

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20592153

研究課題名（和文）

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

研究課題名（英文）

Tooth root morphogenesis - molecular and morphological analysis for multi-root formation

研究代表者

山本 仁 (Yamamoto Hitoshi)

日本大学・松戸歯学部・講師

研究者番号：80265165

研究成果の概要（和文）：歯根の多根化は上皮性根間突起とそれに関連して形成される髄下葉のよってなされる。マウスとラットを用いて多根化の形成過程を whole-mount および切片での in situ hybridization、免疫組織化学、ヘマトキシリン染色によって観察した。上皮性根間突起の形成には特殊な遺伝子カスケードが存在することがわかった。また髄下葉は島嶼状に形成されるが、その際の細胞分化機構は歯冠部に観察されるものと一部類似していた。

研究成果の概要（英文）：Multi-root formation consists of both epithelial projection and subpulpal lobe formation. The process of the multi-root formation was examined by in situ hybridization, immunohistochemistry and hematoxyline staining in mice and rats. As a result, it is considerable that a specific genetic cascade controlled epithelial projection during multi-root formation. Moreover, subpulpal lobes are formed island-like and cell differentiation during subpulpal lobe formation is similar to that of tooth crown dentin formation.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学

キーワード：歯根、多根歯、歯、再生

## 1. 研究開始当初の背景

これまでに行なった歯と歯周組織の再生に関する研究で、マウス下顎第一臼歯を reaggregation 法によって再生させたところ、再生歯の歯冠形態は *in vivo* に類似しているが、単根歯のみが形成され、*in vivo*（2根）とは異なっていた。また培養実験では、単根歯あるいは多根歯が形成されるかは培養す

る歯胚の発生段階により異なっていることが判った。これらの結果から、歯胚は本来単根を形成する能力しか持たないが、発生過程で多根化する因子を獲得する、あるいは元々多根化する潜在能をもち、それが発生過程で何らかの要因により発現されると考えることができる。しかし歯根の多根化に関する研究は、これまでの歯の形態形成研究の中で最

も研究されていない分野の一つである。

## 2. 研究の目的

多根化の機構の解明の為に

- ①硬組織からみた多根化形成過程の観察
- ②上皮性根間突起形成に関わる上皮細胞分裂
- ③上皮性根間突起およびその他の領域でのシグナル遺伝子の発現
- ④髓下葉形成に関わる象牙芽細胞の分化について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

実験動物としてマウスとラットを用い、両動物共に下顎第一臼歯を観察対象とした。なお本実験の遂行に当たっては日本大学松戸歯学部動物実験委員会の承認（承認番号06-0010）を受けている。

- ①硬組織からみた多根歯形成過程の観察  
歯胚を摘出し、次亜塩素酸処理後、ヘマトキシリン染色を施して髓下葉（象牙質根間突起）の形成を実体顕微鏡観察した。
- ②上皮性根間突起形成に関わる上皮細胞の細胞増殖

マウスの臼歯を摘出後4%パラフォルムアルデヒドで固定し、抗 p75 抗体および抗 Ki67 抗体による歯胚全体およびパラフィン包埋後の薄切切片に免疫組織化学を施した。

- ③上皮性根間突起およびその他の領域でのシグナル遺伝子の発現

マウスの臼歯を摘出後4%パラフォルムアルデヒドで固定し、*Shh* と *Fgf10* の発現を whole-mount *in situ* hybridization で観察した。

- ④髓下葉形成に関わる象牙芽細胞の分化  
ラットの臼歯を摘出後、4%パラフォルムアルデヒドで固定し、抗 Hsp25 抗体および抗 amelogenin 抗体による免疫組織化学を行なった。

## 4. 研究成果

- ①硬組織からみた多根歯形成過程の観察

マウス：マウスでは生後7日目から頬側と舌側から象牙質根間突起が形成され始め、生後10日目には象牙質根間突起は癒合し、複根が形成された。

ラット：ラットでは生後8日目から象牙質根間突起が形成されるが、12日目には歯胚の中央部に島嶼状に髓下葉が形成されていた。この髓下葉は大きくなると共に象牙質根間突起と癒合し、多根が形成された。

本結果から上皮性根間突起形成に関する研究にはマウスが、髓下葉形成に関する研究にはラットが適していると考えられた。そのため②、③についてはマウス歯胚を、④にはラット歯胚を用いることとした。

- ②上皮性根間突起形成に関わる上皮細胞増

殖

抗 p75 抗体および抗 Ki67 抗体による whole-mount 免疫組織化学では上皮性根間突起を含む根端を取り巻く Hertwig 上皮鞘全体に陽性反応が観察された。免疫陽性細胞の数は生後5日で上皮性根間突起形成部で多く観察された。

- ③上皮性根間突起およびその他の領域でのシグナル遺伝子の発現

*Shh* は他の領域と比較して上皮性根間突起での発現は弱かった。また *Fgf10* は上皮性根間突起形成領域の間葉ではあまり発現していないが、その他の領域においては強い発現が観察された。

- ④髓下葉形成に関わる象牙芽細胞の分化

抗 Hsp25 抗体による切片での免疫組織化学では、髓下葉形成領域の歯乳頭細胞が早期に象牙芽細胞に分化するのが観察された。また象牙芽細胞の分化に先立ち、上皮性根間突起の内エナメル上皮が抗 amelogenin 陽性産物を分泌しているのが観察された。

以上、4項目にわたる実験結果から以下のことが考えられた。

①歯根の多根化には髓下葉を形成したのちに髓下葉と象牙質根間突起の癒合により多根化するもの（ラット、ヒト、ブタなど）と髓下葉が形成されること無く上皮性根間突起下に形成された象牙質根間突起の癒合のみにより多根化するもの（マウスなど）とがある。実験動物として頻用されているマウスとラットについて考えると、ラットは3根以上を有することから、上皮性根間突起が多く出現することとなり、その形成状態は複雑である。一方マウスでは2根であるため、2本（頬側と舌側）のみの上皮性根間突起が出現するので、上皮性根間突起の出現、成長と消失の過程や、種々シグナル遺伝子や蛋白の出現状況を観察するのに容易である。しかし動物実験からヒトの多根化を説明する場合には、髓下葉をとともなう多根歯形成を行なう動物の情報が必要となる。従って象牙芽細胞の分化を含めた髓下葉の形成研究のためにはマウスよりもラットが適している。

②咬頭の分化に関して、元来一つの咬頭を持った歯が癒合することにより多咬頭歯が出来たという説がある。歯根に関して考えると、元来歯は一つの咬頭と一本の歯根を有しており、これが癒合して多根化したと考えられるが、ヒトを含めたいろいろな動物において咬頭の数と歯根の数は一致しないことが多い。ヒトと同様に歯冠象牙質をエナメル質が覆い、歯根象牙質をセメント質が覆う歯の形態を持つ最初の動物はワニであり、ワニは円錐状の咬頭一つと一本の歯根を有している。したがってヒトを始めとする多根歯はワニからの進化過程で出来上がったものと考え

ることができる。この事実は今後の多根化研究は進化過程における各動物の状況（系統発生の学的検索）を踏まえた上で考えていかなければならないことを示している。

③ 髄下葉形成に関わる象牙芽細胞の分化は、歯冠象牙質形成に関わる象牙芽細胞と同様な過程を経ることが観察された。しかし髄下葉は一つの塊として形成されるのではなく、島嶼状にいくつも形成され、それぞれが癒合することにより大きくなっていく。これはかなり近くに存在する歯乳頭細胞であっても同時期に象牙芽細胞に分化するのではないことを示している。象牙芽細胞の分化には内エナメル上皮との上皮-間葉相互作用が関わっている。*Shh* や *Fgf10* の発現は上皮性根間突起とそれ以外の部位で異なっていたが、上皮性根間突起を形成する細胞間においても象牙芽細胞の分化に働くシグナルの発現状況は異なることが考えられるが、それを調節する機構については本研究では明らかにすることができなかったため、今後の研究を進めていく所存である。

④ 歯根の形態形成、特に多根化についてのメカニズムは歯の形態形成研究で最も行なわれていない分野の一つであるので、本科学研究費補助金による研究において多根化について知見を得られたことは今後の歯の形態形成に役立つものと考えられる。しかしながら本研究では明らかにできなかったことが多いのも事実であり、今後のこの分野での研究の発展が待たれる。

#### 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 8 件)

- ① Yamamoto H、Muramatsu T、Shibukawa Y、Sohn WJ、Kim JY、Tazaki M、Alteration of cytokeratin expression during palatine rugae development in mice、*Journal of Hard Tissue Biology*、査読有、20 巻、2011、17-22
- ② Sakae T、Hirayama K、Yamamoto H、Suzuki K、Hayakawa Y、Takahashi Y、Kuwada T、Nakao K、Nogami K、Inagaki M、Tanaka T、Hayakawa K、Sato I、Kakei M、Three-dimensional orientation of human enamel crystallites using x-ray diffraction、*Journal of Hard Tissue Biology*、査読有、20 巻、2011、7-10
- ③ Sakae T、Hayakawa Y、Takahashi Y、Tanaka T、Hayakawa K、Kuwada T、Nakao K、Nogami K、Inagaki M、Yamamoto H、Iwata N、Suzuki K、

Mori A、Tanimoto Y、Hayakawa T、Nakada H、Suwa T、Numata Y、Suemitsu M、Sato Y、Okada H、Yamamoto H、Sekiya K、Kaneda T、Nishimura H、Kitamura H、Hata S、Akimoto Y、Suzuki K、Yamamoto H、Shintomi T、Sato I、X-ray phase-contrast imaging and x-ray absorption fine structure analysis using parametric x-ray radiation generated at LEBRA、*Nihon University、International Journal of Oral-Medical Sciences*、査読有、9 巻、2010、122-136

- ④ Sasaki H、Muramatsu T、Kwon HJ、Yamamoto H、Hashimoto S、Jung HS、Shimono M、Down-regulated genes in mouse dental papillae and pulp、*Journal of Dental Research*、査読有、89 巻、2010、679-683
- ⑤ Yamamoto H、Cai JL、Cho SW、Kim JY、Jung HS、Periodontal tissue formation by reaggregation system in mice、*Journal of Hard Tissue Biology*、査読有、18 巻、2009、77-82
- ⑥ Yamamoto H、Muramatsu T、Shibukawa Y、Tazaki M、Properties of cells at the palatine rugae during palate development in mice、*Proceedings of International Conference on Frontier of Dental and Craniofacial Research*、査読有、2008、28-29
- ⑦ Suzuki K、Sakae T、Yamamoto H、Kozawa Y、Three dimensional observation of the enamel prism of Subhyracodon Molars、*International Journal of Oral-Medical Sciences*、査読有、7 巻、2008、113-118
- ⑧ Higuchi H、Yamamoto H、Cai JL、Suzuki K、Jung HS、Kozawa Y、Comparison of the structure of tooth germs transplanted into the subcutaneous tissue or the kidney capsule of mice、*International Journal of Oral-Medical Sciences*、査読有、7 巻、2008、37-34

[学会発表] (計 19 件)

- ① Sakae T、Okada H、Nakada H、Suzuki K、Yamamoto H、X-ray phase contrast imaging of dental tissue、The 58<sup>th</sup> Annual meeting of Japanese Association for Dental Research、平成 22 年 11 月 20 日、小倉 (九州歯科大学)
- ② 太田 (横田) ルミ、新美寿英、山本 仁、鈴木久仁博、小澤幸重、象牙芽細胞の

- Grouping and Dancingと象牙質の構造、第52回歯科基礎医学会総会、平成22年9月22日、東京（タワーホール船堀）
- ③ 寒河江登志朗、鈴木久仁博、山本 仁、ヒト・エナメル質結晶のX線回折法による3次元配向解析、第52回歯科基礎医学会総会、平成22年9月22日、東京（タワーホール船堀）
- ④ 鈴木久仁博、寒河江登志朗、山本 仁、太田ルミ、小澤幸重、Observation on the reproduction of gray short-tailed opossum (*Monodelphis domestica*)、第52回歯科基礎医学会総会、平成22年9月21日、東京（タワーホール船堀）
- ⑤ 山本 仁、新美寿英、太田ルミ（横田ルミ）、鈴木久仁博、寒河江登志朗、小澤幸重、ヒト永久歯の無細胞セメント質と細胞セメント質の分布に関する研究、第18回硬組織発生物学会、平成21年9月5日、札幌（北海道医療大学）
- ⑥ 山本 仁、曹晟愿、鈴木久仁博、寒河江登志朗、金幸瑩、鄭翰聖、マウス歯胚を用いた歯と歯周組織の再生に関する研究、第19回硬組織発生物学会学術大会、平成22年9月4日、岡山（就実大学）
- ⑦ 山本 仁、新美寿英、太田ルミ、鈴木久仁博、寒河江登志朗、小澤幸重、横口蓋ヒダの有無による口蓋粘膜構造の違いについて、第114回日本解剖学会学術集会、平成21年3月29日、岡山（岡山理科大学）
- ⑧ 鈴木久仁博、山本 仁、寒河江登志朗、太田ルミ、新美寿英、小澤幸重、ハイイロネズミオポッサム (*Monodelphis domestica*) 臼歯咬頭形成につて、第114回日本解剖学会学術集会、平成21年3月28日、岡山（岡山理科大学）
- ⑨ 小澤幸重、細川貴孝、新美寿英、太田ルミ、山本 仁、鈴木久仁博、歯の起源に関する比較解剖学的検討 - 角質歯から真歯へ、第114回日本解剖学会学術集会、平成21年3月28日、岡山（岡山理科大学）
- ⑩ 鈴木久仁博、山本 仁、寒河江登志朗、新美寿英、太田ルミ、小澤幸重、縦型ハンター・シュレーゲルの条紋について - サイ類臼歯の場合 -、日本古生物学会第158回例会、平成21年1月31日、那覇（琉球大学）
- ⑪ Yamamoto H、Muramatsu T、Shibukawa Y、Tazaki M、Properties of cells at the palatine rugae during palate development in mice、International Congress on Frontiers of Dental and Craniofacial Research、平成20年11月1日、中国（北京）
- ⑫ 山本 仁、村松 敬、澁川義幸、新美寿英、太田ルミ、鈴木久仁博、寒河江登志朗、田崎雅和、小澤幸重、マウス横口蓋ヒダ形成時に一過性に出現する細胞群について、第50回歯科基礎医学会、平成20年9月25日、東京（有明コンベンションホール）
- ⑬ 小澤幸重、大島勇人、新美寿英、太田ルミ、山本 仁、鈴木久仁博、ヒト歯根形態形成分化の比較解剖学的な分析、第50回歯科基礎医学会、平成20年9月25日、東京（有明コンベンションホール）
- ⑭ 大澤枝理、山口 茜、太田ルミ、山本 仁、鈴木久仁博、小澤幸重、胎児混合歯列弓のマイクロシーティー ( $\mu$ CT) と三次元復元による観察、第50回歯科基礎医学会、平成20年9月23日、東京（有明コンベンションホール）
- ⑮ 新美寿英、太田ルミ、山本 仁、鈴木久仁博、寒河江登志朗、山下靖雄、小澤幸重、ヒト下顎切歯のエナメル・象牙境の観察、第50回歯科基礎医学会、平成20年9月23日、東京（有明コンベンションホール）
- ⑯ 鈴木久仁博、小澤幸重、寒河江登志朗、山本 仁、太田ルミ、新美寿英、縦型シュレーゲル条の形成について - Subhyracodon と Pyrotherium の臼歯の場合、第50回歯科基礎医学会、平成20年9月23日、東京（有明コンベンションホール）
- ⑰ 太田ルミ、新美寿英、山本 仁、鈴木久仁博、寒河江登志朗、小澤幸重、エナメル芽細胞のTorsional Motion、第50回歯科基礎医学会、平成20年9月23日、東京（有明コンベンションホール）
- ⑱ 山本 仁、大久保厚司、根未完成歯移植後の歯根形態について - 臨床的および実験的観察、第6回日本再生歯科医学会学術大会、平成20年9月13日、東京（日本歯科大学）
- ⑲ 山本 仁、新美寿英、太田ルミ、鈴木久仁博、寒河江登志朗、小澤幸重、マウスの口蓋発生に関する研究 I. 横口蓋ヒダの形成について、日本大学口腔科学会第8回学術大会、平成20年9月7日、千葉（日本大学松戸歯学部）

〔図書〕（計1件）

- ①山本 仁 他、わかば出版、エナメル質 形成、構造、遺伝、起源と進化、2009、285

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山本 仁 (YAMAMOTO HITOSHI)  
日本大学・松戸歯学部・講師  
研究者番号：80265165

### (2) 研究分担者

太田 ルミ (横田 ルミ) (YOKOTA-OHTA RUMI)  
日本大学・松戸歯学部・助手  
研究者番号：30312044  
鈴木 久仁博 (SUZUKI KUNIHIRO)  
日本大学・松戸歯学部・教授  
研究者番号：30256903  
小澤 幸重 (KOZAWA YUKISHIGE)  
日本大学・松戸歯学部・教授  
研究者番号：80014132  
村松 敬 (MURAMATSU TAKASHI)  
東京歯科大学・歯学部・講師  
研究者番号：00276982

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：