

令和 5 年 6 月 10 日現在

機関番号：32650

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11629

研究課題名(和文) 歯の再生療法の基盤としての多根歯形成機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of multirooted tooth formation for tooth regenerative therapy

研究代表者

山本 仁 (Yamamoto, Hitoshi)

東京歯科大学・歯学部・教授

研究者番号：80265165

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯や歯周組織の再生に関する研究が行われている。再生が発生と同じ過程を経ることが最も理にかなった再生過程と考えられることから、再生研究を進めるためには、発生過程を明らかにする必要がある。ヒトを始めとする現生哺乳類の臼歯は多根であり、ヒトでは髄下葉を伴った多根化が起こることが特徴である。そこでヒトと同じ髄下葉を伴った多根化をおこすラット臼歯を用いて、Hertwig上皮鞘、上皮性根間突起、髄下葉、象牙質根間突起の形成状況を発生学的に観察し、三次元的な動態を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒトを始めとする現生哺乳類の臼歯は多根であることから、喪失前と同等の咀嚼機能をもつ臼歯を再生するためには、ヒの臼歯がどのように多根化されるのかを明らかにする必要がある。本研究は髄下葉を伴った多根化に重要な働きをしているHertwig上皮鞘、上皮性根間突起、髄下葉と象牙質根間突起の3次元的動態を発生学的に明らかにしたことから、髄下葉を伴うヒト臼歯の再生研究の礎を築いたものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： There are many regenerative studies for tooth regeneration. Because it is thought that reproduction passes through a process same as development most with a logical reproduction process, it is necessary to clarify a developmental process to clarify reproduction mechanism. In the human molar, multirooted tooth formation occurs through the formation of dentin islands, termed subpulpal lobus, in the dental papilla after the completion of tooth crown formation independently of dentin in the cervical region. Thus, using the rat molar, in which multirooted teeth formed through subpulpal lobus formation, similar to that in humans, we attempted to research for the three-dimensional observation of the Hertwig's epithelial root sheath, epithelial projection and subpulpal lobus. As a result, we clarified the developmental process of these structures.

研究分野：口腔組織学

キーワード：多根歯 発生 髄下葉 Hertwig上皮鞘 上皮性根間突起 象牙質根間突起 ラット

## 1. 研究開始当初の背景

歯と歯周組織の再生は歯科医学分野における重要な課題の一つである。これまでに歯冠形態形成に関する知見は多く得られているものの、歯根形成に関する知見は少ない。なかでもヒトを始めとする哺乳類の臼歯の多くは多根歯であるが、多根歯形成に関する研究は、歯の形態形成研究の中で最も行われていない領域である。

研究代表者はこれまでに歯と歯周組織の再生に関する研究に取り組んできた。その結果、1. *In vitro*で顎骨内という特殊な環境下で行われる歯根の成長を *in vivo*で再現するための歯胚培養法の確立し(H. Yamamoto et al., J Dent Res 83, 688-692, 2004) 2. Reaggregation systemを用いた歯胚の腎臓被膜下移植や皮下組織移植実験により、上皮組織からの情報を resetされた歯性間葉組織は、本来の性質として歯冠形成能ばかりでなく、歯根や歯周組織形成性能をもつこと(H. Yamamoto et al., J Electron Microsc 52, 567-571, 2003, H. Yamamoto et al., J Hard Tissue Biol 18, 77-82, 2009) 3. Reaggregation systemを応用しない腎臓被膜下移植実験や皮下組織移植実験により、歯だけでなく *in vivo*に類似した歯周組織が形成されること(Y. Higuchi et al., Int J Oral-Med Sci 7, 27-34, 2008)を明らかにした。これらの実験で得られた結果を精査したところ、2と3の実験で得られた再生歯は、*in vivo*では2根をもつマウス下顎第一臼歯歯胚を材料としているにもかかわらず、形成された歯冠は *in vivo*に類似する形態を示すが、歯根形態は *in vivo*と異なり、単根の歯のみが形成されていることを見出した。そこで歯根形態形成に重要な働きを担うと考えられている Hertwig 上皮鞘について分子形態学的な観察を行ったところ、多根歯形成時に発現する上皮性根間突起に特定の遺伝子が時間的な特異性をもって発現するほか、細胞分裂とアポトーシスの出現が上皮性根間突起とそれ以外の上皮性部分で異なっていること、が示された(科学研究費補助金 平成 20-22 年度 基盤研究 C 歯根の形態形成、特に多根化を発現する因子の分子形態学的解析)。これらの研究結果は「歯胚が顎骨内という特殊な環境下で発現することにより多根化する能力をえること」を示唆している。

ヒトの歯根形成の際には上皮性根間突起の下に髓下葉とよばれる硬組織が形成され、髓下葉同士あるいは髓下葉と象牙質根間突起が癒合して根分岐部が形成されることにより多根化が起こることが知られている。ヒトと同様に髓下葉を伴った多根形成をおこなうラット臼歯を観察したところ、髓下葉は上皮性根間突起下の歯乳頭細胞が象牙芽細胞に分化して形成されることが明らかとなった(E. Osawa, J Hard Tissue Biol 26, 149-156, 2017)。しかし多根化に重要と考えられる Hertwig 上皮鞘、上皮性根間突起、髓下葉や象牙質根間突起の3次元的動態は不明である。また髓下葉の出現部位やそれを規定する象牙芽細胞の分化に働く上皮性根間突起のシグナルの部位的発現機構はわかっていない。

## 2. 研究の目的

*In vivo*において歯胚は顎骨内という特殊な環境下で発育することにより多根化すると考えられるが、多根化するためには根分岐部が形成される必要がある。歯の形態形成研究に用いられることの多いマウスでは上皮性根間突起下に象牙質根間突起が形成され、これが癒合することにより根分岐部が形成され多根化が起こる。しかしヒトでは髓下葉という硬組織が上皮性根間突起に面した歯乳頭細胞から分化した象牙芽細胞により形成されて、髓下葉同士あるいは髓下葉と象牙質根間突起が癒合して根分岐部が形成されて多根化が起こる。しかし髓下葉の形成部位や数がどのように規定されているのかについては不明である。髓下葉を形成する象牙芽細胞は上皮性根間突起からのシグナルにより分化すると考えられ、また歯根の数は上皮性根間突起の数と関係することから、上皮性根間突起の性状を明らかにする必要がある。そこで本研究は多根形成における上皮性根間突起の性状を明らかにするために、まず形態学的変化に着目し、ヒトと同様に髓下葉を伴った多根化をするラット臼歯を用いて、*in vivo*における多根形成過程で上皮性根間突起がどのような形態学的変化をもたらすのかを三次元的に観察することを目的とした。併せて象牙質根間突起と髓下葉の形成過程についても観察を行った。

## 3. 研究の方法

本研究は東京歯科大学実験動物委員会の承認を受け、定める動物実験指針を遵守して行った(No. 200202, 210202)

生後 3、5、8、11、13、15、18 日齢の Wistar ラットを 42 匹(three-dimensional (3D) construction 用: 各 3 匹、免疫組織化学用: 各 3 匹)を用いた。また根分岐部の面積が大きい上顎第二臼歯歯胚(M2)を観察対象とした。

実験動物は深麻酔下でリン酸緩衝液により脱血し、0.1%リン酸緩衝 4%パラフォルムアルデヒド溶液で灌流固定を施したのち、上顎を摘出し、同固定液にて 4 で 2 日間浸漬固定を行っ

た。

ラット上顎骨(各ステージ3匹)を脱灰後通法に従ってパラフィンに包埋した。厚さ5 $\mu$ mの前顎断連続切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン重染色(H-E染色)を施し光学顕微鏡で観察を行った。

3D構築のために、H-E染色標本をcellSens(Olympus, Tokyo, Japan)により光学顕微鏡で撮影(40倍: X軸0.86nm/pixel, y軸0.86nm/pixel)した。すべての画像をコンピュータに取り込み後、画像ソフトウエアImageJ(NIH: National Institute of Health)19)を使用して二値化処理を行い、位置を整えた。画像処理後の連続画像は単色にてImageJにNift1形式で保存した。保存した画像のHertwig上皮鞘と上皮性根間突起を赤色、髄下葉を含む象牙質を青色に5枚おきに手動でトレースした。立体構築ソフトとしてITK-SNAP(www.itksnap.org)をダウンロードして使用した。トレースした箇所を自動補間を行うことで3次元化し、前額断方向と、水平断方向の2つの方向からの像を撮影した。

上皮性根間突起周囲の歯乳頭の細胞分裂状況を明らかにするために抗PCNA抗体を用いた免疫組織化学を行った。5 $\mu$ mの前額断パラフィン切片(各ステージ3匹)に対してVECTASTAIN Elite ABC Kit(Vector Laboratories Inc, California, USA)を用いてアビジンビオチン複合体法により免疫組織化学染色を行った。切片はキシレンにより脱パラフィンしたのち、内在性過酸化水素の除去を行った。抗原賦活化処理後、切片を冷却しPBSで洗浄後、2.5%正常ヤギ血清でブロッキングしたのち、細胞分裂の状態を確認するため一次抗体としてRabbit anti-PCNA antibody(1/150, Abcam, Cambridge, UK)を用いた。二次抗体として正常 Goat Anti-Rabbit IgG Antibody)を用いた。その後3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochlorideにより陽性反応を茶色に発色させたのち、ヘマトキシリンによるカウンター染色を施した。なおnegative controlとして一次抗体の代わりに正常ヤギ血清を用いた。

#### 4. 研究成果

H-E染色像の観察では、生後3日においては、歯冠部ではエナメル質と象牙質の形成が開始していた。Hertwig上皮鞘は歯頸部から屈曲し歯乳頭内部へと伸長し細長い構造の上皮性根間突起(EP)を形成した。生後5日においては、両側の歯頸部からHertwig上皮鞘が形成された。また、歯乳頭の底部にもEPが観察された。生後8日においては、歯頸部より上方に伸長したEPが観察された。生後11日においては、上皮は8日と同様に歯乳頭内部において歯頸部より上方に認められた。生後13日においては、歯乳頭内部の上皮の位置は変わらず、下方への成長は認めなかった。生後15日においては、歯冠部エナメル質は石灰化を始めた。また、上皮は歯乳頭部を上方または水平に向けて伸長したが、一部は下方に成長を始めた。生後18日においては、歯乳頭中央部の上皮は下方に伸長しなかった。しかし、最外側および分岐部周囲の上皮は下方へさらに成長した。根尖部は癒合しなかった。

立体構築像の観察では、生後3日においては、一部のHertwig上皮鞘が歯乳頭内部へ伸長しEPが形成された。側方から観察するとEPは歯乳頭内側へ向けて水平または上方に伸長していた。生後5日においては、歯頸部から環状にHertwig上皮鞘が生じ上皮隔膜が形成された。上皮隔膜は歯乳頭内部へ向けて成長し4方向からEPが生じた。EPの長さは異なったがほぼ等間隔に形成された。EPは生後3日と同様に、歯乳頭中心に向かい形成されていた。生後8日においては、EPは5日に比べてさらに歯乳頭内部に伸長し4本形成された。また、歯頸部から象牙質が形成され始めた。EPは歯頸部よりやや上方を向いていた。生後11日においては、成長したEPは歯乳頭中央部で互いに癒合した。髄下葉は上皮の癒合した部位近くの上皮に面して出現し、複数認められた。4方向からの上皮全ての癒合は認められなかったが、上皮に囲まれた空洞は将来の歯根数と同じく4つであった。また、最も早く癒合した上皮は不明であった。生後13日においては、すべての上皮において幅が成長した。また、象牙質根間突起(DP)が形成され。歯乳頭の中央部に髄下葉が複数観察されたが一部の髄下葉は大型化していた。EPは先端を歯乳頭上方へ向け11日よりさらに上方へと侵入していた。また、上皮の根尖側への移動は認められなかった。生後15日においては、各々のEPが癒合し根分岐部が完成し、矢印の歯根が最も大きく観察された。また、髄下葉とDPが癒合した。根分岐部の上皮は歯乳頭中央部に留まり水平方向に成長した。歯根外側の一部の上皮は下方にも伸長を始めた。癒合した上皮の一部は断裂し、マラッセの上皮遺残となった。生後18日においては、髄下葉とDPの癒合が進み髄床底が形成された。分岐部以外の上皮は根尖部に向けてさらに伸長した。歯根部及び分岐部にマラッセの上皮遺残が観察された。

抗PCNA抗体による免疫組織化学では、生後3日においては、歯乳頭内部の細胞は全体的に均一に分裂していたが歯冠咬頭部で特に分裂していた。また、歯乳頭の染色された細胞は円形や不定形の構造をしていた。生後5日においては、歯乳頭中に細胞分裂が観察されたが著名には観察されなかった。生後8日においては歯頸部で細胞増殖が盛んに行われていた。また、根分岐部付近においても集中した細胞分裂が認められた。生後11日、生後13日においては、生後8日に比べて歯頸部の分裂する細胞が増加していた。また、根分岐部付近にも細胞分裂が確認された。しかし、生後15日においては歯頸部で細胞分裂が認められたが、その量は少なかった。一方根分岐部は中央において分裂している細胞が多く認められた。生後18日においては、歯頸

部および根分岐部の細胞分裂は減少していた。

本研究により Hertwig 上皮鞘は上皮性根間突起が互いに癒合するまで根尖方向への成長を停止することが明らかとなった。Hertwig 上皮鞘の伸長は一般には根尖側に向かう方向、つまり一つの方向にのみ行われている。上皮性根間突起は Hertwig 上皮鞘の一部が歯乳頭側に向かって伸長したものであるため、上皮性根間突起が歯髄側に伸長している間は他の部分に向かって伸長することが無く、上皮性根間突起が癒合し歯乳頭方向への伸長が止まることにより、根尖方向への伸長を再開するものと思われた。しかし上皮性根間突起は伸長の過程で幅を増していることから、上皮の伸長方向を規定する因子については、今後の研究成果を待ちたい。上顎第二臼歯の多根化の過程で生じた4本の上皮性根間突起の長さはそれぞれ異なっていた。本研究では、上皮性根間突起の癒合前に近遠心から伸びる上皮性根間突起が頬舌側のものより歯乳頭中央部に近いところまで形成されていた。これらの所見は上皮性根間突起の伸長速度に差があることを示している。伸長速度が速いことにより、上皮性根間突起の内エナメル上皮と対向する歯乳頭細胞の象牙芽細胞への分化が早く起こり、象牙質の形成が早く始まるので、歯根が太くなる可能性が考えられた。ラット上顎第二臼歯の4本の歯根のうち、近心頬側根がもっとも太い。本研究の三次元構築像観察で、4本の上皮性根間突起が癒合したPN11には、将来歯根となる部分のなかで、近心頬側根になる部分の径が最も太かった。この事実は、根分岐部の形成過程において上皮性根間突起が癒合する時期には、すでに根の大きさが決定されることと、その後の成長においても歯根の太さの比率は変化しないことを示しているものと考えられた。抗PCNA抗体を用いた免疫組織化学染色により、上皮の成長に付随して歯乳頭の細胞分裂状況が変化しているのが観察された。上皮が歯乳頭中心部に侵入する時期は細胞分裂が歯頸部において多数観察されたが、歯根が下方へ成長を開始する時期には減少していた。歯頸部で歯乳頭の細胞分裂が盛んにみられる時期に Hertwig 上皮鞘は歯頸部から歯冠側に向う像を示した。歯頸部での盛んな細胞分裂による圧力が、歯冠と歯根の接合部で歯乳頭側から直接的な強い負荷となり、その結果上皮の先端が歯冠側に向かう形態となることが考えられた。更に上皮が癒合すると歯頸部での細胞分裂が減少し歯根が下方に成長する可能性も考えられた。

本研究により多根形成時の根分岐部形成における髓下葉、上皮性根間突起、象牙質根間突起の動態が明らかとなった。髓下葉は上皮性根間突起に面した歯乳頭細胞が象牙芽細胞に分化することにより形成されるが、歯乳頭細胞の分化をもたらす上皮性根間突起の部位とシグナル発現については不明であり、今後の研究が待たれる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 山本 仁	4. 巻 118
2. 論文標題 多根形成機構に関する最近の知見	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 歯科学報	6. 最初と最後の頁 87 - 89
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nobue Kikuchi, Kei Kitamura, Norio Kasahara, Yudai Ogawa, Noboru Ishikawa, Masahito Yamamoto, Hitoshi Yamamoto	4. 巻 31
2. 論文標題 Three-dimensional observation of the furcation area during multi-rooted tooth formation in rat	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 35-40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 菊池布恵、北村啓、笠原典夫、小川雄大、石川昂、山本将仁、阿部伸一、山本仁
2. 発表標題 髄下葉形成を伴うラット臼歯根分岐部の三次元的観察
3. 学会等名 第127回日本解剖学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菊池布恵、北村 啓、笠原典夫、小川雄大、石川 昂、山本将仁、阿部伸一、山本 仁
2. 発表標題 多根歯形成過程におけるHertwig上皮鞘の三次元的成長に関する研究
3. 学会等名 第62回歯科基礎医学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊池布恵、北村 啓、笠原典夫、小川雄大、石川 昂、山本将仁、阿部伸一、山本 仁
2. 発表標題 三次元構築による根分岐部形成過程の観察
3. 学会等名 第310回東京歯科大学学会（総会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中亜生、石川 昂、山本 仁、新谷誠康
2. 発表標題 象牙芽細胞の感覚受容器に関する発生学的研究～免疫組織化学と定量化～
3. 学会等名 日本小児歯科学会第36回北日本地方会・第33回関東地方会合同大会・総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中亜生、澁川義幸、石川 昂、北村 啓、田崎雅和、山本 仁、新谷誠康
2. 発表標題 象牙芽細胞の感覚受容器に関する免疫組織化学的研究
3. 学会等名 第305回東京歯科大学学会（例会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中亜生、新谷誠康、山本 仁、石川 昂、北村 啓、澁川義幸、阿部伸一、山本将仁
2. 発表標題 象牙芽細胞の感覚受容機能発現に関する発生学的研究～免疫組織化学とRT-qPCRによる解析～
3. 学会等名 第60回歯科基礎医学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大澤枝里、山本 仁、新谷誠康
2. 発表標題 ラット臼歯における髓下葉を伴った根分岐部形成の免疫組織学的観察
3. 学会等名 第26回硬組織再生生物学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石川 昂  (Ishikawa Noboru)  (10772288)	東京歯科大学・歯学部・准教授   (32650)	
研究分担者	北村 啓  (Kitamura Kei)  (90792367)	東京歯科大学・歯学部・講師   (32650)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------