

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23593024

研究課題名(和文)新規歯根形成細胞マーカーによる歯根形成・吸収機構の解析～抗がん剤投与モデル～

研究課題名(英文)Effect of the antineoplastic agent busulfan on rat molar root development

研究代表者

三富 智恵 (Tomoe, Mitomi)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：00313528

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：アルカリ化抗腫瘍薬ブスルファン(Bu)は、歯の形成障害を生じる。異なる歯根形成段階でのBu投与が歯根形成に与える影響について、ラット臼歯を対象に観察した。Buを早期に投与すると、根尖部に骨様象牙質形成とヘルトビッチ上皮鞘の破壊が見られた。歯根長はBu投与時期が早いほど短かく、根尖部の早期閉鎖と骨様象牙質形成量も、投与時期に関連していた。本研究により、Bu投与による歯根形成への影響は、投与されるラットの日齢に影響されることが分かった。Buの投与は正常歯根発達に必要なHERSの消失をもたらし、その結果、根尖部の骨様象牙質形成、根尖閉鎖という歯根形成障害を引き起こすことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：The antineoplastic bifunctional-alkylating agent busulfan (Bu) induces developmental anomalies of the teeth. The aims of this study were to clarify the effect of the administering Bu at different stages of rat molar root development. The rats receiving Bu at an early stage showed osteodentin formation and complete destruction of the Hertwig's epithelial root sheath (HERS). The root lengths in rats treated with an early stage were lower than that in the control rats. A narrowed apical foramen and an increased amount of osteodentin were also present, depending on the rat's age at the time of treatment. Busulfan treatment in rats resulted in abnormal root development, depending on the stage at which Bu was administered. The administration of Bu caused a shortage of HERS cells, which are required for normal root development. This disturbs root formation, resulting in osteodentin formation and a narrowed apex foramen.

研究分野：医歯学系

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：歯根 歯の形成障害 抗癌剤 ヘルトビッチの上皮鞘 象牙芽細胞

1. 研究開始当初の背景

小児癌の治療法の進歩により小児癌患者の生存率は劇的に向上している。その結果、現在、小児癌の治療法とその後遺症に多くの注目が集まっている。小児期に癌化学療法を受けた小児患者は著明な歯牙形成障害（無歯症、矮小歯、歯根形成障害）を伴うことが報告されている。歯牙発生時の異常は、歯の異常硬組織形成として治癒不能の永続的な障害として小児期以降の患者に後遺症をたらすため、小児期の化学療法が歯の発生に与える影響について多くの研究がなされてきた。

歯の発生は数年間にわたる長い行程である。ある特定の時期に外因性の損傷によって歯の発生が大きく障害を受けることが予測され、その損傷に対する感受性は時間、空間的に連続的に現れる細胞分裂、細胞移動、細胞分化、石灰化といった個々の発生事象に依存している。歯根および、歯周組織の発生は複雑な事象の連続と様々な細胞の関与が必須である。伸張する歯根の根尖部には二層の上皮性の構造であるヘルトビッチの上皮症（HERS）があり、隣接する神経堤由来上皮性間葉組織を歯乳頭と歯小嚢に分けている。歯根発生時にはこの根尖部の複合体は少なくとも二つの重要な役割を果たしている。象牙質とセメント質の生物学的石灰化と歯根の組織構築である。

ブスルファン（Bu）は二官能機性のアルキル化剤で、慢性骨髄性白血病治療薬として骨髄移植の骨髄機能廃絶前処置療法薬として使用されてきた。この治療薬は胎児組織や培養細胞を用いた実験で、細胞内求核物質およびタンパク質と反応し、DNA-DNA 結合、DNA-タンパク質のクロスリンクを形成して DNA を傷害し、細胞分裂を障害してアポトーシスを引き起こす。

これまでに様々な研究で、抗癌剤の歯牙発生に与える影響について報告されている。シクロホオスファミドを用いた組織形態学的研究により、抗癌剤の投与量と障害の大きさに相関があることが報告されている。疫学的な報告では、抗癌剤投与時の年齢が、その後の歯の障害の程度の重大な因子となることを示している。しかしながら、抗癌剤の投与時期が歯根根尖部の HERS に与える影響はよくわかっていない。歯の発生段階と歯根の発生において抗癌剤が重大な影響を与える決定的な時期があることは容易に想像できる。

2. 研究の目的

異なる歯根発生段階のラットに Bu を投与してその影響を明らかにする。また、歯根発生障害の程度とその投与時期の相関を明らかにする。

3. 研究の方法

実験計画

Wister 系ラット雌雄 72 産仔を 6 グループ ($n = 12$)、生後 13 (歯根形成初期)、15 (歯根形成中期)、19 日齢 (歯根形成後期) に分け、実験群はジメチルスルオキサイド (DMSO) に溶解したブスルファン (Bu) 7.5mg/kg を腹腔内投与し、生後 30 日目に灌流固定し、組織形態学的に観察した。対照として、DMSO のみを腹腔内投与したラットを用いた。

三次元歯根形態解析

μ -CT により上顎第一大臼歯のスライス画像を 201 枚撮影し、その三次元立体構築画像を解析した。

免疫組織化学的解析

HERS の形態解析のためサイトケラチン 14 (CK14)、象牙芽細胞の解析のため nestin および、デンチンシアロプロテイン (Dsp) を用いた免疫組織化学を行った。

組織形態計測

歯根長 (RL)、根尖孔幅 (WAF)、象牙質厚 (RDT)、有細胞セメント質面積 (ACC)、骨様象牙質面積 (AOD) を計測した。

統計解析

組織形態計測データは実験群とコントロール群で分散分析し、その後、多重比較解析を行った。

4. 研究成果

13 日齢に Bu 投与を受けた実験群では体重減少がみられた。他の実験群では有意な体重減少はみられなかった。

μ -CT による三次元立体構築像より、実験群では、歯根の伸長障害が観察された。コントロール群では、異常は観察されなかった。象牙質厚や、石灰化の程度に相違は観察されなかった。

形態学的観察では、実験群では、根尖部に異常が観察された。異常の程度は、若日齢に Bu 投与を受けた実験群に、より顕著な異常が観察された。伸張する象牙質先端部は完全に破壊され、そこには、骨様象牙質が観察された。根尖部破壊の程度は、歯根形成初期に Bu 投与を受けた実験群ほど破壊の程度は大きく、歯根形成後期に Bu 投与を受けた実験群では障害の程度は小さかった。分化する象牙芽細胞や円柱状の象牙芽細胞層は観察されなかった。有細胞セメント質は既に形成されていた。

CK14 免疫組織化学的解析では、若日齢で Bu 投与を受けた実験群では HERS 構造は完全に破壊され、CK14 陽性細胞成分は認められなかった。

nestin 免疫組織化学的解析では、骨様

象牙質中の細胞、および、骨様象牙質表面の立方型の細胞に強い免疫陽性反応が観察された。しかしながら、これらの細胞は典型的な象牙芽細胞の形態を示してはいなかった。また、これらの nestin 陽性細胞は Dsp にも陽性反応を示した。

組織形態計測解析では実験群では有意に歯根長が減少していた。また、根尖孔幅、骨様象牙質面積にも有意差がみられた。しかしながら、象牙質厚、有細胞セメント質面積に有意差はみられなかった。

本研究により、抗癌剤 Bu の投与は、その投与時の歯根の発生段階に依存して顕著な根尖部の破壊をもたらすことが示された。これらの結果は、小児癌化学療法経験患者が、歯根短縮、根尖孔の早期閉鎖を示すというこれまでの臨床報告と一致する。13 日齢に Bu 投与を受けた実験群に体重減少がみられたのは、造血系の細胞傷害によるものと考えられる。しかしながら、これらの歯根発生障害は象牙質厚、有細胞セメント質の形成が 13 日齢投与群においても影響を受けていないので、実験群での歯根短縮と根尖孔の縮小は Bu 投与による全身性傷害の結果ではなく、発達する歯根での Bu 投与が引き起こす局所的な障害によると考えられる。本研究により、ラット歯牙における日齢と歯の発生障害の臨床報告と類似した、ラットでの Bu による病理組織学的変化との相関が体系的に示された。

Bu は 2 つのメチルスルホネート基を置換することによって、DNA のなかに 4 つの炭素結合を形成してクロスリンクを形成する。細胞は G1 期後期にもっとも Bu の影響を受け、S 期を正常に通過するが、正常な有糸分裂をおこなうことができず、細胞周期は G2 期で停止する。Bu はラットを用いた実験で、細胞増殖活性が高い神経性上皮、網膜、レンズでアポトーシスを引き起こし細胞分裂を阻害し、小脳症、小眼球症、白内障を引き起こす。伸長する歯根の先端部と近傍の歯周組織は成長に伴って増殖する。HERS は根尖方向に成長する象牙質に沿って伸長する上皮構造を維持するために必要な細胞数を確保するため、持続的な増殖活性を示す。また、近年、成長する根尖部複合体には幹細胞の存在が報告され、また、培養 HERS 細胞に Bmi-1、Nanog、SSEA-4、Oct3/4 が発現していることが報告されている。Bu 投与群に HERS が特異的に傷害を受けていたことは、Bu 投与後も豊富な歯髄、および歯小囊幹細胞から大量の前駆細胞の供給を受けるとされる象牙芽細胞やセメント芽細胞とは異なり、HERS では幹細胞の数が限られていることを示している。歯根発生中の HERS における上皮性幹細胞の存在は明らかにされていないが、Bu による増殖中の HERS 中の幹細胞に対す

る傷害が HERS の細胞数の総数の不足を引き起こし、正常な HERS 構造を維持できなくなったと考えられる。これにより HERS の崩壊と消失が生じた。しかしながら、我々の実験では TUNNEL 陽性あるいは核濃縮した細胞は検出されなかった。これは、観察期間の間に消失してしまったと考えられる。また、シクロフォスファミドを用いた経時的観察をおこなった実験で、投与後 2 日以内に象牙芽細胞の増殖領域に無細胞領域が現れ、その後、その領域は骨様象牙質になることが報告されている。我々は、Bu 投与直後の組織学的変化は観察できなかったが、同様の骨様象牙質の形成を実験群ラット根尖部に確認しており、Bu による病理学的変化における、投与直後のアポトーシス陽性細胞の細胞動態の詳細な検討が必要である。

歯の発生過程で、象牙質を形成する象牙芽細胞は nestin を発現する。また近年、nestin と Dsp は象牙芽細胞の分化の過程で、分化が進むにつれて協調して象牙芽細胞型の細胞に発現し、nestin は分化マーカー、Dsp は機能的マーカーとなることが報告されている。骨様象牙質中やその表面の細胞での nestin と Dsp の共局在は、これらの細胞が骨芽細胞前駆細胞由来で、骨様象牙質の形成に関与していることを示している。

HERS が上皮間葉相互作用によって、歯乳頭細胞から、組織された歯根象牙質を形成する象牙芽細胞に分化させることはよく知られている。歯根発生では歯根形成の完了時に HERS 細胞は最終的に消滅し、歯根象牙質の形成は終了する。近年、器官培養実験で HERS 細胞の影響無しで骨様象牙質が形成されることが示された。HERS が破壊されたラットの根尖部での骨様象牙質の形成は、HERS の破壊あるいは消滅が、正常に伸長する歯根象牙質を形成するために分化する象牙芽細胞前駆細胞の能力を減弱し、異常な骨様象牙質を作らせた可能性が示唆される。骨様象牙質領域の nestin/Dsp 陽性細胞が正常な象牙芽細胞の性質を持っているかどうかはわからないが、これらの細胞は Bu 投与時に象牙芽細胞前駆細胞であり、HERS との相互作用を経ることなく分化した可能性がある。HERS のダウングロースの停止が、歯根長の減少をもたらす、HERS の破壊・消滅が象牙芽細胞前駆細胞の骨様象牙質の形成のきっかけとなったのかもしれない。また、これが結果として、根尖孔の狭小をもたらしたのかもしれない。HERS 消失後の象牙芽細胞前駆細胞の分化のメカニズムについてはよくわからない。

HERS のセメント芽細胞の分化およびセメント質形成における役割については議論的である。歯小囊細胞と HERS の

相互作用(これはセメント芽細胞の分化を導く)は、何度も繰り返し示唆されているが、まだ解明されていない。一方、HERS細胞の消失自体がセメント質の形成に必須であるとする研究者もいる。実験群では早期のHERSの破壊・消失がセメント質の形成に影響を与えている様には見えなかった。有細胞セメント質の形成量に有意差がみられなかったことは、HERSは有細胞セメント質の形成には直接的な役割を果たしていることはないようである。

Buの歯根発生における主な効果はHERSの破壊と骨様象牙質の形成であるが、これはマラッセの上皮遺残(ERM)細胞の数にも変化をもたらした。ERM細胞の数が減少したことは、ERMは歯根の発生段階でも増殖活性を持っていることを示している。ERMは歯根膜(PDL)中に存続し、歯根吸収抑制、セメント質形成誘導、PDLの恒常性維持に重要な役割を果たしているとされている。本研究では観察日齢が30日であったので、この時点ではPDLは未熟で、ERMが無い状態でのPDLの変化を正常時と比較して比べることはできない。本方法は、Bu投与時に細胞周期中で不活性な細胞は影響を受けないため、PDL中にERM細胞が少ないか、ほとんど無いラットの長期的な観察が可能である。それ故、本モデルは、PDLの恒常性におけるERMの役割を明らかにするのによいモデルとなる。ERMの消失によるPDLの恒常性に与える影響についてはさらに解明が必要である。

本研究によりBu投与による歯根形成への影響は、投与されるラットの日齢に大きく影響されることがわかった。Buの細胞毒性の効果はHERSの早期破壊・消失をもたらし、骨様象牙質の形成を引き起こることを明らかにした。病的に崩壊・消失するHERSに伴う骨様象牙質と有細胞セメント質形成の経時的変化を観察することにより、歯根根尖部の発生における新たな知見をもたらすものと考えられる。

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 1 件)

- ① Mitomi T, Kawano Y, Kinoshita-Kawano S: Effect of the antineoplastic agent busulfan on rat molar development, Archives of Oral Biology, 59(1): 47-59, 2014. 査読有り

[学会発表] (計 1 件)

三富智恵, 河野芳朗, 河野承子, 松山順子, 坂井幸子, 佐野富子: アルキル化抗腫瘍薬によるラット歯根形成障害—根尖部における経日変化—, 第52回日本小児歯科学会大会, 東京都, 2014.5.16-17.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三富 智恵 (MITOMI TOMOE)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 00313528

(2) 研究分担者

河野 芳朗 (KAWANO YOSHIRO)
新潟大学・医歯学系・助教
研究者番号: 60303129

前田 健康 (MAEDA TAKEYASU)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 40183941

早崎 治明 (HAYASAKI HARUAKI)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号: 60238095

(3) 連携研究者

なし