



Title	ヒト SNP 解析による根尖性歯周炎関連遺伝子の同定およびその機能解析
Author(s)	成瀬, 陽菜
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/69503
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

ヒト SNP 解析による根尖性歯周炎関連遺伝子の同定
およびその機能解析

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻（歯科保存学教室）
(指導教員：林 美加子教授)

成瀬 陽菜

本論文の一部は、第 145 回日本歯科保存学会（2016 年 10 月、長野）およ
び第 146 回日本歯科保存学会（2017 年 6 月、青森）において発表した。

目次

I. 緒言	1
II. 材料および方法	
1. 根尖性歯周炎罹患者の SNP 解析	4
2. マウス根尖性歯周炎モデル	5
3. Wnt/ β -catenin シグナルの抑制が根尖病変形成に及ぼす影響 についての <i>in vivo</i> 実験による評価	5
4. Wnt/ β -catenin シグナルの活性化が根尖病変形成に及ぼす影響 についての <i>in vivo</i> 実験による評価	6
5. 根尖病変体積の測定	6
6. 標本作製	7
7. Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色法による根尖病変およびその周囲骨 の観察	7
8. TRAP 染色法による根尖病変およびその周囲骨の破骨細胞の観察	8
9. <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション法による根尖病変およびその周囲骨 の遺伝子発現の観察	8
10. 蛍光免疫染色法による根尖病変およびその周囲骨のタンパク発現の 観察	9
III. 結果	
1. 根尖性歯周炎罹患者の SNP 解析	11
2. Wnt/ β -catenin シグナルの抑制が根尖病変形成に及ぼす影響	12
3. Wnt/ β -catenin シグナルの活性化が根尖病変形成に及ぼす影響	13
IV. 考察	15
V. 結論	21

VI. 謝辞	22
VII. 参考文献	23
X. 図表	38

I. 緒言

根尖性歯周炎は、根管内のバクテリアなどの外来性因子が根尖孔を通じて宿主内に侵入することにより生じる [1, 2]. 侵入してきた外来性因子をマクロファージや樹状細胞などの抗原提示細胞が貪食し、抗原提示することで T 細胞が活性化される [3-6]. 活性化した T 細胞は様々な液性因子を分泌し、宿主免疫応答を誘導し、バクテリアなどの侵入を阻止する [3]. また、分泌された液性因子は骨芽細胞や破骨細胞前駆体などにも作用し、破骨細胞の分化を誘導する [4, 7-9]. その結果、根尖性歯周炎に認められる根尖周囲歯槽骨の吸収が生じる [10, 11]. このように宿主側の免疫応答、そして免疫応答によって引き起こされる骨恒常性の偏りにより根尖性歯周炎が生じる [12, 13].

近年、様々な多因子疾患において一塩基多型 (SNP) による疾患関連遺伝子の特定が展開されてきている. SNP とは、ある生物種集団のゲノム塩基配列中に 1 塩基変異が多様性を持って認められ、その変異が集団内で 1% 以上の頻度で認められるものの呼称である. SNP は 300 bp~1000 bp に 1 個の割合で出現し、人種差を認め、疾患との関連性を見出すことで、病態の解明、創薬の足がかりとなることが期待されている [14-16]. 根尖性歯周炎において、アメリカの研究グループは *IL-1 β* , *MMP-2*, *MMP-3*, *TLR4* および *HSP70* が、ブラジルの研究グループ

ープは *CD14* が発症と関連していると報告しているが、日本人における報告は未だない [17-26]。日本においても全身疾患では研究が進められており、Wnt の共役受容体である *LRP5* の SNP (A1330V) の変異は骨粗鬆症患者に認められていることが知られている [27-40]。この SNP は欧米、南米をはじめ他人種においても骨粗鬆症の疾患関連遺伝子であることが判明している [27-40]。

ところで、*LRP5* が属する Wnt/ β -catenin シグナル経路は骨恒常性の維持に大きく関与していることがわかってきており [41, 42]。Wnt ファミリータンパクは、体軸パターンの形成、体節の形成、尾芽形成に必要不可欠な分泌性糖タンパク質である [43, 44]。また、Wnt ファミリータンパクは、受容体である Frizzled および 共役受容体 *LRP5/6* と結合し、GSK-3 β による β -catenin のリン酸化を抑制する。こうして安定化した β -catenin は細胞質内に蓄積され、核内へ移行し転写因子である Tcf/Lef と結合し、Runx2 などの様々な標的遺伝子の転写を調節する (Canonical 経路)。そして、この Wnt/ β -catenin シグナル経路は骨芽細胞の幹細胞である間葉系幹細胞に対して作用し、骨芽細胞への分化を誘導することが報告されている [41]。また、GSK-3 β の阻害薬である LiCl は、*in vivo* および *in vitro* の実験系により、硬組織形成を誘導することも報告されている [45-48]。このように Wnt/ β -catenin シグナル経路は、硬組織産生細胞の分化と深く関わりのあるシグナル伝達経路である。

一方で, Wnt/ β -catenin シグナル経路は, 硬組織産生細胞の分化を制御しているだけでなく, 免疫応答にも関与していることがこれまでに報告されている [49]. たとえば, Wnt/ β -catenin シグナル経路は胸腺において, CD4 $^-$ CD8 $^+$ T 細胞から CD4 $^+$ CD8 $^+$ T 細胞への分化を制御しているとの報告がある [49-56]. また, B 細胞の分化過程においても, 骨髓内での pro-B 細胞の増殖に Wnt/ β -catenin シグナルが関与していることが明らかとなっている [49, 57-59]. 根尖性歯周炎においては, 根管内からの外来性因子を排除するために, 宿主は免疫応答を誘導し, その結果, 根尖歯周骨の吸収が生じる. すなわち, 硬組織産生細胞や免疫担当細胞の分化に関与している Wnt/ β -catenin シグナル経路は, 根尖性歯周炎の発症と関連性があるのでないかと考えた. そこで, Wnt/ β -catenin シグナル経路と根尖病変と関連しているかを明らかにするために, 日本人における骨粗鬆症の疾患関連遺伝子であり Wnt/ β -catenin シグナル経路に属する *LRP5* の SNP について日本人根尖性歯周炎患者を対象に解析した. そして, *in vivo* 実験にて Wnt/ β -catenin シグナル経路を抑制した時と活性化させた時の根尖病変とその周囲組織について解析し, Wnt/ β -catenin シグナル経路と根尖病変との関連について明らかにすることを本研究の目的とした.

II. 材料および方法

1. 根尖性歯周炎罹患者の SNP 解析

大阪大学歯学部附属病院保存科を 2015 年から 2017 年に受診し根尖性歯周炎と診断された患者のうち、本研究への資料提供の同意が得られ、過去に永久歯に対して根管治療の既往があるものを対象とした。デンタルエックス線写真にて根尖部透過像の長径が 3 mm 以上認めるものを病変有群 (n=50)、根尖病変を認めないものを病変無群 (n=30) とした。SNP 解析は、大阪大学研究倫理審査委員会（承認番号 450）および大阪大学歯学部附属病院倫理審査委員会にて承認されたプロトコール（承認番号 H25-E22）にて実施した。被験者の頬粘膜から滅菌綿棒にて非侵襲的に細胞を採取した。採取した細胞を Peter らの方法に準じてゲノム DNA を抽出した [60]。綿棒の先を Lysis Buffer (100 mM Tris HCl pH 8.5, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl, 100 μ g Proteinase K/ml) に浸漬し、55 °C にて 24 時間反応させた。反応後、イソプロパノール沈殿およびエタノール沈殿にてゲノム DNA を調整し、100 μ l TE 溶液を加えて、-80°C にて保存した。採取したゲノム DNA に対して TaqMan[®] GTxpressTM Master Mix および TaqMan[®] SNP Genotyping Assays (Applied Biosystems, California, USA) にて *IL-1 β* (rs1143643) および *LRP5* (rs3736228) について SNP 解析を

行った。群間の比較は Fisher's exact test ($\alpha=0.05$) にて検定した。

2. マウス根尖性歯周炎モデル

動物実験は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認のもと、大阪大学動物実験規定に則って実施した（承認番号：動歯-26-011-0）。8 週齢の C57BL/6J マウス（日本チャールズ・リバー、横浜）をドミトール[®]（0.3 mg/kg）（日本全薬工業、福島）、ドルミカム[®]（4 mg/kg）（アステラス製薬、東京）、ベトルファール[®]（5 mg/kg）（Meiji Seika ファルマ、東京）の 3 種混合麻酔薬を腹腔内注射にて全身麻酔を行った。下顎左側第一大臼歯を電気エンジン（VIVA MATE G5、NSK、栃木）に装着した #1/4 ラウンドバー（Dentsply、Ballaigues, Switzerland）を用いて天蓋除去を行った後、根尖病変を形成させることを目的として #8 K ファイル（Dentsply）を用いて根尖の破壊を行い、根管系を口腔に 4 週間開放した [61, 62]。

3. Wnt/β-catenin シグナルの抑制が根尖病変形成に及ぼす影響についての *in vivo* 実験による評価（図 1）

Wnt/β-catenin シグナル伝達経路を阻害する IWR-1（Sigma-Aldrich, Missouri, USA）を本実験に用いた。8 週齢の C57BL/6J マウスを項目 2. のと

おり露髓させた。露髓当日から 1 日 1 回、尾静脈から以下のように調整した溶液を投与した。IWR-1 投与群：DMSO（和光純薬、大阪）に IWR-1 を溶解したものを PBS にて希釈した溶液 (IWR-1 : 2.5 μ mol/kg), IWR-1 非投与群：DMSO を PBS にて希釈した溶液を連続投与した。露髓後 1 週、2 週、3 週、4 週目に根尖病変体積の測定を行った（各群 n=4）。また 4 週目の試料に関しては、標本試料を作製し、組織学的検索を行った (n=4)。

4. Wnt/ β -catenin シグナルの活性化が根尖病変形成に及ぼす影響についての *in vivo* 実験による評価（図 2）

8 週齢の C57BL/6J マウスを全身麻酔下にて項目 2. のとおり露髓させた。露髓 4 週後、#10 K ファイル (Dentsply) を用いて根管拡大を行った。GSK-3 β 阻害薬である LiCl (和光純薬) を根管貼薬剤 (1 根管あたり 0.025 g) として使用した群および拡大のみで貼薬を行わなかった非貼薬群に対し、ボンディング材（クリアフィルボンド SE ONE[®], クラレノリタケデンタル、東京）およびコンポジットレジン (MI フロー[®], GC、東京) にて仮封を行った。根管貼薬 4 週目に根尖病変体積の測定と組織学的検索を行った (n=4)。

5. 根尖病変体積の測定

根尖病変体積測定のため、下顎左側第一大臼歯に対してマイクロ Computed Tomography (CT) (R_mCT2 : 理学メカトロニクス, 東京) 撮影を行った。撮影条件は管電圧 90 kV, 管電流 160 μ A, スライス幅 5 μ m に設定した。得られた画像は、SimpleViewer software (理学メカトロニクス) を用いて解析した。根尖病変体積は、米田ら [63] および Kalatizis-Sousa ら [64] の方法に準じて、骨形態計測ソフト (TRI 3D-BON : RATOC, 大阪) を用いて算出し、3 次元的評価を行った。根尖部透過像体積を病変体積とし、実験群間の比較を行った。病変体積の統計学的有意差の検定は Student's *t* 検定 ($\alpha=0.05$) を用いて行った。

6. 標本作製

上記実験に供したマウスを 4% パラホルムアルデヒト (PFA:Paraformaldehyde) 溶液にて還流固定した後、下顎骨を採取し、24 時間 4% PFA 溶液にて浸漬固定後、10% EDTA 溶液による脱灰を 2 週間行い、上昇エタノール系列で脱水し、パラフィン包埋を行った。そして、厚さ 9 μ m の薄切切片を作製した。

7. Hematoxylin-Eosin (H-E) 染色法による根尖病変およびその周囲骨の観察
作製したパラフィン切片を脱パラフィンし、水洗後、Mayer ヘマトキシリン液 (武藤、大阪) に 7 分間反応させた。流水にて 20 分間水洗後、エオジン液

(Merck, Darmstadt, Germany) にて 5 分間染色し, エタノールにて脱水および脱色を行い, キシレンにて透徹し, 50% グリセロール/PBS にて封入した. 光学顕微鏡 (Axioskop 2 plus : Carl Zeiss, Aalen, Germany) にて根尖病変およびその周囲骨を観察した.

8. TRAP 染色法による根尖病変およびその周囲骨の破骨細胞の観察

0.5 mg ナフトール AS-MS リン酸と 0.25 mg Fast red violet LB salt (Sigma-Aldrich) を 50 μ l N, N ジメチルホルムアミドに溶解し, 5 ml の 50 mM 酒石酸ナトリウム添加 0.1 M 酢酸ナトリウム緩衝液に加えたものを TRAP 反応液とした. パラフィン包埋した組織標本を脱パラフィンし, 10% 中性緩衝ホルマリン溶液 (Sigma-Aldrich) にて固定を行った. その後, エタノール・アセトン (1 : 1) にて再固定し, 10 分間乾燥させた後, TRAP 反応液と約 2 時間反応させた. 2 回水洗乾燥後に封入し, 光学顕微鏡にて根尖病変およびその周囲骨を観察した.

9. *in situ* ハイブリダイゼーション法による根尖病変およびその周囲骨の遺伝子発現の観察

パラフィン切片を脱パラフィン後, 0.01 M PBS にて洗浄し, 4% PFA にて 10

分間固定を行い、再度 PBS にて洗浄した。この切片を $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ プロテアーゼ K (タカラバイオ、大津) と 5 分間反応させた後、4% PFA にて後固定を行った。0.25% 無水酢酸を含む 0.1 M トリエタノールアミンでアセチル化処理を行い、0.01 M PBS にて洗浄した。55 °C にて 1 時間プレハイブリダイゼーションを行い、表 1 に示す cRNA プローブを用いて 70 °C で一晩ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、この切片を 5 倍濃度のクエン酸ナトリウム溶液 (5-SSC) 中に 20 分間静置した。0.2-SSC で 70 °C にて 20 分間反応させ、0.2-SSC 中に 5 分間、マレイン酸緩衝液 (MBA) 中に 5 分間静置した。そして、5% ヤギ血清 (Vector Laboratories, California, USA) 含有ブロッキング溶液で 2 時間ブロッキングを行った。アルカリホスファターゼ (AP) 標識抗ジゴキシゲニン抗体 (1:5000) (Roche, Basel, Switzerland) と 4 °C にて 24 時間反応させた後、0.1% Tween20 添加 MBA にて洗浄し、0.1% Tween 20 添加脱イオン蒸留水で洗浄した。BM Purple AP (Roche) を基質として室温で 6 時間反応させた後、PBS にて洗浄し、50% グリセロール/ PBS にて封入後、光学顕微鏡にて根尖病変およびその周囲骨を観察した。

10. 蛍光免疫染色法による根尖病変およびその周囲骨のタンパク発現の観察
パラフィン切片を脱パラフィン後、トリス緩衝生理食塩水 (TBS:Tris Buffered

Saline) にて洗浄し, Citrate バッファーにて 100 °C にて 10 分反応させ, 30 分間室温にて静置した. 10% ヤギ血清含有ブロッキング溶液 (10% goat serum /TBS) にて 1 時間ブロッキングを行った後, 各抗体を室温にて一晩反応させた. 各抗体濃度は, 1 : 100 ; CD3 (Abcam, Cambridge, United Kingdom), 1 : 50 ; CD45R (Abcam), 1 : 250 ; F4/80 (CST, Massachusetts, USA), 1 : 100 ; β -catenin (Abcam) にて実験に供した. 一次抗体との反応後, TBS にて洗浄し, 1 : 500 ; Alexa488-goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, California, USA) または 1 : 500 ; Alexa594-goat anti-rat IgG (Abcam) と室温にて 2 時間反応させた後, 洗浄し, 1 : 1000 ; DAPI (4', 6-diamidino-2-phenylindole) (Sigma) と 15 分間反応させた. 反応後, 洗浄し, 50% グリセロールにて封入した. 染色組織切片は, 蛍光顕微鏡にて根尖病変およびその周囲骨を観察した.

III. 結果

1. 根尖性歯周炎罹患者の SNP 解析

過去に根管治療の既往があるものを対象とした。デンタルエックス線写真にて根尖部透過像の長径が 3 mm 以上認める病変有群と、根尖病変を認めない病変無群のゲノム DNA に対して *IL-1 β* および *Wnt/β-catenin* シグナルの共役受容体で骨代謝疾患に関連のある *LRP5* の SNP 解析を行った。病変有群および病変無群の年齢、性別、基礎疾患等の分布は表 2 に示す。病変有群の平均年齢は 48.2 歳、病変無群の平均年齢は 59.8 歳であった。病変有群では男性が 19 名、女性が 31 名の合計 50 名、病変無群では男性が 12 名、女性が 18 名の合計 30 名であった。病変有群の平均根尖病変長径は 6.0 ± 2.7 mm であった。基礎疾患に関しては、今回探索した SNP と関連する疾患をもつものはおらず、両群に特異な差はなかった（表 2）。

他の研究グループ [53] により、根尖性歯周炎との関連を報告されていた *IL-1 β* の SNP は、本研究において関連性を見出すことはできなかった（表 3）。一方、骨粗鬆症との関連が報告されている *LRP5* の SNP において根尖性歯周炎の発症と関連性があることが明らかとなった（表 3）。

2. Wnt/ β -catenin シグナルの抑制が根尖病変形成に及ぼす影響

マウスの下顎左側第一大臼歯を露髓させ、Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路の阻害薬 (IWR-1) を 1 日 1 回投薬し、根尖病変体積の経時的な変化をマイクロ CT にて計測し、露髓 4 週目の試料に対して組織学的検索を行った (図 1)。

マイクロ CT 解析の結果、露髓後すべての試料は根尖病変を形成しており、露髓 2 週後において、IWR-1 群と Vehicle 群の近心根の病変体積はそれぞれ $1.22 \pm 0.14 \text{ mm}^3$ 、 $1.57 \pm 0.16 \text{ mm}^3$ であった。IWR-1 群では Vehicle 群に比べて有意に病変体積が増加していることが明らかとなった (図 3)。また、露髓 4 週後においても IWR-1 群と Vehicle 群の近心根の病変体積はそれぞれ $1.65 \pm 0.33 \text{ mm}^3$ 、 $1.46 \pm 0.01 \text{ mm}^3$ であり、IWR-1 群では Vehicle 群に比べて有意に病変体積の増加が認められた (図 3)。露髓 4 週後の試料に対して HE 染色を行ったところ、歯根と歯槽骨の間にヘマトキシリンが濃染した細胞が凝集している領域 (根尖病変) が認められた (図 4 A)。根尖病変部の拡大像では、広範囲に免疫担当細胞様の細胞群が認められた (図 4 B)。IWR-1 群では Vehicle 群に比べると広範囲に免疫担当細胞様細胞が分布していることが確認された (図 4 C, D)。*in situ* ハイブリダイゼーション法による染色では、IWR-1 群では Vehicle 群に比べて Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路のマーカーである *Axin2* の発現の減少を認めた (図 5)。また、骨芽細胞分化マーカーである

Col1a1 および *Runx2* の発現は, Vehicle 群では歯根周囲と根尖病変周囲の歯槽骨の表面に認められるが, IWR-1 群では *Col1a1* および *Runx2* の発現の低下が認められた (図 6, 7). TRAP 染色より破骨細胞数については両群間に差は認められなかった (図 8).

3. Wnt/ β -catenin シグナルの活性化が根尖病変形成に及ぼす影響

露髓後 4 週経過したマウスに対して, Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路を活性化する LiCl を根管内に貼薬し, 4 週後の試料に対してマイクロ CT 解析及び組織学的検索を行った (図 2). 貼薬 4 週後の近心根病変体積は, LiCl 貼薬群において非貼薬群と比較して, 有意差をもって根尖病変体積の縮小を認めた (図 9). HE 染色では, 両群において線維芽細胞や血管新生を認めたことから, 肉芽組織が形成されていることがわかった. また, 非貼薬群では根尖病変内に結合組織の新生が認められることから慢性炎症が生じていることが推測され, 歯根肉芽腫の形成途上段階と認められる像が認められた (図 10). 貼薬 4 週後の試料における *in situ* ハイブリダイゼーション法による染色では, 両群において *Axin2* の発現に差がないことがわかった (図 11). 一方, 貼薬 24 時間後の試料では, LiCl 貼薬群において非貼薬群と比較してより多くの *Axin2* 陽性細胞の発現が認められた (図 12). また, 貼薬 24 時間後の根尖病変内には β

-catenin の細胞質への蓄積および核内での発現が認められた（図 13）。骨芽細胞分化マーカーである *Colla1* は非貼薬群では根尖病変周囲の骨表層にのみ発現が認められるが、LiCl 貼薬群では根尖病変内にも発現が認められた（図 14）。*Runx2* についても同様に、非貼薬群では根尖病変周囲の骨の表層にわずかに認められるが、LiCl 貼薬群では根尖病変周囲の骨および根尖病変内に発現が強く認められた（図 15）。また、T 細胞の表面マーカーである CD3 および 活性型マクロファージの表面マーカーである F4/80 陽性細胞については、非貼薬群と LiCl 貼薬群の間で差は認められなかった（図 16, 17）。一方、B 細胞表面マーカーの CD45R については LiCl 貼薬群において非貼薬群と比較して多数の陽性細胞を認めた（図 18）。

IV. 考察

日々の臨床において、根管内に細菌感染が明らかに生じているにもかかわらず根尖病変を形成しない症例や根管充填が緊密になされているにもかかわらず根尖病変を形成する症例にしばしば遭遇する。これらの事実から根尖性歯周炎の発症には、細菌感染以外にも要因となるものがあることが推測された。根尖性歯周炎は、外来性因子に対して生じる免疫応答、そして免疫応答時に產生される炎症性サイトカインにより誘導される歯槽骨の吸収により発症する。つまり、宿主側の因子、免疫応答および骨代謝に目を向ける必要性がある。そこで、近年、様々な多因子疾患において一塩基多型（SNP）による疾患関連遺伝子の特定が展開されてきていることに着目し、根尖性歯周炎と関連する遺伝子について解析することにした。根尖性歯周炎の成立に関与する免疫応答および骨代謝の関連遺伝子の中から候補遺伝子を抽出することにした。免疫応答系の遺伝子としてとして *IL-1 β* を、日本人をはじめ他人種においても骨粗鬆症の疾患関連遺伝子であると特定されている *LRP5* を骨代謝系の遺伝子として、SNP 解析した [27-40]。解析の結果、根尖性歯周炎と *IL-1 β* の SNP とのあいだには、関連性は認められなかった（表 2）。アメリカの大学における深在性象牙質う蝕が根尖病変を形成するかに対して関連が報告されていることから、*IL-1 β* の SNP には人種差が存在する可能性があることが明らかとなった。また、*LRP5* の SNP

(A1330V, rs3736228) については、ヘテロタイプにおいて有意に分布に偏りが認められた（表 2）。また A1330V については *in vitro*において Tcf/Lef 活性と関連していることが報告されている [39, 40]。このように本研究では、根尖性歯周炎の発症に関連する新たな SNP を発見することに成功した。

ところで、根尖性歯周炎は、免疫応答および骨代謝などの複雑な宿主因子により生じるため、個体差が出やすい。そこで本研究では、個体差の影響を減ずることを目的として、近親交配マウスを実験に用いることにした [65]。今回の解析に用いた Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路を阻害する低分子化合物である IWR-1 は、細胞膜透過が容易で細胞内シグナル伝達経路の阻害に有効であることで知られている [66, 67]。Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路を阻害する低分子化合物としては IWR 化合物のほかに IWP 化合物がある [66, 67]。IWP 化合物は Wnt 依存性の LRP6 のリン酸化と、Dvl2 および β -catenin の蓄積を阻害する [66, 67]。IWR-1 は下流において β -catenin を分解する Axin2, Apc, Ck1, Gsk3 β の複合体を安定化させ、 β -catenin の分解を促進させる [66, 67]。IWP 化合物は LRP6 に作用するが LRP5 に作用しないため、今回の実験では IWR-1 を用いることとした [66, 67]。

本研究において、すべてのマウスは露髓により、根尖病変を形成し、経時的に病変の拡大が認められた（図 3）。また、IWR-1 投与群では DMSO 投与群に比較

し、根尖病変体積の拡大が認められた（図 3）。そこで、IWR-1 投与群で認められた根尖病変体積の増加は、IWR-1 による Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路の阻害によるものなのかどうか検証するために、*in situ* ハイブリダイゼーションをおこなった。その結果、IWR-1 投与群では *Axin2* の mRNA の発現の低下を認めたことから、Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路を阻害していることが確認された（図 5）。また、骨芽細胞分化マーカーである *Col1a1* および *Runx2* についても IWR-1 群では mRNA の発現の低下を認めた（図 6, 7）。TRAP 染色法にて破骨細胞についても評価したが、両群の間に差は認められなかった（図 8）。これらの結果より、IWR-1 投与による Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路を阻害は、骨芽細胞の分化を抑制し、その結果として骨吸収が促進したため、根尖病変の拡大が起ったと考えられる。

次に、Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路を活性化させた場合の根尖病変の体積の変化について検討した。Tang らは、LiCl を間欠的に経口投与すると、露髓による根尖病変の体積を減ずると報告している [68]。この LiCl は GSK3 β の活性を阻害し、 β -catenin の細胞質内での蓄積を引き起こし、 β -catenin の核内移行を促進することで転写を活性化する。また、Li 化合物は血中濃度が上昇するとリチウム中毒を引き起こしてしまうことも報告されている [69-73]。Li 塩として LiCO₃ があり、これは現在双極性障害の治療薬として臨床で用い

られている。血中リチウム濃度の 0.6~1.2 mmol/1 が治療域, 1.5~2.5 mmol/1 で中毒域であり, 両者が近いことが問題点となっている [69-73]。また LiCO_3 は腎排泄性であるため, 腎機能障害を合併した場合はクリアランスが低下し, 少量でも中毒症状を引き起こすという問題点もある。よって, アンギオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害剤または非ステロイド性抗炎症薬 (NSAID) のような腎機能を変える薬剤や高齢者においても投与量に注意が必要である [69, 74, 75]。さらに, LiCO_3 の使用によるリチウム中毒は死亡例も報告されている [76]。以上のことから, 根尖病変の治療法を考えた場合 LiCl の全身投与はリスクが高く現実的でないといえる。そこで本研究では, 根尖病変を形成した患歯に Li^+ を根管貼薬することで根尖病変の治癒を促進しうるかどうか検討したところ, 貼薬 4 週後において LiCl 貼薬群は非貼薬群と比べ有意に根尖病変体積の縮小が認められた (図 9, 10)。次に, LiCl 貼薬群で認められた根尖病変体積の縮小は, LiCl による $\text{Wnt}/\beta\text{-catenin}$ シグナル伝達経路の活性化によるものなのかどうか検証するために *in situ* ハイブリダイゼーションをおこなった。そこで, より早い時期の方が *Axin2* の mRNA 発現を捉えるのには有利なのではないかと考え, 貼薬 24 時間後の組織切片に対して *in situ* ハイブリダイゼーションをおこなった。その結果, 貼薬 24 時間後の組織切片において, *Axin2* の転写活性および $\beta\text{-catenin}$ の細胞質での蓄積および核内への移行が認められた (図

12, 13). これらの結果から, LiCl は貼薬後初期の段階で, Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路を活性化し, 根尖病変の縮小を誘導していると考えられた.

また, LiCl 貼薬群では非貼薬群と比べて, 骨芽細胞分化マーカーの *Colla1* (図 14) および *Runx2* (図 15) の発現の増加が認められた. 以上の結果から, LiCl による Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路の活性化を起点として骨芽細胞の分化を誘導し, 根尖病変の治癒を促進したと考えられる.

次に, 免疫担当細胞に対する LiCl の効果について解析した. まず, T 細胞のマーカーである CD3 について蛍光免疫染色をおこなったが, LiCl 貼薬群と非貼薬群との間で陽性細胞数に差は認められなかった (図 16). また, マクロファージのマーカーである F4/80 についても同様の結果であった (図 17). 一方, B 細胞のマーカーである CD45R 陽性細胞は, LiCl 貼薬群において非貼薬群と比べて多く認められた (図 18). CD45R は pro B 細胞から成熟 B 細胞まで発現しており, 遺伝子欠損マウスの解析結果から, Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路は B 細胞の増殖能を正に制御していることが明らかとなっている [49, 57]. これは本研究にて LiCl 貼薬により根尖病変内において B 細胞数の増加を認めた結果と一致している. LiCl は T 細胞を未分化な状態で保つという報告もある一方, 制御性 T 細胞の増殖を行うことも知られているため [49, 77-80], 制御性 T 細胞をはじめ, その他の免疫担当細胞についてのさらなる検討が必要

と考えている [48, 81].

将来的には、本研究の成果をもとにして、シグナル伝達経路をターゲットにした次世代の根管貼薬剤の開発につなげていきたいと考えている。水酸化カルシウム製剤など従来の根管貼薬剤が殺菌効果を主としているのに対し、LiCl は骨の形成促進および免疫を誘導することにより病変を形成した根尖性歯周炎の治癒を促すことが可能と考えられる。よって、根尖病変を形成している根尖性歯周炎の患者に対して、感染歯質除去および根管拡大が終了した根管に LiCl を貼薬することで根尖病変の治癒を促進できると考えている。

V. 結論

LRP5 が日本人における根尖性歯周炎の疾患関連遺伝子であるとわかった. *In vivo* 実験より, 根尖性歯周炎における根尖病変の形成は, Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路により制御されていることが明らかとなった.

VI. 謝辞

稿を終えるにあたり，本研究を行う機会を与えて頂き，適切なる御指導と御高
閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存
学教室）林 美加子教授に謹んで感謝の意を表します. また，本研究の遂行に際
し，終始変わらぬ御指導を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染
制御学講座（歯科保存学教室）伊藤祥作博士，口腔解剖学第一教室 阿部 真
士博士に深く感謝致します. 最後に本研究に対して御理解，御協力を頂きました
大阪大学大学院歯学研究科口腔分子感染制御学講座（歯科保存学教室）の諸先
生方に心から感謝致します.

VII. 参考文献

1. Stashenko P, Teles R, D' Souza R (1998) . Periapical inflammatory responses and their modulation. *Crit Rev Oral Biol.* 9 : 498–521.
2. Nair PN. (2004) . Pathogenesis of apical periodontitis and the causes of endodontic failures. *Crit Rev Oral Biol Med.* 15 : 348–81.
3. Kaneko T, Okiji T, Kaneko R, Nör JE, Suda H (2008) . Antigen-presenting cells in human radicular granulomas. *J Dent Res.* 87 : 553–7.
4. Graunaite I, Lodiene G, Maciulskiene V (2012) . Pathogenesis of apical periodontitis : a literature review. *J Oral Maxillofac Res.* 2 : e1.
5. Márton IJ, Kiss C (2000) . Protective and destructive immune reactions in apical periodontitis. *Oral Microbiol Immunol.* 15 : 139–50.
6. Metzger Z (2000) . Macrophages in periapical lesions. *Endod Dent Traumatol.* 16 : 1–8.
7. Gilles JA, Carnes DL, Dallas MR, Holt SC, Bonewald LF (1997) . Oral bone loss is increased in ovariectomized rats. *J Endod.* 23 : 419–22.

8. Jiang Y, Mehta CK, Hsu TY, Alsulaimani FF (2002) . Bacteria induce osteoclastogenesis via an osteoblast-independent pathway. *Infect Immun.* 70 : 3143-8.
9. Graves DT, Oates T, Garlet GP (2011) . Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol.* 3 : 5304.
10. De Rossi A, Rocha LB, Rossi MA (2008) . Interferon-gamma, interleukin -10, intercellular adhesion molecule-1, and chemokine receptor 5, but not interleukin-4, attenuate the development of periapical lesions. *J Endod.* 34 : 31-8.
11. Huang GT, Do M, Wingard M, Park JS, Chugal N(2001). Effect of interleukin-6 deficiency on the formation of periapical lesions after pulp exposure in mice. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 92 : 83-8.
12. Márton IJ, Kiss C (2014) . Overlapping protective and destructive regulatory pathways in apical periodontitis. *J Endod.* 40 : 155-63.

13. Graves DT, Oates T, Garlet GP (2011) . Review of osteoimmunology and the host response in endodontic and periodontal lesions. *J Oral Microbiol.* 17 : 1-15.
14. Ziegler A, Konig IR (2013) . ゲノム疫学の発想と実用化. 東海大学出版会. 神奈川. p9-271.
15. 徳永 勝士 (2007) . 人類遺伝学ノート. 南山堂. 東京. p27-97.
16. Robert LN, Roderick RM, Huntington FW (2007) . Thompson & Thompson Genetics in Medicine 8th edition. Elsevier. Amsterdam. p45-56.
17. Menezes-Silva R, Khaliq S, Deeley K, Letra A, Vieira AR (2012) . Genetic susceptibility to periapical disease : conditional contribution of MMP2 and MMP3 genes to the development of periapical lesions and healing response. *J Endod.* 38 : 604-7.
18. Dill A, Letra A, Chaves de Souza L, Yadlapati M, Biguetti CC, Garlet GP, Vieira AR, Silva RM (2015) . Analysis of multiple cytokine polymorphisms in individuals with untreated deep carious lesions reveals IL1B (rs1143643) as a susceptibility factor for periapical lesion development. *J Endod.* 41 : 197-200.

19. Iglesias-Linares A, Yañez-Vico RM, Ballesta S, Ortiz-Ariza E, Mendoza-Mendoza A, Perea E, Solano-Reina E (2012) . Interleukin 1 gene cluster SNPs (rs1800587 , rs1143634) influences post-orthodontic root resorption in endodontic and their contralateral vital control teeth differently. *Int Endod J.* 45 : 1018-26.
20. Maheshwari K, Silva RM, Guajardo-Morales L, Garlet GP, Vieira AR, Letra A (2016) . Heat Shock 70 Protein Genes and Genetic Susceptibility to Apical Periodontitis. *J Endod.* 42 : 1467-71.
21. Rôças IN, Siqueira JF Jr, Del Aguila CA, Provenzano JC, Guilherme BP, Gonçalves LS (2014) . Polymorphism of the CD14 and TLR4 genes and post-treatment apical periodontitis. *J Endod.* 40 : 168-72.
22. de Sá AR, Moreira PR, Xavier GM, Sampaio I, Kalapothakis E, Dutra WO, Gomez RS (2007) . Association of CD14, IL1B, IL6, IL10 and TNFA functional gene polymorphisms with symptomatic dental abscesses. *Int Endod J.* 40 : 563-72.
23. Pasqualini D, Bergandi L, Palumbo L, Borraccino A, Dambra V, Alovisi M, Migliaretti G, Ferraro G, Ghigo D, Bergerone S, Scotti N, Aimetti M, Berutti E (2012) . Association among oral health, apical periodontitis,

- CD14 polymorphisms, and coronary heart disease in middle-aged adults. J Endod. 38 : 1570-7.
24. De Soet JJ, van Gemert-Schriks MC, Laine ML, van Amerongen WE, Morré SA, van Winkelhoff AJ (2008) . Host and microbiological factors related to dental caries development. Caries Res. 42 : 340-7.
25. Virtej A, Papadakou P, Sasaki H, Bleltsa A, Berggreen E (2016) . VEGFR-2 reduces while combined VEGFR-2 and -3 signaling increases inflammation in apical periodontitis. J Oral Microbiol. 19 : 32433.
26. Sousa NG, Cardoso CR, Silva JS, Kuga MC, Tanomaru-Filho M, Faria G (2014) . Association of matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) with the expression of matrix metalloproteinases-1, -2 and -9 during periapical lesion development. Arch Oral Biol. 59 : 944-53.
27. Chubachi S, Nakamura H, Sasaki M, Haraguchi M, Miyazaki M, Takahashi S, Tanaka, K, Funatsu Y, Asano K, Betsuyaku T ; Keio COPD Comorbidity Research (K-CCR) Group (2015) . Polymorphism of LRP5 gene and emphysema severity are associated with osteoporosis in Japanese patients with or at risk for COPD. Respirology. 20 : 286-95.

28. Kitjaroentham A, Hananantachai H, Phonrat B, Preutthipan S, Tungtrongchitr R (2016) . Low density lipoprotein receptor-related protein 5 gene polymorphisms and osteoporosis in Thai menopausal women. *J Negat Results Biomed.* 15 : 16.
29. Canto-Cetina T, Polanco Reyes L, González Herrera L, Rojano-Mejía D, Coral-Vázquez RM, Coronel A, Canto P (2013) . Polymorphism of LRP5, but not of TNFRSF11B, is associated with a decrease in bone mineral density in postmenopausal Maya-Mestizo women. *Am J Hum Biol.* 25 : 713-8.
30. Funakoshi Y, Omori H, Yada H, Katoh T (2011) . A1330V polymorphism of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene and bone mineral density in Japanese male workers. *Environ Health Prev Med.* 16 : 106-12.
31. Funakoshi Y, Omori H, Yada H, Katoh T (2010) . Relationship between changes of bone mineral density over seven years and A1330V polymorphism of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene or lifestyle factors in Japanese female workers. *Asia Pac J Clin Nutr.* 19 : 534-9.

32. Tran BN, Nguyen ND, Eisman JA, Nguyen TV (2008) . Association between LRP5 polymorphism and bone mineral density: a Bayesian meta-analysis. BMC Med Genet. 9 : 55.
33. Brixen K, Beckers S, Peeters A, Piters E, Balemans W, Nielsen TL, Wraae K, Bathum L, Brasen C, Hagen C, Andersen M, Van Hul W, Abrahamsen B (2007) . Polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with peak bone mass in non-sedentary men: results from the Odense androgen study. Calcif Tissue Int. 81 : 421-29.
34. Grundberg E, Lau EM, Lorentzson M, Karlsson M, Holmberg A, Groop L, Mellstrom D, Orwoll E, Mallmin H, Ohlsson C, Ljunggren O, Akesson K (2007) . Large-scale association study between two coding LRP5 gene polymorphisms and bone phenotypes and fractures in men. Osteoporos Int. 19 : 829-37.
35. Giroux S, Elfassihi L, Cardinal G, Laflamme N, Rousseau F (2007) . LRP5 coding polymorphisms influence the variation of peak bone mass in a normal population of French-Canadian women. Bone. 40 : 1299-307.

36. Saarinen A, Valimaki VV, Valimaki MJ, Loyttyniemi E, Auro K, Uusen P, Kuris M, Lehesjoki AE, Makitie (2007) . The A1330V polymorphism of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) associates with low peak bone mass in young healthy men. *Bone*. 40 : 1006-12.
37. Ezura Y, Nakajima T, Urano T, Sudo Y, Kajita M, Yoshida H, Suzuki T, Hosoi T, Inoue S, Shiraki M, Emi M (2007) . Association of a single-nucleotide variation (A1330V) in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 gene (LRP5) with bone mineral density in adult Japanese women. *Bone*. 40 : 997-1005.
38. Urano T, Shiraki M, Usui T, Sasaki N, Ouchi Y, Inoue S (2009) . A1330V variant of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene decreases Wnt signaling and affects the total body bone mineral density in Japanese women. *Endocr J*. 56 : 625-31.
39. Urano T, Inoue S (2014) . Genetics of osteoporosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 452 : 287-93.
40. Urano T, Inoue S (2015) . Recent genetic discoveries in osteoporosis, sarcopenia and obesity. *Endocr J*. 62 : 475-84.

41. Komori T (2011) . Signaling networks in RUNX2-dependent bone development. *J Cell Biochem.* 112 : 750–5.
42. 田中栄 (2014) . 骨代謝 つくり, 壊し, 変える—その治療メカニズムと最新治療. 羊土社. 東京. 26–191.
43. Baron R, Kneissel M (2013) . WNT signaling in bone homeostasis and disease : from human mutations to treatments. *Nat Med.* 19 : 179–92.
44. Kubota T, Michigami T, Ozono K (2010) . Wnt signaling in bone. *Clin Pediatr Endocrinol.* 19 : 49–56.
45. Nusse R, Clevers H (2017) . Wnt/ β -catenin Signaling, Disease and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell.* 169 : 985–99.
46. Dale TC (1998) . Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J.* 329 : 209–23.
47. Klein PS, Melton DA (1996) . A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93 : 8455–9.
48. Clément-Lacroix P, Ai M, Morvan F, Roman-Roman S, Vayssi ère B, Belleville C, Estrera K, Warman ML, Baron R, Rawadi G (2005) . Lrp5-independent activation of Wnt signaling by lithium chloride increases bone

- formation and bone mass in mice. Proc Natl Acad Sci USA. 102 : 17406–11.
49. Han P, Wu C, Chang J, Xiao Y (2012) . 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 : 6370–9.
50. Han P, Ivanovski S, Crawford R, Xiao Y (2015) . Activation of the Canonical Wnt Signaling Pathway Induces Cementum Regeneration. J Bone Miner Res. 30 : 1160–74.
51. Staal FJ, Luis TC, Tiemessen MM (2008) . WNT signalling in the immune system: WNT is spreading its wings. Nat Rev Immunol. 8 : 581–93.
52. Weerkamp F, Baert MR, Naber BA, Koster EE, de Haas EF, Atkuri KR, van Dongen JJ, Herzenberg LA, Staal FJ (2006) . Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules. Proc Natl Acad Sci USA. 103 : 3322–6.
53. Pongracz JE, Parnell SM, Jones T, Anderson G, Jenkinson EJ (2006) . Overexpression of ICAT highlights a role for catenin-mediated

- canonical Wnt signalling in early T cell development. *Eur J Immunol.* 36 : 2376-83.
54. Mulroy T, Xu Y, Sen JM (2003) . β -catenin expression enhances generation of mature thymocytes. *Int Immunol.* 15 : 1485-94.
55. Gounari F, Chang R, Cowan J, Guo Z, Dose M, Gounaris E, Khazaie K (2005) . Loss of adenomatous polyposis coli gene function disrupts thymic development. *Nat Immunol.* 6 : 800-9.
56. Yu Q, Sen J. M (2007) . β -catenin regulates positive selection of thymocytes but not lineage commitment. *J Immunol.* 178 : 5028-34.
57. Yu Q, Xu M, Sen JM (2007) . β -catenin expression enhances IL-7 receptor signaling in thymocytes during positive selection. *J Immunol.* 179 : 126-31.
58. Okamura RM, Sigvardsson M, Galceran J, Verbeek S, Clevers H, Grosschedl R (1998) . Redundant regulation of T cell differentiation and TCRalpha gene expression by the transcription factors LEF-1 and TCF-1. *Immunity.* 8 : 11-20.

59. Reya T, O'Riordan M, Okamura R, Devaney E, Willert K, Nusse R, Grosschedl R (2000) . Wnt signaling regulates B lymphocyte proliferation through a LEF-1 dependent mechanism. *Immunity*. 13 : 15–24.
60. Laird PW, Zijderveld A, Linders K, Rudnicki MA, Jaenisch R, Berns A (1991) . Simplified mammalian DNA isolation procedure. *Nucleic Acids Res.* 19 : 4293.
61. Døsen G, Tenstad E, Nygren MK, Stubberud H, Funderud S, Rian E (2006) . Wnt expression and canonical Wnt signaling in human bone marrow B lymphopoiesis. *BMC Immunol.* 29 : 7–13.
62. Liang H, Chen Q, Coles AH, Anderson SJ, Pihan G, Bradley A, Gerstein R, Jurecic R, Jones SN (2003) . Wnt5a inhibits B cell proliferation and functions as a tumor suppressor in hematopoietic tissue. *Cancer Cell*. 4 : 349–60.
63. Yoneda N, Noiri Y, Matsui S, Kuremoto K, Maezono H, Ishimoto T, Nakano T, Ebisu S, Hayashi M (2017) . Development of a root canal treatment model in the rat. *Sci Rep.* 12 : 3315.
64. Kalatzis-Sousa NG, Spin-Neto R, Wenzel A, Tanomaru-Filho M, Faria G (2017) . Use of micro-computed tomography for the assessment of

- periapical lesions in small rodents : a systematic review. *Int Endod J.* 50 : 352-66.
65. 江崎 孝三郎 (1969) . 動物実験と実験動物Ⅱ. 化学と生物. 7 : 108-14.
66. Chen B, Dodge ME, Tang W, Lu J, Ma Z, Fan CW, Wei S, Hao W, Kilgore J, Williams NS, Roth MG, Amatruda JF, Chen C, Lum L (2009) . Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat Chem Biol.* 5 : 100-7.
67. Liu C, He X (2010) . Destruction of a destructor : a new avenue for cancer therapeutics targeting the Wnt pathway. *J Mol Cell Biol.* 2 : 70-3.
68. Tang Y, Zhou X, Gao B, Xu X, Sun J, Cheng L, Zhou X, Zheng L (2014) . Modulation of Wnt/ β -catenin signaling attenuates periapical bone lesions. *J Dent Res.* 93 : 175-82.
69. Timmer RT, Sands JM (1999) . Lithium intoxication. *J Am Soc Nephrol.* 10 : 666-74.
70. 内藤 裕史 (2001) . 中毒百科 : 事例・病態・治療 : 工業用品/ガス/農薬/医品. 南江堂. 東京. p368-9.

71. Goldfrank LR, Flomenbaum NE, Lewin NA, Weisman RS, Howland MA, Hoffman RS, Stamford CT (1998) . Toxicologic Emergencies. Appleton and Lange. New York. p969.
72. Finley PR, Warner MD, Peabody CA (1995) . Clinical relevance of drug interactions with lithium. *Clin Pharmacokinet.* 29 : 172-91.
73. Holstein-Rathlou NH (1990) . Lithium transport across biological membranes. *Kidney Int.* 37 : S4-9.
74. Sproule BA, Hardy BG, Shulman KI (2000) . Differential pharmacokinetics of lithium in elderly patients. *Drugs Aging.* 16 : 165-77.
75. Kayipmaz S, Altınöz AE, Ok NEG (2017) . Lithium Intoxication: A Possible Interaction with Moxifloxacin. *Clin Psychopharmacol Neurosci.* 15 : 407-9.
76. Yamamoto H, Sawamura A, Mukai N, Sugano M, Kubota N, Uegaki S, Hayakawa M, Gando S (2013) . A report of 6 cases with acute lithium intoxication. *J Jpn Soc Intensive Care Med.* 20 : 401-4.
77. Ding Y, Shen S, Lino AC, Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ (2008) . β -catenin stabilization extends regulatory T cell survival and induces anergy in nonregulatory T cells. *Nature Med.* 14 : 162-9.

78. Oderup C, LaJevic M, Butcher EC (2013) . Canonical and noncanonical Wnt proteins program dendritic cell responses for tolerance. *J Immunol.* 190 : 6126-34.
79. Hong Y, Manoharan I, Suryawanshi A, Majumdar T, Angus-Hill ML, Koni PA, Manicassamy B, Mellor AL, Munn DH, Manicassamy S (2015) . Beta-catenin promotes regulatory T-cell responses in tumors by inducing vitamin A metabolism in dendritic cells. *Cancer Res.* 75 : 656-65.
80. Alves CH, Ober-Blobaum JL, Brouwers-Haspels I, Asmawidjaja PS, Mus AM, Razawy W, Molendijk M, Clausen BE, Lubberts E (2015) . Dendritic cell-specific deletion of beta-catenin results in fewer regulatory T-cells without exacerbating autoimmune collagen-induced arthritis. *PLoS One.* 20 ; 10 : e0142972.
- 81.** van Loosdregt J, Fleskens V, Tiemessen MM, Mokry M, van Boxtel R, Meerding J, Pals CE, Kurek D, Baert MR, Delemarre EM, Gröne A, Koerkamp MJ, Sijts AJ, Nieuwenhuis EE, Maurice MM, van Es JH, Ten Berge D, Holstege FC, Staal FJ, Zaiss DM, Prakken BJ, Coffer PJ (2013) . Canonical Wnt signaling negatively modulates regulatory T cell function. *Immunity.* 39 : 298-310.

表 1. *in situ* ハイブリダイゼーションに用いた cRNA プローブ

cRNA プローブ	GenBank Accession No., nucleotide
Axin2	Addgene #21277, NM_015732, nt1774-2787
Col1a1	NM_007742, nt29553415
Runx2	AF010284, nt922_1746

表 2. 根尖性歯周炎罹患患者の SNP 解析結果の対象者

	病巣有群	病巣無群
平均年齢 (最小-最大)	48.2 (22-82)	59.8 (28-86)
性別		
男性	19	12
女性	31	18
根尖病変長径 (mm) 平均長径±標準偏差 (最小-最大)	6.0±2.7 (3.0-12.0)	
基礎疾患		
循環器系 (高血圧、心筋梗塞)	3	5
糖尿病	1	2
消化器疾患 (虫垂炎)	2	2
悪性新生物	1	1
呼吸器疾患 (喘息、結核)	1	2
自己免疫疾患 (リウマチ、乾癬)	1	1

表 3. 根尖性歯周炎罹患患者の SNP 解析結果

	ジエノタイプ頻度		P 値	オッズ比
	病巣有群	病巣無群		
<i>IL-1β</i> (rs1143643)				
C/C	0.21	0.24	NS	
C/T	0.53	0.33	NS	
T/T	0.26	0.43	NS	
<i>LRP5</i> (rs3736228)				
C/C	0.36	0.54	NS	
C/T	0.62	0.46	.00396*	1.19
T/T	0.02	0.00	NS	

Fisher's exact test, *: $P<0.05$

8 週齢雄性
C57BL/6J マウス

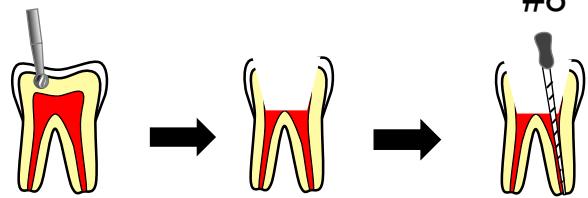


IWR-1 群: IWR-1 (2.5 $\mu\text{mol}/\text{Kg}$)

Vehicle 群: DMSO in PBS

下顎左側第一臼歯 露髓

1, 2, 3, 4 週後 灌流固定 (4% パラホルムアルデヒド)



1. マイクロ CT 解析 (各群 n=4)

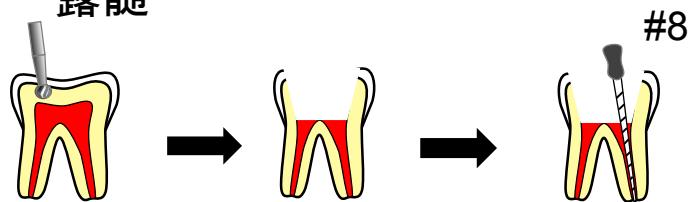
2. 組織学的検索 (4 週後)

図 1. Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路の阻害による根尖病変形成への影響についての *in vivo* 実験のタイムスケジュール

下顎左側第一大臼歯を露髓させ、その日から 1 日 1 回 IWR-1 を経静脈的に投与した。露髓後 1, 2, 3 および 4 週目にマイクロ CT 解析を行い、4 週目の切片を組織学的検索に供した。

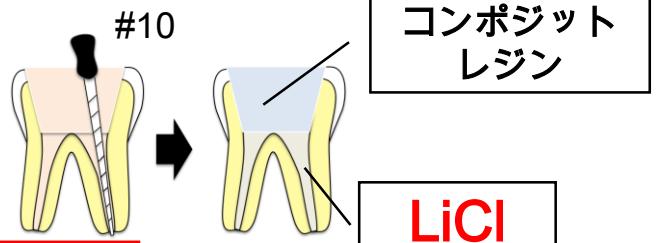
8 週齢雄性 C57BL/6J マウス

下顎左側第一臼歯 露髓



露髓 4 週後

根管拡大 根管貼薬



貼薬 4 週後

1. μ CT 解析 (各群 n=3)

2. 組織学的検索

図 2. Wnt/ β -catenin シグナル伝達経路の活性化による根尖病変形成への影響についての *in vivo* 実験のタイムスケジュール

下顎左側第一大臼歯を露髓し、根尖病変を形成した。露髓 4 週後に根管内に LiCl を貼薬し、貼薬後 4 週目にマイクロ CT 解析および組織学的検索を行った。

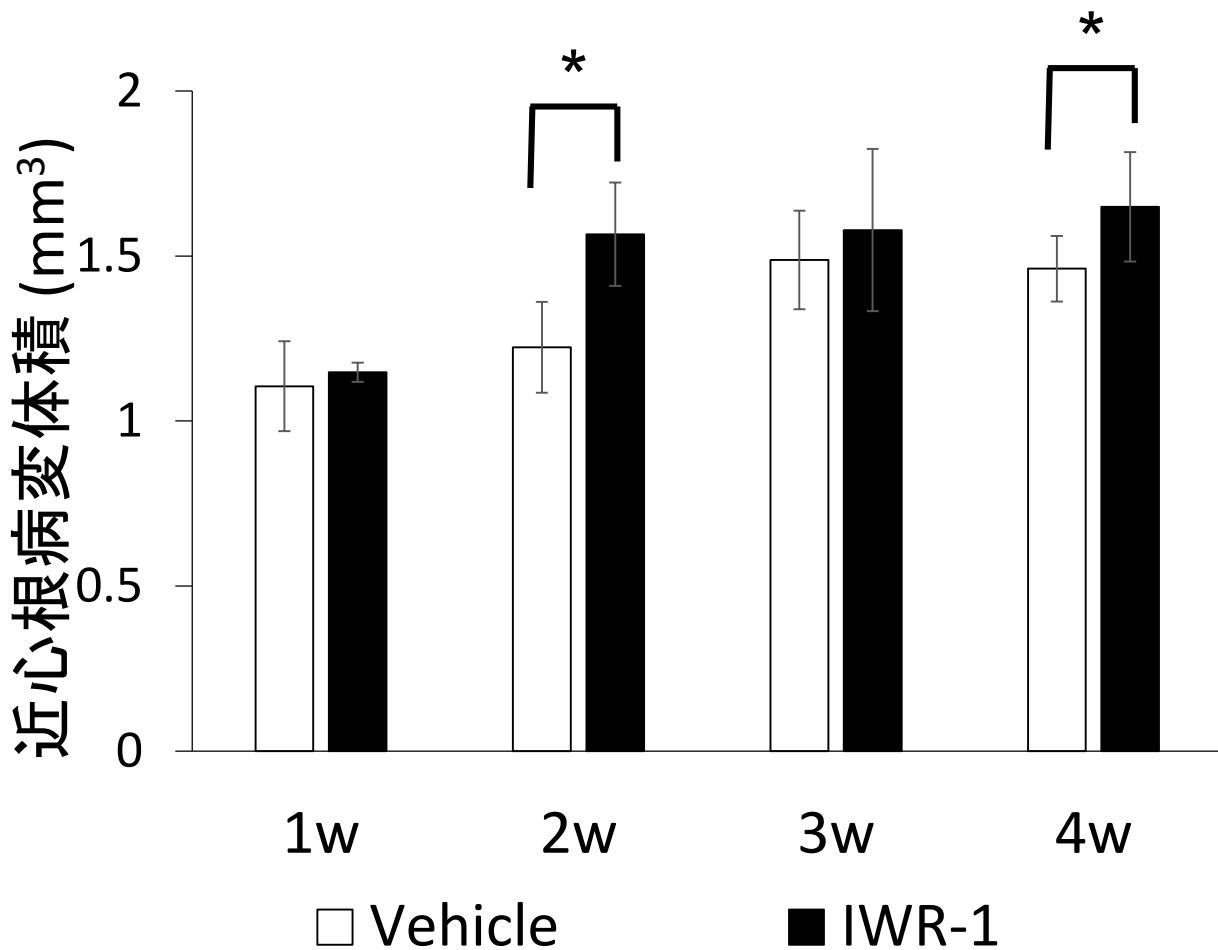
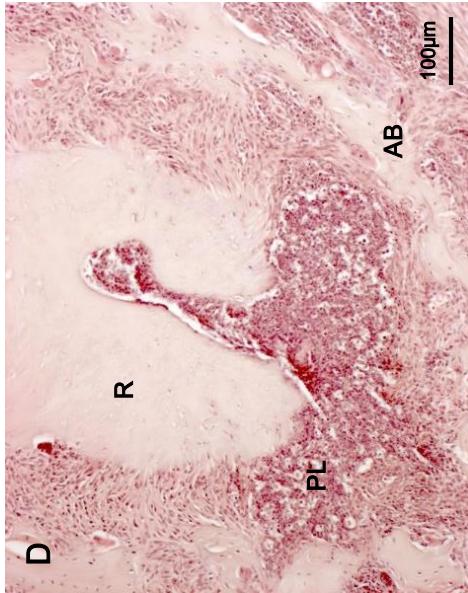
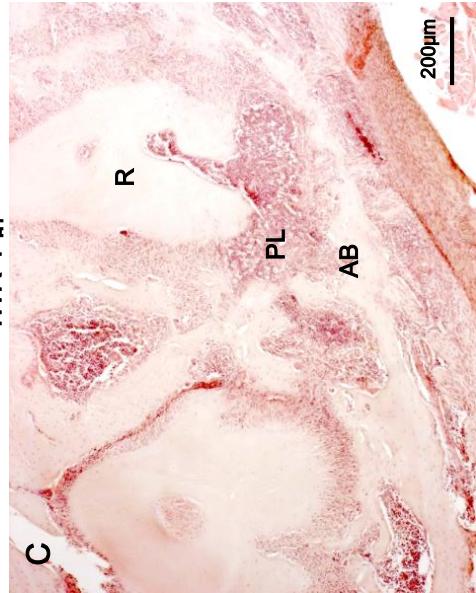


図 3. マウス下顎第一大臼歯露髓後の近心根病変体積のマイクロ CT 解析
 近心根の病変体積をマイクロ CT を用いて計測した ($n=4$). グラフは各群の
 体積の平均値と標準偏差を示す.

Student's *t*-test, *: $P < 0.05$

IWR-1 群



Vehicle 群

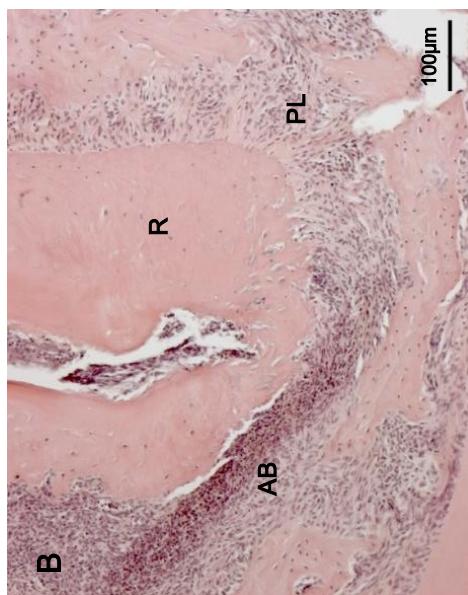
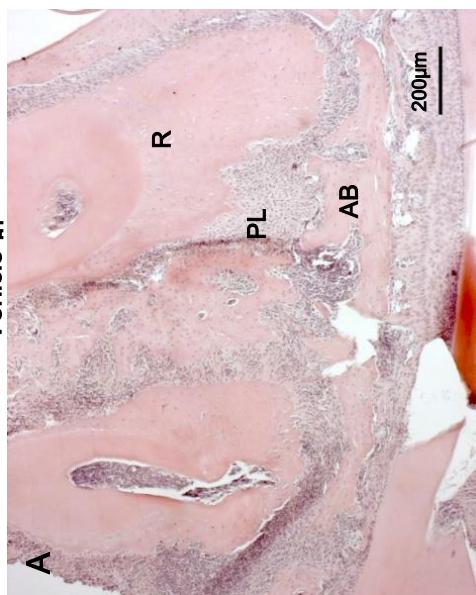
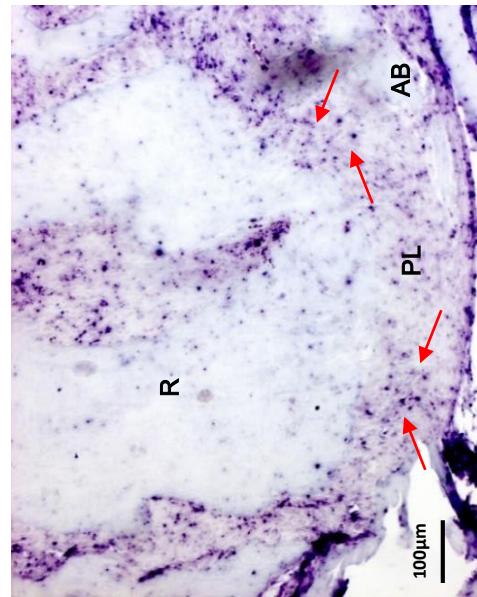


図 4. マウス下顎第一臼歯露髓 4 週後の根尖部の HE 染色像

(A) Vehicle 群の弱拡大像 (観察倍率: $\times 50$): 齒根と歯槽骨の間にヘマトキシリンが濃染した細胞が凝集している領域 (根尖病変) が認められた。(B) Vehicle 群の強拡大像 (観察倍率: $\times 100$): 根尖病変部の拡大像では、広範囲に免疫担当細胞様の細胞群が認められた。(C) IWR-1 群の弱拡大像 (観察倍率: $\times 50$): IWR-1 群では Vehicle 群に比べると広範囲に免疫担当細胞様細胞が分布していることが確認された。

R: 齒根, AB: 齒槽骨, PL: 歯槽骨

Vehicle 群



IWR-1 群

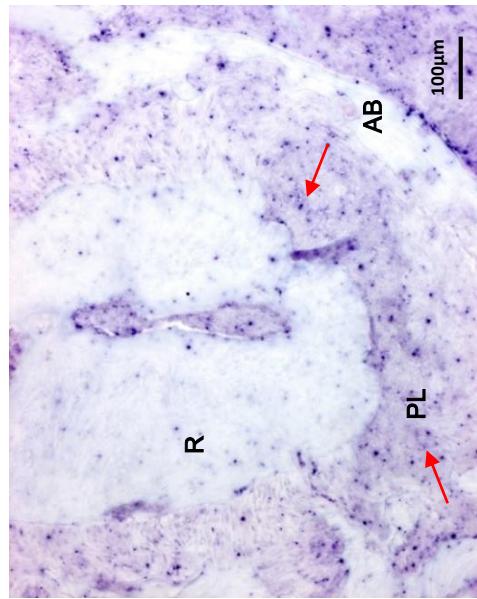


図 5. マウス下顎第一大臼歯露髓 4 週後の根尖周囲組織における *Axin2* の発現
Vehicle 群に比べて、IWR-1 群での *Axin2* の mRNA 発現の低下を認めた。
矢印 : *Axin2* 陽性細胞, R : 齒根, AB : 齒根, PL : 齒槽骨

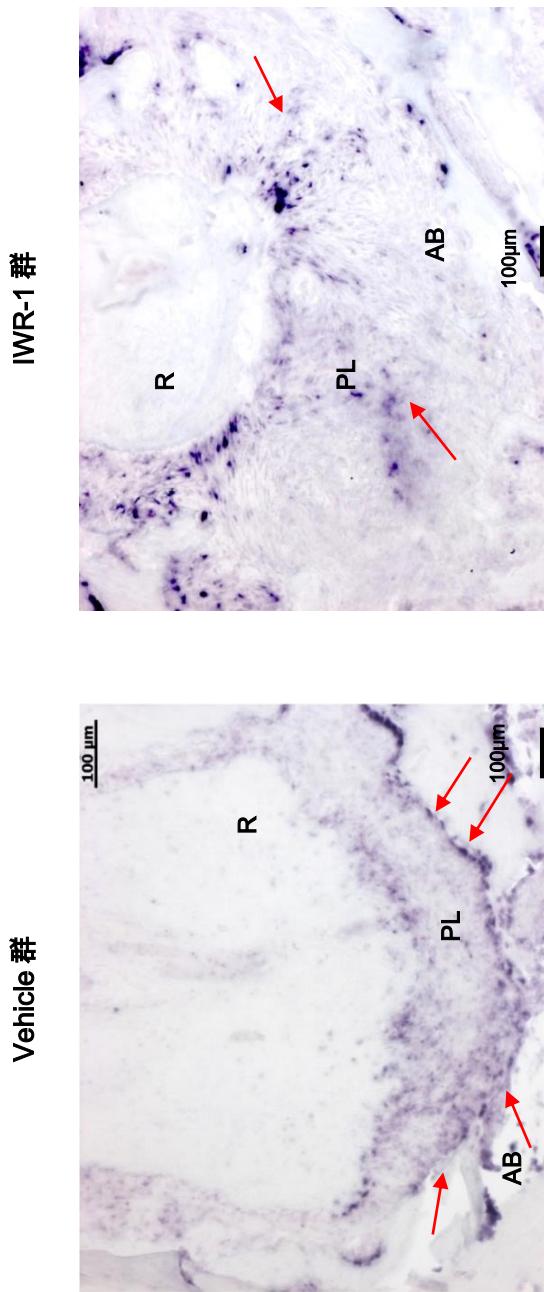


図 6. マウス下顎第一大臼歯露髓 4 週後の根尖周囲組織における *Co1a1* の発現
Vehicle 群において歯根および根尖病変周囲の歯槽骨表面に *Co1a1* 陽性細胞
(矢印) の発現を認めた。一方、IWR-1 群では *Co1a1* 発現の低下を認めた。
矢印: *Co1a1* 陽性細胞, R: 歯根, AB: 歯槽骨, PL: 根尖病変

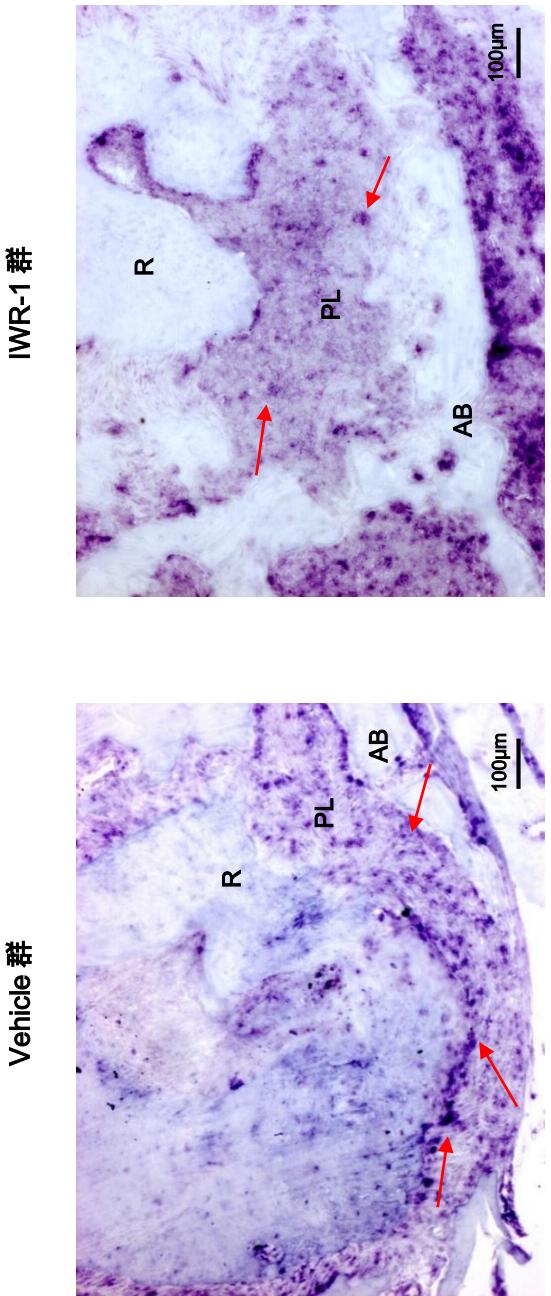
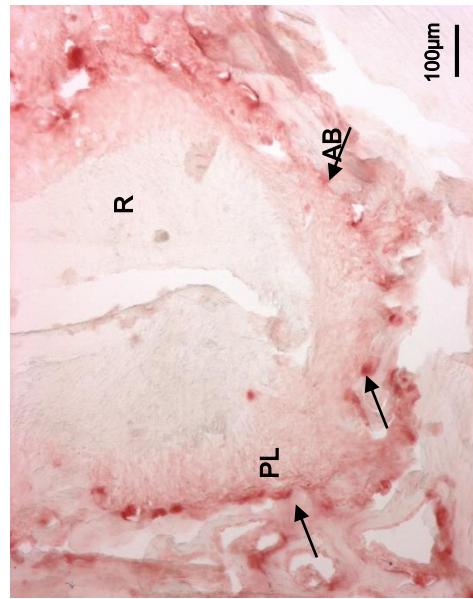


図 7. マウス下顎第一大臼歯露髓 4 週後の根尖周囲組織における*Runx2* の発現
Vehicle 群において歯根および根尖病変周囲の歯槽骨表面に *Runx2* 陽性細胞
(矢印) の発現を認めた。IWR-1 群ではその発現の低下を認めた。
矢印: *Runx2* 陽性細胞, R: 歯根, PL: 歯槽骨, AB: 根尖病変

Vehicle 群



IWR-1 群

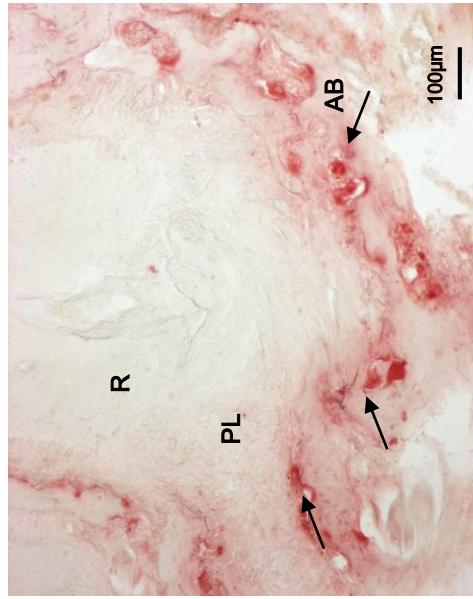


図 8. マウス下顎第一大臼歯露髓 4 週後の根尖周囲組織における TRAP 染色
Vehicle 群と IWR-1 群では TRAP 陽性細胞の発現に差を認めなかつた。
矢印: TRAP 陽性細胞, R: 歯根, PL: 歯槽骨, AB: 根尖病変

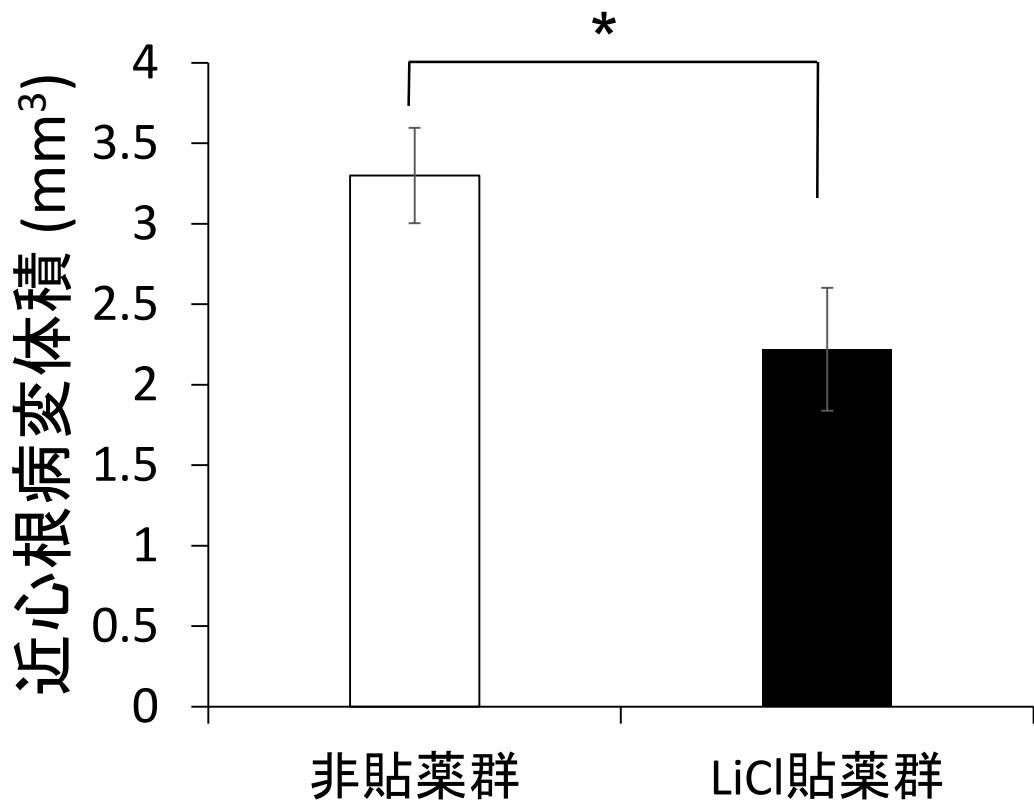


図 9. マウス下顎第一大臼歯に LiCl 貼薬後の近心根病変体積のマイクロ CT 解析

貼薬後 4 週目の近心根の病変体積をマイクロ CT を用いて計測した ($n=3$). グラフは各群の体積の平均値と標準偏差を示す.

Student's t -test, *: $P < 0.05$

LiCl 貼薬群



非貼薬群

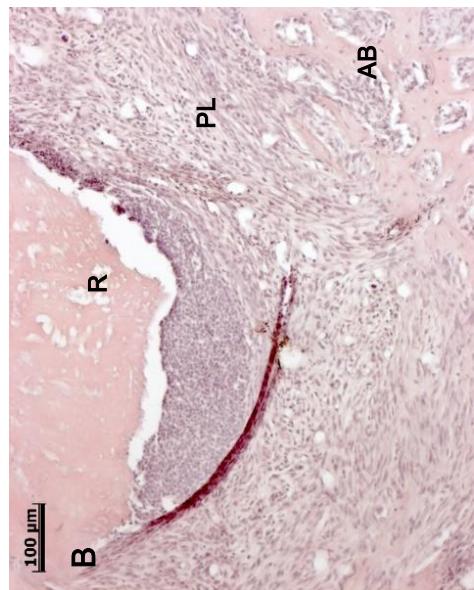
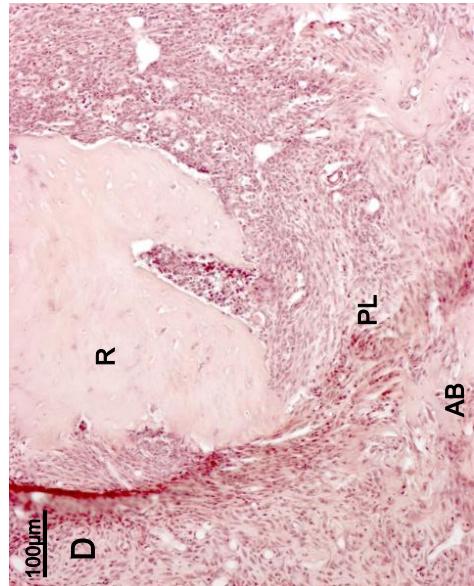
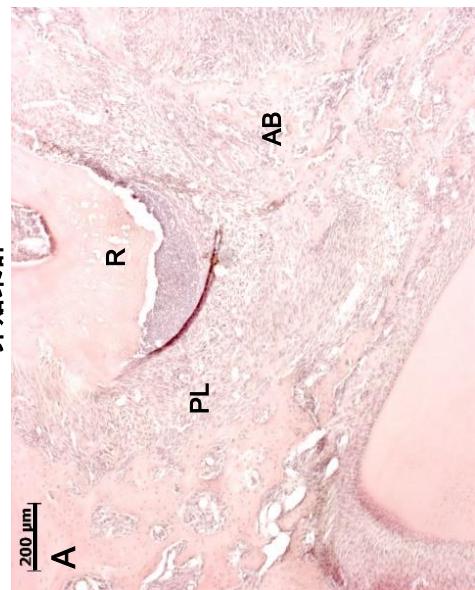
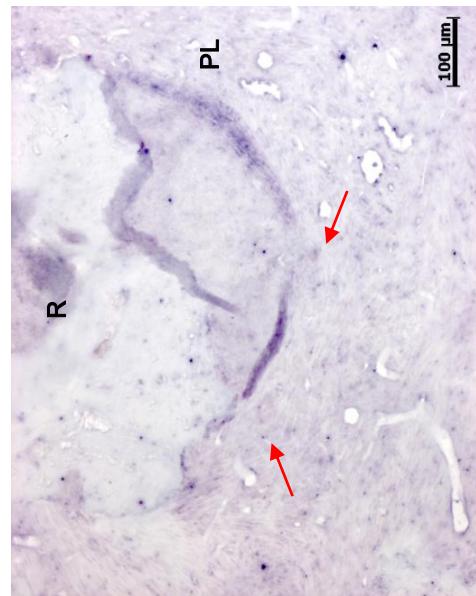


図 10. マウス下顎第一大臼歯に LiCl 貼薬 4 週後の根尖部の HE 染色像
 (A) 非貼薬群の弱拡大像 (観察倍率: $\times 50$). (B) 非貼薬群の強拡大像 (観察倍率: $\times 100$). (C) LiCl 貼薬の弱拡大像 (観察倍率: $\times 50$). (D) LiCl 貼薬群の強拡大像 (観察倍率: $\times 100$). 両群において線維芽細胞や血管新生を認めた. また, 非貼薬群では凝集した免疫担当細胞が集まる根尖病変内に結合組織の新生が認められることから慢性炎症が生じていることが推測され, 齒根肉芽腫の形成途上段階と認められる像が認められた.

R: 齒根, AB: 齒槽骨, PL: 根尖病変

非貼薬群



LiCl 貼薬群

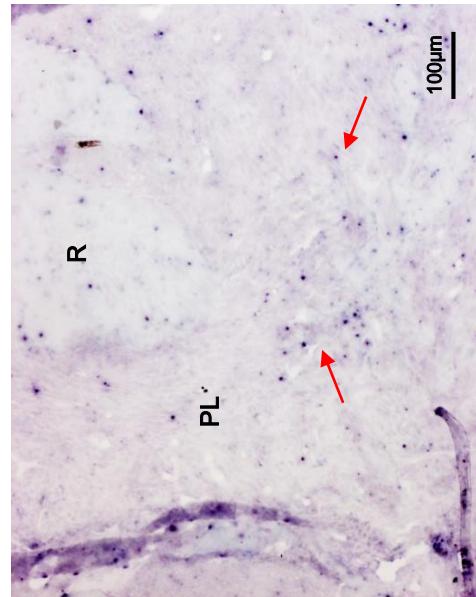
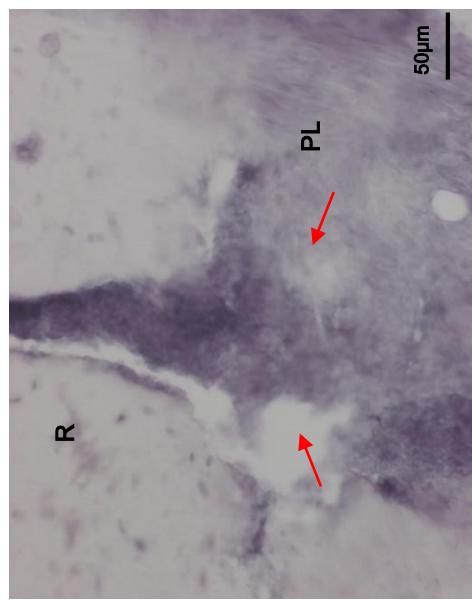


図 11. マウス下顎第一大臼歯に LiCl 貼薬 4 週後の根尖周囲組織における *Axin2* の発現

非貼薬群と LiCl 貼薬群の間で *Axin2* の発現に差は認められなかつた。
矢印 : *Axin2* 陽性細胞, R: 歯根, PL: 根尖病変

非貼薬群



LiCl 貼薬群

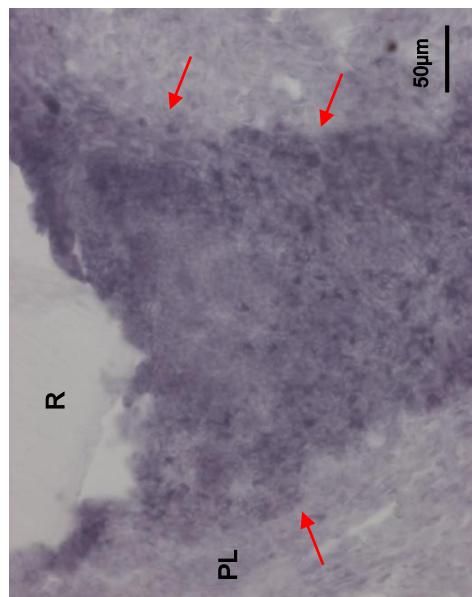


図 12. マウス下顎第一大臼歯に LiCl 貼薬 24 時間後の根尖周囲組織における *Axin2* の発現

非貼薬群に比べて LiCl 貼薬群では多数の *Axin2* 陽性細胞を認めた。
矢印: *Axin2* 陽性細胞, R: 歯根, PL: 根尖病変

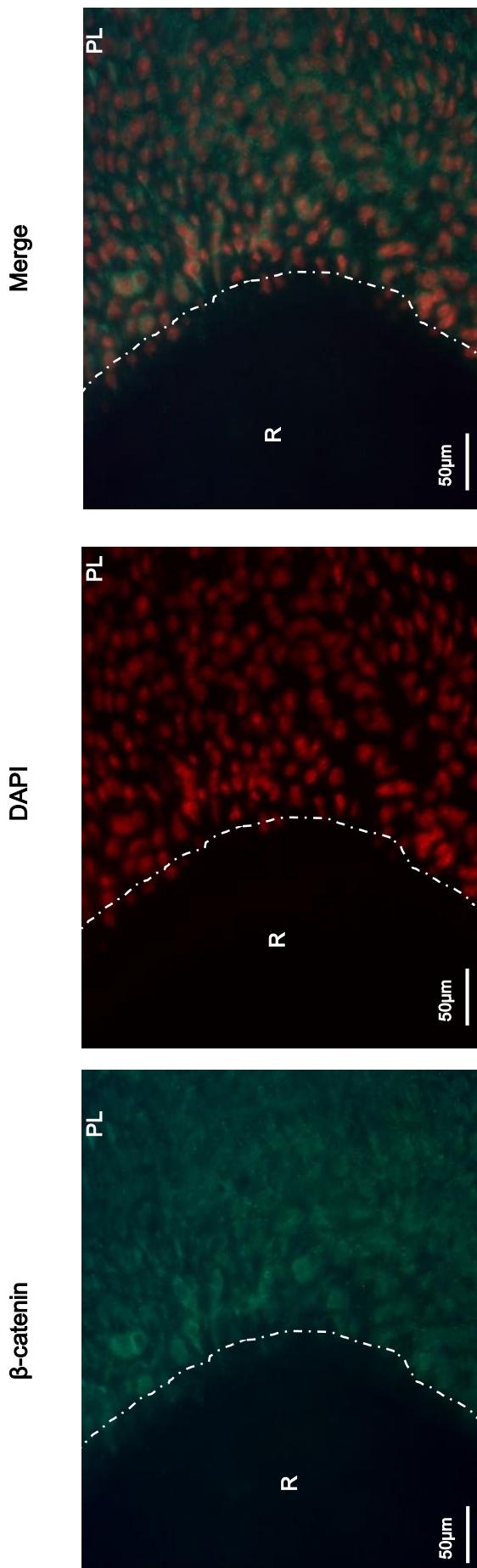
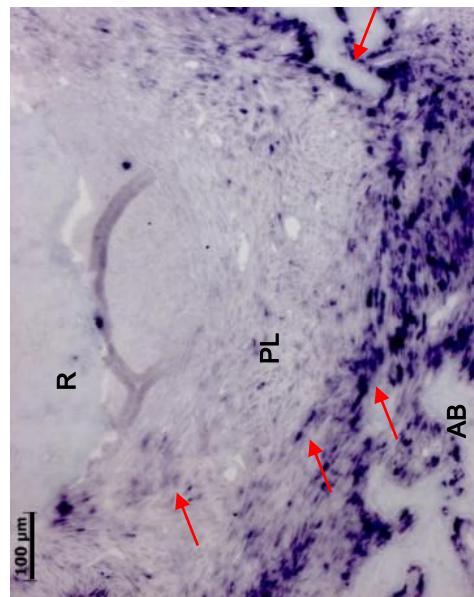


図 13. マウス下顎第一大臼歯に LiCl 貼葉 24 時間後の根尖周囲組織における β -catenin の発現
 β -catenin の細胞質での蓄積および核内での存在を認めた。
緑: β -catenin, 赤: DAPI, R: 歯根, PL: 根尖病変

非貼薬群



LiCl 貼薬群

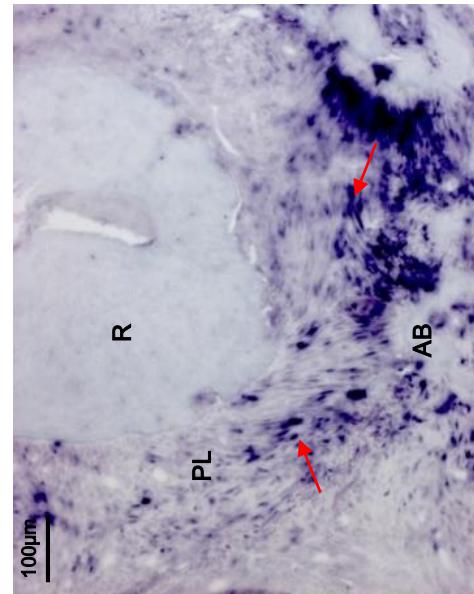
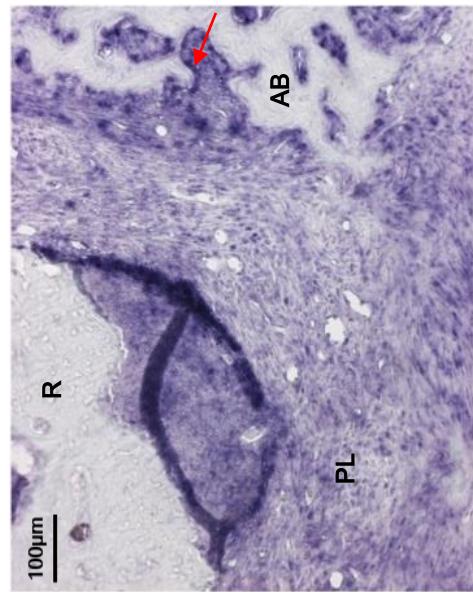


図 14. マウス下顎第一臼歯に LiCl 貼薬 4 週後の根尖周囲組織における *co1a1* の発現

非貼薬群において根尖病変周囲の歯槽骨表面に *co1a1* 陽性細胞(矢印)が認められた。一方、LiCl 貼薬群では病変内にも *co1a1* 陽性細胞を認めた。
矢印: *co1a1* 陽性細胞, R: 歯根, AB: 歯槽骨, PL: 根尖病変

非貼薬群



LiCl 貼薬群

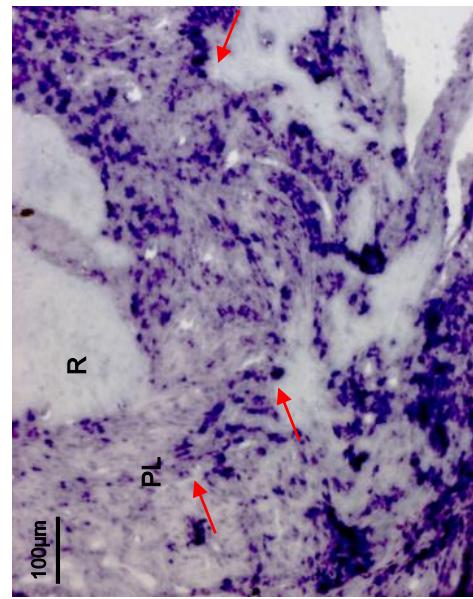


図 15. マウス下顎第一臼歯に LiCl 貼薬 4 週後の根尖周囲組織における *Runx2* の発現

非貼薬群において根尖病変周囲の歯槽骨表面に *Runx2* 陽性細胞 (矢印) がわずかに認められた。一方、LiCl 貼薬群では多数の *Runx2* 陽性細胞が認められた。矢印: *Runx2* 陽性細胞, R: 歯根, AB: 歯槽骨, PL: 根尖病変

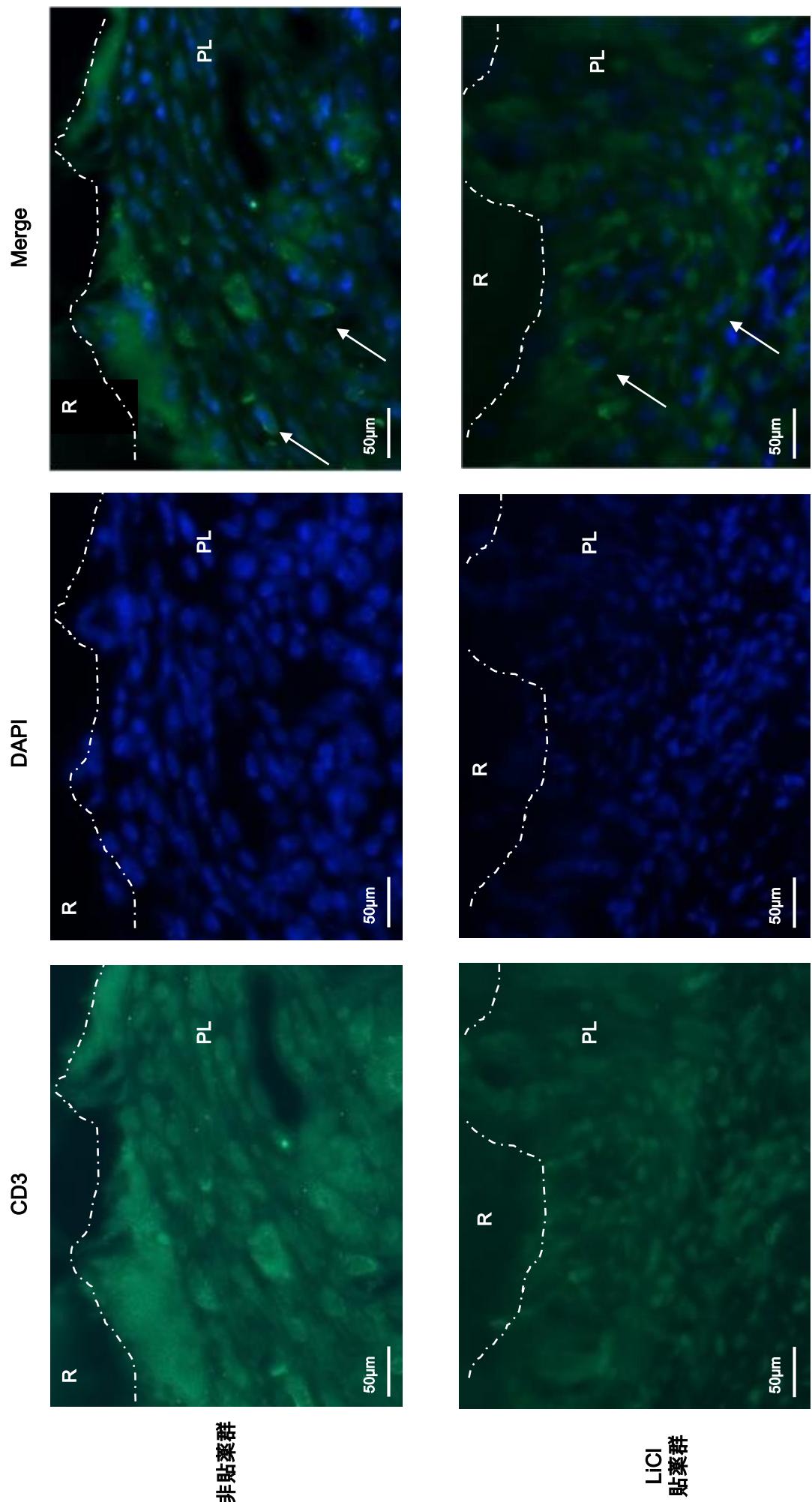


図 16. マウス下顎第一大臼歯に LiCl 貼薬 4 週後の根尖周囲組織における CD3 陽性細胞の評価
非貼薬群と LiCl 貼薬群の両群において CD3 陽性細胞 (矢印) は認められたが、差は認められなかつた。
緑: CD3, 青: DAPI, R: 歯根, PL: 根尖病変

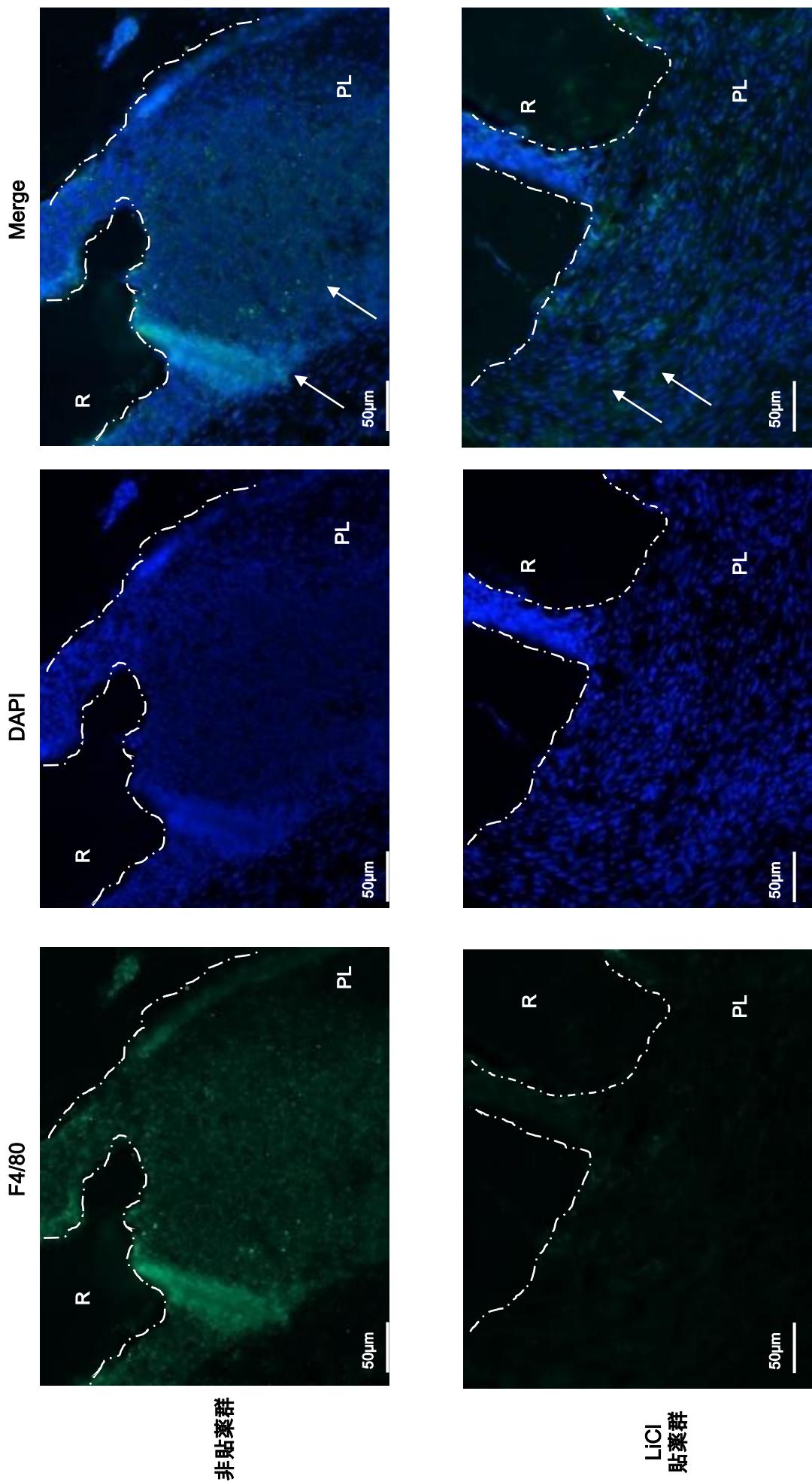


図 17. マウス下顎第一大臼歯に LiCl 貼葉 4 週後の根尖周囲組織における F4/80陽性細胞の評価
 非貼葉群と LiCl 貼葉群の両群において F4/80 陽性細胞 (矢印) は認めめたが、差は認められなかつた。
 緑: F4/80, 青: DAPI, R: 歯根, PL: 根尖病変

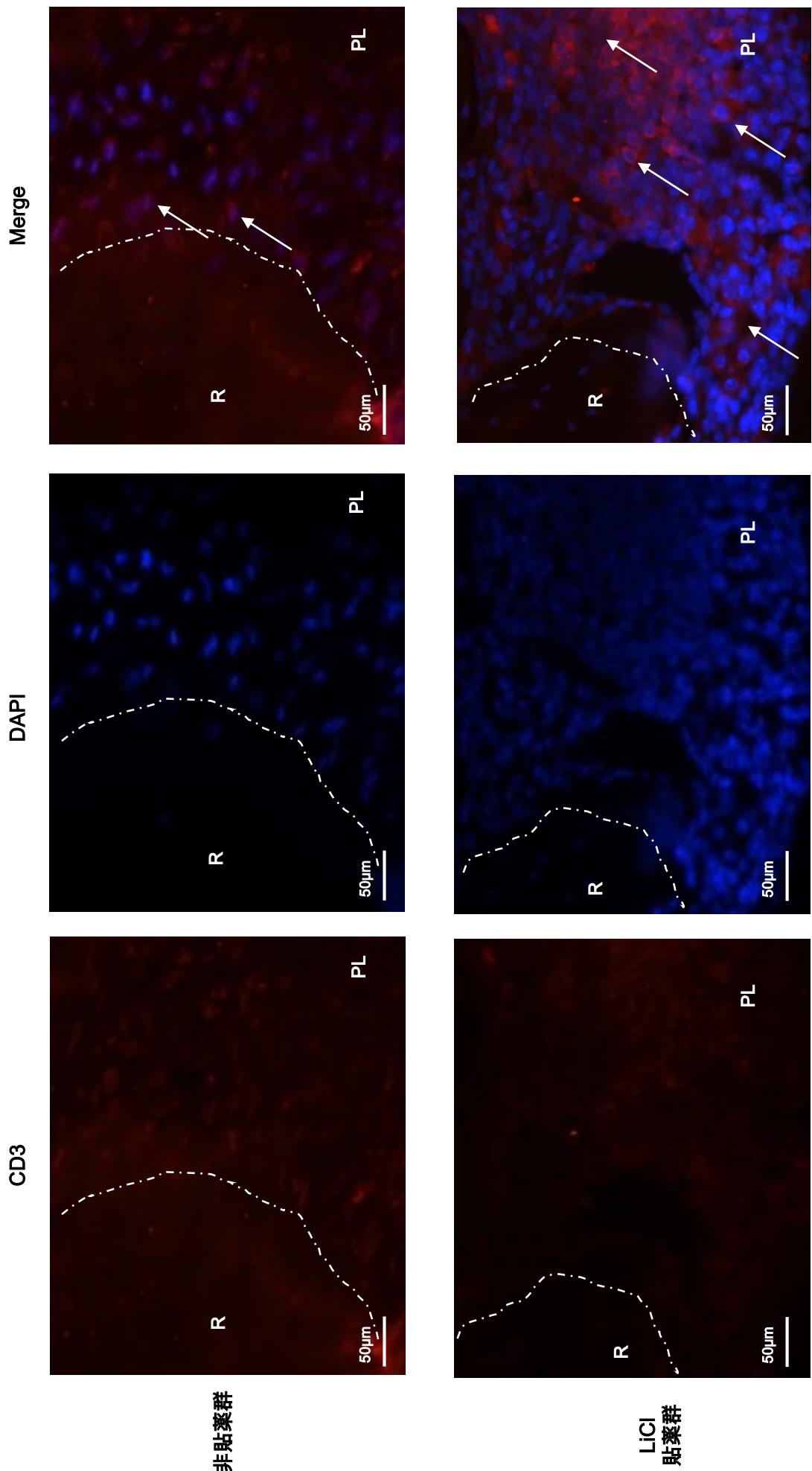


図 18. マウス下顎第一大臼歯に LiCl 貼着 4 週後の根尖周囲組織における CD45R 陽性細胞の評価
 非貼着群と比べて LiCl 貼着群において多くの CD45R 陽性細胞 (矢印) が認められた。
 緑: CD45R, 青: DAPI, R: 齒根, PL: 根尖病変