

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670884

研究課題名(和文) ライブイメージングから探る歯根形成の分子・細胞機構の解明とその制御

研究課題名(英文) In vivo live-imaging of the growing root tip to understand the molecular and cellular mechanism of the root development

研究代表者

山城 隆 (Yamashiro, Takashi)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70294428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯根は歯冠と同様、歯種に応じて複雑な形態を示し、その形成端に存在するヘルトビッチ上皮鞘を鋳型に、上皮間葉相互作用によって形成される。しかし、その複雑な形態形成を担う細胞・分子機構はまだまだ明らかではない。そこで、本研究では斬新な試みとしてヘルトビッチ上皮鞘をライブイメージングで観察した。その結果、器官培養系と上皮基底細胞特異的GFPマウスを用いて、生きたヘルトビッチ上皮鞘の動態と遺伝子発現をリアルタイムで観察し、歯根の形態形成のメカニズムの基盤となる所見を見出した。

研究成果の概要(英文)：The shape of the root is complicated, in particular in the multirooted molar teeth. After the crown has formed, the outer and inner enamel epithelia form a double-layered Hertwig's epithelial root sheath which proliferates apically and directs root morphogenesis. There is a close association between the epithelial root sheath and the initiation of root dentin formation. However, it should be still addressed how the multi-root are formed in root development. In the present report, we demonstrate in vivo fluorescence imaging of the epithelial root sheath of the K14-GFP tooth explants. The epithelial sheaths were visualized by real-time fluorescence imaging in the tooth explant culture system. We optimized the conditions of the cultures and the timing of the observation. This is the first trial to visualize the process of multi-root formation in vivo and in real time.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：歯根 ライブイメージング 器官培養

## 1. 研究開始当初の背景

歯根はその形成端に存在するヘルトビッチ上皮鞘を鋳型に、上皮間葉相互作用によって形成される。申請者はこれまで歯根の形態形成における分子機構(J Dent Res, 2003, 12598544)を探索するとともに、歯根の器官培養系を樹立してきた(J Dent Res, 2007, 17959897)。しかし、歯根には単根や複根などの歯種に応じた特異的な形態があり、複雑な形態がどのようにして生じるのか、その細胞・分子機構はいまだに明らかにされていない。

昨今、細胞や組織のイメージング技術は、蛍光を発する遺伝子改変動物、光学顕微鏡技術、優れた蛍光・発光プローブなどの開発・進歩により、生きたままの組織をリアルタイムで観察することを可能にしつつある。

そこで、このイメージング技術と、上皮基底細胞を蛍光で可視化する K14-GFP マウス、さらに歯根形成の器官培養系を応用することで、生きたヘルトビッチ上皮鞘を可視化し、その動態をリアルタイムで観察するという発想に至った。さらに、幹前駆細胞と TA 細胞の局在を明らかにし、歯根の形態形成の細胞・分子機構を明らかにするという発想にいたった。

本研究は、歯根の形態形成メカニズムを検討するために生きたヘルトビッチ上皮鞘を可視化し、その動態をリアルタイムで観察するという斬新な方法論を提案するものである。申請者がこれまでに開発した歯根の器官培養系を改良し、さらに実験動物として K14-GFP マウスを用いることで、器官培養中の歯根先端に位置するヘルトビッチ上皮鞘の動態をライブイメージングで捉えることが可能となり、新しい原理の発展に繋がると言える。

## 2. 研究の目的

歯根は歯冠と同様、歯種に応じて複雑な形

態を示し、その形成端に存在するヘルトビッチ上皮鞘を鋳型に、上皮間葉相互作用によって形成される。しかし、その複雑な形態形成を担う細胞・分子機構はいまだ明らかではない。本研究は斬新な試みとしてヘルトビッチ上皮鞘をライブイメージングで観察する。特に、申請者らが確立した器官培養系と上皮基底細胞特異的 GFP マウス、さらに新規蛍光・発光プローブを用いて、生きたヘルトビッチ上皮鞘の動態と遺伝子発現をリアルタイムで観察し、歯根の形態形成のメカニズムを解明することを目的とする。

この実験系が確立されれば、歯根の形態形成メカニズムの検討を器官培養系で行うための基盤が確立され、歯根の形態形成メカニズムの解明に貢献する。さらに本研究の成果は、歯根の形態に異常をもたらす先天性疾患の原因解明の糸口となることが期待できる。同様に、再生医療において歯根形態を人為的に制御するための分子基盤となることも期待される。

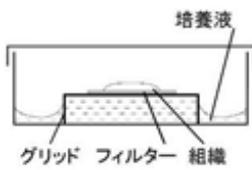
## 3. 研究の方法

本研究は、上皮基底特異的 GFP (K14-GFP) マウスを用いて歯根の器官培養を行うことでヘルトビッチ上皮鞘を可視化し、その挙動を明らかにする。それによって、歯根の形態形成のメカニズムおよびその動態を解明を試みた。

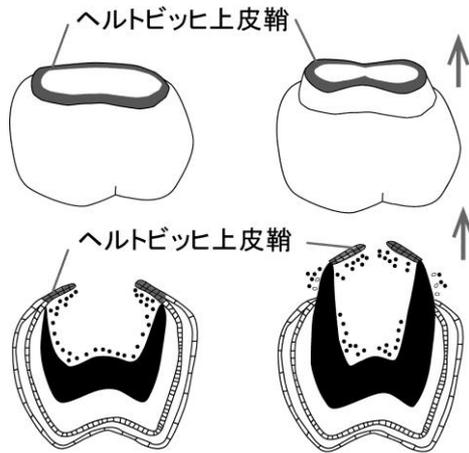
まず、ヘルトビッチ上皮鞘がどのステージにおいて複根をつくる形態をしめすかを検討するために、Shh によるホールマウン ト *in situ* ハイブリダイゼーションによって Shh mRNA の発現を解析した。

次に、K14-GFP マウスを用いた歯根形成の器官培養系の確立と最適化を行った。マウスの歯根の形成は出生後から生じる。そのため様々な時期に出生後にマウス下顎臼歯を取り出し、歯根形成面を観察できるよ

う、歯根先端を上方に向けて位置づけ器官培養を行った。(下図)



蛍光顕微鏡を用いたライブイメージング観察を実施するため、顕微鏡上で歯根の形態形成状況を確認しながら、歯根の器官培養系を行う条件を最適化するとともに、器官培養中の組織を顕微鏡で観察するためのステージングを最適化した。歯胚、スライドガラスの位置を調整し、かつ培養液に組織が浸るようなプラットフォームを作成した。(下図)



器官培養上の歯根と模式図  
歯根は上向き(矢印)に伸長

ヘルトビッチ上皮鞘の細胞増殖速度に応じた、ライブイメージングにおけるタイムラプスの撮影条件を最適化する。

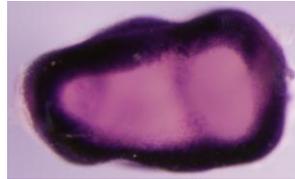
蛍光と位相鎖のタイムラプス観察によって、ヘルトビッチ上皮鞘の動態を検討する。ヘルトビッチ上皮鞘はGFPでラベリングされるため、その動態は蛍光像で観察することができる。

#### 4. 研究成果

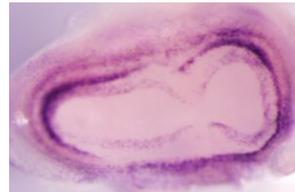
##### ヘルトビッチ上皮鞘における Shh mRNA の発現について

出生後、0日目から9日目までの第一臼

歯を取り出し、Shh mRNA の発現を核にした。その結果、ヘルトビッチ上皮鞘は、生後、4日から5日の間に複根の鋳型となるヘルトビッチ上皮鞘のくぼみが見られるようになることを見出した。



P3



P6

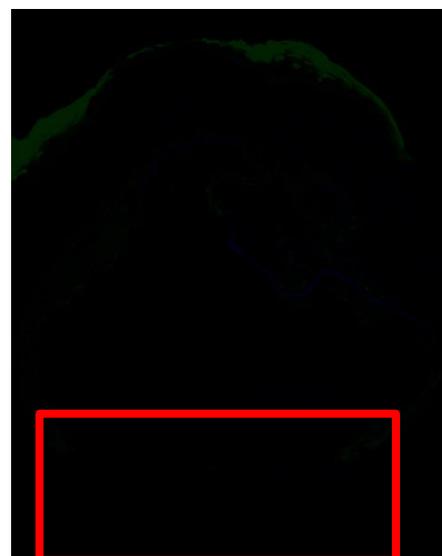
##### K14-GFP マウスにおけるヘルトビッチ上皮鞘の解析

P5 から P9 までの歯胚を取り出す (下図)。



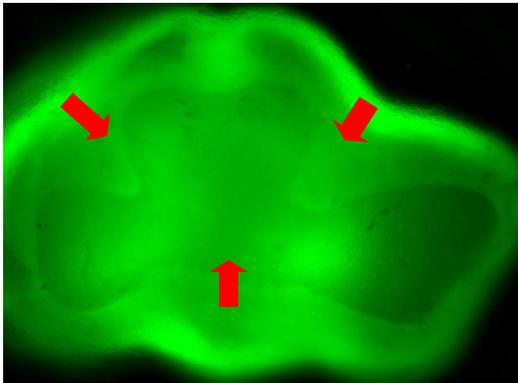
この歯胚の歯根形成面を蛍光顕微鏡で観察する。さらに培養しながら、この上皮がどのように変化するかを検討した。

下図は8日齢の K14-GFP マウスのヘルトビッチ上皮鞘を示す (赤枠内)。

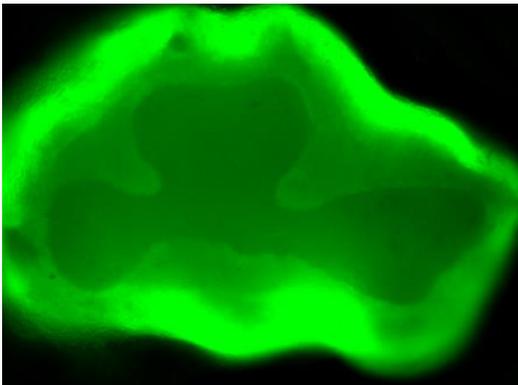


培養直前の2日齢の歯胚を下面から観察すると、ヘルトビッチ鞘が赤矢印部で顕著に歯髄が革に伸長していることが観察される。

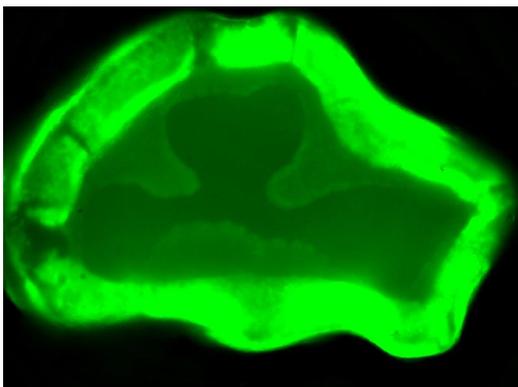
その後、2日後、6日後と伸長することが観察された。



培養開始2日後



培養開始6日後



このように、我々はK14-GFPマウスを用いて歯根の形成過程におけるヘルトビッチ上皮鞘の動態を観察することに、世界ではじめて成功した。現在、この増殖の部位とアポトーシスが生じる部位との関連を観察しているところで、この成果がまとまり次第、

論文投稿により、成果を公表する予定である。

#### 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3件)

Islam MN, Itoh S, Yanagita T, Sumiyoshi K, Hayano S, et al. Runx/Cbfb signaling regulates postnatal development of granular convoluted tubule in the mouse submandibular gland. *Dev Dyn*. 2015 Mar;244(3):488-96. PubMed PMID: 25410786.

Kawanabe N, Fukushima H, Ishihara Y, Yanagita T, Kurosaka H, et al. Isolation and characterization of SSEA-4-positive subpopulation of human deciduous dental pulp cells. *Clin Oral Investig*. 2015 Mar;19(2):363-71. PubMed PMID: 24862940.

Ishimoto K, Hayano S, Yanagita T, Kurosaka H, Kawanabe N, et al. Topical application of lithium chloride on the pulp induces dentin regeneration. *PLoS One*. 2015;10(3):e0121938. PubMed PMID: 25812134; PubMed Central PMCID: PMC4374937.

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山城 隆 (YAMASHIRO, Takashi)  
大阪大学・大学院歯学研究科・教授  
研究者番号：70294428

### (2) 研究分担者

三原聖美 (MIHARA, Kiyomi)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：00551920

伊藤慎将 (ITOH, Shinsuke)  
大阪大学・大学院歯学研究科・助教  
研究者番号：40633706

### (3) 連携研究者

なし