

**Ectodin がラット象牙芽細胞様細胞の分化に
及ぼす影響について**

奥羽大学大学院歯学研究科 保存修復学専攻

中 島 宗 隆

(指導教員：菊 井 徹 哉)

**Effect of ectodin on differentiation of odontoblastic
cell isolated from dental pulp of rat incisors**

**Department of Restorative Dentistry,
Ohu University, Graduate School of Dentistry**

Munetaka Nakashima

(Director : Tetsuya Kikui)

Abstract

Purpose: Ectodin (Sostdc1/Wise/USAGE), which is a secreted glycoprotein containing SOST domain, has been known as an antagonist for Wnt signaling inhibiting its canonical pathway. It plays an important role of tooth development through the inhibition of Wnt signaling. Although ectodin maybe involved in mechanism of reparative dentinogenesis as well as tooth development, effects of ectodin on differentiation of odontoblasts have not been analyzed in more details. Here, I investigated the mode of action of ectodin on odontoblast differentiation using dental pulp cells isolated from rat incisors.

Methods: Cultured primary dental pulp cells isolated from rat lower incisors were used in this study. The cells were treated with or without lithium chloride (LiCl, 10mmol/l) for 2 days and cultured for 20days. Alkaline phosphate (ALP) activity and von Kossa staining were performed by using naphthol AS-MX phosphate and fast blue BB salt, respectively. Total RNA was extracted, treat with DNase1, and reverse-transcribed to prepare cDNA. Resultant cDNA was then amplified by real-time quantitative polymerase chain reaction with specific primer sets for the genes of interest: alkaline phosphate (*ALP*), dentin sialoprotein (*DSPP*), bone Gla-protein (*BGP*), β -catenin, and ectodin. To prove the biological role of ectodin on odontoblast differentiation, I transfected short hairpin RNA (shRNA) expression vector to transiently knock down *ectodin* gene expression.

Results: Dental pulp cells treated with LiCl suppressed odontoblast differentiation and mineralized dentin-like nodule formation. Expressions of *ALP*, *DSPP*, and *BGP* mRNA were reduced by LiCl, while the expression of *ectodin*, which was transiently up-regulated at early stage of odontoblast differentiation, was further enhanced by LiCl. When *ectodin* expression in dental pulp cells were knocked down by using shRNA, both odontoblast differentiation and mineral dentin-like nodules were notably suppressed with concomitant reduction of *DSPP* gene expression.

Conclusion: Taken together, these findings suggested that *ectodin* plays an important role of early odontoblastic differentiation as a negative feed-back factor for the canonical Wnt/ β -catenin pathway.

Keyword: *ectodin*, dental pulp cells, dentinogenesis,
Wnt signaling pathway, rat

抄 録

目的：Ectodin は SOST ドメインを有する分泌型糖蛋白質であり，Wnt シグナルを阻害するアンタゴニストとして知られている。歯の発生において歯冠の形態形成や咬頭の数，歯の数を決定する因子として重要な働きをしている。一方，Wnt シグナルは象牙芽細胞の分化調節に重要な役割を果たしていることが報告されており，dentinogenesis の調節因子として注目されている。Wnt シグナルのアンタゴニストである ectodin が Wnt シグナルに作用して dentinogenesis に関与することは十分に考えられ，これまでに象牙芽細胞の分化や機能に関して ectodin と Wnt シグナルの関係について研究されているが不明な点が多い。本研究ではラット切歯から分離した培養歯髓細胞を利用して ectodin と Wnt シグナルの関係が dentinogenesis に対してどのように作用しているかを調べることを目的とした。

材料と方法：Sprague-Dawley(SD)ラットの下顎切歯から酵素法によって分離した培養歯髓細胞を 5,10,15,20 日間培養し実験に使用した。これらの培養細胞に塩化リチウム (LiCl) を添加して Wnt シグナル活性化状態にし，象牙芽細胞の分化，機能に対する影響を調べた。ALP 染色と von Kossa 染色を行い象牙質様石灰化結節の形成状況を調べた。象牙芽細胞の分化指標として，alkaline phosphatase(ALP)，bone gla protein (BGP)，dentin sialophosphoprotein (DSPP)，ectodin の mRNA 発現も合わせて調べた。また，ectodin の short hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターを作製してノックダウンを行い，分化に及ぼす影響を調べた。

結果と考察：培養歯髓細胞に LiCl を添加するとその分化が抑制され，ALP，DSPP，BGP の mRNA の発現が抑制さ

れ，象牙質様石灰化結節の形成も抑制された。Ectodin mRNA 発現が培養 10 日目（分化初期）で促進され，Wnt シグナルに対するネガティブフィードバック機構があることが示唆された。Ectodin の shRNA 発現ベクター導入によるノックダウンの結果，培養歯髄細胞の DSPP の mRNA 発現が抑制され象牙質様石灰化結節の形成も抑制された。これらの結果から Wnt シグナルは象牙芽細胞の分化を抑制しており，このシグナルを ectodin が分化初期において阻害することによって象牙芽細胞の分化を調節していることが示唆された。

結論：Ectodin は象牙芽細胞の分化調節因子である。

キーワード：ectodin, 歯髄細胞, dentinogenesis,
Wnt シグナル, ラット

緒言

Ectodin (Sostdc-1, Wise, USAG-1)は分泌型タンパク質¹⁾であり, Wnt タンパクおよび Bone morphogenic protein(BMP)のアンタゴニストとしての作用している。すなわち ectodin は Sclerostin-encoding ドメインを有することから, Wnt シグナルの co-receptor である LRP6 に結合して Wnt1, Wnt3a や Wnt10b などのリガンドの LRP5/6 への結合を阻害して Wnt シグナル を抑制することが知られている^{2,3)}。そのため ectodin は Wnt とともに多くの組織に発現しており, 発生初期においては外胚葉の表層⁴⁾, 鰓弓⁵⁾, 毛嚢⁶⁾や腎臓⁷⁾などにみられ組織, 臓器の形態形成に関与している。また, 歯胚においても歯数や咬頭の数の決定因子として注目されている¹⁾。

一方, 成体の歯髄組織においても Wnt シグナルは dentinogenesis に重要な役割を果たし、象牙芽細胞の分化を調節して修復象牙質の形成に深く関与するため^{1,3,5)}, 齲蝕や破折などにより損傷を受けた歯髄の再生, 回復を図る vital pulp therapy 開発の手がかりになると思われる。これまでに Yokose ら⁸⁾は Wnt シグナルの最終過程で機能する Lef-1 が象牙芽細胞の分化を促進することを示しており, 門倉ら⁹⁾は歯髄細胞に塩化リチウム(LiCl)を作用させ, β -catenin のプロテアソームによる分解を阻害すると, Wnt シグナルのカスケードであるカノニカル経路が活性化されて, 歯髄細胞の象牙芽細胞への分化が抑制されることを明らかにしている。門倉らはさらに, 象牙質・歯髄複合体が傷害を受けた際の修復象牙質形成にも Wnt シグナルが関与することを報告している⁹⁾。それとともに門倉らの報告⁹⁾は, Wnt のアンタゴニストである ectodin の発現が β -catenin の核内蓄積で生じ, Wnt シ

グナルを抑制することを示唆している。しかしながら、ectodin が Wnt シグナルを抑制して象牙芽細胞の分化を調節することについての詳細は未だ解明されていない。

本研究においては今後の vital pulp therapy 開発の手がかりを得るために、ectodin が歯髄細胞の象牙芽細胞への分化にいかなる影響を及ぼしているかを調べることを目的として、ラット切歯から分離した培養歯髄細胞を用いた実験を行った。

材料および方法

1. 細胞分離

歯髄細胞の分離ならびに培養は Yokose ら¹⁰⁾の方法に従って行った。すなわち 5 週齢の雌性 Sprague-Dawley(SD)ラット 5 匹から、イソフルラン麻酔下に下顎切歯を摘出し、その後、無菌的に切歯を分割して歯髄組織を採取した。本研究は奥羽大学動物実験委員会規定および明海大学動物実験委員会規程を遵守し、両大学の動物実験委員会の承認を得てから行った。採集した歯髄組織は 1 mm 角に細切したのち、0.1% collagenase, 0.05% trypsin, 4 mmol/l EDTA-2Na (いずれも和光純薬, 大阪) 添加 10mmol phosphate buffered saline (PBS, ニッスイ製薬, 東京) からなる酵素液 3 ml を入れたコニカルチューブ (Falcon Labware, NJ, USA) の中に投入した。その後、コニカルチューブを 37℃ で 20 分間震盪してから、細胞を含む酵素液を回収、遠心分離して細胞を集めた。その後、再び新しい酵素液をコニカルチューブに加えて同様の処理により細胞を回収した。この細胞回収の行程を 6 回くり返した。分離した歯髄細胞を 37℃, 5% CO₂ 環境下で、直径 150mm プラスチックシャーレ (Falcon Labware, NJ, USA) にて 10% 仔牛血清, ペニシリン G カリウム (100IU/ml, 明治製薬, 東京), および硫酸ストレ

プトマイシン(100 μ g/ml, 明治製薬)を添加した α -minimam essential medium (α -MEM 培地, Gibco Laboratories, NY, USA)で培養した。細胞が subconfluent に達したところで, 0.05% trypsin, 4 mmol/l 2 Na EDTA を含む PBS 酵素液で細胞を剥離, 分散して回収した。

2. 細胞培養

分離採集した歯髓細胞を 6-multi well plate (Falcon Labwar, NJ, USA)に 4×10^5 cells/well の細胞密度で播種し, 10% 仔牛血清, 1 mmol/l β -グリセロリン酸 (和光純薬), および 50 μ g/ml のアスコルビン酸 (和光純薬)を添加した α -MEM 培地で 37.0 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 環境下で 20 日間培養した。なお, 培養液は 2 日ごとに交換した。

3. 塩化リチウム (LiCl) の添加

実験群 (LiCl 群) の細胞は, 培養開始後 3 日目から 5 日目にかけて培養液に LiCl (和光純薬) を 10 mmol/l の濃度で添加して培養し, その後は LiCl を含まない培養液で培養した。対照群の細胞は LiCl を含まない培養液で培養した。おのおの培地は 2 日ごとに交換した。

4. アルカリホスファターゼ (ALP) 染色と von Kossa 染色

培養細胞の石灰化状態について ALP 酵素組織化学的染色および von Kossa 鍍銀染色で二重染色を行い検討した。6-multi well plate にて培養した各細胞を PBS にて洗浄した後, ただちに室温で 10% 中性ホルマリンにて 5 分間固定し, 再び PBS にて洗浄してから naphthol AS-MX phosphate (Sigma, MO, USA) と fast blue BB salt (Sigma, MO, USA) を含む反応液を室温で 20 分間反応させた。その後, 細胞を蒸留水で洗浄し, 日光を照射させつつ 5% 硝酸銀水溶液と 20 分間室温で反応させた後, 5% チオ硫酸ナトリウム水溶液と 2 分間反応させ, その後再度蒸

留水で水洗してから，顕微鏡で観察した。

5. リアルタイム定量的 PCR 法

6 -multiwell plate の各細胞の total RNA を，EASY Prep RNA Kit (タカラバイオ，東京)により抽出し，残存ゲノム DNA の分解除去のために DNase 1 (タカラバイオ)にて処理した。その後，RT-PCR kit (タカラバイオ)を用いて，逆転写酵素とランダムプライマーにて 500ng の total RNA から cDNA を合成し，次いで cDNA を鋳型としたリアルタイム qPCR を行った。プライマー濃度は SYBER Green Premix (タカラバイオ)12.5 μ l 中 2.5pmol とし，最終的には 25 μ l で反応させた。SYBER Green PCR 増幅とリアルタイムの蛍光検出には，Smart Cycler System (タカラバイオ)を用いた。PCR 反応は，95 $^{\circ}$ C，5 秒間，60 $^{\circ}$ C，25 秒間 の two-step method にて 40 サイクル行った。なお，各遺伝子発現に関する標準化は β -actin を内部対照とした。各プライマーの塩基配列は，以下の通りである。*Dentin sialophosphoprotein (DSPP)*: 5'-CTC AGT TAG TGC CGC TGG AGA-3'， 5'-GAA TCG TCG TTA GTG GCG TTG-3'；*Bone Gla protein(BGP)*: 5'-AGA CTC CGG CGC TAC CTC AA-3'， 5'-CGT CCT GGA AGC CAA TGT G-3'；*Alkaline phosphatase (ALP)*: 5'-TTG AAT CGG AAC AAC CTG CTG AC-3'， 5'-GAT GAT GGC CTC ATC CAT CTC CAC-3'；*Ectodin*: 5'-GAA TGG AGG CAG GCA CTT CAG-3'， 5'-ACT GGC CAT CCG AGA TGT ATT TG-3'； *β -catenin*: 5'-GCT GAC CAA ACT GCT AAA TGA CGA-3'， 5'-TGT AGG GTC CCA ACG GTA CAA-3'； *β actin*: 5'-TGA CAG GAT GCA GAA GGA GA-3'， 5'-TAG AGC CAC CAA TCC ACA CA-3'。これらのプライマーを用いて，それぞれの mRNA に対する特異的な cDNA の定量をお

こない内部標準として用いた β -actin に対する cDNA の相対量として補正した。培養 5, 10, 15, 20 日目に PCR のための試料採取を行い, PCR 産物の融解曲線の分析により, 単一ターゲット産物であることを確認した。

6. Ectodin の knock down 法

ラットの Ectodin の mRNA に対する knock down は siRNA expression vector (pBasi mU6Pur DNA; タカラ) を用いて行い, ターゲットとなる塩基配列は 5'-GGA TCG AAA TAG TCG AGT T-3' とした。製作した vector を培養 5 日目に培養歯髄細胞に対して Gene PulserXcell (Bio-Rad 社製, CA, USA) を用いたエレクトロポレーション法で導入した。導入条件はマニュアルの通りとした (Square wave, 15msec 100V)。なお, knock down の対照群として非発現性のコントロール vector を用いて同様に培養細胞に遺伝子導入した。遺伝子導入後直ちに 6-multi well plate に細胞を播種し, その後 20 日間培養してから実験に用いた。Knock down の効果は遺伝子導入後 7 日前後に見られる⁸⁾ことより, 培養 5 日目の ectodin mRNA の発現量を測定した。

7. 統計学的分析

統計学的分析には Unpaired *t*-test を用い, $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

結 果

1. 培養歯髄細胞の分化に及ぼす LiCl の影響

培養 20 日後の対照群の細胞は ALP 染色で中等度陽性であり, von Kossa 染色陽性の石灰化結節が多数形成されていた。一方, LiCl 群では対照群と比較して石灰化結節の数が少なく, ALP 染色も弱陽性であった (図 1)。

培養 5 日目における LiCl 群の ALP の mRNA 発現量は

対照群の約 50%となった (図 2 a)。また, 石灰化のマーカーである DSPP(図 2 b)と BGP (図 2 c) いずれの mRNA 発現も, 培養 20 日目で対照群に比較すると 50% 少なかった。

対照群の *ectodin* の mRNA 発現は, 培養 5 日目から 10 日にかけて上昇し, その後経時的に発現が減少した (図 3 a)。これと同様に β -catenin の mRNA も培養 10 日目に発現のピークがみられ, その後次第に減少した (図 3 b)。Ectodin と β -catenin の mRNA 発現が最も多くみられた培養 10 日目において, 実験群の *ectodin* 発現量は対照群の発現量の約 2 倍であった (図 4 a)。また, β -catenin の mRNA の発現量も対照群に比較して約 30%増加していた (図 4 b)。

2. Ectodin の knock down が象牙芽細胞様細胞に及ぼす影響

Ectodin を knock down して 5 日間培養した歯髄細胞における *ectodin* と β -catenin の mRNA 発現を図 5 に示す。*Ectodin* を knock down した細胞での *ectodin* 発現は knock down していない細胞と比較して約 15%に抑制されており, knock down 効果が確認できた (図 5 a)。このときの β -catenin の mRNA は非 knock down 細胞に比較して有意に増加していた (図 5 b)。一方、*ectodin* knock down 後 20 日目における DSPP の mRNA 発現量は非 knock down 細胞に比較して約 40%に抑制されており (図 5 c), von Kossa 染色では *ectodin* を knock down した 20 日後の細胞は非 knock down 細胞に比較して石灰化結節の個数が減少していた (図 6)。

考 察

象牙芽細胞の分化は多くの細胞成長因子によって制御されていることが知られているが^{11,12)}, 最近特に Wnt シ

グナルが歯の発生のみではなく歯髄の再生過程にも重要であることが解明されてきた^{8,9,13)}。Wnt シグナルのカスケードにはカノニカル経路 (β -catenin 経路) と非カノニカル経路 (PCP 経路と Ca^{2+} 経路) がある。門倉ら⁹⁾ は Wnt シグナルのうち古典的なカスケードであるカノニカル経路が象牙芽細胞の分化に重要な役割を果たしており、歯髄培養細胞と LiCl を用いた実験からカノニカル経路にはネガティブフィードバック機構がある可能性を示し、その機構に ectodin が関与することを報告した。しかし、ectodin が具体的にどのように象牙芽細胞の分化に作用するのかは不明であることから、本研究ではここに焦点を当てた。本研究に用いた培養系は既に Yokose ら¹⁰⁾ によって確立されている。すなわち、その培養系は歯髄組織に存在する未分化な細胞を象牙芽細胞様細胞に分化し、象牙質様の石灰化結節を形成させる培養系である。

初めに Wnt シグナルのカノニカル経路すなわち β -catenin を GSK3 β がリン酸化、ユビキチン化してプロテアソームで分解する経路と象牙芽細胞分化との関係を調べるために、 β -catenin のリン酸を抑制する LiCl を添加したところ、象牙芽細胞の初期分化マーカーである ALP の mRNA 発現、最終分化マーカーである石灰化結節の形成、ならびに DSPP および BGP の mRNA の発現がいずれも低下したことから、象牙芽細胞への分化が抑制されたことが明らかになった。LiCl は GSK3 β を阻害することによって β -catenin のリン酸化を抑制し、プロテアソームによる β -catenin の分解を阻害して、 β -catenin の核内蓄積を亢進させることが知られている^{14,15)}。すなわち LiCl 添加により Wnt シグナルのカノニカル経路が活性化した状態が維持される。

Wnt のカノニカル経路の活性化は象牙芽細胞の分化を

抑制することが明らかにされている。Schellerら¹⁹⁾は β -catenin を培養歯髄細胞に強制発現させ、Wntシグナルを活性化すると象牙芽細胞の分化マーカーである DSPP の mRNA の発現が低下して、石灰化結節の形成が抑制されると報告している。一方、Limら²⁰⁾は Wnt chaperon protein である wntless の発現を低下させて Wntシグナルを抑制したトランスジェニックマウスを調べたところ、歯髄腔の狭窄や象牙質の形成が亢進することを報告している。これらの報告は Wntシグナルのカノニカル経路を活性化すると象牙芽細胞分化が抑制されることを示しており、本研究で LiCl を添加して Wntシグナルを活性化したときに象牙芽細胞様細胞の分化が抑制された結果を支持するものである。

硬組織形成における Wntシグナルの影響は骨芽細胞でも研究されている。van Buchem 病で報告されているように Wntシグナルの活性化により骨芽細胞による骨形成は亢進され、骨硬化症 (sclerosteosis) を示す¹⁶⁾。さらに培養骨芽細胞において Wnt1 や Wnt3a といったカノニカル経路を活性化するリガンドは骨芽細胞への分化を亢進させることを報告している^{17,18)}。しかしながら、象牙芽細胞分化に対するカノニカル経路の作用と、骨芽細胞分化に対するそれとが異なる理由については未だ解明されておらず、今後の研究が必要である。

Ectodin には BMP と結合する性質があり、SOST ドメインが含まれていることから、BMP と複合体を形成した ectodin は LRP4 に結合して Wntカノニカル経路を阻害することが知られている^{1,5,21)}。つまり ectodin は sclerostin と並んで Wnt1, 3a, 10b のシグナルのアンタゴニストになっている^{9,22~24)}。門倉らは LiCl 添加により β -catenin のリン酸化が抑制されることを示しており、このことは

β -catenin のプロテアソームでの分解が抑制されていることを示唆している。本研究ではさらに LiCl 添加により β -catenin の mRNA 発現が亢進することが明らかになったことから、LiCl 添加のより β -catenin の核内蓄積が起きていると考えられる。これによりカノニカル経路の活性化が引き起こされていると考えられ、この時 ectodin の mRNA 発現が亢進した。これは、LiCl 添加による Wnt シグナルの異常亢進に対応する ectodin によるネガティブフィードバック機構が象牙芽細胞様細胞に存在することを示唆している。事実、門倉ら⁹⁾によっても同様に LiCl 添加後に象牙芽細胞様細胞での ectodin の mRNA 発現が亢進することが報告されている。さらに ectodin が象牙芽細胞分化にどのように影響しているかを具体的にするために ectodin に対する siRNA を作製し、ectodin 発現の knock down を行った。ここで重要なことは、本研究に用いた発現 vector はマウスの U6 promotor を用いたもので、この方法による knock down 効果は遺伝子導入後 7 日前後にみられることである⁸⁾。本研究における培養 5 日目の real time PCR の結果から、ectodin の mRNA 発現が siRNA により knock down されたことが確認できた。

Ectodin knock down 細胞の培養 20 日後には、象牙芽細胞の、最終分化の指標である石灰化結節や DSPP の発現が明らかに抑制されていた。これは ectodin により Wnt シグナルが抑制されていたが、knock down により ectodin が Wnt シグナルを抑制する効果がなくなり Wnt シグナルの活性化状態が継続し、その結果象牙芽細胞の分化が抑制されたと考えられる。Ectodin を knock down された歯髄細胞は培養 5 日目において、興味あることに β -catenin の mRNA 発現量が対照群に比較して増加している。これは明らかに Wnt シグナルのカノニカル経路の

活性化を示している。一般に、Wntは主にオートクライン、パラクラインで働くことが知られていることから²¹⁾、培養歯髄細胞がWntリガンドを産生していると考えられる。

Ectodin発現が培養10日目という分化初期段階で一過性に上昇することと、shRNAのtransientな作用から考えると、ectodinのWntシグナル抑制作用による象牙芽細胞の分化調節機構は分化の比較的初期段階で作用していると考えられた。Limら²⁰⁾は象牙芽細胞においてWntシグナルがRunx2を誘導し、dentin sialoproteinの発現を抑制することで、象牙芽細胞分化を抑制するメカニズムを明らかにしている。おそらく本研究でみられたectodinの作用も、WntシグナルによるRunx2発現に影響することにより象牙芽細胞の分化を間接的に調節していると考えられる。しかし、本研究ではRunx2とectodinとの関係については検討していないため、ectodinがRunx2発現にどのように作用しているかについて今後新たな研究が必要である。

結 論

本研究においてectodinが象牙芽細胞の分化に及ぼす影響について以下の知見が得られた。

1. Ectodinは培養10日目で発現量が最大となった。
2. LiClの添加により象牙芽細胞分化が抑制される条件において、ectodin発現レベルは上昇した。
3. Ectodinの発現をknock downして抑制すると象牙芽細胞分化が抑制され、ectodinによるWnt/ β -catenin経路の亢進に対してのネガティブフィードバック機構の存在が示唆された。

以上よりectodinは培養初期段階で作用し、Wntシグナルを通して象牙芽細胞様細胞の分化を調節しているこ

とが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるに鑑み、ご指導、ご協力を頂いた明海大学歯学部 機能保存回復学講座 保存治療学 横瀬敏志教授に衷心より感謝の意を表します。また、奥羽大学歯学部 歯科保存学講座 保存修復学分野の先生方に感謝致します。

参考文献

1. Kasai Y., Munne P., Hotta Y., Penttila E., Kavanagh K., Ohbayashi N., Takada S., Thesleff I., Jernvall J., Itoh N. : Regulation of mammalian tooth cusps patterning by ectodin. *Science* **309** ; 2067-2070 2005.
2. Linten K.B., Guidato S., Rowe A., Saldanha J.W., Itasaki N. : Characterization of wise protein and its molecular mechanism to interact with both Wnt and BMP signals. *J. Biol. Chem.* **284** ; 23159-23168 2009.
3. Munne P.M., Tummers M., Jarvinen E., Thesleff I., Jernvall J. : Tinkering with the inductive mesenchyme: Sostdc uncovers the role of dental mesenchyme in limiting tooth induction. *Development* **136** ; 393-402 2009.
4. Itasaki N., Jones C.M., Mercurio S., Rowe A., Domingos P.M., Smith J.C., Krumlauf R. : Wise, a context-based activator and inhibitor of Wnt signaling. *Development* **130** ; 4295-4305 2003.
5. Laurikkala J., Kasai Y., Pakkasjarvi L., Thesleff I., Itoh N. : Identification of secreted BMP antagonist, ectodin, integrating BMP, FGF, and SHH signals from the tooth enamel knot. *Dev. Biol.* **264** ; 91-105 2003.
6. Närhi K., Jarvinen E., Birchmeier W., Taketo M.M., Mikkola M.L., Thesleff I. : Sustained epithelial beta-catenin activity induces precocious hair development but disrupts hair follicle down-growth and hair shaft formation. *Development*. **135** ; 1019-1028 2008.
7. Tanaka M., Endo S., Okuda T., Economides A.N., Valenzuela D.M., Murphy A.J., Robertson E., Sakurai T., Fukatsu A., Yancopoulos G.D., Kita T., Yanagita M. :

- Expression of BMP-7 and USAG-1 (a BMP antagonist) in kidney development and injury. *Kidney Int.* **73** ; 181-191 2008.
8. Yokose S., Naka T. : Lymphocyte enhancer-binding factor 1: an essential factor in odontoblastic differentiation of dental pulp cells enzymatically isolated from rat incisors. *J. Bone Miner. Metab.* **28** ; 650-658 2010.
 9. 門倉弘志, 山崎崇秀, 和田康弘, 菊井徹哉, 西村 翼, 廣瀬公治, 天野義和, 横瀬敏志 : 塩化リチウムによる β -catenin のリン酸化阻害がラット象牙芽細胞分化と ectodin 発現に及ぼす影響について. *日歯保存誌* **56** ; 231-238 2013.
 10. Yokose S., Kadokura H., Tajima Y., Fujieda K., Katayama I., Matsuoka T., Katayama T. : Establishment and characterization of a culture system for enzymatically released rat dental pulp cells. *Calcif. Tissue Int.* **66** ; 139-144 2000.
 11. Ten Cate A.R., Sharpe P.T., Roy S., Nanci A. : Development of tooth and its supporting tissues. Ten Cate A.R. *Oral histology* 6th ed. 79-110. Mosby St. Louis 2003.
 12. Nanci A. : Dentin-pulp complex. Ten Cate A.R. *Oral histology* 6th ed. 192-139. Mosby St. Louis 2003.
 13. Naka T., Yokose S. : Spatiotemporal expression of sclerostin in odontoblasts during embryonic mouse tooth morphogenesis. *J. Endo.* **37** ; 340-345. 2011.
 14. Klein P.S., Melton D.A. : A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93** ; 8455-8459 1996.

15. Hedgepeth C.M., Conrad L.J., Zhang J., Huang H-C., Lee V.M.Y., Klein P.S. : Activation of the Wnt signaling Pathway : A molecular mechanism for lithium action. *Dev. Biol.* **185** ; 82-91 1997.
16. Stephen L.X., Hamersma H., Gardner J., Beighton P. : Dental and oral manifestations of sclerosteosis. *Int. Dent. J.* **51** ; 287-290 2001.
17. Gaur T., Lengner C.J., Hovhannisyan H., Bhat R.A., Bodine P.V., Komm B.S., Javed A., van Wijnen A.J., Stein J.L., Stein G.S., Lian J.B. : Canonical WNT signaling promotes osteogenesis by directly stimulating Runx2 gene expression. *J. Biol. Chem.* **280** ; 33132-33140 2005.
18. Kang S., Bennett C.N., Gerin I., Rapp L.A., Hankenson K.D., Macdougald OA. : Wnt signaling stimulates osteoblastogenesis of mesenchymal precursors by suppressing CCAAT/enhancer-binding protein alpha and peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J. Biol. Chem.* **282** ; 14515-14524 2007.
19. Scheller E.L., Chang J., Wang C.Y. : Wnt/beta-catenin inhibits dental pulp stem cell differentiation. *J. Dent. Res.* **87** ; 126-130 2008.
20. Lim W.H., Liu B., Cheng D., Hunter D.J., Zhong Z., Ramos D.M., Williams B.O., Sharpe P.T., Bardet C., Mah S.J., Helms J.A. : Wnt signaling regulates pulp volume and dentin thickness. *J. Bone Miner. Res.* **29** ; 892-901 2014.

21. Ohazama A., Johnson E.B., Ota M.S., Choi H.Y., Porntaveetus T., Oommen S., Itoh N., Eto K., Gritli-Linde A., Herz J., Sharpe P.T. : Lrp4 modulates extracellular integration of cell signaling pathways in development. *PLos One* **3** ; e4092 2008.
22. Yanagita M., Oka M., Watabe T., Iguchi H., Niida A., Takahashi S., Akiyama T., Miyazono K., Yanagisawa M., Sakurai T. : USAG-1: a bone morphogenetic protein antagonist abundantly expressed in the kidney. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **316** ; 490-500 2004.
23. Beaudoin G.M. 3rd, Sisk J.M., Coulombe P.A., Thompson C.C. : Hairless triggers reactivation of hair growth by promoting Wnt signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102** ; 14653-14658 2005.
24. Thompson C.C., Sisk J.M., Beaudoin G.M. 3rd. : Hairless and Wnt signaling: allies in epithelial stem cell differentiation. *Cell Cycle.* **5** ; 1913-1917 2006.

図表の解説

図 1 : 培養 20 日目の石灰化結節形成の様相を示す。

a: 対照群では象牙質様石灰化結節が多数形成されている。
b: 対照群の強拡大像。c: LiCl 群では石灰化結節の形成数が少ない。d: LiCl 群の強拡大像。上段は肉眼的所見、下段は顕微鏡所見(スケールバー = 200 μ m)を示す(ALP と von Kossa 染色)。

図 2 : LiCl 添加群の培養歯髓細胞における mRNA 発現様相。a: ALP (培養 5 日目), b: DSPP (培養 20 日目), c: BGP (培養 20 日目) を示す。* : $P < 0.0001$

図 3 : 対照群 (LiCl 無添加) における培養歯髓細胞の経時的 mRNA の発現様相を示す。

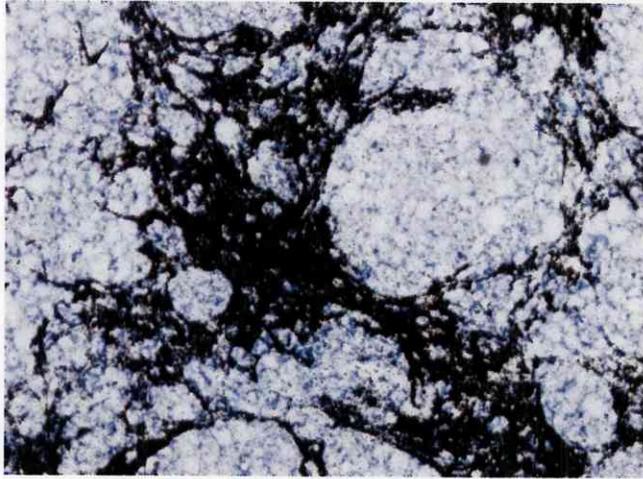
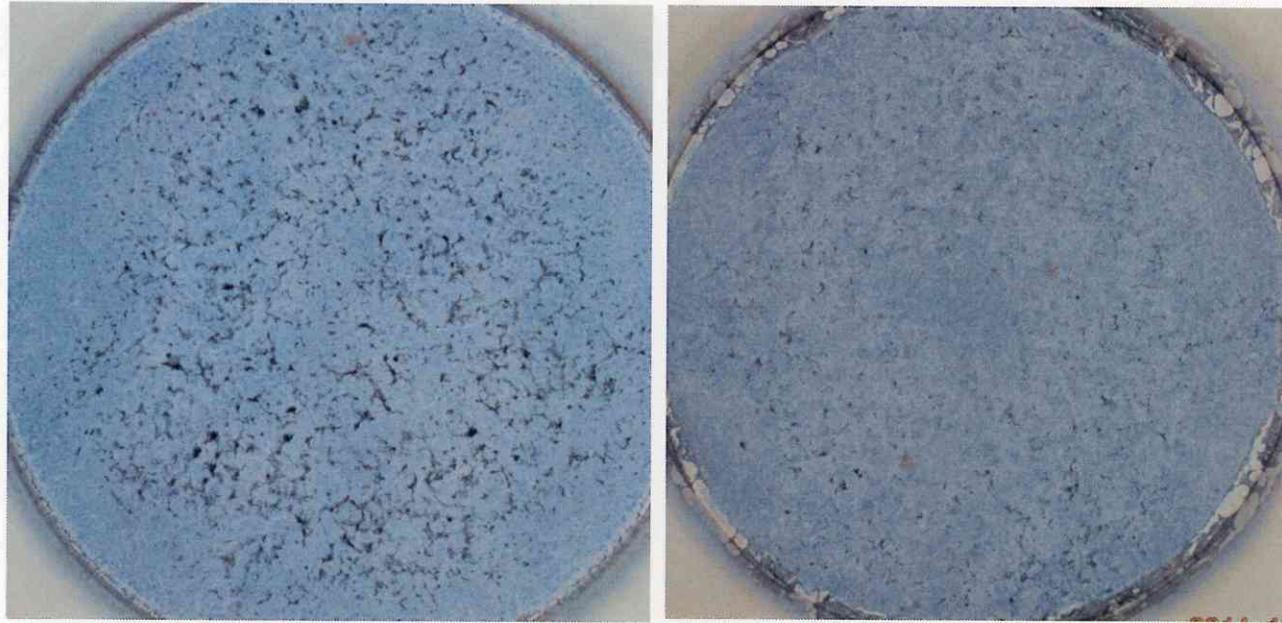
a: 経時的な ectodin の mRNA 発現変化。b: 経時的な β -catenin の mRNA 発現変化。内部標準 β -actin と比較した相対量を示す。* : $P < 0.0001$

図 4 : LiCl 添加群の培養 10 日目の ectodin(a)と β -catenin(b)の mRNA の相対発現量を示す。* : $P < 0.0001$

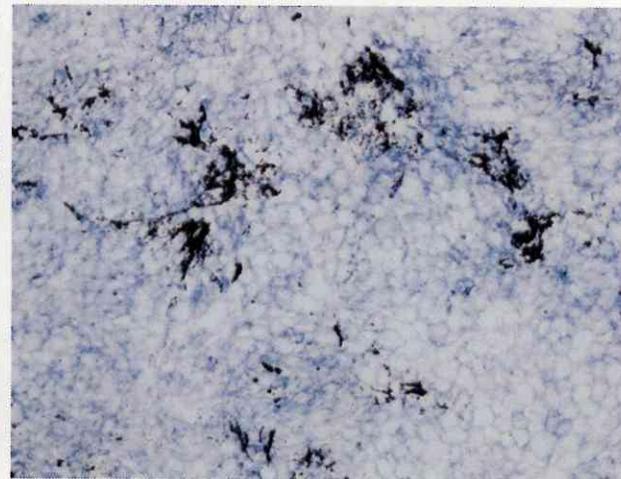
図 5 : siRNA による ectodin knock down 時の培養 5 日目における ectodin(a)と β -catenin(b)の mRNA 相対発現量を示す。c: ectodin knock down 時の培養 20 日目の DSPP mRNA 発現相対量を示す。* : $P < 0.0001$

図 6 : siRNA による ectodin knock down 時の培養 20 日目における象牙質様石灰化結節の形成様相を示す。

a: 対照群, b: ectodin knock down 群の肉眼的な所見を示す (ALP と von Kossa 染色所見)。



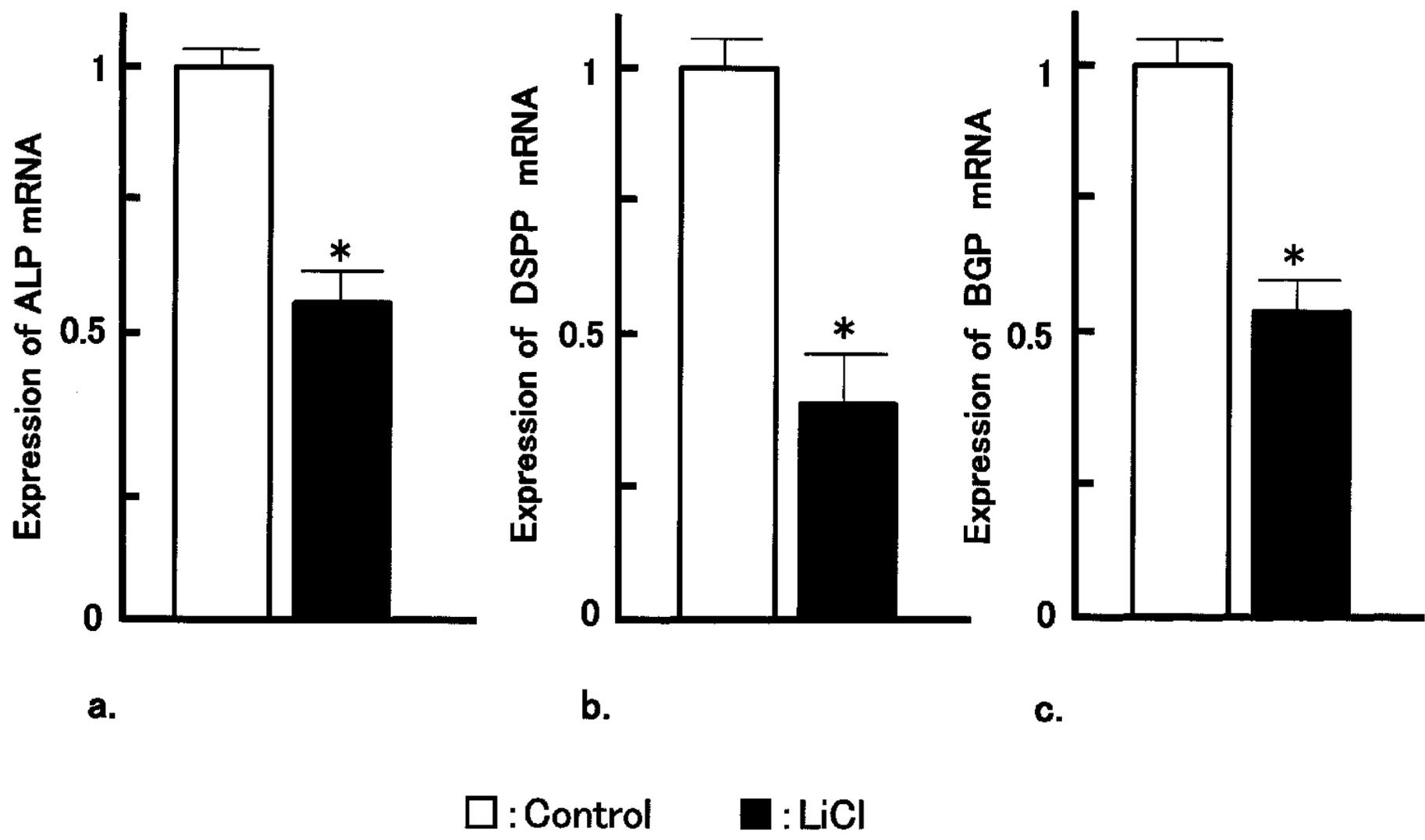
Control

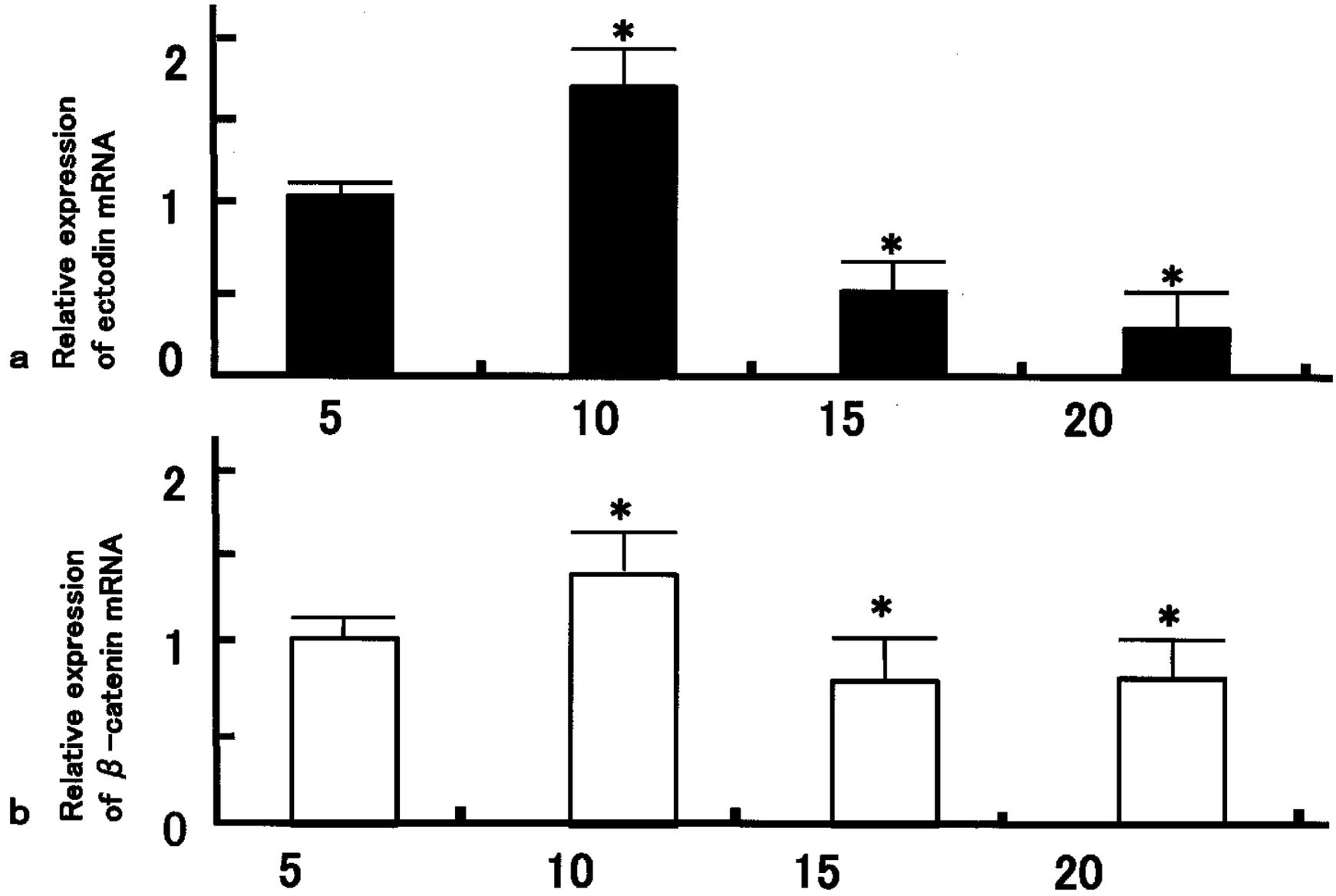


LiCl

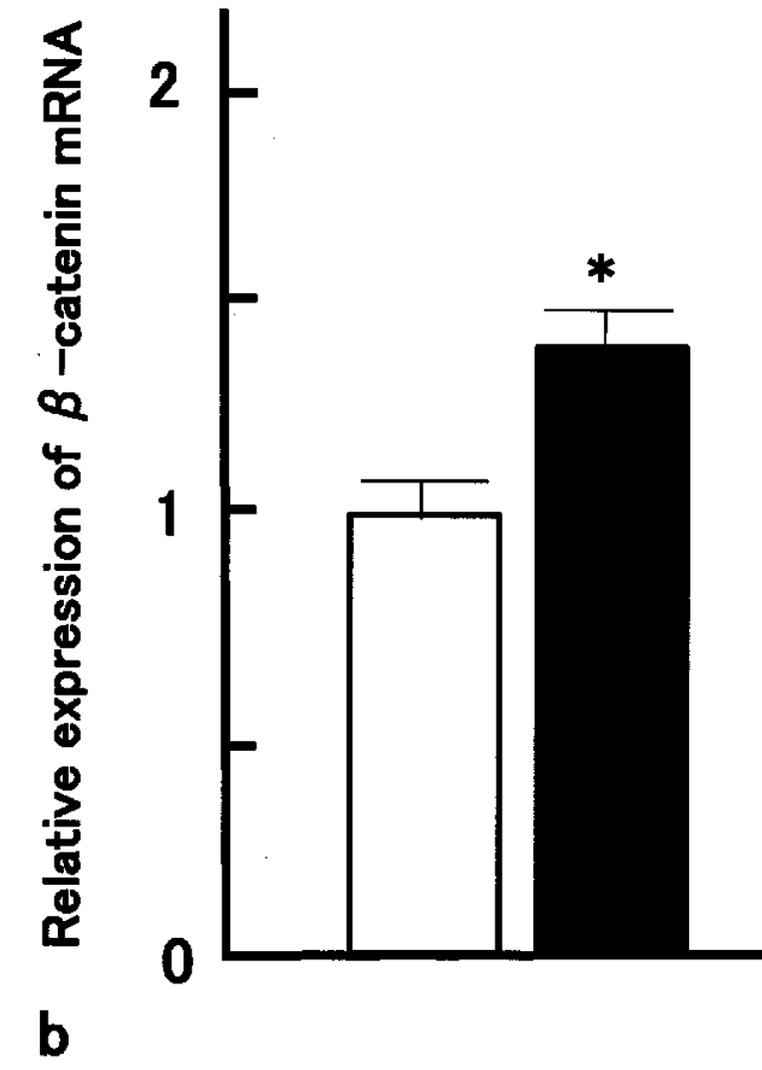
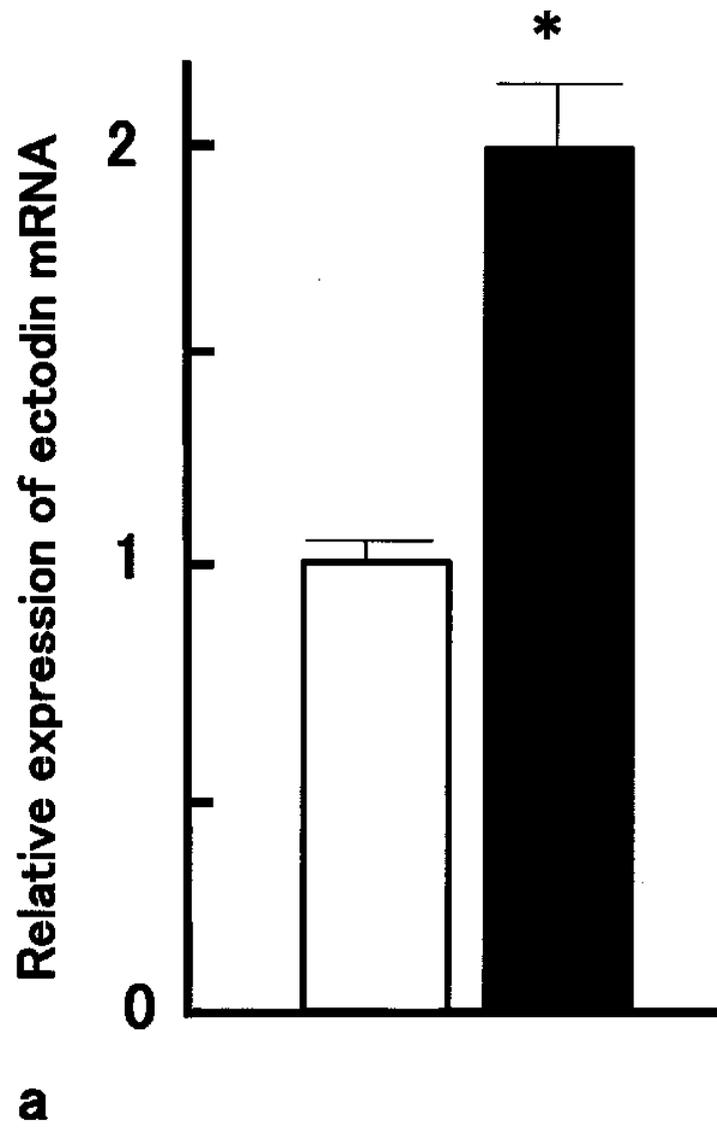
200μm

图 1





3



4

□ : Control

■ : LiCl

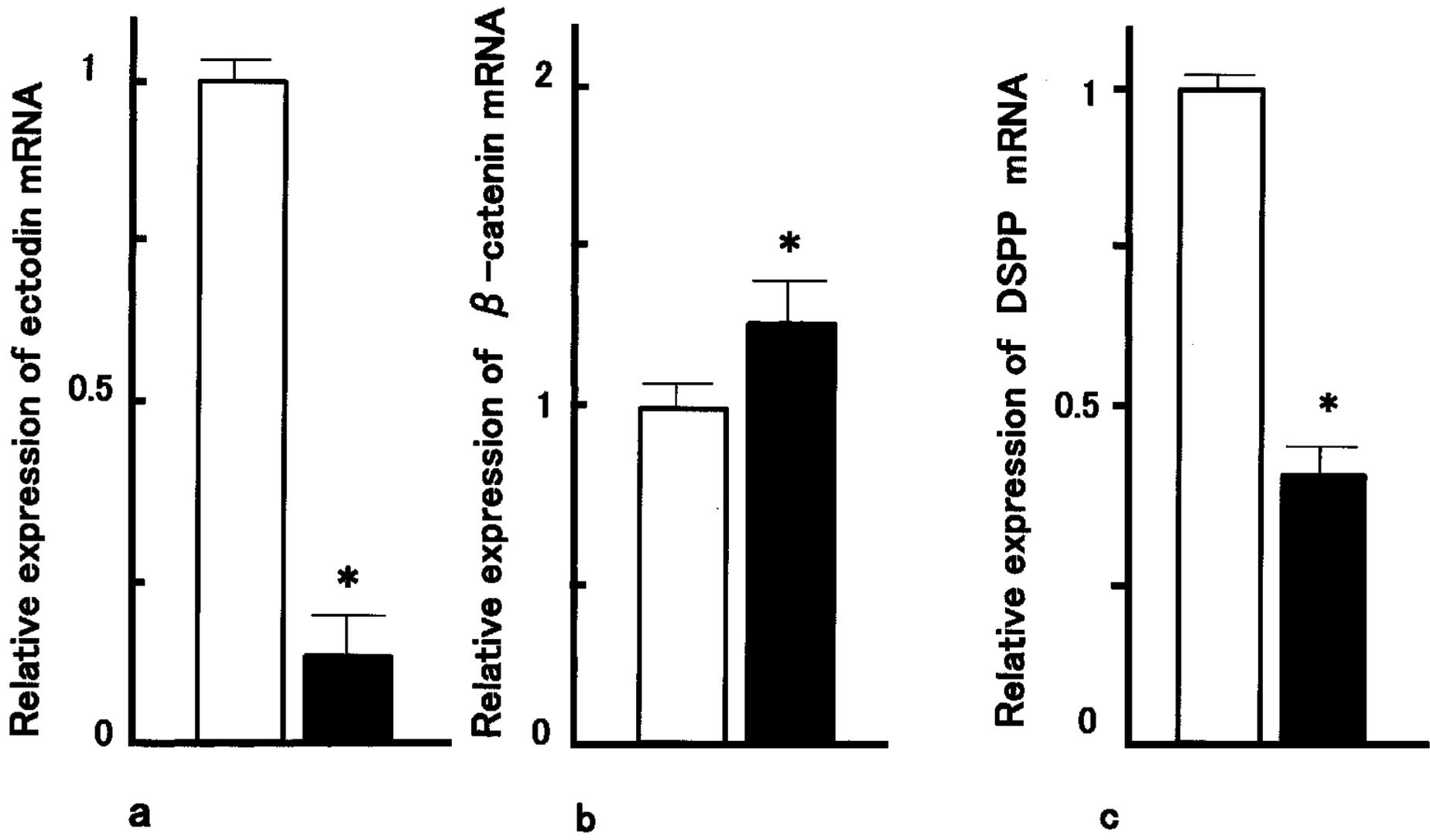


图 5

□: Control ■: Ectodin knock down



a Control



b Ectodin knock down

图6