することができれば、抜髄の適応が減少し歯髄を保存できると考えられる。一方、象牙芽細胞の分化には古典的 Wnt シグナルの重要性が明らかにされ、直接覆髄後のデンティンブリッジ形成にも Wnt シグナルが深く関与していると報告されている。しかしながら、その過程における細胞動態や Wnt リガンドの局在については不明な点も残されている。そこで、マウスの歯に直接覆髄モデルを作製し、デンティンブリッジ形成過程における古典的 Wnt シグナルに関与する因子の局在を免疫組織化学的に解析した。

【方法】

マウスの上顎第一臼歯にラウンドバーにて窩洞形成し、露髄後 MTA セメントにて直接覆髄し、グラスアイオノマーセメントにて封鎖した。処置後 1 日、4 日、7 日、14 日、28 日に上顎骨を摘出し、4%パラホルムアルデヒド溶液にて 24 時間固定後、 μ CT にて硬組織形成の有無を確認した。その後、10%EDTA にて 4℃、2 週間脱灰し、パラフィンに包埋した。厚さ 4 μ m の切片を作製し、Wnt3a, Wnt10a, β -catenin の局在を免疫組織化学的に解析した。また、マクロファージのマーカーとして F4/80, 活性化した象牙芽細胞と修復象牙芽細胞のマーカーとして Osterix の局在を検討した。

【結果】

直接覆髄を行わない未処置歯では髄角部周辺の象牙芽細胞に Wnt3a, Wnt10a の陽性反応はほとんど認められなかった。また、 β -catenin に関しても髄角部周辺の象牙芽細胞の核に陽性反応はほとんど観察されなかった。覆髄後 4 日、7 日では覆髄部周辺の象牙芽細胞と歯髄細胞が Wnt3a, Wnt10a の陽性反応を示すとともに、象牙芽細胞の核と歯髄細胞の核に β -catenin 局在が認められた。覆髄後 14 日では覆髄部周辺に reactionary dentin が形成されており、その表面に配列した象牙芽細胞とその周辺の歯髄細胞は Wnt3a, Wnt10a 陽性反応を示した。また、象牙芽細胞の核とその周辺に存在する歯髄細胞の核に β -catenin 局在が認められた。さらに、露髄部

周辺と歯髄中央部には異物を貪食した大型の F4/80 陽性マクロファージが多数観察され、これらの細胞に Wnt10a 陽性反応が認められた。覆髄後 28 日では覆髄部直下にデンティンブリッジが形成されており、その表面に接した象牙芽細胞と修復象牙芽細胞に Wnt3a, β -catenin, Osterix の陽性反応が観察された。

【考察】

デンティンブリッジに接した象牙芽細胞および修復象牙芽細胞の核に β -catenin と Osterix 陽性反応を認めたことから、これらの細胞で Wnt シグナル伝達が生じ、デンティンブリッジ形成に関与していることが明らかになった。また、覆髄後 4 日、7 日には覆髄部周辺の象牙芽細胞と歯髄細胞に Wnt3a, Wnt10a 発現がみられたことから、象牙芽細胞と歯髄細胞由来の Wnt が直接覆髄後初期における象牙芽細胞活性化と修復象牙芽細胞分化の役割を担うと考えられた。一方、直接覆髄後 14 日では覆髄部周辺と歯髄中央部のマクロファージも Wnt10a を発現していたことから、後期においては象牙芽細胞と歯髄細胞に加え、マクロファージ由来の Wnt10a も修復象牙細胞分化とデンティンブリッジ形成に関与していると示唆された。

緒言

歯髄は齲蝕や咬耗、窩洞形成などの外部刺激を受けると、損傷部位に対応して象牙質を再生する高い治癒能力を持った組織である^{1,2)}。そのため、深在性齲蝕に罹患した歯であっても、直接覆髄法などの歯髄保存療法を用いて、生活歯髄を維持することで、デンティンブリッジ形成による象牙質-歯髄複合体の修復を期待できる。しかしながら、歯科臨床の現場では深在性の齲蝕歯に対して抜髄処置が行われる症例や、覆髄処置が成功せず歯髄壊死を起こす症例があることも事実である。失活歯は破折のリスクが高くなり歯を失うことにつながってしまうため、効率的に象牙質を再生し歯髄を確実に保存する治療法が求められている^{3,4)}。

現在、歯髄保存療法に使用される優れた覆髄材の一つに **Mineral Trioxide Aggregate (MTA)** がある。MTA は硬化後にケイ酸カルシウム水和物 ($3\text{CaO} \cdot 2\text{SiO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) と水酸化カルシウム ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) の結晶が生成され、この MTA 硬化体から持続的にカルシウムイオン (Ca^{2+}) が放出されるため硬組織形成能を示すと考えられている^{5,6)}。さらに、MTA は硬組織形成能の他に良好な封鎖性と高い生体親和性、強アルカリ性による抗菌作用を有しており、覆髄のみならず断髄、穿孔封鎖、逆根管充填など多くの用途で臨床応用されている⁷⁾。

直接覆髄後のデンティンブリッジ形成に関する研究によると、MTA による覆髄処置後、露髄部表層の歯髄には壊死層が形成され、この部位の直下に炎症性細胞の浸潤が起こる。その後、覆髄部周辺と歯髄中央部で活発な細胞増殖が起こり、修復象牙芽細胞の配列にともなって線維性基質の形成が認められる。これに続いて、細管構造を持つ象牙質様基質が覆髄部直下に観察され、経時的に厚みを増しデンティンブリッジが形成される^{8,9)}。これらの結果は、血流によって運ばれてきた間葉系幹細胞や、歯髄組織に存在する歯髄幹細胞が歯髄の損傷部位に遊走し、修復象牙芽細胞に分化して硬組織形成が生じることを示唆している。

Wingless-type MMTV integration site family (Wnt) は分泌型糖タンパク質であり生体の胚発生、器官形成、細胞の増殖と分化を調節するなど、

多くの生体機能制御に関与することが知られており¹⁰⁾, これまで哺乳動物において 19 種類の Wnt 遺伝子が同定されている^{11,12)}. Wnt の結合する受容体には 7 回膜貫通型の Frizzled とその共受容体として機能する 1 回膜貫通型の LRP5/6 があり, これらの下流に Wnt/ β -catenin 経路, Wnt/PCP 経路, Wnt/Ca 経路の少なくとも 3 種類の経路が存在する. Wnt/ β -catenin 経路は古典的 Wnt シグナル経路と呼ばれ, それ以外の経路は非古典的 Wnt シグナル経路と呼ばれる^{13,14)}. これまでの研究では歯胚の発生過程において Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt6, Wnt7b, Wnt10a, Wnt10b が発現していることや^{15,16)}, 象牙芽細胞特異的に Wnt の分泌を阻害すると象牙質形成が低下することが報告されている¹⁷⁾. また, 古典的 Wnt シグナル経路は歯髓細胞から象牙芽細胞への分化に関与しているという報告もあり¹⁸⁾, 歯の形成において Wnt は重要な役割を果たしていると考えられる. さらに, 近年では古典的 Wnt シグナル経路を活性化する塩化リチウム(LiCl)を覆髓材に使用する研究¹⁹⁾や代表的な古典的 Wnt である Wnt3a を直接覆髓に応用する研究が行われている²⁰⁾. これらの報告は歯の発生時と同様に, 象牙質の修復時においても古典的 Wnt シグナル経路が関与していることを示唆している. しかしながら, 直接覆髓後のデンティンブリッジ形成過程において Wnt 発現細胞や古典的 Wnt シグナルが活性化される細胞について局在を詳細に観察した研究は見当たらない.

本研究の目的は, マウス臼歯に MTA による直接覆髓を行い, 歯髓損傷後のデンティンブリッジ形成過程における Wnt 関連分子の局在を免疫組織化学的手法により経時的に観察し, 歯髓細胞から修復象牙芽細胞への分化過程における, 古典的 Wnt シグナル経路の関与を明らかにすることである.

実験材料及び方法

1. 直接覆髓

実験には 6 週齢の雄マウス(C57BL/6J, 日本 SLC, 静岡, 日本)を 60 匹使用した. 直接覆髓を行わない未処置群 10 匹と直接覆髓後 1, 4, 7, 14, 28 日からなる処置群の各 10 匹から試料を採取した. なお, 本実験は松本歯科

大学実験動物運営委員会の承認を得て行った(承認番号 321)。

マウスにジエチルエーテルを吸入させ前麻酔を施したのち、ペントバルビタールナトリウム 30mg/kg を腹腔内投与し、全身麻酔下にて覆髄処置を行った。麻酔の効果を確認後、開口状態にてマウスを固定し、上顎第一臼歯をアルコール綿球にて消毒した。ラウンドバー(HP1/4)をマイクロモーターハンドピース(INTRAmatic 10C, カボ デンタルシステムズ, 東京, 日本)に接続し、上顎第一臼歯近心咬頭を切削して、直径約 0.5mm の窩洞を形成した。歯髄の過度な損傷を避けるために窩洞形成はフェザータッチで行い、点状露髄を確認した(図 1A)。露髄部を綿球にて止血後、MTA セメント(TheraCal LC, BISCO, Inc., Schaumburg, IL, USA)を用いて直接覆髄を施し、ガラスイオノマーセメント(フジVII, ジーシー, 東京, 日本)にて封鎖した(図 1B)。なお、直接覆髄は上顎両側第一臼歯に対して行い、咬合によるセメント脱落を防止するため、下顎両側第一臼歯を抜去した。マウスは覆髄後 1, 4, 7, 14, 28 日の間、午前 6 時から午後 6 時を照明条件とする室温 26℃の環境下にて飼育された。

2. μ CT による画像解析

適切な直接覆髄が行われ、デンティンブリッジが形成されているかを確認するため、 μ CT(ScanXmate A080, コムスキャンテクノ, 神奈川, 日本)による画像解析を行った。マウスをジエチルエーテル吸入により安楽死させ、上顎骨を摘出し、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液にて 24 時間固定した。その後、管電圧 30kV, 管電流 250 μ A, 拡大率 8.5 倍の条件にて μ CT の撮影を行った。 μ CT 画像は上顎第一臼歯の近心根、歯冠部、遠心根に存在する歯髄が全て含まれる矢状断面となるように調整し、二次元画像として保存した。未処置歯と覆髄後 4, 7, 14, 28 日の処置歯、それぞれの n 数を 6 とし、画像解析ソフト ImageJ(U. S. National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)を用いて定量を行った。 μ CT 画像では既存の象牙質と歯髄腔内に新生した象牙質の境界を判別することが困難であったため、未処置歯の歯髄腔面積の平均値を基準値とし、この数値から処置歯の歯髄腔面積を減算することにより、新生硬組織の面積を算出した。新生硬組織面積の統計処理は統計ソフト EZR(自治医科大学附属さいたま医療センター, 埼玉, 日本)を用い

て、覆髄後 4, 7, 14, 28 日からなる 4 群の結果を Tukey-Kramer 法にて多重比較した。有意水準は 0.05 (5%) とし、P 値が 0.05 未満の場合を有意差として判定した。

3. ヘマトキシリン・エオシン (H-E) 染色による評価

μ CT 撮影後、10% ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) を用いて試料を 4℃ の環境下にて 2 週間脱灰した。その後、アルコールにて脱水し、パラフィンに包埋して、ミクロトーム (Microm HM440E, GMI Inc., Ramsey, MN, USA) を用いて厚さ 4 μ m の連続切片を作製した。薄切は、切片に上顎第一臼歯の近心根、歯冠部、遠心根が含まれる矢状断面となるように行った。象牙質-歯髄複合体の損傷後に形成される象牙質は、窩洞形成や齲蝕などの刺激が歯髄に加わった際、生存した象牙芽細胞によって形成される reactionary dentin と、歯髄細胞から分化した修復象牙芽細胞によって形成される reparative dentin の二種類に分類されている²¹⁾。また、reactionary dentin と reparative dentin の形態学的差異として reactionary dentin には象牙細管があり、reparative dentin には象牙細管がなく骨細胞様細胞が埋め込まれている。本研究においても、この分類に従って直接覆髄後のデンティンブリッジ形成過程を、H-E 染色を行い光学顕微鏡にて経時的に観察した。

4. 免疫組織化学染色による評価

組織切片をキシレンにて脱パラフィンし、アルコール系列によって親水後、内因性ペルオキシダーゼ除去のため、3% 過酸化水素水にて 20 分間処理した。次に 3% の bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を含む濃度 0.01 mol/L, pH 7.4 の Phosphate buffered saline (PBS) にて非特異反応のブロッキングを 30 分間行ったのち、一次抗体を 4℃ にて 24 時間反応させた。一次抗体は Wnt 関連因子として抗 Wnt3a 抗体 (希釈倍率 1:500; Abcam, Cambridge, UK), 抗 Wnt 10a 抗体 (希釈倍率 1:700; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 古典的 Wnt シグナル活性化の指標として抗 β -catenin 抗体 (希釈倍率 1:200; Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA) を用いた。また、マクロファージのマーカーとして抗 F4/80 抗体 (希釈倍率 1:100; Bio-Rad, Richmond, CA,

USA), 象牙質形成時の象牙芽細胞と修復象牙芽細胞のマーカーとして抗 Osterix 抗体(希釈倍率 1:5000; Abcam, Cambridge, UK)を使用した. 一次抗体の反応終了後 PBS で洗浄し, ヒストファイン シンプルステイン マウス MAX-PO (R) または, ヒストファイン シンプルステイン マウス MAX-PO (Rat) (ニチレイバイオサイエンス, 東京, 日本) を室温にて 30 分間反応させ, DAB 発色キット(Dako Liquid DAB+ Substrate Chromogen System, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA)を用いて室温にて 1~3 分間発色させた. その後, ヘマトキシリンにて核染色し, 光学顕微鏡を用いて観察した. なお, Wnt3a, Wnt10a は分泌タンパク質であるため細胞内局在で, 古典的 Wnt シグナル伝達は β -catenin の核移行を起こすため核局在で陽性判定を行っている.

結果

1. μ CT による所見

直接覆髄後の硬組織形成を確認するために, μ CT を用いて解析を行った. 直接覆髄を行わない未処置歯の μ CT 画像では象牙質は不透過像として観察され, 歯髄腔は透過像として確認された. また, 歯髄腔内に硬組織形成を示唆するような不透過像は観察されなかった(図 2A, B). 覆髄後 4 日, 7 日においては, 覆髄部直下の歯髄腔に不透過像が認められたが, その範囲は狭く既存の象牙質とは分離していた(図 2C, D, E, F). 覆髄後 14 日では覆髄部直下の近心壁に硬組織形成を示唆する不透過像がみられたが, 露髄面全体には不透過像は確認できなかった(図 2G, H). 覆髄後 28 日では覆髄部直下に露髄面全体を覆う不透過像が認められたが, 既存の象牙質と不透過性がほぼ同じであるため, 境界を判定することは困難であった(図 2I, J). 未処置歯の歯髄腔面積の平均値から処置歯の歯髄腔面積を減算することによって新生硬組織の面積を定量したところ, 覆髄後 4 日における平均値は 0.002mm^2 , 覆髄後 7 日では 0.004mm^2 , 覆髄後 14 日では 0.016mm^2 , 覆髄後 28 日では 0.023mm^2 であった. 覆髄後 14 日では覆髄後 4 日と比較して新生硬組織の面積が約 6 倍に増加しており, 覆髄後 28 日では, 覆髄後 4

日と比較して新生硬組織の面積が約 9 倍に増加していた。新生硬組織面積の統計処理として Tukey-Kramer 法を用いて多重比較を行ったところ、覆髄後 14 日と 4 日の比較では P 値が 0.0006811 であり、覆髄後 28 日と 4 日の比較では P 値が 0.0000033 であった。有意水準を 0.05 としたため、これらは有意な差であった(図 2K)。

2. 組織学的所見

1) H-E 染色による所見

直接覆髄を行わない未処置歯では、髄角部を含む象牙質表面に卵円形の核を持つ象牙芽細胞が配列しており、歯髄全体には多数の血管が確認できた(図 3A)。覆髄後 1 日では露髄部表層の歯髄にわずかであるが壊死層が観察され、近心咬頭の髄角部には象牙芽細胞はほとんど認められず、この部位には扁平な核を持つ線維芽細胞様細胞が観察された(図 3B)。覆髄後 4 日では覆髄部直下に象牙質の削片が認められ、扁平な核を持つ線維芽細胞様細胞が存在していたが、象牙芽細胞は確認できなかった(図 3C)。覆髄後 7 日でも覆髄部直下には少数の象牙質削片が認められ、紡錘形の線維芽細胞様細胞は存在していたが、象牙芽細胞は認められず、象牙質形成も確認できなかった。また、歯髄中央部にはわずかな炎症性細胞の浸潤が観察された(図 3D)。覆髄後 14 日になると覆髄部周辺の近心壁に象牙細管を有する **reactionary dentin** が形成されており、これに接して卵円形の核を持つ象牙芽細胞が配列していた。また、覆髄部周辺には多くの炎症性細胞が認められ(図 3E)、歯髄中央部には異物を貪食した大型の細胞が観察された(図 3E')。覆髄後 28 日では露髄面を覆うようにデンティンブリッジの形成が確認された。覆髄部の直下には象牙細管を含まず、骨細胞様細胞が埋入している **reparative dentin** が認められ、その表面には修復象牙芽細胞が認められた。**Reparative dentin** の周囲には **reactionary dentin** が存在しており、覆髄後 14 日より厚い傾向を示した。そして、歯髄腔内の炎症性細胞や異物を貪食した大型の細胞は覆髄後 14 日に比べて減少していた(図 3F)。

2) 免疫組織化学染色による所見

直接覆髄を行わない未処置歯では髄角部周辺の象牙芽細胞に Wnt3a, Wnt10a の陽性反応はほとんど認められなかった(図 4A, B, C, D)。また、 β

-catenin も髄角部周辺の象牙芽細胞の核に陽性反応はほとんど観察されなかった(図 4E, F). 覆髄後 1 日における局在も未処置歯における局在と同様の傾向を示し, 覆髄部直下の細胞には Wnt3a, Wnt10a, β -catenin の局在はほとんどみられなかった. 覆髄後 4 日の歯髄では Wnt3a, Wnt10a 陽性反応が覆髄部周辺に生存する象牙芽細胞と歯髄細胞に顆粒状に認められた(図 5A, B, C, D). また, β -catenin の陽性反応は覆髄部周辺の象牙芽細胞と歯髄細胞の核に観察された(図 5E, F). 覆髄後 7 日の歯髄においても覆髄後 4 日と同様に, 覆髄部周辺の象牙芽細胞と歯髄細胞が Wnt3a, Wnt10a の陽性反応を示すとともに(図 6A, B, C, D), 覆髄部周辺の象牙芽細胞と歯髄細胞の核に β -catenin の陽性反応が認められた(図 6E, F). 覆髄後 14 日では覆髄部周辺の近心壁に reactionary dentin が形成されており, その表面に配列する象牙芽細胞と, 周辺に存在する歯髄細胞は Wnt3a, Wnt10a の強い陽性反応を示した(図 7 A, B, C, D). また, reactionary dentin の表面に配列する象牙芽細胞の核と, その周辺に存在する歯髄細胞の核に強い β -catenin 陽性反応が認められた(図 7 G, H). さらに, 覆髄部周辺と歯髄中央部には異物を貪食した大型の細胞が多数みられ, これらの細胞に Wnt10a 陽性反応が認められた. また, 異物を貪食した Wnt10a 陽性細胞はマクロファージのマーカーである F4/80 陽性を示した(図 7E, F). 覆髄後 28 日の歯髄では覆髄部直下に reactionary dentin と reparative dentin から構成されるデンティンブリッジが形成されており, その表面に配列した象牙芽細胞に Wnt3a の陽性反応が観察されたが, Wnt10a 局在はほとんど認められなかった(図 8 A, B, C, D). また, デンティンブリッジ表面に配列した象牙芽細胞と修復象牙芽細胞の核に β -catenin 陽性反応が観察された(図 8E, F). さらに, これらの細胞の核には, 象牙質形成時の象牙芽細胞と修復象牙芽細胞のマーカーである Osterix の陽性反応が認められた(図 8G, H).

考察

1. マウスの直接覆髄モデルについて

実験動物の歯に水酸化カルシウム製剤や MTA セメントを用いて直接覆髄

を行い、デンティンブリッジの形成過程を観察した研究は、これまで多く報告されている^{8,9)}。これらの研究において、直接覆髄モデルとして使用される動物にはラットが多く、その理由としては飼育が容易であることや維持費用が低いこと、マウスと比較すると歯が大きいこと、直接覆髄が行いやすいことが挙げられる。しかしながら、遺伝子改変動物はラットよりもマウスに種類が多く、本研究では将来的に遺伝子改変マウスを使用することを考慮し、マウスを用いて直接覆髄の実験系を構築した。これまでマウスの上顎第一臼歯に MTA セメントにて直接覆髄を行った実験では、覆髄後 28 日でデンティンブリッジが形成されたと報告されている²²⁾。また、古典的 Wnt シグナル経路が歯髄細胞から修復象牙芽細胞への分化に関与することも報告されている¹⁸⁾。しかしながら、それらの研究は主に分子生物学的手法を用いて解析を行っており、マウスの直接覆髄モデルにおいて Wnt 関連分子の局在を形態学的に明らかにした報告は見当たらない。そのため、本研究ではデンティンブリッジ形成過程を μ CT の撮影を行ったのち、H-E 染色と免疫組織化学染色による形態学的手法を用いて観察することとした。 μ CT を用いた画像解析では覆髄後 14 日で覆髄部直下の近心壁に硬組織形成を示唆する不透過像がみられ、覆髄後 28 日では露髄部全体を覆う不透過像が認められた。この結果からマウスの上顎第一臼歯に対して MTA セメントを用いて直接覆髄を行うと、覆髄から 28 日前後でデンティンブリッジの形成にいたることが推察された。H-E 染色による組織像でも覆髄後 14 日では覆髄部周辺の近心壁に reactionary dentin がみられ、覆髄後 28 日では覆髄部直下にデンティンブリッジが形成されていた。これらの結果は覆髄後約 28 日でデンティンブリッジの形成にいたるという点で、Vidovic らの報告とも一致しており、本実験系の有用性が確認された。

2. マウス歯髄におけるデンティンブリッジ形成過程

これまでのデンティンブリッジ形成過程における組織学的解析は、ラットの上顎第一臼歯に対して MTA セメントを使用し直接覆髄を行った実験が多く報告されている^{8,9)}。すなわち、直接覆髄後 1 日では露髄部表層の歯髄に壊死層が形成され、覆髄後 3 日から 5 日では壊死層の直下に炎症性細胞の浸潤が認められる。これに続いて、覆髄部周辺と歯髄中央部で活発な細胞増殖が起こり、覆髄後 7 日では修復象牙芽細胞が配列して、覆髄部直下に線維性

基質の形成が認められる。覆髄後 14 日以降になると細管構造を持つ象牙質様基質が観察され経時的に厚みを増してデンティンブリッジとなる。

本研究において、覆髄後 1 日では露髄部表層の歯髄にわずかであるが壊死層が観察され、覆髄部周辺に象牙芽細胞はみられなかった。これは窩洞形成時に発生する摩擦熱や物理的刺激によって象牙芽細胞が死滅したためと考えられる。覆髄後 4 日、7 日では覆髄部直下に、窩洞形成時に押し込まれたと思われる象牙質の削片がみられたが、新たな象牙芽細胞は認められず、象牙質形成も確認できなかった。そのため、 μ CT 画像で認められた覆髄部直下の不透過像は、窩洞形成時に押し込まれた象牙質削片であることが考えられた。覆髄後 14 日において、**reactionary dentin** が覆髄部周辺の近心壁と遠心壁に形成されており、この表面には象牙芽細胞が配列していた。さらに、覆髄後 28 日では **reactionary dentin** の厚みが増し、**reparative dentin** も覆髄部直下に形成されて、露髄面を閉鎖するデンティンブリッジとなっていた。また、**reparative dentin** の表面には修復象牙芽細胞が観察された。本研究におけるデンティンブリッジ形成過程は、ラットに比較して遅延しているが、マウスの上顎第一臼歯に MTA セメントを用いて直接覆髄を行った研究でも、直接覆髄後 28 日でデンティンブリッジが形成されたと報告されている²²⁾。今回の組織学的観察から炎症性細胞の浸潤が覆髄後 7 日と 14 日で認められ、歯髄損傷の程度によって炎症が長期間継続したために、マウスの直接覆髄モデルではラットと比較して、歯髄の治癒過程が長期に及ぶと推察された。以上の結果からマウスにおける直接覆髄では歯髄損傷時に生存した象牙芽細胞によって **reactionary dentin** が先に形成され、その後、新たに分化した修復象牙芽細胞によって **reparative dentin** が形成されて、覆髄後 28 日でデンティンブリッジができることが明らかとなった。

3. 歯の修復過程における古典的 Wnt シグナル経路の関与

歯胚の発達過程において **Wnt3a**, **Wnt4**, **Wnt5a**, **Wnt6**, **Wnt7b**, **Wnt10a**, **Wnt10b** が発現していると報告されており^{15,16)}、これらの **Wnt** リガンドは歯の形成過程における重要な成長因子であると考えられる。また、上皮特異的に β -catenin を欠失させると歯胚発生が蕾状期で停止することや、過剰発現させることで異常な形態の歯が多数形成されることが報告されており

^{23,24,25)}, 歯の発生過程において古典的 Wnt シグナル経路が重要な役割を担っている. 古典的 Wnt シグナル経路を活性化させる代表的な Wnt リガンドとして Wnt 3a と Wnt10a が知られており, Wnt3a を直接覆髄に用いると, 歯髄細胞のアポトーシスを抑制し細胞増殖を亢進させ象牙芽細胞分化を誘導すること²⁰⁾, Wnt10a は象牙芽細胞の分化マーカーである Dentin sialophosphoprotein (Dspp) 発現に重要であることが報告されている²⁶⁾. これらの報告は, 歯の発生時と同様に象牙質修復過程においても, 古典的 Wnt シグナル経路が象牙芽細胞分化や象牙質形成に関与することを示唆している. 古典的 Wnt シグナル経路において, 細胞膜表面の受容体に Wnt3a や Wnt10a などの Wnt リガンドが結合すると, GSK-3 β のキナーゼ活性が阻害され細胞質内に β -catenin が蓄積する. 蓄積した β -catenin は核内に移行し, 転写因子である TCF/LEF と結合して転写を促進する¹⁴⁾. そのため, β -catenin の核移行は古典的 Wnt シグナル活性化の指標として用いることができる. 本研究では代表的な古典的 Wnt として Wnt3a と Wnt10a, 古典的 Wnt シグナル活性化の指標として β -catenin の局在を免疫組織化学的に観察した.

直接覆髄を行わない未処置歯では髄角部周辺の象牙芽細胞に Wnt3a, Wnt10a, β -catenin の陽性反応をほとんど認めず, 覆髄後 1 日においても未処置歯と同様の傾向を示した. この所見から, 未処置歯と覆髄後 1 日の処置歯では古典的 Wnt シグナル経路の活性化はほとんど生じていないと考えられた. 覆髄後 4 日では, Wnt3a, Wnt10a は覆髄部周辺に生存する象牙芽細胞と歯髄細胞に顆粒状に陽性反応が認められ, 覆髄後 7 日, 14 日ではこれらの細胞における Wnt3a, Wnt10a の強い陽性反応が観察された. このことから, 直接覆髄後に象牙芽細胞と歯髄細胞が分泌顆粒を經由して Wnt3a, Wnt10a を分泌していると考えられた. さらに β -catenin は覆髄後 4 日, 7 日, 14 日で象牙芽細胞と歯髄細胞の核に強い陽性反応が認められ, 覆髄後 28 日では象牙芽細胞と修復象牙芽細胞の核に弱い陽性反応が認められた. これらのことから, 象牙芽細胞と歯髄細胞が産生する Wnt3a, Wnt10a がオートクリンとして象牙芽細胞活性化と修復象牙芽細胞分化に関与していることが示唆された. また, 覆髄後 7 日, 14 日で Wnt3a, Wnt10a の強い陽性反応が

認められたことから、この時期で活発な Wnt シグナル伝達が行われ、その後の修復象牙芽細胞分化とデンティンブリッジ形成に関与していると考えられた。細胞系譜解析 (Lineage Tracing) の結果からも歯髄細胞が Wnt の自己分泌を行い、修復象牙芽細胞に分化することが報告されている¹⁸⁾。また、歯の形成過程において象牙芽細胞特異的に Wnt 分泌を阻害すると象牙質形成が低下することも明らかにされている¹⁷⁾。これらの報告は、歯の修復過程では歯髄細胞に加え、象牙芽細胞が Wnt を分泌しオートクリンとして作用するという本研究の知見を裏づけている。

さらに、覆髄後 14 日の覆髄部周辺と歯髄中央部に存在する異物を貪食した大型の F4/80 陽性マクロファージに Wnt10a の陽性反応が認められた。F4/80 陽性マクロファージが貪食した異物は直接覆髄に使用された MTA セメントである可能性が高く、異物処理を行った F4/80 陽性マクロファージが Wnt10a を産生していると考えられた。ラットの直接覆髄後に、歯髄内に組織修復に関与する M2 マクロファージが多数認められることは報告されているが²⁷⁾、その機能的な意義は不明であった。マクロファージ周囲に存在する歯髄細胞の核に β -catenin 局在が認められることから、覆髄後 14 日では象牙芽細胞、歯髄細胞に加え、マクロファージ由来の Wnt10a も修復象牙芽細胞分化とデンティンブリッジ形成に重要な役割を担っていることが示唆された。

覆髄後 28 日では覆髄部直下に reactionary dentin と reparative dentin から構成されるデンティンブリッジが形成されており、その表面に配列した象牙芽細胞と修復象牙芽細胞の核に Osterix の陽性反応が認められた。Osterix は骨芽細胞の分化マーカーとして知られているが、歯胚の発達過程において象牙質を形成している象牙芽細胞の核に局在する²⁸⁾。また、歯髄細胞から象牙芽細胞への分化過程において、高い発現が認められることも報告されており²⁹⁾、象牙質形成時の象牙芽細胞と、歯髄細胞から新たに分化した修復象牙芽細胞のマーカーとして有用である。今回の所見は reactionary dentin 形成のための象牙芽細胞活性化と、reparative dentin 形成のための修復象牙芽細胞分化に古典的 Wnt シグナルが重要な役割を担っていることを示唆している。

本研究の結果から、損傷した歯髄における古典的 Wnt シグナルの活性化

はデンティンブリッジ形成を誘導すると推察される。Wnt シグナル伝達を促進する覆髄材の臨床応用は象牙質・歯髄複合体を効率的に修復できる、新たな歯髄保存療法となる可能性が示された。

結 論

デンティンブリッジ形成過程において、象牙芽細胞の活性化および修復象牙芽細胞の分化に古典的 Wnt シグナルの関与が明らかになった。また、象牙芽細胞と歯髄細胞由来の Wnt3a, Wnt10a が直接覆髄後初期における象牙芽細胞活性化と修復象牙芽細胞分化の役割を担っていると考えられた。一方、直接覆髄後 14 日以降の後期においては象牙芽細胞と歯髄細胞に加え、マクロファージが Wnt10a を産生することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご懇篤なるご指導とご校閲を賜りました松本歯科大学大学院歯学独立研究科硬組織疾患制御再建学講座中村浩彰教授に深甚なる謝意を表するとともに、研究の実施に際し、終始ご懇切なるご指導を賜った硬組織疾患制御再建学講座平賀徹教授に心より感謝の意を表します。合わせて、この研究の円滑な進展のために特別にご配慮を頂いた東京歯科大学口腔科学研究センター溝口利英講師、松本歯科大学口腔解剖学講座堀部寛治助教に深くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Tziafas D (1994) Mechanisms controlling secondary initiation of dentinogenesis: a review. Int Endod J 27:61-74.
- 2) Hosoya A, Nakamura H, Ninomiya T, Hoshi K, Yoshida K, Yoshida N, Takahashi M, Okabe T, Sahara N, Yamada H, Kasahara E and Ozawa H (2007) Hard tissue formation in

- subcutaneously transplanted rat dental pulp. *J Dent Res* 86:469-74.
- 3) Trope M (2008) Regenerative potential of dental pulp. *J Endod* 34:13-7.
 - 4) Hilton TJ (2009) Keys to clinical success with pulp capping: a review of the literature. *Oper Dent* 34:615-25.
 - 5) Camilleri J and Pitt Ford TR (2006) Mineral trioxide aggregate: a review of the constituents and biological properties of the material. *Int Endod J* 39:747-54.
 - 6) Roberts HW, Toth JM, Berzins DW and Charlton DG (2008) Mineral trioxide aggregate material use in endodontic treatment: a review of the literature. *Dent Mater* 24:149-64.
 - 7) Torabinejad M and Chivian N (1999) Clinical applications of mineral trioxide aggregate. *J Endod* 25:197-205.
 - 8) Kuratate M, Yoshiba K, Shigetani Y, Yoshiba N, Ohshima H and Okiji T (2008) Immunohistochemical analysis of nestin, osteopontin, and proliferating cells in the reparative process of exposed dental pulp capped with mineral trioxide aggregate. *J Endod* 34:970-4.
 - 9) Okiji T and Yoshiba K (2009) Reparative dentinogenesis induced by mineral trioxide aggregate: a review from the biological and physicochemical points of view. *Int J Dent* 10:464-80
 - 10) Cadigan KM and Nusse R (1997) Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev* 11:3286-305.
 - 11) Logan CY and Nusse R (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20:781-810.
 - 12) Clevers H (2006) Wnt/ β -catenin signaling in development and disease. *Cell* 127:469-80.
 - 13) Veeman MT, Axelrod JD and Moon RT (2003) A second canon.

- Functions and mechanisms of β -catenin-independent Wnt signaling. *Dev Cell* 5:367-77.
- 14) van Amerongen R and Nusse R (2009) Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 136: 3205-14.
 - 15) Dassule HR and McMahon AP (1998) Analysis of epithelial-mesenchymal interactions in the initial morphogenesis of the mammalian tooth. *Dev Biol* 202:215-27.
 - 16) Sarkar L and Sharpe PT (1999) Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mech Dev* 85: 197-200.
 - 17) Bae CH, Kim TH, Ko SO, Lee JC, Yang X and Cho ES (2015) Wntless regulates dentin apposition and root elongation in the mandibular molar. *J Dent Res* 94:439-45.
 - 18) Babb R, Chandrasekaran D, Carvalho Moreno Neves V and Sharpe PT (2017) Axin2-expressing cells differentiate into reparative odontoblasts via autocrine Wnt/ β -catenin signaling in response to tooth damage. *Sci Rep* 7:3102.
 - 19) Ishimoto K, Hayano S, Yanagita T, Kurosaka H, Kawanabe N, Itoh S, Ono M, Kuboki T, Kamioka H and Yamashiro T (2015) Topical application of lithium chloride on the pulp induces dentin regeneration. *PLoS One* 10:0121938.
 - 20) Hunter DJ, Bardet C, Mouraret S, Liu B1, Singh G, Sadoine J, Dhamdhere G, Smith A, Tran XV, Joy A, Rooker S, Suzuki S, Vuorinen A, Miettinen S, Chaussain C and Helms JA (2015) Wnt acts as a prosurvival signal to enhance dentin regeneration. *J Bone Miner Res* 30:1150-9.
 - 21) Smith AJ, Cassidy N, Perry H, Bègue-Kirn C, Ruch JV and Lesot H (1995) Reactionary dentinogenesis. *Int J Dev Biol.* 39:273-80.

- 22) Vidovic I, Banerjee A, Fatahi R, Matthews BG, Dymont NA, Kalajzic I and Mina M (2017) α SMA-Expressing perivascular cells represent dental pulp progenitors in vivo. *J Dent Res* 96:323-30
- 23) Järvinen E, Salazar-Ciudad I, Birchmeier W, Taketo MM, Jernvall J and Thesleff I (2006) Continuous tooth generation in mouse is induced by activated epithelial Wnt/ β -catenin signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18627-32.
- 24) 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 and Millar SE (2008) Wnt/ β -catenin signaling directs multiple stages of tooth morphogenesis. *Dev Biol* 313:210-24.
- 25) Chen J, Lan Y, Baek JA, Gao Y and Jiang R (2009) Wnt/ β -catenin signaling plays an essential role in activation of odontogenic mesenchyme during early tooth development. *Dev Biol* 334:174-85.
- 26) Yamashiro T, Zheng L, Shitaku Y, Saito M, Tsubakimoto T, Takada K, Takano-Yamamoto T and Thesleff I (2007) Wnt10a regulates dentin sialophosphoprotein mRNA expression and possibly links odontoblast differentiation and tooth morphogenesis. *Differentiation* 75:452-62.
- 27) Takei E, Shigetani Y, Yoshida K, Hinata G, Yoshida N and Okiji T (2014) Initial transient accumulation of M2 macrophage-associated molecule-expressing cells after pulpotomy with mineral trioxide aggregate in rat molars. *J Endod.* 40:1983-8.
- 28) Hosoya A, Yukita A, Ninomiya T, Hiraga T, Yoshida K, Yoshida N, Kasahara E and Nakamura H (2013) Localization of SUMOylation factors and Osterix in odontoblast lineage cells during dentin formation and regeneration. *Histochem Cell Biol*

140:201-11.

- 29) Yang G, Li X, Yuan G, Liu P and Fan M (2014) The effects of osterix on the proliferation and odontoblastic differentiation of human dental papilla cells. J Endod 40:1771-7.

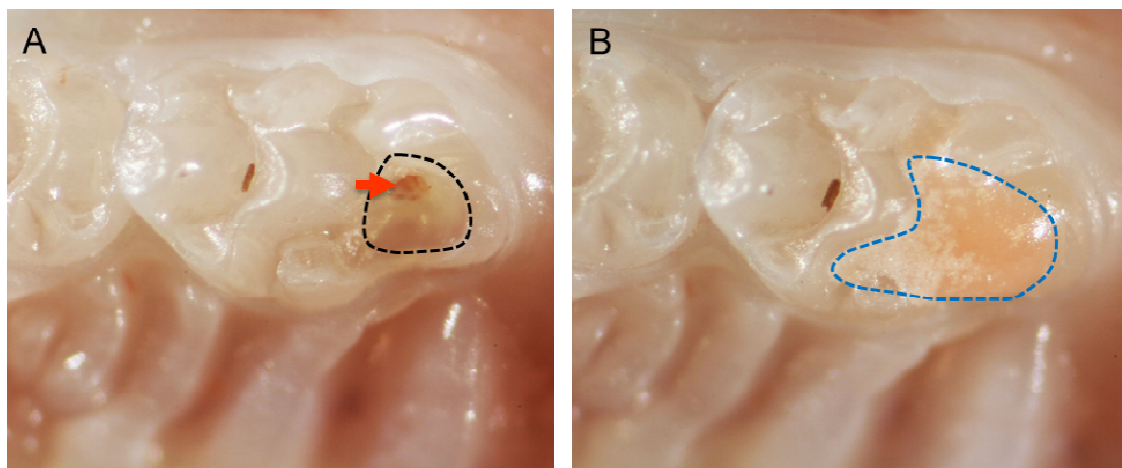


図 1: 直接覆髄を行ったマウス上顎第一臼歯の術中写真

A: マウスの上顎第一臼歯近心咬頭に窩洞形成を行い、露髄させた直後の口腔内写真。形成された窩洞（黒の点線）と露髄を起こした部位（赤の矢印）が確認できる。**B:** 露髄部をMTA セメントにて直接覆髄しガラスアイオノマーセメントにて封鎖した直後の口腔内写真。ガラスアイオノマーセメントによって封鎖された部位（青の点線）が確認できる。

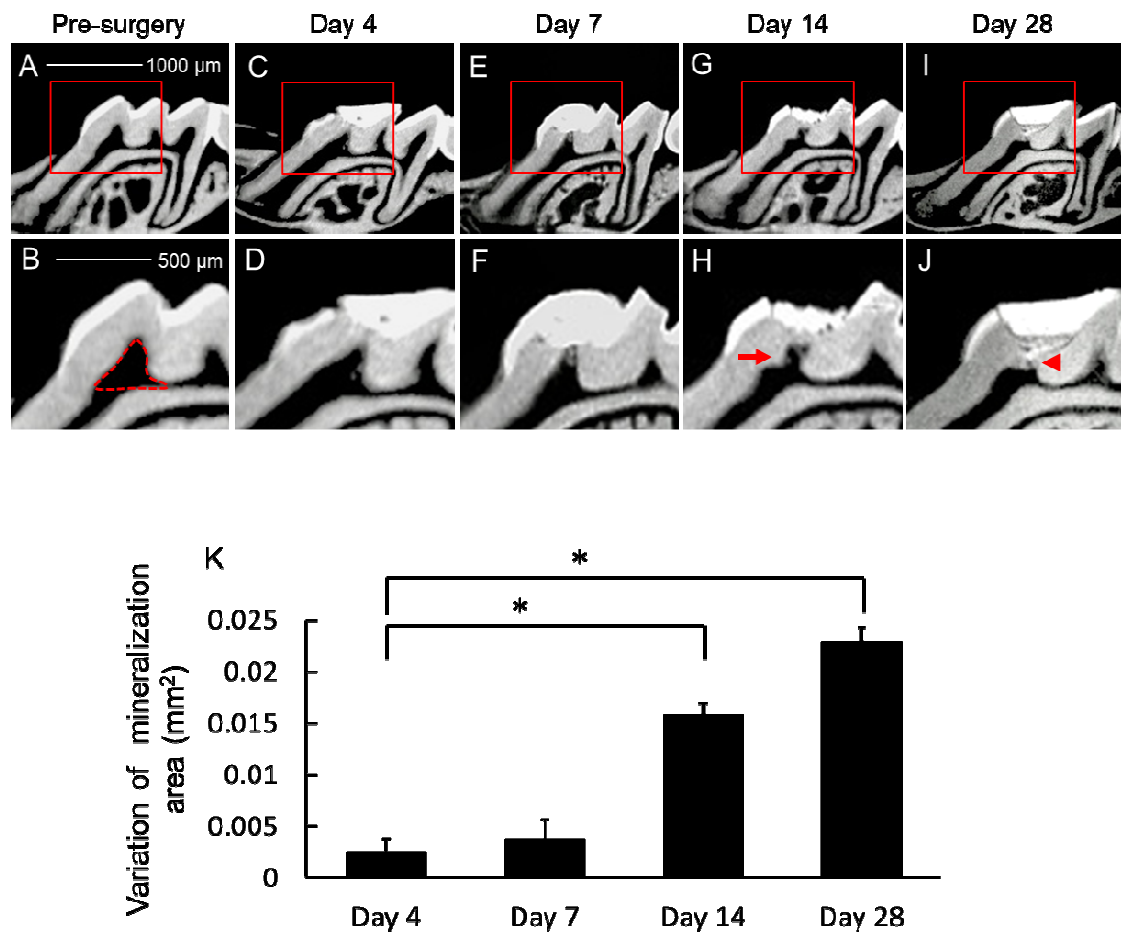


図 2: μ CT による直接覆髄後の解析

A: 未処置歯の μ CT 画像. **B:** A の拡大像. 赤の点線は定量に用いた歯髄腔範囲を示す.
C: 覆髄後 4 日における μ CT 画像. **D:** C の拡大像. **E:** 覆髄後 7 日における μ CT 画像. **F:** E の拡大像. **G:** 覆髄後 14 日における μ CT 画像. **H:** G の拡大像. 覆髄部直下の近心壁に不透過像が認められる (赤の矢印). **I:** 覆髄後 28 日における μ CT 画像. **J:** I の拡大像. 露髄面全体を覆う不透過像が認められる (赤の矢頭). **K:** 直接覆髄後歯髄における硬組織形成量 (mm^2) の変化. Tukey-Kramer method, Average \pm SE, * $P < 0.05$, $n = 6/\text{group}$.

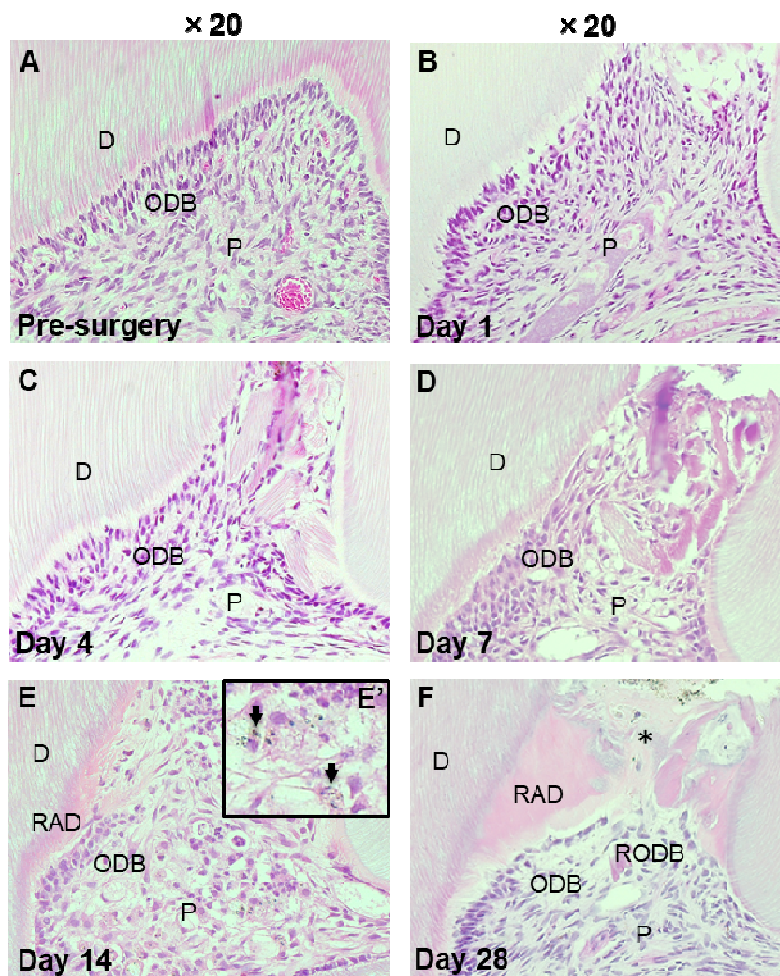


図 3: H-E 染色による直接覆髄後歯髄の組織像

A: 未処置歯の組織像. **B:** 覆髄後 1 日における組織像. **C:** 覆髄後 4 日における組織像. **D:** 覆髄後 7 日における組織像. **E:** 覆髄後 14 日における組織像. 近心壁に reactionary dentin (RAD) が形成されている. **E':** E の拡大像. 異物を貪食した大型の細胞が認められる (矢印). **F:** 覆髄後 28 日における組織像. reactionary dentin (RAD) と reparative dentin (*) から構成されるデンティンブリッジが認められる. D: 象牙質, ODB: 象牙芽細胞, RODB: 修復象牙芽細胞, P: 歯髄.

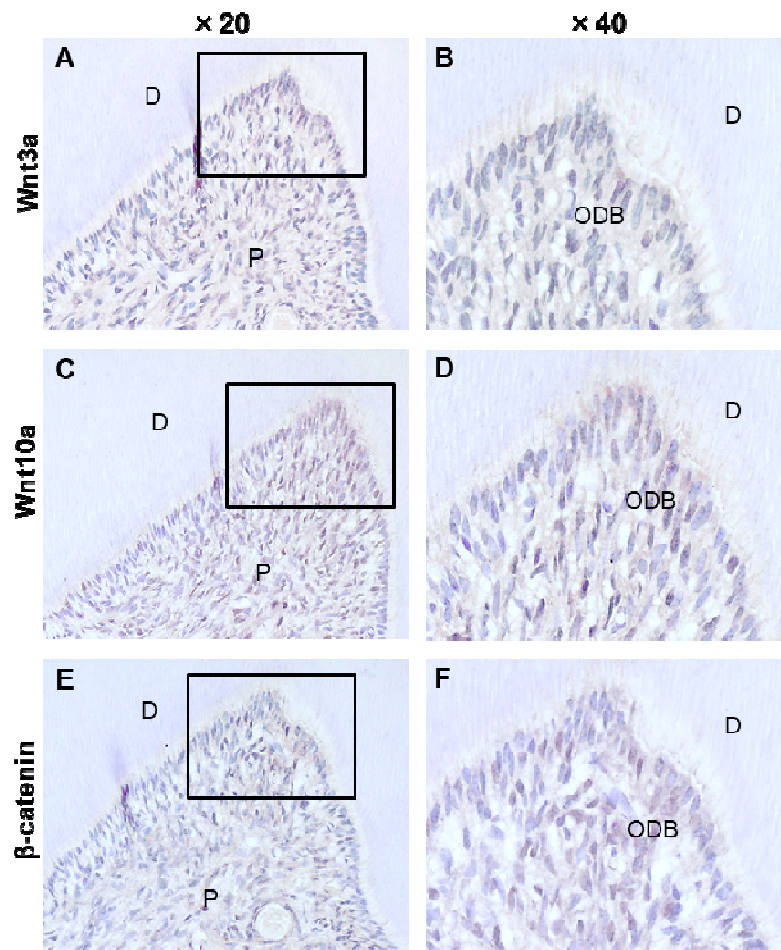


図 4: 未処置歯における Wnt 関連分子の免疫染色像

A: 未処置歯における Wnt3a 局在. **B:** A の拡大像. 象牙芽細胞に Wnt3a 局在をほとんど認めない. **C:** 未処置歯における Wnt10a 局在. **D:** C の拡大像. 象牙芽細胞に Wnt10a 局在をほとんど認めない. **E:** 未処置歯における β -catenin 局在. **F:** E の拡大像. 象牙芽細胞の核に β -catenin 局在をほとんど認めない. D: 象牙質, ODB: 象牙芽細胞, P: 歯髄.

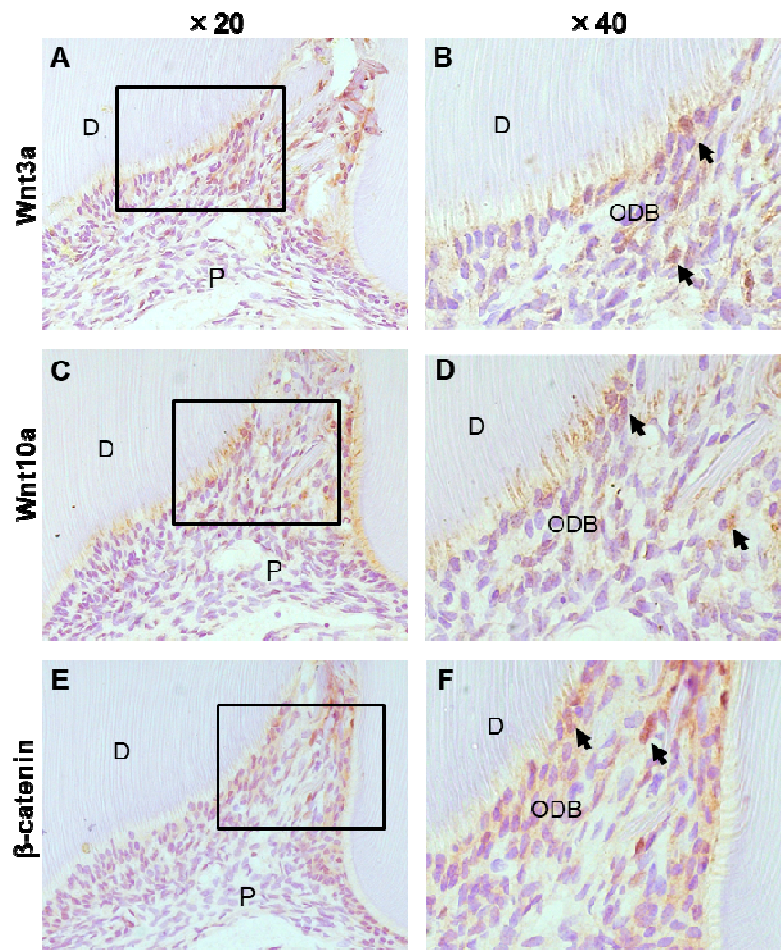


図 5: 直接覆髄後 4 日における Wnt 関連分子の免疫染色像

A: 覆髄後 4 日における Wnt3a 局在. **B:** A の拡大像. 象牙芽細胞と歯髓細胞に Wnt3a 局在を認める(矢印). **C:** 覆髄後 4 日における Wnt10a 局在. **D:** C の拡大像. 象牙芽細胞と歯髓細胞に Wnt10a 局在を認める(矢印). **E:** 覆髄後 4 日における β -catenin 局在. **F:** E の拡大像. 象牙芽細胞と歯髓細胞の核に β -catenin 局在を認める(矢印). D: 象牙質, ODB: 象牙芽細胞, P: 歯髓.

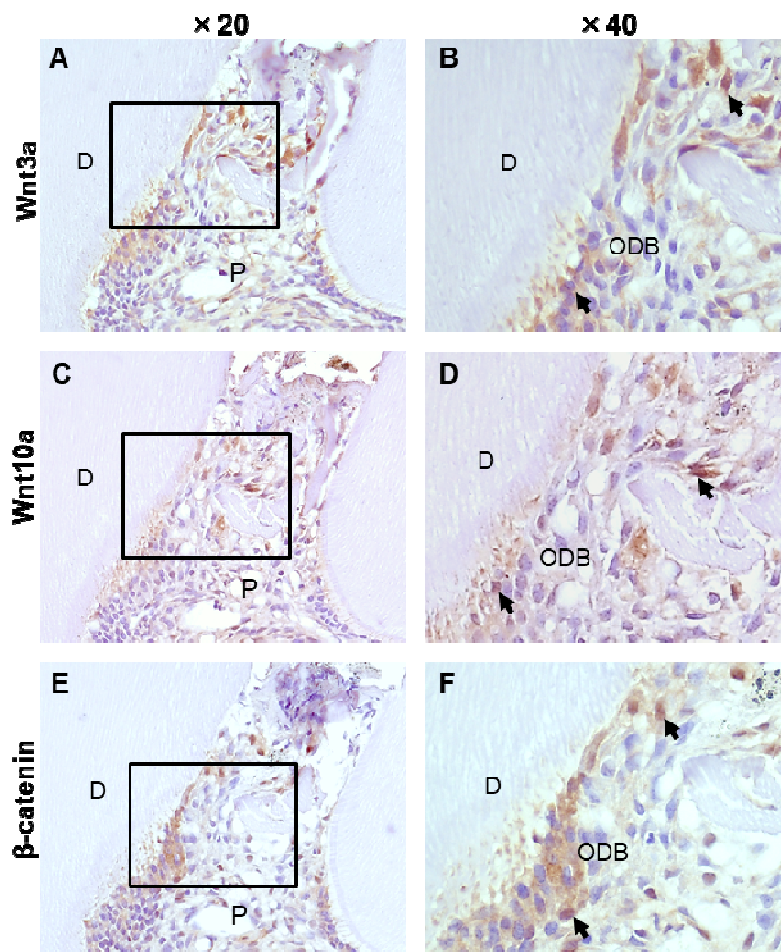


図 6: 直接覆髄後 7 日における Wnt 関連分子の免疫染色像

A: 覆髄後 7 日における Wnt3a 局在. **B:** A の拡大像. 象牙芽細胞と歯髄細胞に Wnt3a 局在を認める(矢印). **C:** 覆髄後 7 日における Wnt10a 局在. **D:** C の拡大像. 象牙芽細胞と歯髄細胞に Wnt10a 局在を認める(矢印). **E:** 覆髄後 7 日における β -catenin 局在. **F:** E の拡大像. 象牙芽細胞と歯髄細胞の核に β -catenin 局在を認める(矢印). D: 象牙質, ODB: 象牙芽細胞, P: 歯髄.

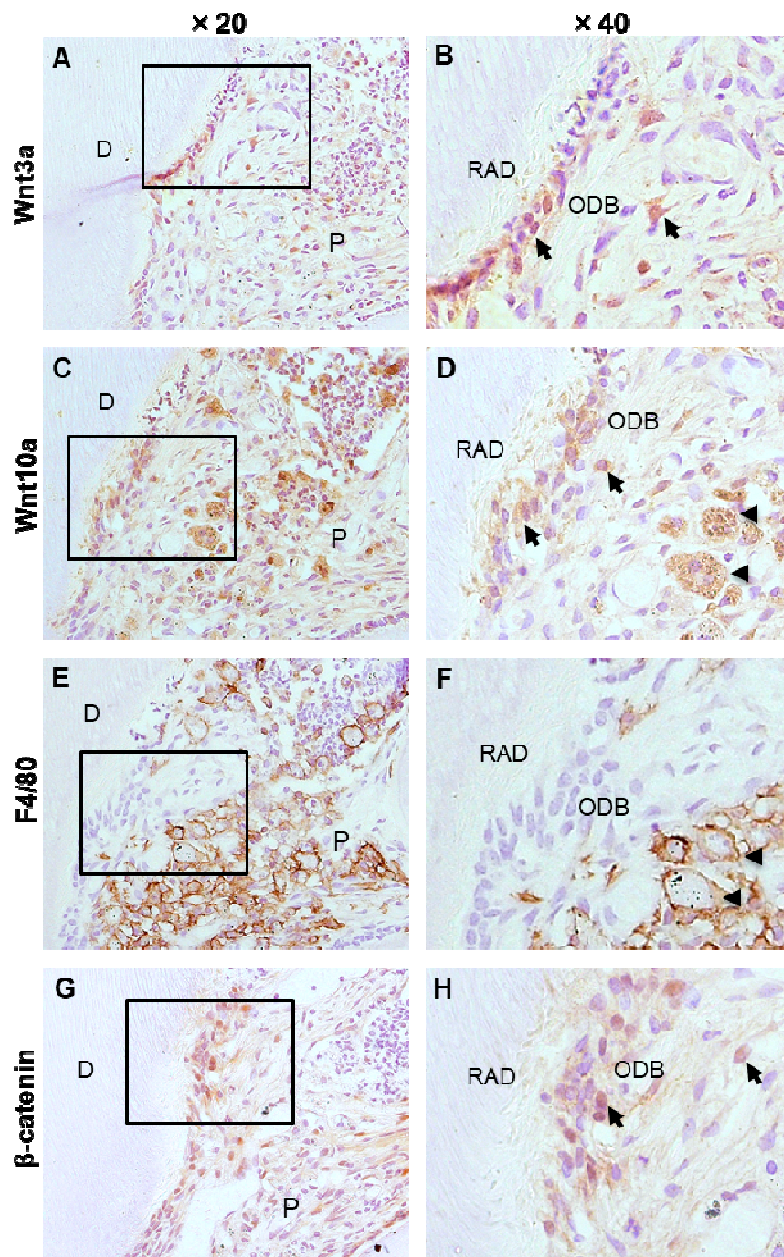


図 7: 直接覆髄後 14 日における Wnt 関連分子と F4/80 の免疫染色像

A: 覆髄後 14 日における Wnt3a 局在. **B:** A の拡大像. 象牙芽細胞と歯髓細胞に Wnt3a 局在を認める(矢印). **C:** 覆髄後 14 日における Wnt10a 局在. **D:** C の拡大像. 象牙芽細胞と歯髓細胞(矢印)に加え, 異物を貪食した大型の細胞に Wnt10a 局在を認める(矢頭). **E:** 覆髄後 14 日における F4/80 局在. **F:** E の拡大像. 異物を貪食した大型の細胞に F4/80 局在を認める(矢頭). **G:** 覆髄後 14 日における β -catenin 局在. **H:** G の拡大像. 象牙芽細胞と歯髓細胞の核に β -catenin 局在を認める(矢印). D: 象牙質, RAD: reactionary dentin, ODB: 象牙芽細胞, P: 歯髓.

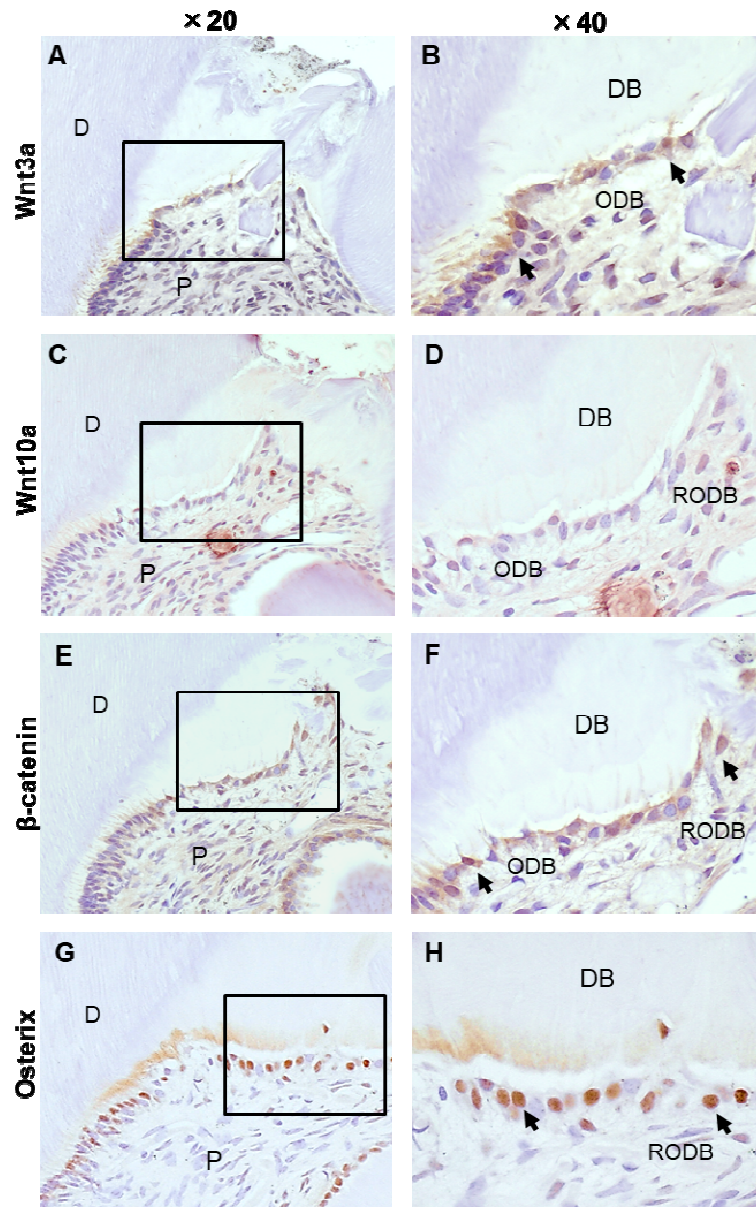


図 8: 直接覆髄後 28 日における Wnt 関連分子と Osterix の免疫染色像

A: 覆髄後 28 日における Wnt3a 局在. **B:** A の拡大像. デンティンブリッジ表面の象牙芽細胞に Wnt3a 局在を認める(矢印). **C:** 覆髄後 28 日における Wnt10a 局在. **D:** C の拡大像. 象牙芽細胞と修復象牙芽細胞に Wnt10a 局在を認めない. **E:** 覆髄後 28 日における β -catenin 局在. **F:** E の拡大像. 象牙芽細胞と修復象牙芽細胞に β -catenin 局在を認める(矢印). **G:** 覆髄後 28 日における Osterix 局在. **H:** G の拡大像. 修復象牙芽細胞の核に β -catenin 局在を認める(矢印). D: 象牙質, DB: デンティンブリッジ, ODB: 象牙芽細胞, RODB: 修復象牙芽細胞, P: 歯髄.