

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592991

研究課題名(和文) TDL培養による歯根形態形成制御機構解明の新展開

研究課題名(英文) A study of tooth root formation by a novel co-culture system -Three Dimensional and Layered (TDL) culture.

研究代表者

松村 達志 (MATSUMURA, TATSUSHI)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・助教

研究者番号：70432648

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：歯根形成期を再現する実験系が確立されていないことから、歯根形成期には未だ不明な点が多い。そこで本研究では、申請者らが開発したTDL培養法を応用した歯根形成期の実験系確立を試みた。歯根上皮の分離が困難なことからTDL培養には至らなかったが、パールカンが歯髄細胞の分化マーカーとなりうる事を明らかにした。また、ヘルトビッチの上皮鞘の伸長・断裂で生じるマラッセの上皮遺残がラット切歯では認めず、上皮鞘が「断裂しない」または「断裂しても上皮断片は残らない」可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Tooth root formation is a complex process and the mechanism remains largely unclear due to the difficulty to mimic the procedure. Thus it is extensively necessary to establish the experimental model of tooth root formation. In this study we tried to develop tooth root formation model using Three Dimensional and Layered (TDL) culture that we engineered. The isolation of Hertwig's Epithelial Root Sheath/Epithelial Rest of Malassez (HER/ERM) to culture is challenging, however, our data revealed that pearlcan might be one of the cell markers of dental pulp cells. Interestingly, ERM was not observed in rat incisor. ERM is transformed during 'elongation' and 'fragmentation' of HERS. It is possible that discreteness may not occur in HERS or the discrete residual cells may disappear resulting in no evidence of ERM. To understand the variety of events including HERS/ERM during root formation, further investigation is needed and our TDL culture is essential to develop the experimental model.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：歯根形成 再生医学

## 1. 研究開始当初の背景

今日、再生医療に関する研究や臨床応用が脚光を浴びているが、そのほとんどが骨・粘膜など単一細胞によるものが中心であり複合組織かつ立体構造をもつ器官の再生までには至っていない。この点で、歯は歯冠と歯根という2構造、エナメル質・象牙質・セメント質という3硬組織からなる複合組織で精緻な立体構造をもつ器官であり、その理解にはより高度な手法と知見が必要とされる。また、歯は上皮・間葉相互作用で発生するよいモデル器官である事、他の器官と比べてサイズが小さい事、血流や周囲の組織に殆ど依存しない事、動物実験を行なう場合に歯の欠損によって動物が死に至らない事などから、実験系としてすぐれており、我々歯科領域の人間のみならず、器官発生や再生を研究する実験モデルとしても広く認知されており、その発生機構の解明は広く求められている。

これまで、歯の発生研究は歯冠形成期の上皮・間葉相互作用を中心に進められてきた(Thesleff et al, J Cell Sci 2003 など)。申請者らも細胞培養や歯胚の器官培養を用いて、分化誘導シグナルの肝細胞増殖因子(HGF)や骨形成タンパク(BMP)4などの関与を明らかにしてきた(Matsumura, Tabata et al, Int J Dev Biol 1998; Tabata, Matsumura et al, Development 1996; Tabata, Matsumura et al, J Histochem Cytochem 2003; Liu, Tabata, Matsumura et al, Eur J Oral Sci 1998)。しかし、培養歯胚では見事な歯冠が形成されるにもかかわらず、細胞培養では基質形成や細胞形態が貧弱でその落差が大きかった。そこで、2007年より申請者らは新しい共培養法=TDL培養を開発するに至った。これは、上皮と間葉の細胞を個々に調整し、個々に制御できる共培養系で、エナメル芽細胞の典型的な形態と歯胚組織の再構築

が可能となった。また、この手法は他の細胞の組み合わせも可能と考えられた。

一方、歯根形成期は、再生歯根と既存の歯科治療とを組み合わせる事で機能回復可能な事から、以前から注目されている。特に分化誘導シグナルの研究では、in situ ハイブリダイゼーションやノックアウトマウスなどを用いた解析が進んでおり(Karn et al, Gene Expr Patterns, 2007; Nakatomi et al, J Dent Res, 2006)、申請者らも、骨芽細胞分化に必須の転写調節因子 Runx2、Runx2により転写調節されるオステオポンチン、骨シアロプロテインの局在性を検討し、Runx2がセメント芽細胞分化・基質形成に重要である可能性を明らかにしてきた(Hirata et al, J Histochem Cytochem, 2009)。また、ヘパラン硫酸プロテオグリカン(HSPG)であるパールカンおよびその分解酵素ヘパラーゼについて免疫組織化学的手法により検討し、ヘパラーゼが基底膜のパールカンを介してセメント芽細胞の分化・増殖に関与する可能性を報告している。そこで機能的解析を試みたいところであるが、歯根の培養技術は未だに十分に整備されていないため、各因子の機能的解析へ踏み込めない状況であった。

## 2. 研究の目的

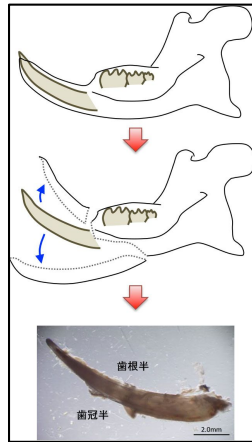
申請者らは、このプロジェクトを以前に、下顎骨器官培養(Fujiwara, Tabata et al, Cell Tissue Res 2005)を導入した歯根形成期の機能的解析を試みたが、手法の制限もあって十分な知見を得るに至っていない。そこで、前述のTDL培養法を歯根形成期のin vitro実験系に応用した新たな手法の確立と新たな実験系による歯根形成期での各因子の機能的解析を目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 試料採取

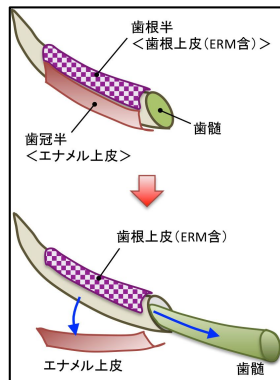
##### 下顎切歯の採取

生後7-10日齢Wisterラットより下顎骨を摘出し、氷温のHanksへ浸漬。摘出された下顎骨を実体顕微鏡下で下顎切歯を損傷しない様に周囲硬組織を除去して下顎切歯を採取して試料とした。(右図)。



##### 歯根上皮(ERM)の採取

上記同様に摘出した下顎切歯より歯髓組織および歯冠半のエナメル上皮を除去(右図)。0.25% コラゲナーゼ処理を37℃で行った後、歯根上皮を採取してニトロセルロース紙に貼付した。



##### 下顎体の摘出

Wisterラットを4%パラフォルムアルデヒドで還流固定した後に下顎骨を摘出した。

#### (2) 観察方法

##### 固定・脱灰

10%パラフォルムアルデヒドで常温下、または4%パラフォルムアルデヒドで4℃下、3日間浸漬固定した。脱灰まで期間がある場合には、0.05M Phosphate Buffer pH7.4に浸漬して4℃保存した。脱灰は5% EDTA または10% ギ酸で行った。

##### 切片作成

通法通り、脱灰後、パラフィン包埋を行い、マイクロトームを用いて厚さ6μmに薄切した。凍結非脱灰切片の作成は、サンプルをTCAコ

ンパウンドに埋没・凍結し、包埋後、川本法で薄切、または、クリアレジン樹脂(テクノビット)包埋後、薄切した。

##### 染色

形態観察では、Hematoxyline-Eosin 染色(HE染色)またはトルイジンブルー染色を行った。

##### 免疫組織染色

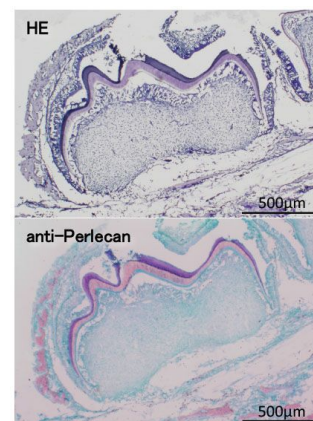
ヒアルロニダーゼ前処理後、4%BSA-PBSでブロッキングを行い、抗パールカンマウスモノクローナル抗体(A7L6; Millipore)およびBiotin-Rabbit Anti-Goat IgG (H+L) (ZYMED 61-1640)で標識後、Streptavidin-beta-gal conjugate (Boehringer-Mannheim)で発色した。

### 4. 研究成果

#### (1) 下顎臼歯歯胚におけるパールカンの免疫組織学的検討

培養歯胚においてパールカンは歯乳頭で強く発現し、上皮鞘細胞での発現は非常に弱い結果であった(data not shown)。今回は摘出した下顎臼歯歯胚でパールカンの分布を検討した所、

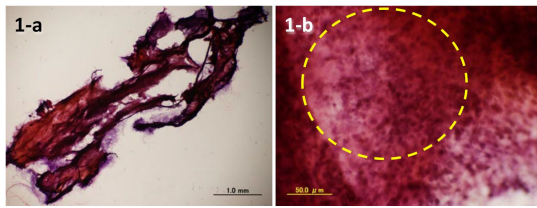
培養歯胚と同様の結果を得た(右図)。この事から、パールカンが歯乳頭細胞の分化マーカーとなりうる事が示唆された。



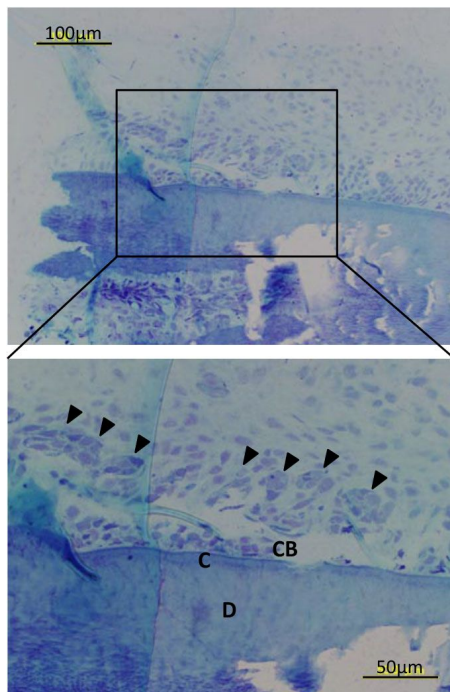
#### (2) 歯根上皮の分離、単層培養の検討

歯根半より酵素処理と外科的処理で取り出した歯根上皮(歯根膜)をHE染色後、クリアレジンで封入して顕微鏡にて観察した所(後図1-a)、ERM網を想起させる網状の構

造を認めた（後図 1-b）。



そこで、歯根上皮の断裂状態を確認するため、下顎切歯の歯軸に対する水平断で検討した。下顎切歯をギ酸脱灰、クリアレジジン樹脂包埋後、2 μm 厚で薄切し、トルイジンブルー染色を行って観察した。その結果、基部側水平断の歯根上皮は不明瞭であったが、切歯先端に近い視野ではERM 様の断裂した構造（下図下；矢頭）を確認出来た（下図：D;dentin, C;cementum, CB;cementoblast）。但し、断裂部位の識別は困難であり、ERM の量は少なかった。



さらに摘出した下顎切歯を実体顕微鏡で観察した所、周囲には多量の繊維を認め（右図）、歯冠半と歯根半を比較すると、

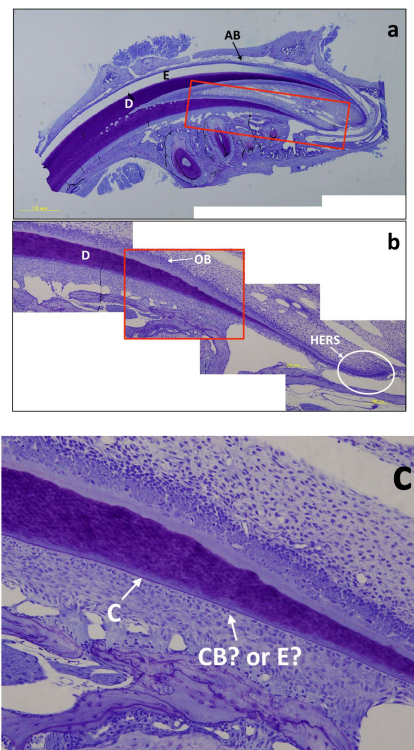


歯根半により多くの繊維を認めた。

以上の検討結果より、歯根上皮の採取には外科的処置のみではなく、繊維等の除去のため、酵素処理を始めとする化学的処理が必須である事が判明した。また、TDL 培養へ移行するためには、採取量を増やす工夫が必要であると考えられた。

### (3) ラット切歯の再評価

採取量を増やすために、ラット切歯について再検討を行う事とした。成獣ラット切歯のクリアレジジン樹脂包埋後、薄切し、トルイジンブルー染色を行って観察した（下図 a,b,c: D;dentin, E;enamel, AB;ameloblast, OB;odontoblast, C;cementum, CB;cementoblast, E;epithelium）。切歯では、セメント質があまり形成されておらず、HERS 中間付近の形態が不明瞭であった（下図 c; CB? or E?）。また、HERS の断裂や集塊像、つまり ERM を認めなかった。常生歯の場合、常に萌出し続けるため、セメント質やシャーピー線維が不要であり、HERS も「断裂しない」または「断裂しても上皮断片は残らない」可能性が示唆された。



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2件)

Wakimoto M, Matsumura T, Ueno T, Mizukawa N, Yanagi Y, Iida S.、Bone quality and quantity of the anterior maxillary trabecular bone in dental implant sites.、Clin Oral Implants Res.、査読有、Vol.23、No.11、2012、pp1314-1319、doi: 10.1111/j.1600-0501.2011.02347.x.

Inoue H, Giannakopoulos S, Parkhurst CN, Matsumura T, Kono EA, Furukawa T, Tanese N.、Target genes of the largest human SWI/SNF complex subunit control cell growth.、Biochem J.、査読有、Vol.432、No.1、2011、pp83-92、doi: 10.1042/BJ20101358.

〔学会発表〕(計 3件)

喜多憲一郎、山近英樹、松原正和、石田展久、森谷徳文、松村達志、藤田佑貴、高畠清文、飯田征二、OVX マウスにおける DHNA の骨吸収抑制効果 第二報 骨量に対する統計学的解析.、第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2012 年 10 月 19~21 日、横浜

山近英樹、喜多憲一郎、松原正和、高畠清文、仲田直樹、石田展久、水川展吉、松村達志、高木 慎、飯田征二、マウス骨髄由来細胞および皮質骨由来細胞による骨再生.、第 57 回日本口腔外科学会総会・学術大会、2012 年 10 月 19~21 日、横浜

Wakimoto M, Matsumura T, Ueno T, Ota A, Mizukawa N, Yanagi Y, Iida S.、Bone quality and quantity of the anterior maxillary trabecular bone in dental implant sites.、20th Annual Scientific Meeting of the European Association of Osseointegration.、2011 年 10 月 13-15 日、Athens, Greece

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)  
なし  
取得状況(計 0件)  
なし

〔その他〕  
なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

松村 達志 (MATSUMURA TATSUSHI)  
岡山大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・助教  
研究者番号: 70432648

### (2)研究分担者

田畑 純 (TABATA JUN)  
東京医科歯科大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・准教授  
研究者番号: 20243248

平田 あずみ (HIRATA AZUMI)  
大阪医科大学・医学部・助教  
研究者番号: 40263587

山近 英樹 (YAMACHIKA EIKI)  
岡山大学・大学病院・講師  
研究者番号: 10294422

森谷 徳文 (MORITANI NORIFUMI)  
岡山大学・大学院医歯(薬)学総合研究科・助教  
研究者番号: 60467751

### (3)連携研究者

なし