The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	歯根膜細胞の分化制御におけるセメント芽細胞との相互作用の意義
Author(s)	下村, 純平
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82167
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

歯根膜細胞の分化制御における
セメント芽細胞との相互作用の意義

大阪大学大学院歯学研究科　口腔科学専攻

口腔分子免疫制御学講座　歯周病分子病態学

下村　純平

（指導教官：村上 伸也 教授）

緒言

歯根膜はセメント質と固有歯槽骨との間隙に位置する幅 0.1～0.4 mm の結合組織で、歯を顎骨に固定しその機能を支持する一方で、軟組織としての性質を維持しながら咬合力に起因するメカニカルストレスを緩衝するという役割を担う[1,2]。歯根膜は、主成分であるコラーゲン線維に加え、血管、神経の他、線維芽細胞、セメント芽細胞および骨芽細胞の前駆細胞、さらには未分化間葉系幹細胞などの細胞成分によって構成され、歯周組織の恒常性維持のみならず、歯周組織再生過程において極めて重要な役割を果たす[1,2]。これまでに歯根膜の分子生物学的特徴を *in vitro* で解析することを目的とし、歯根膜由来間葉系幹細胞を単離、培養する手法が報告されている[3]一方で、抜去した歯の歯根表面から歯根膜を採取し、培養皿内で outgrowth してきた heterogeneous な細胞群が、初代培養歯根膜細胞として広く研究に用いられてきた[4]。歯根膜細胞は、線維芽細胞と同様の細胞形態を呈し、分化誘導培地の存在下で硬組織形成細胞への分化を果たすが、PLAP-1 や S100A4 など分化抑制分子を高発現していることが *in vivo* における軟組織としての機能を特徴づけている[5,6]。

セメント質は歯根象牙質外表を被覆する硬組織で、シャーピー線維を埋入することで歯を歯槽窩に固定、支持する役割を担う。セメント質は無機成分としてハイドロキシアパタイト、有機質は I 型コラーゲンを主成分に、III 型コラーゲン、非コラーゲン性タンパクとしてオステオポンチン、オステオカルシン、骨シアロタンパク質（以下、BSP）等により構成されること[7]から骨と類似する硬組織といえるが、血管や神経を含まない点で骨と異なる。さらにセメント質に特徴的に発現する分子として Cementum attachment protein（CAP）[8,9]、Cementum protein 1（CEMP1）[10]が報告され、前者は細胞接着・増殖、後者は硬組織形成細胞への分化を制御することが示されている。このようなセメント基質を分泌する細胞がセメント芽細胞と定義され、セメント質の表層に存在し、セメント質形成の主役となる。発生初期のセメント芽細胞は歯小嚢に由来し、歯根完成後は歯根膜由来間葉系幹細胞からも分化すると考えられているが、その分化制御機構については未だ十分に解明されているとは言えない。

歯周病によって失われた歯周組織の再生を目的として、Guided tissue regeneration 法、エナメルマトリクスタンパクや塩基性線維芽細胞増殖因子（FGF-2）の局所投与が歯周組織再生療法として開発され、臨床において一定の成果を挙げている[11-13]。歯周組織の再生過程では、組織欠損部に歯根膜由来の未分化間葉系幹細胞が増殖・遊走したのちセメント芽細胞や骨芽細胞に分化することで、同組織の再生が達成される[14]。興味深いことにセメント質の再生に関し

ては、歯周組織の再生過程を組織学的に解析した非臨床研究の結果[15,16]から、上記のいずれの歯周組織再生療法においても、新生セメント質は既存セメント質から連続的に生じることが示されている。このことは、セメント質表層に存在するセメント芽細胞が、隣接する歯根膜細胞のセメント芽細胞への分化に対し何らかの役割を担っていることを示唆している。しかしながら、セメント芽細胞と歯根膜細胞の細胞間相互作用が歯根膜細胞のセメント芽細胞への分化に及ぼす影響については十分な情報がない。

生体を構成する細胞間の相互作用は、異なる機能を有する細胞群を組織化し、協調的に機能させることにより、組織の発生や恒常性維持、さらには組織再生を成立させる。細胞間相互作用は、ホルモン、成長因子などの液性因子を介した paracrine シグナルと、細胞の隣接が必要となる juxtacrine シグナルに大別される。さらに juxtacrine シグナルは、Notch シグナルに代表される細胞膜上に発現する分子間の会合を介したシグナル伝達、細胞膜上分子・細胞外基質の接着によるシグナル伝達、さらには gap junction を介した直接的な低分子の授受によるシグナル伝達に細分される[17]。paracrine シグナル制御は、免疫疾患や悪性腫瘍における分子標的薬の開発に応用されているだけでなく、同シグナル活性化の歯科分野における代表例として FGF-2 による歯周組織再生療法が挙げられる。一方で、juxtacrine シグナルの一部は分子標的薬の対象として研究が進められていることに加え、細胞移植治療への応用が期待されている[17]。

現在臨床応用されている歯周組織再生療法は、歯周組織に内在する未分化間葉系幹細胞の増殖促進やスペースメイキングが主な作用機序であるが、セメント芽細胞の効率的な分化誘導が可能になれば、その有効性を著しく高めることが期待できる。そこで、本研究では、歯根膜細胞のセメント芽細胞への分化過程においてセメント芽細胞が果たす役割を明らかにすることを目的とし、*in vitro* 共培養実験系を用いて両細胞間の細胞間相互作用について解析するとともに、その分子機序について検討を加えた。

材料および方法

1. 試薬

Recombinant Human Wnt3a Protein（R&D Systems、Minneapolis、MN、USA）、Recombinant Human Dickkopf-1 （PEPROTECH、Rocky Hill、NJ、USA、以下、DKK-1 と略す）を実験に供した。

2. 細胞培養

ヒト歯根膜細胞（以下、HPDL と略す）は Lonza（Basel、Switzerland）より購入し、不死化ヒトセメント芽細胞（以下、HCEM と略す）[18] は広島大学の高田隆先生（現名誉教授）より供与されたものを使用した。細胞は 10%ウシ胎仔血清（Equitech-Bio、Kerrville、TX、USA、以下、FBS と略す）と 60 μg/ml カナマイシン（和光純薬工業、大阪、日本）を加えたα-Modification of Eagle's Medium（和光純薬工業）培地（以下、培養培地と略す）にて 5%CO_2、37℃、湿度 95%の条件下で培養した。継代培養の際には 0.05%トリプシン、0.02%EDTA（Life technologies、Carlsbad、CA、USA）添加のリン酸緩衝液（和光純薬工業、以下、PBS と略す）で処理し、100 mm 培養ディッシュ（Corning、Corning、NY、USA）に播種した。HPDL は継代 10 代から 14 代目までの細胞を実験に供した。

本研究では同一の培養ディッシュでの共培養（以下、直接的共培養と略す）およびトランスウェル（Corning）を使用した非接触環境下での共培養（以下、間接的共培養と略す）を行うことにより、HPDL と HCEM の細胞間相互作用について検討を行った。直接的共培養では 100 mm 培養ディッシュに総細胞数が 2.0×10^6 個となるように HPDL と HCEM を混合して細胞を播種し、間接的共培養ではトランスウェルおよびプレート底面に 4.0×10^4 個/cm^2 となるように細胞を播種し、培養培地を用いて培養した。

3. EGFP 強発現 HPDL の作製

6 穴細胞培養プレート（Corning）に HPDL を 3.0×10^5 個播種し、24 時間後に EGFP およびピューロマイシン耐性遺伝子を強発現させるウイルス（pLV[Exp]-Puro-CMV>EGFP）（VectorBuilder、Chicago、IL、USA）を MOI=10 にて感染させた。感染 48 時間後に PBS にて 2 度洗浄した後に培養培地に交換した。さらに 24 時間後に 1 μg/ml ピューロマイシン含有培養培地に交換し 3 日間の選択培養を行うことで、EGFP 強発現 HPDL（以下、GFP-HPDL と略す）を作製した。EGFP の発現は蛍光顕微鏡 Nikon ECLIPSE Ti-U（Nikon、東京、

日本）による観察にて確認した。

4. セルソーターによる細胞分取

GFP-HPDL と HCEM の直接的共培養系から GFP-HPDL を分取するにあたっては、SH800Z Cell Sorter（Sony、東京、日本）を使用した。すなわち、100 mm 培養ディッシュに GFP-HPDL と HCEM を総細胞数が 2.0×10^6 個となるように混合して播種し、12 時間あるいは 24 時間の共培養後にトリプシン処理により細胞を回収し、10%FBS 含有 PBS にて 2.0×10^6 個/ml の細胞懸濁液を作製した。同細胞のプロファイルをセルソーターで解析し、GFP が強発現している細胞を選択的に回収した。

5. 分化誘導

GFP-HPDL の硬組織形成細胞への分化誘導は、細胞を 24 穴細胞培養プレート（Corning）に 5.0×10^4 個/well となるように播種し、10 mM β-グリセロリン酸（和光純薬工業）、50 μg/ml アスコルビン酸（和光純薬工業）を添加した培養培地（以下、石灰化誘導培地と略す）にて培養し、以後 3 日ごとに培地交換することにより行った。

6. 培養上清の回収

HPDL、HCEM それぞれを培養培地にて 100 mm 培養ディッシュに 1.0×10^6 個播種し、培養 3 日後の培養上清を回収し実験に使用した。

7. 全 RNA の抽出および相補的 DNA（以下、cDNA と略す）の作製

培養細胞からの全 RNA 抽出には、PureLink™ RNA Mini Kit（Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA）を用いた。抽出・精製した全 RNA を鋳型として、High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いて逆転写反応を行い、cDNA を作製した。

8. Real-time PCR 法による遺伝子発現解析

Real-time PCR 法による解析は、cDNA を鋳型として、表 1 に示す各遺伝子特異的な Real-time PCR 用プライマー（タカラバイオ、滋賀、日本、および FASMAC、神奈川、日本）を用いて行った。PCR 反応は Fast SYBR® Green PCR Master Mix（Applied Biosystems、Foster City、CA、USA）を用いて、Step One Plus Real-time PCR System®（Applied Biosystems）にて行った。なお、各遺伝子の発現量は、ハウスキーピング遺伝子の一つである ribosomal protein lateral stalk subunit P0（*RPLP0*）を内在性コントロール遺伝子として同遺伝

子の発現量に対する相対量として算出した。

表 1　本研究で使用した Real-time PCR 用プライマーの一覧

Gene		Primer sequence
ALPL	F	5'-GGACCATTCCCACGTCTTCAC-3'
	R	5'-CCTTGTAGCCAGGCCCATTG-3'
BGLAP	F	5'-CCCAGGCGCTACCTGTATCAA-3'
	R	5'-GGTCAGCCAACTCGTCACAGTC-3'
CEMP1	F	5'-CTGAGGATGGGCACATCAAG-3'
	R	5'GAGGTTCTCAGCCGATGTGTTAG-3'
IBSP	F	5'-GGCCACGATATTATCTTTACAAGCA-3'
	R	5'-TCAGCCTCAGAGTCTTCATCTTCA-3'
AXIN2	F	5'-TGGTGCCCTACCATTGACACA-3'
	R	5'-TGGTCAACCCTCAAGACCTTTAAGA-3'
LEF1	F	5'-AGCGAATGTCGTTGCTGAGTGTA-3'
	R	5'-CTCTTGCAGACCAGCCTGGATAA-3'
RPLP0	F	5'-TTCGACAATGGCAGCATCTACAA-3'
	R	5'-CTGCAGACAGACACTGGCAACA-3'

9. アリザリンレッド染色による石灰化ノジュール形成能の検討

石灰化ノジュール形成能は、アリザリンレッド染色により検討した。すなわち、GFP-HPDL を硬組織形成細胞へと 18 日間、あるいは 30 日間分化誘導した後、培養上清を除去、細胞層を PBS にて 2 回洗浄を行い、100%エチルアルコール（和光純薬工業）にて固定（4℃、10 分間）した。1%アリザリンレッド S（和光純薬工業）、0.1%水酸化アンモニウム（和光純薬工業）水溶液（pH 6.4）にて染色（室温、5 分間）した後、蒸留水にて洗浄した。染色像は、カラーイメージスキャナ GT-X970（エプソン、東京、日本）にて読み込むことで、画像を取得した。その後、画像解析ソフトウェア WinRoof（三谷商事、福井、日本）にて解析を行い、染色部面積率および色濃度を数値化し、その積を石灰化ノジュールの形成度として算出し評価した。

10. 免疫蛍光細胞染色法による解析

HCEM もしくは HPDL を、35 mm 径ガラスボトムディッシュ（松波硝子、大阪、日本）上に 3.0×10^4 個播種し、培養培地で 24 時間培養した。PBS で洗

浄した後、CellMask™（Thermo Fisher Scientific）を 10 分間反応させ、細胞膜を染色した。4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液（和光純薬工業）で 15 分、室温にて固定した。PBS で洗浄した後、10%ヤギ血清 （Sigma-Aldrich、St. Louis、MO、USA）含有 PBS で 30 分間、室温にてブロッキングを行った。一次抗体にはウサギ抗-ヒト Wnt3a モノクローナル抗体（10 μg/ml；Abcam、Cambridge、UK）を用い、1 時間、室温にて反応させた。ネガティブコントロールの一次抗体にはウサギ IgG モノクローナル抗体（Abcam）を使用した。PBS で洗浄した後に、二次抗体に Alexa Fluor 488 標識ヤギ抗-ウサギ IgG 抗体（10 μg/ml；Abcam）を用い、1 時間、室温にて反応させ、DAPI（Sigma-Aldrich）にて 10 分、室温で核染色を行った。なお、一次抗体および二次抗体は、それぞれ PBS で希釈した。これを共焦点レーザー顕微鏡 Leica TCS SP8 を用いて観察した。

11. RNAscope *in situ* hybridization

CO2 ガスを用いて安楽死させた 8 週齢 C57BL/6J 雌性マウス（日本 SLC 株式会社、静岡、日本）より上顎骨を取り出した（大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会　受付番号：動歯-30-016-0）。4%パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液にて一晩浸漬固定後、モールス液（和光純薬工業）にて一晩脱灰処理を行い、70%エタノール液に浸漬した。これをパラフィン包埋装置 CT-Pro20（Genostaff、東京、日本）および、Leica EG1150（Leica Microsystems、Wetzlar、Germany）を用いてパラフィン包埋した。4 μm に薄切した切片を、抗原賦活化装置 Decloaking Chamber NxGen（BIOCARE Medical、Pacheco、CA、USA）を用いて 95℃で 15 分間反応させることで標的賦活化し、RNAscope *in situ* hybridization システム（Advance Cell Diagnostics、Newark、CA、USA）2.5HD-RED キットを用いて、薄切切片上の *PLAP-1* および *IBSP* の mRNA 発現を検出し、DAPI にて 10 分間核染色を行った後に共焦点顕微鏡 Leica TCS SP8 を用いて観察した。

12. 統計処理

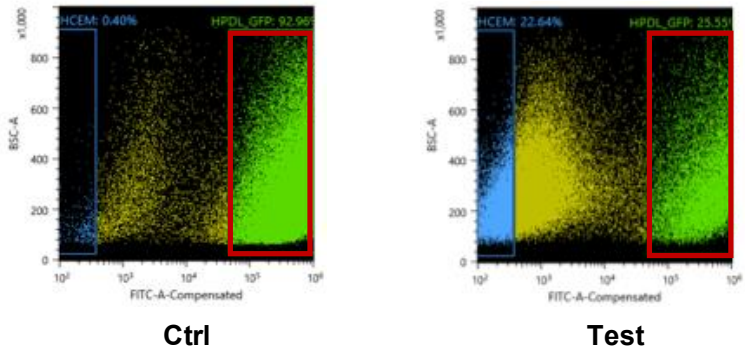
実験データは平均値±標準誤差で示した。有意差検定は、2 群比較は Student's-t 検定を、多群比較は分散分析（ANOVA）を行った後に post-hoc として Tukey 検定を用いて行い、$p < 0.05$ を有意差があるものとした。

結果

1. セメント芽細胞との共培養が歯根膜細胞のセメント芽細胞への分化に及ぼす影響の検討

まず、セメント芽細胞との共培養が歯根膜細胞に及ぼす影響を明らかにするために、HCEM と共培養した GFP-HPDL を分取し、その遺伝子発現を解析した。すなわち、HCEM と GFP-HPDL を 1:1 の比率で混合し、12 時間あるいは 24 時間の直接的共培養後に GFP-HPDL のみをセルソーターで分取した（図 1A）。分取した GFP-HPDL から RNA を回収し、セメント芽細胞関連遺伝子である *ALPL*、*IBSP*、*CEMP1*、*BGLAP* の発現を Real-time PCR 法にて解析した。なお、GFP-HPDL のみ播種したものから同様にセルソーターにて分取処理した細胞をコントロールとして用いた。その結果、HCEM と共培養した GFP-HPDL は、コントロールと比較して 12 時間後に *IBSP* の有意な発現上昇を認め、24 時間後には *ALPL*、*IBSP*、*CEMP1*、*BGLAP* の有意な発現上昇を認めた（図 1B）。また、HCEM の含有比率を 50%以下で検討したところ、GFP-HPDL におけるセメント芽細胞関連遺伝子の発現上昇は HCEM の含有比率に依存し、50%で最大となることが明らかとなった（結果には示さず。）そこで以降の実験は共培養する時間を 24 時間、HCEM と GFP-HPDL の混合比率を 1:1 と設定し解析を行った。

A



B

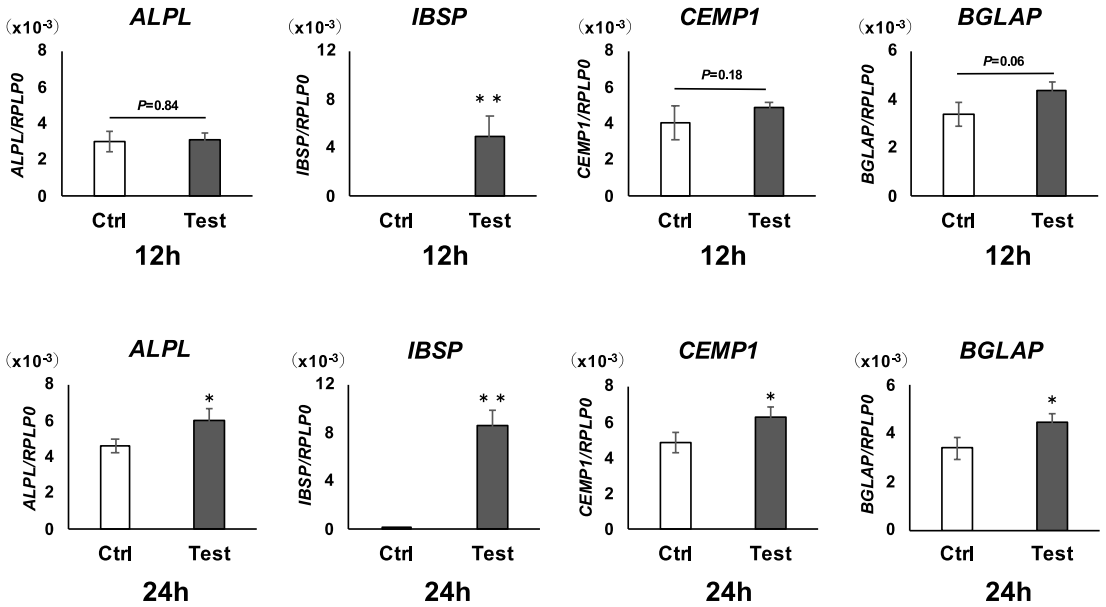


図 1. HCEM と HPDL の共培養が HPDL のセメント芽細胞への分化に及ぼす影響

A. GFP-HPDL をセルソーターで回収した際の細胞のプロファイルを示す。赤枠内の細胞をゲーティングし、GFP-HPDL を回収した。

B. GFP-HPDL を HCEM と 1:1 の比率で混合し、12、24 時間直接的共培養した際の GFP-HPDL における *ALPL*、*IBSP*、*CEMP1*、*BGLAP* の発現を示す。値は *RPLP0* との相対比で示す。

＊p <0.05、＊＊p <0.01

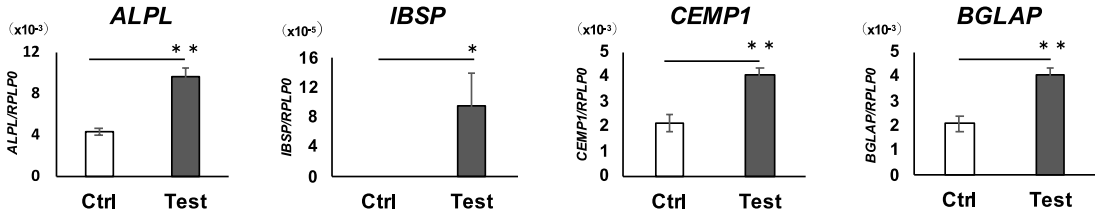
3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

2. セメント芽細胞との共培養が歯根膜細胞の硬組織形成細胞への分化に及ぼす影響の検討

次に HCEM との直接的共培養が HPDL の硬組織形成細胞への分化能に及ぼす影響について検討を行った。すなわち、GFP-HPDL と HCEM を 1:1 の比で混合し培養培地にて 24 時間の直接的共培養後、セルソーターで GFP-HPDL を分取し 24 穴細胞培養プレートに播種した。これを石灰化誘導培地で培養し、3 日後における GFP-HPDL の遺伝子発現を Real-time PCR 法にて解析するとともに、18 日後、30 日後にアリザリンレッド染色を行うことで硬組織形成細胞への分化能を評価した。なお、GFP-HPDL のみ播種したものから同様にセルソーターにて分取処理した細胞をコントロールとして用いた。その結果、HCEM と共培養した GFP-HPDL ではコントロールと比較し、培養 3 日目において *ALPL*、

IBSP、*CEMP1*、*BGLAP* の有意な発現上昇を認めた（図 2A）。またアリザリンレッド染色の結果、HCEM と共培養した GFP-HPDL ではコントロールと比較し培養 18 日目と 30 日目において石灰化ノジュール形成の亢進を認めた（図 2B）。

A



B

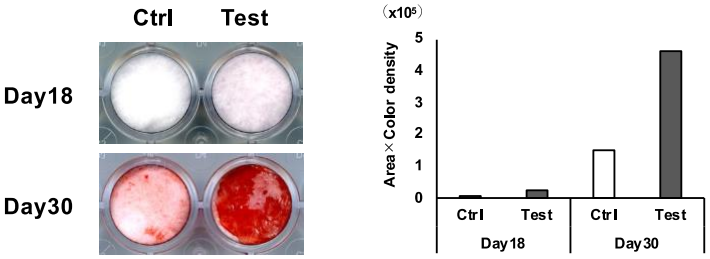


図 2. HCEM と HPDL の共培養が HPDL の硬組織形成細胞への分化に及ぼす影響

A. GFP-HPDL を HCEM と 1:1 の比率で混合し、24 時間の直接的共培養後にセルソーターで GFP-HPDL を回収後に培養皿に播種し、石灰化誘導培地で 3 日間培養した際の GFP-HPDL における *ALPL*、*IBSP*、*CEMP1*、*BGLAP* の発現を示す。値は *RPLP0* との相対比で示す。
＊p <0.05、＊＊p <0.01
3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

B. GFP-HPDL を HCEM と 1:1 の比率で混合し、24 時間の直接的共培養後にセルソーターで GFP-HPDL を回収後に培養皿に播種し、石灰化誘導培地で培養した際の 18 日目および 30 日目におけるアリザリンレッド染色像（左）と画像解析結果（右）を示す。
2 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

3. セメント芽細胞由来液性因子が歯根膜細胞に及ぼす影響の検討

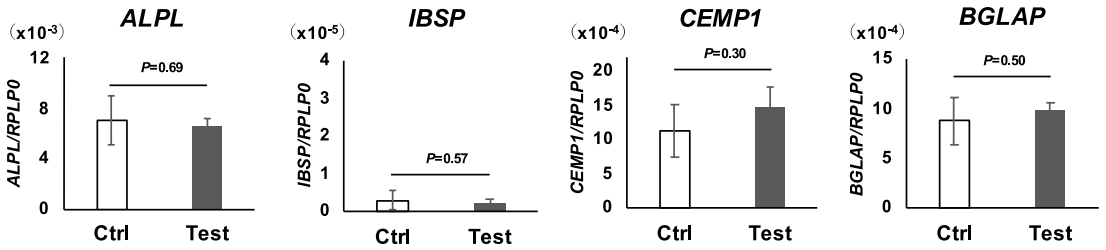
次に、直接的共培養後に認められた HPDL における遺伝子発現変化が、HCEM 由来液性因子によるものか否かについて検討するために、HCEM の培養上清を 50%の割合で添加した培養培地にて HPDL を 24 時間培養し、HPDL におけるセメント芽細胞関連遺伝子の発現を Real-time PCR 法にて解析した。コントロールは HPDL の培養上清を 50%の割合で添加した培地を用いて HPDL を培養

したものとした。その結果、HCEM 由来培養上清の添加は、HPDL におけるセメント芽細胞関連遺伝子の発現に影響を及ぼさないことが明らかとなった（図 3A）。

さらにトランスウェルを使用して HPDL と HCEM を間接的共培養することで、HCEM 由来液性因子が HPDL に及ぼす影響について解析を行った。間接的共培養では、トランスウェルインサート内に HCEM を、トランスウェル下部のプレート底面には HPDL を播種し、24 時間培養した後の HPDL におけるセメント芽細胞関連遺伝子の発現を Real-time PCR 法にて解析した。なお、コントロールはトランスウェルインサート内に HPDL を播種したものとした。その結果、HCEM との間接的共培養は HPDL における *ALPL*、*IBSP*、*CEMP1*、*BGLAP* の各遺伝子発現に影響を及ぼさないことが明らかとなった（図 3B）。

以上の結果から、HCEM 由来液性因子は HPDL におけるセメント芽細胞関連遺伝子の発現に有意な影響を及ぼさないことが明らかとなった。

A



B

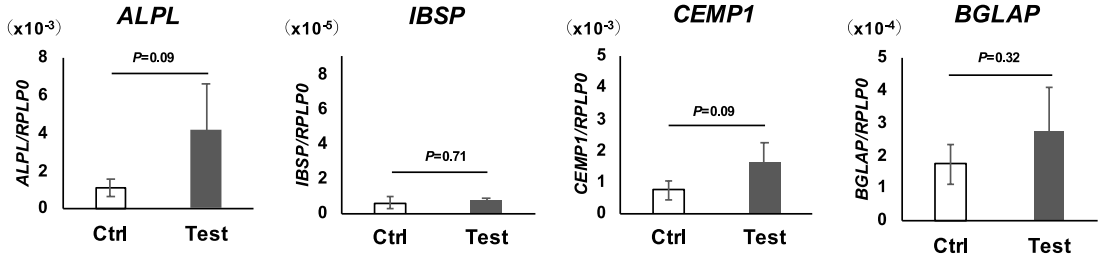


図 3　HCEM 由来液性因子が HPDL に及ぼす影響の検討

A. HPDL あるいは HCEM の培養上清を 50%含有した培地にて HPDL を 24 時間培養した際の *ALPL*、*IBSP*、*CEMP1*、*BGLAP* の各遺伝子発現を示す。値は *RPLP0* との相対比で示す。

B. トランスウェルにより HPDL と HCEM を 24 時間間接的共培養した際の HPDL における *ALPL*、*IBSP*、*CEMP1*、*BGLAP* の各遺伝子発現を示す。値は *RPLP0* との相対比で示す。

以上の実験はすべて 3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

4. マウス歯周組織における *Ibsp* 発現の解析

ここまでの実験結果から、HCEM との直接的共培養により認められた HPDL におけるセメント芽細胞関連遺伝子の発現上昇は、HCEM 由来液性因子の作用ではなく、細胞間の直接的な接着によって誘導されることが示唆された。そこで、HCEM と HPDL の直接的な細胞間相互作用がいかなる分子機序によって成り立っているのかを明らかにするために、両細胞の直接的共培養により発現が顕著に上昇した *IBSP* の発現を指標として検討を行うこととした。RNAscope® *in situ* hybridization 法によってマウス歯周組織における *Ibsp* mRNA の発現を解析した結果（図 4）から、歯根膜に特異的に発現が認められる *Plap-1* とは異なり、*Ibsp* mRNA は歯根表面のセメント芽細胞と歯槽骨表面の骨芽細胞に発現が認められた。この結果から、歯根膜細胞がセメント芽細胞を含む硬組織形成細胞へと分化する過程をモニターするマーカーとして *IBSP* が有用であることが裏付けられた。

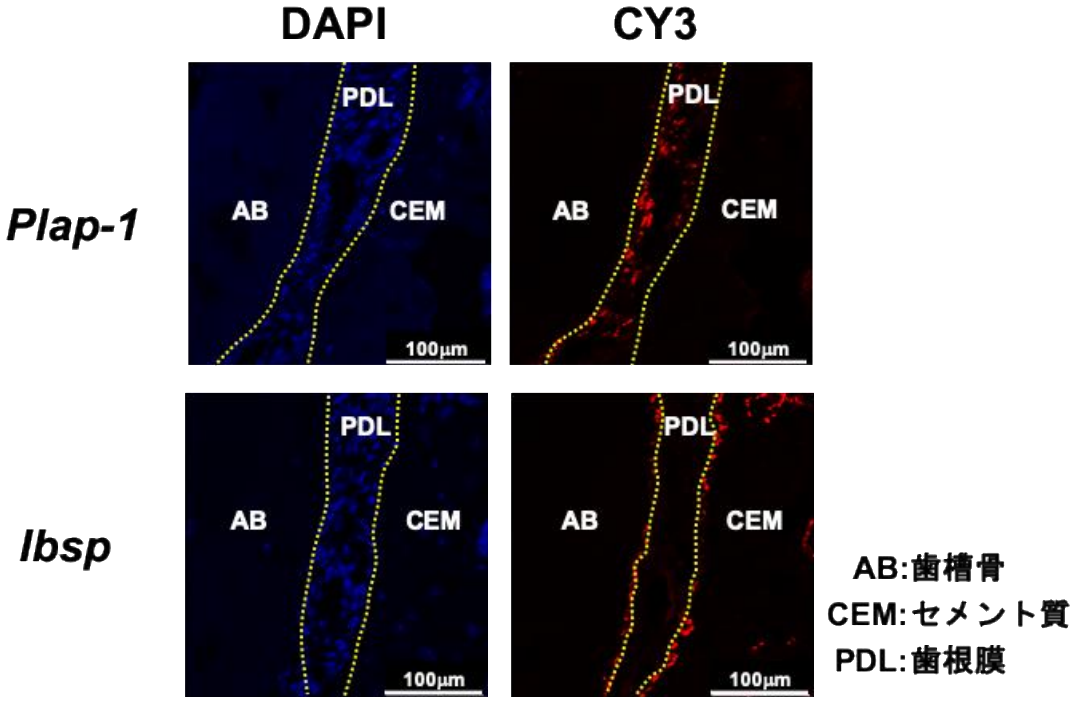


図 4.　マウス歯周組織における *Ibsp* の発現

8 週齢 57BL/6J 雌性マウスの上顎骨を採取し、モールス液にて脱灰後パラフィン包埋し、薄切切片を作成した。RNA Scope® *in situ* hybridization 法による mRNA の検出後、共焦点顕微鏡で撮影した上顎第一大臼歯遠心根部の強拡大像を示す。

5. HCEM および HPDL の細胞膜上における Wnt3a 発現の解析

HCEM と HPDL の直接的接着により HPDL に *IBSP* 遺伝子発現が誘導される分子機序として、Canonical Wnt シグナルに着目した。Canonical Wnt シグナルは、*in vitro* においてセメント芽細胞への分化を誘導するだけなく、*in vivo* にてセメント質の再生誘導や過形成に関与することが報告されている [19-22]。一方で、従来は autocrine、paracrine で作用すると考えられてきた Canonical Wnt シグナルが、骨芽細胞を用いた実験から juxtacrine でのシグナル伝達により骨芽細胞の分化誘導を促進していることが近年報告されている [23]。そこでまず、HCEM、HPDL の細胞膜上に発現する Wnt3a の検出を免疫蛍光細胞染色法により試みた。その結果、HCEM の細胞膜上に Wnt3a の発現が検出された。一方、HPDL の細胞膜上には Wnt3a は検出されなかった（図 5）。

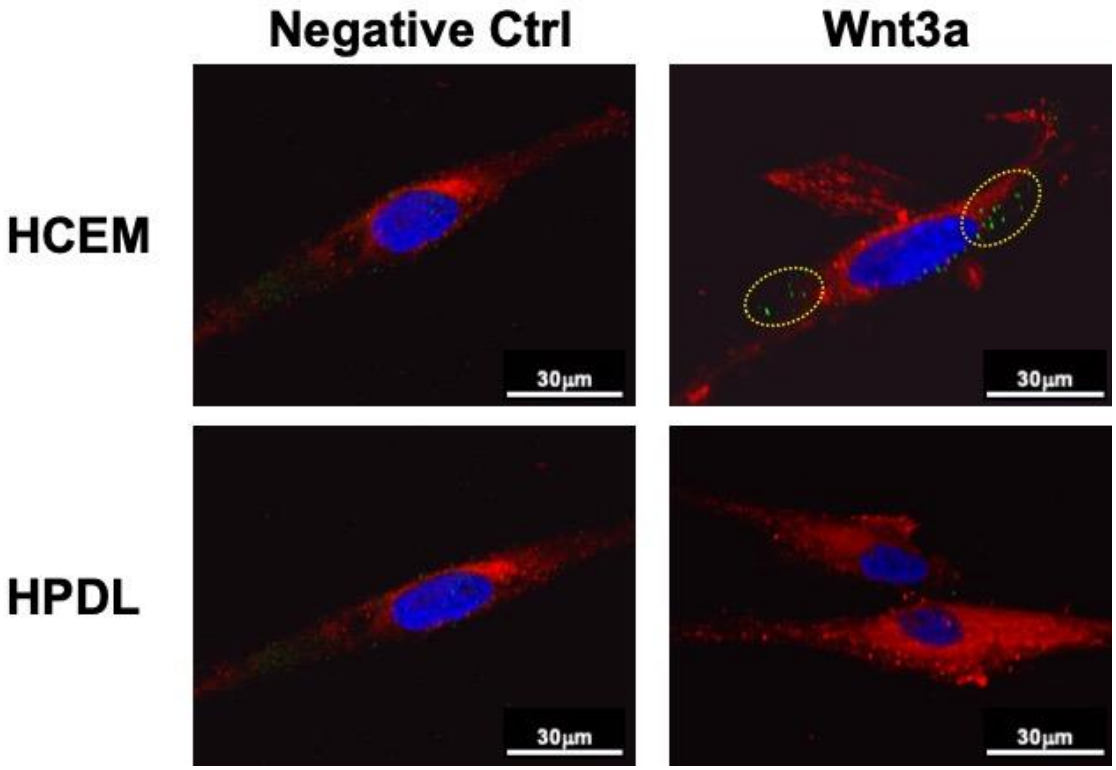


図 5.　HCEM の細胞膜上に発現する Wnt3a

HCEM、HPDL を 24 時間培養した際の細胞膜上における Wnt3a の発現を示す。赤が細胞膜、青が核染色、緑が検出された Wnt3a を示す。細胞膜の透過処理は行わずに CellMask™ で細胞膜を染色した。Wnt3a を Alexa Fluor 488 標識抗体にて検出し、DAPI にて核染色を行った。共焦点レーザー顕微鏡にて細胞膜に焦点を当て、画像を取得した。

6. Canonical Wnt シグナルが HPDL における *IBSP* の遺伝子発現に及ぼす影響の検討

続いて、Canonical Wnt シグナルが HPDL に *IBSP* の発現を誘導するか否かを検討するために、HPDL を Recombinant Wnt3a 存在下にて 24 時間培養し、Wnt 関連遺伝子である *AXIN2*、*LEF1* および *IBSP* の発現を Real-time PCR 法にて解析した。その結果、Wnt3a 存在下では HPDL における *AXIN2*、*LEF1*、*IBSP* の発現が濃度依存的に上昇することが明らかとなった（図 6）。この Wnt3a 刺激により上昇した *IBSP* の発現が、Wnt 受容体である LRP5/6、Frizzled 受容体を介したシグナルによるものか否かを検討するために、Wnt の共役受容体である LRP5/6 への結合を阻害する DKK-1 を添加し、その遺伝子発現を Real-time PCR 法にて解析した。その結果、Wnt3a 刺激により上昇した Wnt 関連遺伝子および *IBSP* の発現は、DKK-1 の存在下で有意に抑制された（図 7）。

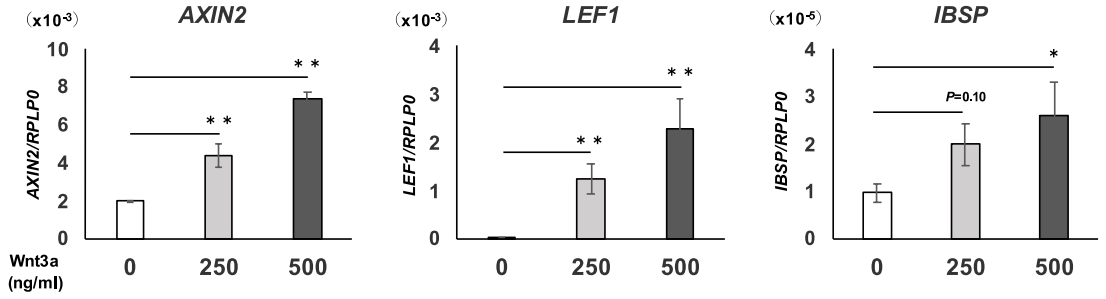


図 6.　Wnt3a によって HPDL に誘導される Wnt 関連遺伝子および *IBSP* 遺伝子の発現

HPDL を Wnt3a（250、500 ng/ml）存在あるいは非存在下で 24 時間培養した際の *AXIN2*、*LEF1*、*IBSP* の発現を示す。値は *RPLP0* との相対比で示す。

＊p <0.05、＊＊p <0.01

3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

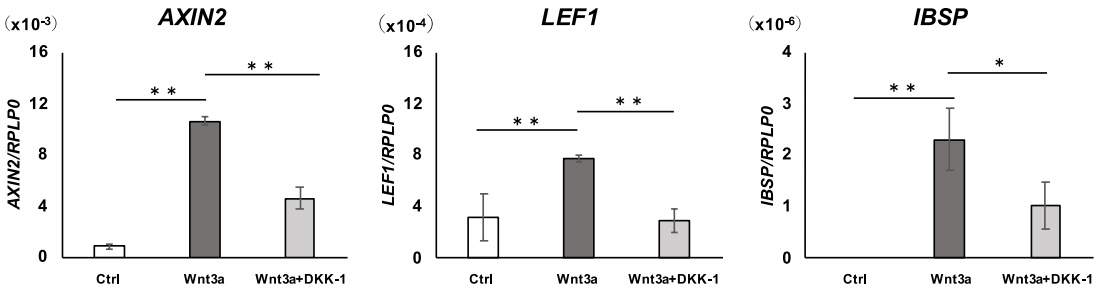


図 7. DKK-1 による Wnt3a 誘導 Wnt 関連遺伝子および *IBSP* 遺伝子の発現抑制

HPDL を Wnt3a（500 ng/ml）あるいは DKK-1（50 ng/ml）の存在、非存在下で 24 時間培

養した際の *AXIN2*、*LEF1*、*IBSP* の発現を示す。値は *RPLP0* との相対比で示す。

＊p <0.05、＊＊p <0.01

3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

7. HCEM と直接的共培養後に HPDL に誘導される *IBSP* 遺伝子発現における Canonical Wnt シグナルの影響の検討

続いて、HCEM との直接的共培養によって HPDL に *IBSP* 遺伝子の発現が誘導されるメカニズムとして、Canonical Wnt シグナルが関与しているか否かを明らかにするために、HCEM と GFP-HPDL とを 1:1 の比で直接的共培養した際に DKK-1 を添加し、24 時間培養後にセルソーターで GFP-HPDL を分取し *AXIN2*、*LEF1* および、*IBSP* の発現を Real-time PCR 法にて解析した。その結果、HCEM との共培養で HPDL における発現が上昇した *IBSP* の発現は、*AXIN2*、*LEF1* と同様に DKK-1 存在下にて抑制された（図 8）。

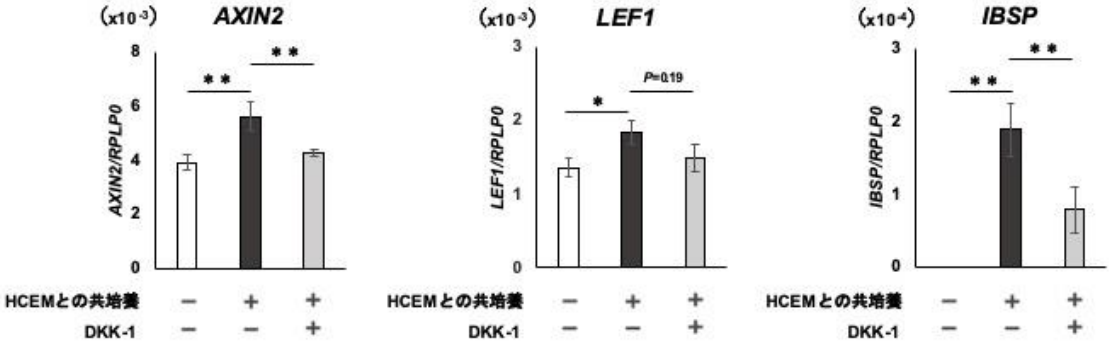


図 8. HCEM と直接的共培養後の HPDL における *IBSP* 遺伝子発現の DKK-1 による抑制

DKK-1（50 ng/ml）存在下あるいは非存在下で HCEM と GFP-HPDL を 24 時間共培養した後の GFP-HPDL における *AXIN2*、*LEF1*、*IBSP* の発現を示す。値は *RPLP0* との相対比で示す。

＊p <0.05、＊＊p <0.01

3 回の実験で得られた同様の結果のうち、代表的なものを示す。

考察

歯周病により破壊された歯周組織の再生には歯根膜に存在する未分化間葉系幹細胞が重要な役割を担うことが知られており、同細胞の増殖や分化の制御に基づいた歯周組織再生療法の開発が進められている。しかしながら組織再生の過程において歯根膜由来の未分化間葉系幹細胞がどのような機序で歯周組織を構成する種々の細胞群に分化し、組織の再生に寄与しているのかの全貌は明らかになっていない。なかでも、歯根膜細胞からセメント芽細胞への分化を制御するメカニズムについては未だに十分な情報が得られていない。本研究ではセメント芽細胞との細胞間相互作用、特に直接的な細胞間接着による juxtacrine 作用により歯根膜細胞がセメント芽細胞へ分化誘導される可能性をはじめて明らかにした。

HPDL と HCEM を直接的共培養することで HPDL におけるセメント芽細胞関連遺伝子、特に *IBSP* の発現が誘導されることが明らかとなった（図 1B）。*IBSP* 遺伝子の発現は共培養前の HPDL には認められず、HCEM にのみ発現する遺伝子である。同上実験では、同一培養皿にて上記二種の細胞を培養後、セルソーターによって GFP 標識した HPDL のみを単離し、その遺伝子発現を検討したことから、特に GFP 強発現細胞のみをゲーティングしたものの、HCEM の僅かな混入による遺伝子発現変化である可能性については否定できない。そこで、共培養後に HPDL に発現誘導された *IBSP* 遺伝子発現量と HCEM における同遺伝子発現量を比較検討したところ、共培養後に HPDL に誘導された *IBSP* 遺伝子発現は、HCEM における *IBSP* 発現の半分から同程度であった（結果には示さず）。この結果は、共培養後に HPDL に認められた *IBSP* 発現が、HCEM の混入ではなく HPDL 内に誘導されたことを示唆している。今後は、*IBSP* 遺伝子のプロモーターに tdTomato 等の赤色蛍光タンパクのレポーター遺伝子を組み合わせ HPDL に導入後、共培養中の蛍光イメージング解析を行うことにより、HPDL における *IBSP* 遺伝子の発現誘導についてさらに検証を加えたいと考えている。

二種の細胞を同じ培養皿内で培養することによる細胞間相互作用の解析では、液性因子を介した paracrine シグナルと、細胞の直接的な接着による juxtacrine シグナルを区別して解析することが困難である。本研究では、HCEM 由来の培養上清およびトランスウェルを用いた間接的共培養では、HPDL におけるセメント芽細胞関連遺伝子の発現上昇は認められなかった（図 3）。これらの結果は HCEM 由来の液性因子が HPDL のセメント芽細胞への分化誘導に積極的に関与しないこと、すなわち、直接的共培養により HPDL に認められた *IBSP* 等の

遺伝子発現は両細胞が接触している、あるいは非常に近接することによりシグナルを伝える juxtacrine シグナルの関与を強く示唆している。歯周組織再生療法を施術した後の歯周組織再生過程において、セメント質の形成が既存のセメント質から連続して生じることは、これまでに報告のあるセメント質に含まれる CEMP1 や CAP によるセメント芽細胞分化制御に加え、セメント質表層に存在するセメント芽細胞が隣接する歯根膜細胞にシグナルを伝えることでセメント芽細胞への分化、さらには新生セメント質の形成を促しているものと考えられる。

HCEM との直接的共培養により、HPDL に誘導された *IBSP* は bone sialoprotein（BSP）をコードする遺伝子である。BSP は Small Integrin-Binding Ligand N-linked Glycoprotein（SIBLING）family に属するリン酸化および硫酸化を受けた非コラーゲン性蛋白で、Arg-Gly-Asp（RGD）配列により細胞に接着する一方で、グルタミン酸連続配列がハイドキシアパタイトに結合することから、石灰化初期に組織特異的に発現し、アパタイトの結晶形成に重要な役割を果たす[24,25]。本研究において RNAscope® *in situ* hybridization 法によってマウス歯根表面のセメント芽細胞に *Ibsp* mRNA が発現していることが確認された様に（図 4）、BSP はセメント質の主要な構成成分の一つであり[26-28]、*IBSP* をノックアウトしたマウスでは無細胞セメント質の形成量が減少すること[29-31]、また *IBSP* をノックアウトしたセメント芽細胞は石灰化能が大幅に低下する[32]ことから、同分子のセメント質形成に果たす役割が大きいことが分かる。また、マウス歯根膜（図 4）および分化誘導前の HPDL にその発現は認められなかったことから、HPDL の硬組織形成細胞への分化を特徴付ける分子の一つといえる。一方で、*IBSP* はセメント芽細胞のみならず骨芽細胞にもその発現が認められることからセメント芽細胞の特異的マーカーと位置付けることはできない。これまで *CAP* や *CEMP1* がセメント質に特異的に発現すると報告されてきた[8-10]が、少なくとも遺伝子レベルでは HPDL にも発現が認められることから、セメント芽細胞前駆細胞での発現が示唆される。本研究では、*IBSP* に加えて *ALPL*、*CEMP1*、*BGLAP* の各セメント芽細胞関連遺伝子が、HCEM と直接的共培養の結果 HPDL で発現上昇したことから、セメント芽細胞への分化が誘導されたものと考えられる。今後、*IBSP* を強発現させた HPDL を作製し、硬組織形成細胞への分化や石灰化能を解析することで、*IBSP* が歯根膜細胞の機能に及ぼす影響を明らかにする必要があると考えている。さらに、ラット歯周組織再生モデルを用いてセメント質再生過程における *IBSP* 遺伝子、BSP 分子の発現を検討することにより、本研究にて得られた知見を *in vivo* で検証したいと考えている。

本研究において、HPDL を Recombinant Wnt3a で刺激することにより Wnt 関連遺伝子である *AXIN2*、*LEF1* に加え *IBSP* の遺伝子発現が上昇し（図 6）、

HCEMとの直接的共培養でHPDLに誘導された*IBSP*の各遺伝子発現がDKK-1存在下で抑制されることが明らかとなった（図8）。これらの結果はHPDLとHCEMの細胞間相互作用にCanonical Wntシグナルが関与していることを示している。近年、セメント質の形成におけるWntシグナルの役割に関する報告が集積しつつある[33]。ヒト歯根膜細胞をWntシグナル活性化因子であるLiClで刺激することにより*CEMP1*、*CAP*、*OCN*などのセメント芽細胞関連遺伝子の発現が上昇することに加え、ラット歯周組織欠損モデルへのLiClの局所投与が、セメント質を含めた歯周組織の再生を促進することが報告されている[19]。また、*OCN*発現細胞においてβ-cateninシグナルを活性化したマウスでは、象牙質およびセメント質の過形成が生じること[20]、Wntのアンタゴニストである Sclerostin欠損マウスではセメント質が肥厚すること[21]が報告されている。これらの報告は、本研究にて得られたCanonical Wntシグナルを介した歯根膜細胞のセメント芽細胞への分化促進作用を支持すると考えられる。Canonical Wntシグナル経路は、WntがFrizzledとLRP5 / 6受容体に結合することでAXIN、adenomatous polyposis coli、glycogen synthase kinase 3複合体の解離を誘発し、その後β-cateninが細胞質内に蓄積され、核内へ移行することで活性化する[34]。核内へ移行したβ-cateninは転写因子T-cell factor（TCF）およびlymphoid enhancer factor（LEF）と結合し、標的遺伝子の転写を活性化させる。HCEMと直接的共培養したHPDLに*IBSP*の発現が誘導されるメカニズムとしては、HCEMの細胞膜上に発現しているWnt3aがHPDLのLRP5/6およびFrizzled受容体に結合し、β- cateninの核内移行を通じて*IBSP*の発現が誘導されたものと考えられる。今後、LRP5/6およびFrizzled受容体のHPDLにおける発現に加え、HCEMと共培養したHPDLを抗β-catenin抗体で免疫染色し、その核内への移行を観察することで、同シグナル経路の関与を裏付けたいと考えている。

歯根の発生段階においては、幹細胞や骨芽細胞、歯根膜細胞、あるいはセメント芽細胞の前駆細胞が含まれる歯小嚢細胞[35]が、ヘルトビッヒ上皮鞘（HERS）由来の細胞との相互作用により、セメント芽細胞へと分化しセメント質が形成されると考えられている[36]。また、歯根形成期におけるマウスHERSにWnt3aの発現が報告されていること[37]に加え、ラット歯小嚢細胞とHERS由来細胞を共培養することにより歯小嚢細胞に*Ibsp*や*Ocn*の発現上昇が認められ、同細胞の分化および石灰化ノジュール形成能が亢進するが、同現象にCanonical Wntシグナルの積極的な関与が報告されている[38]。これらの報告から、発生期のセメント質形成過程においても、本研究で明らかとなったCanonical Wntシグナルを介した細胞間相互作用が重要な役割を果たしているものと考えられる。興味深いことに、象牙基質存在下では、HERS由来細胞との細胞間相互作用による歯小嚢細胞のセメント芽細胞への分化が増強されることが示されている[38]こと

に加え、Dentin sialoprotein（DSP）、Dentin phosphoprotein（DPP）、および Dentin matrix protein-1（DMP-1）を含む象牙質非コラーゲンタンパク質の存在下でラット歯小嚢細胞を培養すると、セメント芽細胞への分化が誘導されたことが報告されている[39]。これらの報告は、象牙質表層という場の提供もセメント質形成に重要な要素となっていることを示唆している。歯周組織の再生過程において、ルートプレーニングにより滑沢化した象牙質は新生セメント質の形成に必須であることから、セメント芽細胞による歯根膜細胞の分化促進効果に対する象牙基質の影響については今後検討すべき重要な課題の一つだと考えられ、DSP、DPP、および DMP-1 等の分子群を介した分化増強作用の有無について検討することを予定している。

抗 Wnt3a 抗体による細胞免疫蛍光染色の結果、HCEM の細胞膜上に Wnt3a の発現が検出された（図 5）。細胞表面への Wnt の輸送には、膜貫通タンパクである Wntless（Wls）が関与している[40]。Wnt3a を強発現させた細胞と、TCF/LEF レポータープラスミドを導入した細胞との共培養によるレポーターアッセイの結果、Wnt3a を強発現させた細胞から Wls をノックアウトすることでルシフェラーゼレベルは抑制されたとの報告がなされている[41]。Wnt は細胞内で Wls に結合し、分泌小胞により輸送されて細胞外に排出されるか、あるいは Wls に結合したまま細胞膜上に留まり標的細胞へと直接提示される[40]。本研究において、直接的共培養で認められたセメント芽細胞関連遺伝子の発現上昇は、間接的共培養では認められなかった。この結果は HCEM から HPDL への Wnt3a の伝達に分泌小胞を介した輸送ではなく、HCEM の細胞膜上に Wls を介して Wnt3a が発現することで、近位の細胞へと接着しシグナルを伝達していると考えられる。興味深いことに、Wls をノックアウトしたマウスではセメント質の欠如や歯根膜腔の拡大が認められたと報告されている[42]。今後は HPDL と HCEM との直接的共培養における Wls の局在と機能について検討する必要があると考えている。

本研究ではセメント芽細胞と歯根膜細胞の直接的接着を介したシグナル伝達が歯根膜細胞をセメント芽細胞へと分化誘導することを明らかにした。歯周病によって歯周組織が破壊されると、歯根膜細胞は既存のセメント質の断端部に遊走し、表層のセメント芽細胞と接着することで自らをセメント芽細胞へと分化誘導し、セメント質の形成に寄与しているのではないかと考える（図 9）。このことは既存セメント質上に存在するセメント芽細胞の存在が、セメント質の再生に重要な役割を果たしていることを示唆している。歯根膜細胞とセメント芽細胞の細胞間相互作用のさらなる解析を通じてセメント質再生の分子メカニズムを明らかにすることは、新たな歯周組織再生療法の開発につながるものと考える。

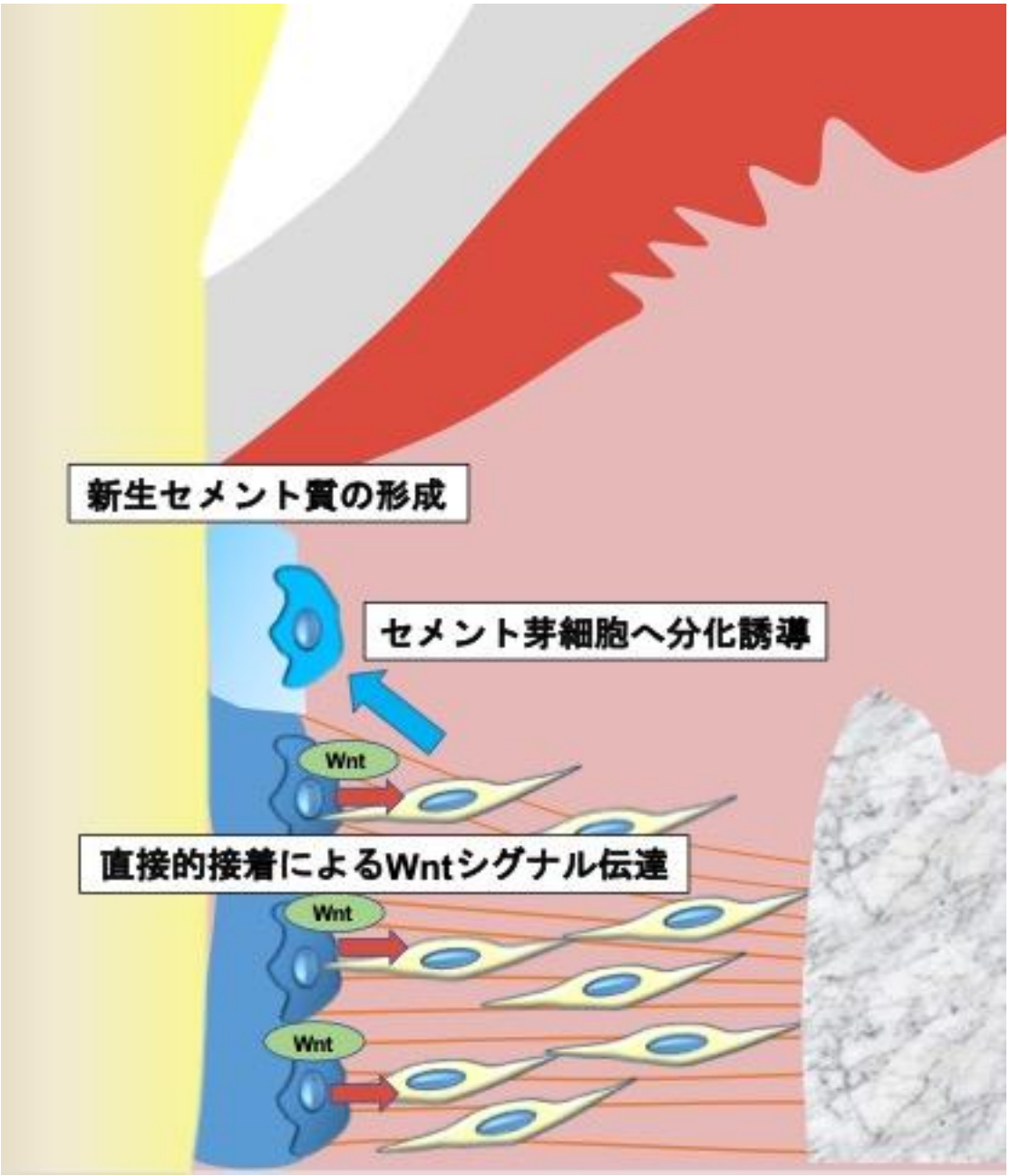


図 9. 歯根膜細胞の分化制御におけるセメント芽細胞との相互作用の意義（作業仮説）

本研究の結果から歯周組織の再生過程において、セメント質表層に存在するセメント芽細胞が歯根膜細胞に直接接着して Wnt シグナルを伝達し、歯根膜細胞をセメント芽細胞へと分化誘導することで、新生セメント質の形成に寄与していることが示唆された。

結論

本研究の結果より、以下の結論を得た。

1.　HPDL と HCEM の直接的共培養により HPDL におけるセメント芽細胞関連遺伝子の発現が有意に上昇することが明らかとなった。

2.　HCEM 由来液性因子は HPDL におけるセメント芽細胞関連遺伝子の発現に影響を及ぼさないことが明らかとなった。

3.　Wnt3a 刺激により HPDL における *IBSP* の発現は有意に上昇することが明らかとなった。

4.　HCEM と直接的共培養した HPDL に *IBSP* の発現が誘導される分子機序として、Canonical Wnt シグナルが関与していることが示唆された。

以上のことから、セメント芽細胞は歯根膜細胞と直接接着することで歯根膜細胞にセメント芽細胞への分化を誘導していることが明らかとなった。また、その分子機序に、少なくとも Canonical Wnt シグナルが関与していることが示唆された。すなわち、セメント質の再生には既存セメント質表面に存在するセメント芽細胞と隣接する歯根膜細胞との細胞間相互作用が重要な役割を果たしていることが示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました大阪大学大学院歯学研究科口腔分子免疫制御学講座、村上伸也教授に深甚なる謝意を表します。

本研究の進行にあたり、直接御指導ならびに御助言を頂きました大阪大学歯学部附属病院口腔治療・歯周科、竹立匡秀講師に心より感謝申し上げます。

最後に、本研究の遂行に対して様々な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免疫制御学講座（口腔治療学教室）の教室員の皆様に厚く御礼申し上げます。

文献

1. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol 2000.* 1997;13:20-40.
2. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K, Inoue T. Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microsc Res Tech.* 2003;60(5):491-502.
3. Tominaga N, Nakahara T, Nasu M, Satoh T. Isolation and characterization of epithelial and myogenic cells by "fishing" for the morphologically distinct cell types in rat primary periodontal ligament cultures. *Differentiation.* 2013;85(3):91-100.
4. Xu J, Wang W, Kapila Y, Lotz J, Kapila S. Multiple differentiation capacity of STRO-1+/CD146+ PDL mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells Dev.* 2009;18(3):487-496.
5. Yamada S, Tomoeda M, Ozawa Y, Yoneda S, Terashima Y, Ikezawa K, Ikegawa S, Saito M, Toyosawa S, Murakami S. PLAP-1/asporin, a novel negative regulator of periodontal ligament mineralization. *J Biol Chem.* 2007;282(32):23070-23080.
6. Duarte WR, Iimura T, Takenaga K, Ohya K, Ishikawa I, Kasugai S. Extracellular role of S100A4 calcium-binding protein in the periodontal ligament. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;255(2):416-420.
7. Arzate H, Zeichner-David M, Mercado-Celis G. Cementum proteins: role in cementogenesis, biomineralization, periodontium formation and regeneration. *Periodontol 2000.* 2015;67(1):211-233.
8. McAllister B, Narayanan AS, Miki Y, Page RC. Isolation of a fibroblast attachment protein from cementum. *J Periodontal Res.* 1990;25(2):99-105.
9. Wu D, Ikezawa K, Parker T, Saito M, Narayanan AS. Characterization of a collagenous cementum-derived attachment protein. *J Bone Miner Res.* 1996;11(5):686-692.
10. Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Narayanan AS, Izumi Y, Morita I. Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol.* 2012;227(2):649-657.
11. Needleman I, Tucker R, Giedrys-Leeper E, Worthington H. Guided tissue regeneration for periodontal intrabony defects--a Cochrane Systematic Review. *Periodontol 2000.* 2005;37:106-123.
12. Froum SJ, Weinberg MA, Rosenberg E, Tarnow D. A comparative study utilizing open

flap debridement with and without enamel matrix derivative in the treatment of periodontal intrabony defects: a 12-month re-entry study. *J Periodontol.* 2001;72(1):25-34.

13. Kitamura M, Akamatsu M, Kawanami M, Furuichi Y, Fujii T, Mori M, Kunimatsu K, Shimauchi H, Ogata Y, Yamamoto M, Nakagawa T, Sato S, Ito K, Ogasawara T, Izumi Y, Gomi K, Yamazaki K, Yoshie H, Fukuda M, Noguchi T, Takashiba S, Kurihara H, Nagata T, Hamachi T, Maeda K, Yokota M, Sakagami R, Hara Y, Noguchi K, Furuuchi T, Sasano T, Imai E, Ohmae M, Koizumi H, Watanuki M, Murakami S. Randomized placebo-controlled and controlled non-Inferiority phase III trials comparing trafermin, a recombinant human fibroblast growth factor 2, and enamel matrix derivative in periodontal regeneration in intrabony defects. *J Bone Miner Res.* 2016;31(4):806-814.
14. Bartold PM, Shi S, Gronthos S. Stem cells and periodontal regeneration. *Periodontol 2000.* 2006;40:164-172.
15. Sculean A, Donos N, Brecx M, Reich E, Karring T. Treatment of intrabony defects with guided tissue regeneration and enamel-matrix-proteins. An experimental study in monkeys. *J Clin Periodontol.* 2000;27(7):466-472.
16. Murakami S, Takayama S, Kitamura M, Shimabukuro Y, Yanagi K, Ikezawa K, Saho T, Nozaki T, Okada H. Recombinant human basic fibroblast growth factor (bFGF) stimulates periodontal regeneration in class II furcation defects created in beagle dogs. *J Periodontal Res.* 2003;38(1):97-103.
17. Toda S, Frankel NW, Lim WA. Engineering cell-cell communication networks: programming multicellular behaviors. *Curr Opin Chem Biol.* 2019;52:31-38.
18. Kitagawa M, Tahara H, Kitagawa S, Oka H, Kudo Y, Sato S, Ogawa I, Miyaichi M, Takata T. Characterization of established cementoblast-like cell lines from human cementum-lining cells in vitro and in vivo. *Bone.* 2006;39(5):1035-1042.
19. Han P, Ivanovski S, Crawford R, Xiao Y. Activation of the canonical wnt signaling pathway induces cementum regeneration. *J Bone Miner Res.* 2015;30(7):1160-1174.
20. Kim TH, Lee JY, Baek JA, Lee JC, Yang X, Taketo MM, Jiang R, Cho ES. Constitutive stabilization of ß-catenin in the dental mesenchyme leads to excessive dentin and cementum formation. *Biochem Biophys Res Commun.* 2011;412(4):549-555.
21. Kuchler U, Schwarze UY, Dobsak T, Heimel P, Bosshardt DD, Kneissel M, Gruber R. Dental and periodontal phenotype in sclerostin knockout mice. *Int J Oral Sci.* 2014;6(2):70-76.
22. Han P, Wu C, Chang J, Xiao Y. The cementogenic differentiation of periodontal ligament cells via the activation of Wnt/ß-catenin signalling pathway by Li+ ions

released from bioactive scaffolds. *Biomaterials.* 2012;33(27):6370-6379.

23. Wang F, Tarkkonen K, Nieminen-Pihala V, Nagano K, Majidi RA, Puolakkainen T, Rummukainen P, Lehto J, Roivainen A, Zhang FP, Mäkitie O, Baron R, Kiviranta R. Mesenchymal cell-derived juxtacrine wnt1 signaling regulates osteoblast activity and osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res.* 2019;34(6):1129-1142.
24. Ogata Y. Bone sialoprotein and its transcriptional regulatory mechanism. *J Periodontal Res.* 2008;43(2):127-135.
25. Chen J, Shapiro HS, Sodek J. Development expression of bone sialoprotein mRNA in rat mineralized connective tissues. *J Bone Miner Res.* 1992;7(8):987-997.
26. Fisher LW, Fedarko NS. Six genes expressed in bones and teeth encode the current members of the SIBLING family of proteins. *Connect Tissue Res.* 2003;44 Suppl 1:33-40.
27. Staines KA, MacRae VE, Farquharson C. The importance of the SIBLING family of proteins on skeletal mineralisation and bone remodelling. *J Endocrinol.* 2012;214(3):241-255.
28. Fisher LW, Torchia DA, Fohr B, Young MF, Fedarko NS. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001;280(2):460-465.
29. Foster BL, Soenjaya Y, Nociti FH, Holm E, Zerfas PM, Wimer HF, Holdsworth DW, Aubin JE, Hunter GK, Goldberg HA, Somerman MJ. Deficiency in acellular cementum and periodontal attachment in bsp null mice. *J Dent Res.* 2013;92(2):166-172.
30. Foster BL, Ao M, Willoughby C, Soenjaya Y, Holm E, Lukashova L, Tran AB, Wimer HF, Zerfas PM, Nociti FH, Kantovitz KR, Quan BD, Sone ED, Goldberg HA, Somerman MJ. Mineralization defects in cementum and craniofacial bone from loss of bone sialoprotein. *Bone.* 2015;78:150-164.
31. Soenjaya Y, Foster BL, Nociti FH, Ao M, Holdsworth DW, Hunter GK, Somerman MJ, Goldberg HA. Mechanical forces exacerbate periodontal defects in bsp-null mice. *J Dent Res.* 2015;94(9):1276-1285.
32. Ao M, Chavez MB, Chu EY, Hemstreet KC, Yin Y, Yadav MC, Millán JL, Fisher LW, Goldberg HA, Somerman MJ, Foster BL. Overlapping functions of bone sialoprotein and pyrophosphate regulators in directing cementogenesis. *Bone.* 2017;105:134-147.
33. Tamura M, Nemoto E, Sato MM, Nakashima A, Shimauchi H. Role of the Wnt signaling pathway in bone and tooth. *Front Biosci (Elite Ed).* 2010;2:1405-1413.
34. Gordon MD, Nusse R. Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem.* 2006;281(32):22429-22433.

35. Bosshardt DD, Schroeder HE. Cementogenesis reviewed: a comparison between human premolars and rodent molars. *Anat Rec.* 1996;245(2):267-292.

36. Hirata A, Nakamura H. Localization of perlecan and heparanase in Hertwig's epithelial root sheath during root formation in mouse molars. *J Histochem Cytochem.* 2006;54(10):1105-1113.

37. Nemoto E, Sakisaka Y, Tsuchiya M, Tamura M, Nakamura T, Kanaya S, Shimonishi M, Shimauchi H. Wnt3a signaling induces murine dental follicle cells to differentiate into cementoblastic/osteoblastic cells via an osterix-dependent pathway. *J Periodontal Res.* 2016;51(2):164-174.

38. Yang Y, Ge Y, Chen G, Yan Z, Yu M, Feng L, Jiang Z, Guo W, Tian W. Hertwig's epithelial root sheath cells regulate osteogenic differentiation of dental follicle cells through the Wnt pathway. *Bone.* 2014;63:158-165.

39. Wu J, Jin F, Tang L, Yu J, Xu L, Yang Z, Wu G, Duan Y, Jin Y. Dentin non-collagenous proteins (dNCPs) can stimulate dental follicle cells to differentiate into cementoblast lineages. *Biol Cell.* 2008;100(5):291-302.

40. Clevers H, Loh KM, Nusse R. Stem cell signaling. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science.* 2014;346(6205):1248012.

41. Bänziger C, Soldini D, Schütt C, Zipperlen P, Hausmann G, Basler K. Wntless, a conserved membrane protein dedicated to the secretion of Wnt proteins from signaling cells. *Cell.* 2006;125(3):509-522.

42. Lim WH, Liu B, Cheng D, Williams BO, Mah SJ, Helms JA. Wnt signaling regulates homeostasis of the periodontal ligament. *J Periodontal Res.* 2014;49(6):751-759.