

平成 21年 5月 15日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592128
 研究課題名（和文） 新規器官培養法によるヘルトヴィッヒ上皮鞘形成過程のイメージングと発生機序の解明
 研究課題名（英文） Cell dynamics in transition stage from crown to tooth root formation and effects of growth factors in development of Hertwig epithelial root sheath

研究代表者
 藤原 尚樹 (FUJIWARA NAOKI)
 岩手医科大学・歯学部・講師
 研究者番号：20190100

研究成果の概要：

臼歯の歯根形成にはヘルトヴィッヒ上皮鞘 (HERS) が重要な役割を果たすことが知られているが、その中で理解が乏しい HERS 発達のメカニズムについて今回検討した。我々は 2 つのオリジナルな器官培養系を用いて上皮成長因子 epidermal growth factor、インスリン様成長因子 insulin-like growth factor -I が、それぞれ歯冠形成から HERS 形成の移行時期、HERS の伸長・発達に重要な作用を示すことを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
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：歯の発生、歯根形成、ヘルトヴィッヒ上皮鞘、器官培養、EGF

1. 研究開始当初の背景

再生生物学の進歩と培養技術の発達により、齧歯類切歯由来の上皮性組織幹細胞を用いた研究 (Harada ら, 2002) や組織再結合による臼歯の歯冠形成 (Young ら, 2002) の研究などが報告され、歯胚再生の研究は進んできた。埋伏歯や歯根未発達歯の再植、組織再結合により得られた歯胚を用いた歯牙再生を考える際に歯周組織を形成させ、歯を機能状態で安定・維持させることが重要であり、そのためには歯根形成・萌出機構の解明は重要であると考えた。しかし歯冠形成に関するさまざまな発生メカニズムの解明がなされ

てきた一方で、臼歯歯胚の歯根伸長や歯の萌出を司るメカニズムについては未だ不明な点が残されていた。この原因のひとつに歯冠形成機序の解明に有効な実験系として役割を果たしてきた従来の器官培養系が生後歯胚では機能しなかった (Slavkin ら, 1990) ことが考えられた。そこで我々は臼歯歯根の形態形成を調節するメカニズムを解明するために必要な、生後歯胚の培養が可能な新しい器官培養系を考案した (Fujiwara ら, 2005)。そしてヘルトヴィッヒ上皮鞘 (HERS) の発達には外エナメル上皮の細胞増殖が重要な因子となることを報告した。

この器官培養系の主要な特徴は3点あり、それは1)歯根が *in vivo* と同様、下方へ向かって形成される系であること、2)HERS の分化の時期からセメント質形成まで生後白歯歯胚の発達を広く観察できること、3)無血清器官培養系を用いることで外因性に添加した因子の作用や標的細胞の動態を直接観察できることである。さらに我々は歯胚を薄切した後に器官培養を行う別の培養法も確立しており、我々の持つ技術を体系的に組み合わせることによって歯根形成機序の解明を進めることができると考え本研究を立案した。

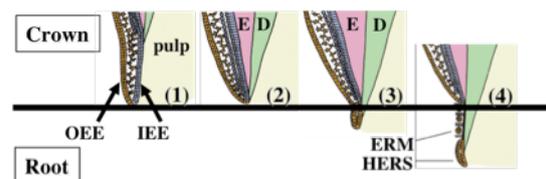
2. 研究の目的

歯根形成に HERS が重要な役割を果たすことは良く知られているが、その詳細についてはよく分かっていない。我々の研究目的は白歯歯胚によって、歯根形成を調節する因子の解明と HERS の歯根形成における細胞や分子のダイナミクスについて比較検討し、作用部位や作用機序の詳細を明らかにすることである。また器官培養系は *in vivo* と同様の組織間相互作用が維持されているのが最も大きな特徴であり、この利点を利用して歯根形成メカニズムを解明する実験系の確立を目指し包括的な研究へとつなげたい。今回我々は2つのオリジナルの器官培養系を用いるが、後述する slice culture の生後白歯歯胚への応用は開発中であり HERS 内の細胞ダイナミクスを観察するために調整する必要がある。この培養法は従来の期間培養系では不可能であった組織の形態的变化をリアルタイムで観察することを可能にするもので本実験において必須であり、この培養条件を確立し、実験系を完成させるのが第一の目的とする。一方で我々はもう一つの培養系を使って insulin-like growth factor (IGF)-I (Fujiwara ら, 2005) や fibroblast-growth factor (FGF)-10 (Tamaki- Yokohama ら, 2006) が歯根形成において重要な役割を果たすことを報告した。しかし培養細胞などで 齧歯類の切歯の萌出を促進するとして Klein ら (1994) によって報告された epidermal growth factor (EGF) などの他の因子に関してはほとんど分かっていない。そこで本研究の2つ目の目的としてこれらの因子 (とその receptor) が HERS の形成機序にはたす役割を添加 (生理的濃度・過剰投与) 実験、機能抑制実験により検索する。

またすでに我々は HERS において外エナメル上皮 (OEE) 細胞の分裂活性が内エナメル上皮 (IEE) より高いことを報告した (Fujiwara ら, 2005)。通常相接する2つの細胞層の細胞分裂に不均衡が生じれば HERS の形態もどンドン彎曲していくと考えられるが、実際はそうならない。このことは

HERS の形態維持や長さ (サイズ) の維持に何らかの独特のメカニズムが存在していると考えられる。我々は HERS の維持には細胞分裂の盛んな OEE 細胞が積極的に関わっていること、そして IEE は間葉細胞との相互作用を維持し歯根象牙質形成・HERS の断裂のタイミングを調節することによってセメント質形成のトリガーとしての役割も担うと考えている。本研究における3つ目の目的は、HERS の OEE と IEE とでは役割が異なり、その協調的作用が HERS の維持や歯根形成に関係しているという我々の仮説 (図1) を証明することである。

図 1



1, 歯冠形成時にはIEE細胞の増殖分化が活発で、分化したエナメル芽細胞はエナメル質形成を行う。2, IEE細胞の増殖が停止し、エナメル芽細胞への分化する細胞も枯渇し、歯冠形成が終了する。3, OEE細胞 (黄色) の増殖は継続し、増殖した細胞は先端部へ移動し、HERS形成を始める。4, OEE細胞の増殖は継続し、先端部でHERSを形成し続けるが、他方咬頭頂側のHERSは歯根の伸長に伴い上皮の層はしだいに断裂(ERM)を始める。

3. 研究の方法

- (1) HERS 発達の観察に最適な slice culture の培養条件の確立
- (2) 各ステージの歯胚のHERSへのマイクロインジェクション条件の確立
- (3) HERSにおけるIGF-I, PDGF, EGFと各因子のレセプターの発現についての経時的、免疫組織化学的観察
- (4) 器官培養下でのHERS発達における成長因子の効果についての検索

1, EGFの至適濃度の検索

2, EGFの作用の検索

- (1) 対照群、(2) EGF添加群、(3) 中和抗体添加群の3群それぞれの培養液を用いて培養し、形態学的にまたHERSの形態計測による差異を評価する。

3, EGF receptor の作用の検索

- (4) EGF receptorの中和抗体添加群、
- (5) EGF receptor kinase inhibitorである tyrphostin 添加群、
- (6) tyrphostin + 外因性EGF添加群にて培養し、形態学的にまたHERSの形態計測による差異を評価する。

同様にIGF-Iとplatelet derived growth factor (PDGF)についても行う。

4. 研究成果

(1) HERS形成時の細胞ダイナミクスを観察するために、脳の研究で用いられているSlice cultureを応用することを計画した。そのためHERSの形成過程の観察に適したSlice cultureの培養条件の検索を行った。その結果、生後歯胚の中でもまだ歯冠部の硬組織の形成が未発達な時期の歯胚である、生後(P) 0～1日齢の Maus 下顎臼歯歯胚が培養開始時期として操作しやすいこと、スライスする組織の厚さは200 μ mに設定することで、培養後の組織の維持が良好で、かつ細胞ダイナミクスの観察も可能であること、またその時用いる包埋材は様々な濃度を検討した結果、5%寒天が試料の包埋、スライス、培養後の維持に置いて良好な結果を得られること、さらにスライスした切片はTrowell法にて培養することが培養中の組織の立体構築の維持やその後の発達過程を観察するのに適していることなどを明らかにすることができた。

(2) 上記で示した仮説を検証するためにHERS細胞の動態に関して2つの実験を行った。まず、サービカルループの細胞やHERS細胞へ生体色素DiIをマイクロインジェクション(図2)し、リアルタイムイメージングにより観察した。OEE細胞にDiIをマイクロインジェクションすると、サービカルループ周辺でDiIを保持したOEE細胞が、HERSの形成過程と共に先端方向へ移動していく様子が見られ、一方でIEE細胞にDiIをマイクロインジェクションすると、その移動はOEEと反対方向への流れを示すことを動画映像として捉えることができた(図3には動画から得られた経時的な写真を5つ配列した)。

次にGFP(Green Fluorescence Protein 発現)マウスの生後臼歯歯胚を用いてHERS形成へ移行する時期のサービカルループの先端部での細胞動態を蛍光実体顕微鏡システムによるリアルタイムイメージング像をコマ撮り画像として観察した(図4には一部の写真を経時的に9つ配列した)。

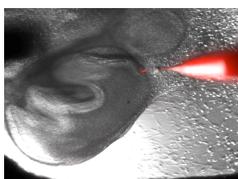


図2

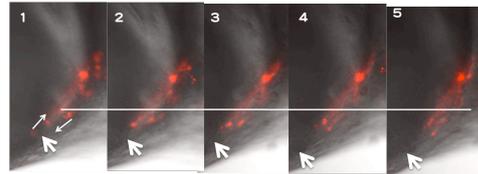


図3

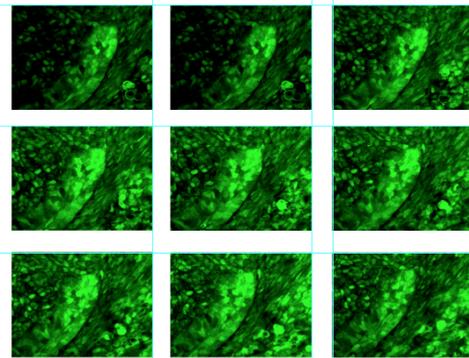


図4

その結果、DiIインジェクションの結果を追証することができ(図4)。(図4はサービカルループ先端が上方に向けて配置してある。また細胞の移動や形態変化が大きい細胞は蛍光強度が強く、明るく見える。)

これ以降の結果については、限られた記入スペース・字数のため、HERSの形成過程に対する影響を調べたEGF、IGF-I、PDGFの中から、最も顕著な変化が認められたEGFについての結果を中心にまとめ、他の因子については最後に総合的な図の中でまとめる。

3) EGFの受容体であるEGF receptorに対して免疫組織化学的な検索を行った。EGF receptorは胎生期歯胚から生後HERS形成が開始される前までのサービカルループに発現していたが、HERSが形成されると、この部位からしだいに減少し、最終的に消失した(図5)。具体的には胎生期17日(E17)から生後2日齢(P2)のサービカルループには褐色に染まるEGF receptor陽性の上皮層が見られる。一方で生後4日齢(P4)のサービカルループではその反応が弱まる。生後5日齢頃からHERS形成が始まり、このHERS形成期に入った生後6日齢(P6)の歯胚のサービカルループからはEGF receptorに対する反応が消失した。

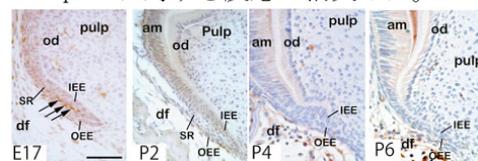


図5

この歯冠形成期から歯根形成に至る過程における外因性に添加したEGFの効果について検討するために、我々が独自に考案した器官培養系と従来からのTrowell法を用いて、さまざまな発達段階の歯胚の器官培養を行った。

EGFを添加して1週間培養することによって、歯冠形成期(P0-3)の歯胚では星状網の領域が拡大した(図6はP1の歯胚、右図がEGF投与群、左は対照群)。IEE、星状網(SR)、OEEでのBrdUの取り込みによる

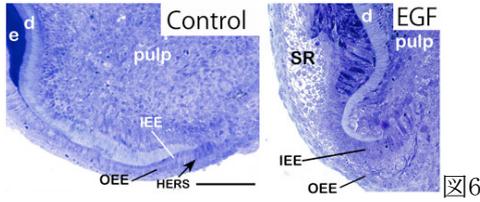


図6

細胞分裂活性を調べた所、対照群に比較しEGF添加群ではOEEとSRの活性が有意に高い直を示し(図7)、図6で示す形態学的研究から得られたデータを裏付ける結果となった。

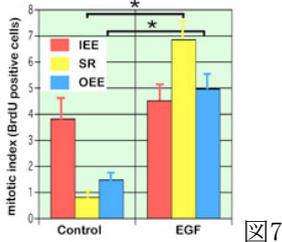


図7

次に、HERS形成期(P5)の歯胚にEGFを添加して同様に1週間培養を行った。その結果、EGF添加群では、本来消失しているべき、IEE&OEEの間の細胞層が残存し、HERS形成が阻害されていることが判明した(図8の中央の図)。またEGF receptorの阻害剤(tyrophostin, TY)をEGFと同時に添加して培養したHERS形成期歯胚(図8の右図)では対照群(図8の左図)と同様に正常なHERSの発達を示した。

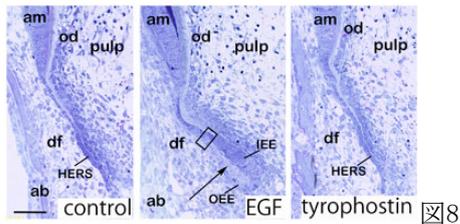


図8

歯冠形成期の実験と同様にBrdUの取り込みによる細胞分裂活性を調べた(図9)ところ、対照群に比較しEGF添加群では、IEE, OEE, SRの活性が有意に高い直を示した。本来、対照群では消失しているSRの活性がEGF添加群では高い直で維持されており、特に特徴的であ

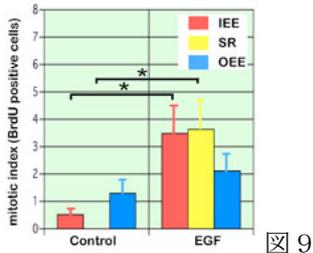


図9

った。これはEGFによる星状網細胞の増殖促進作用の結果生じたものであると考えられた。

P5臼歯歯胚にEGFを添加して培養をさらに2週間継続すると、その培養歯胚ではエナメル芽細胞の分化が継続し、エナメル質が歯冠部から連続的に分泌(矢印)し、HERSの形成に移行することに失敗し、歯根形成も行われていないことが観察された(図10の右図)。

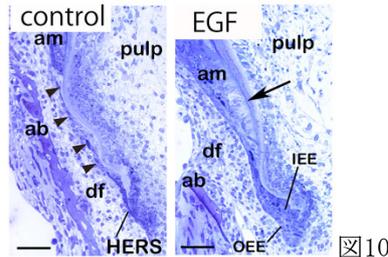


図10

一方で、歯根形成期(P9)歯胚の器官培養ではEGFの影響は見られず正常なHERS形成が観察された(データは示していない)。

以上のことから歯冠形成から歯根形成への移行期において、HERSの発達・形成にはEGFが重要な調節因子として機能していることが判明した。

切歯は舌側に歯根様のHERS唇側にapical budが存在し、apical budはSRを維持していることが知られるので、切歯を用いたTrowell器官培養を行い、EGFのおよぼす影響について検証した。

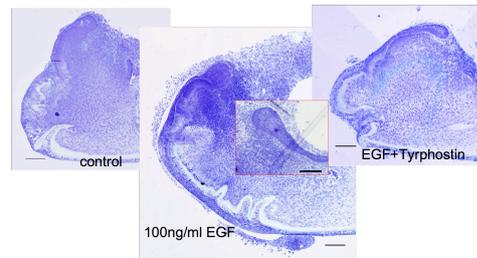


図11

切歯歯胚にEGFを添加して培養すると、EGF添加群(図11の中央の図)はHERSのIEEとOEE間で、本来ほとんど観察されないSRの領域が拡張した(中央の図の赤枠インセット図)。一方、EGF receptorの阻害剤(TY)の添加群(図11の右図)では、HERSはもとよりapical budの星状網が対照群(図11の左図)よりも退縮する傾向が観察された。

臼歯と切歯から得られた結果と併せて考えると、EGFはSRの維持、さらに臼歯においてはHERS形成に関わっていることが追証できたと考えている。

本研究から得られた結果を元に、HERS形成過程における成長因子の影響についてのシエマを図12に示す。

歯冠形成から歯根形成期への移行期においてそれまで歯髄に発現していたFGF10が消失し、このことがエナメル上皮の幹細胞の消失を招き、その結果歯根形成に移行することが

すでにTamaki- Yokohamaら (2006)によって報告されている。本研究においては、さらにHERS形成が開始するためには星状網の消失が重要な現象であり、この現象にはEGFが重要な役割を果たしていることを明らかにした。またHERSが形成された後はIGF-IがHERSの伸長を促進することで歯根形成を調節していることも分かった。しかし、今回 PDGFについても検討を行ったが、歯根膜にリセプターの発現が存在するものの、本課題の研究期間内では、歯根形成に対する影響を明確にとらえることができなかった。

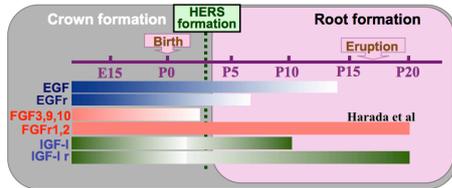


図12

本研究課題において、独自の培養法を確立することができ、また我々の立てたHERS形成に関する仮説を検証することができた。中でもHERSの発達・形成にはEGFとIGF-Iが重要な調節因子として機能していることが判明した。

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 11 件)

- 1) Lee MJ, Cai J, Kwak SW, Cho SW, Harada H, Jung HS. MAPK mediates Hsp25 signaling in incisor development. *Histochem Cell Biol.* 2009 Feb 19 e-Pub. 査読あり
- 2) Fujiwara N., Akimoto, T., Kagiya T., Ishizeki K., Harada H. Egf signaling regulates transition from crown to root formation in the development of mouse molars. *Journal of Experimental Zoology - Molecular and Developmental Evolution*, Dec. 17 2008, e-Pub、査読あり
- 3) Fujiwara N., Kagiya T., Ishizeki K., Harada H. Molecular mechanisms regulating transition from crown to root formation in the development of mouse molars. *J Oral Bioscience.* 50:154-159 (2008)査読あり
- 4) Xu L, Harada H., Taniguchi A. The effects of LAMP1 and LAMP3 on M180 amelogenin uptake, localization and amelogenin mRNA induction by amelogenin protein. *J. Biochem.* 144(4):531-537 (2008), Epub Jul 31 2008. 査読あり
- 5) Miyoshi K., Nagata H., Horiguchi T., Abe K., Wahyudi I. A., Baba Y., Harada H., Noma T. BMP2-induced gene profiling in

dental epithelial cell line. *J. Med. Invest.* 55:216-226 (2008) 査読あり

- 6) Yokohama-Tamaki T., Fujiwara N., Shibata S., Wakisaka, S. and Harada H. The epithelial- mesenchymal interaction plays a role in the maintenance of the stem cell niche of mouse incisors via Fgf10 and Fgf9 signaling. *Open Biotechnol J.* 2 :111-115 (2008) 査読あり
- 7) 原田英光、藤原尚樹、大島勇人：歯冠形成から歯根形成に移行するメカニズム。岩医大歯誌, 32: 97-104 (2007) 査読あり
- 8) Yokoi, T., Saito, M., Kiyono, T., Iseki, S., Kosaka, K., Nishida, E., Tsubakimoto, T., Harada, H., Eto, K., Noguchi, T. and Teranaka, T.: Establishment of immortalized dental follicle cells for generating periodontal ligament in vivo. *Cell Tissue Res.*, 327(2): 301-11(2007) 査読あり
- 9) Xu, L., Takahashi, R., Harada, H. and Taniguchi, A.: Effect of BMP-2 on gene expression of enamel matrix proteins at the dental epithelial cell line. *Open Biotechnol J.*, 1: 18-20(2007) 査読あり
- 10) Fujiwara, N., Kagiya, T., Ishizeki, K. and Harada, H.: Egf prevents formation of Hertwig's epithelial root sheath during developing mouse molar tooth *in vitro*. *Eur Cell Mat.* 14, Suppl. 2 p54 (2007) 査読なし Proceeding
- 11) Kagiya, T., Fujiwara, N., Ishizeki, K., Xiao, J. and Harada, H.: A role of Wnt5a in continuously growing mice incisors. *Eur Cell Mat.* 14, Suppl. 2 p91 (2007) 査読なし Proceeding

[学会発表] (計 15 件)

- 1) 藤原尚樹、大津圭史、秋元 義、鍵谷忠慶、石関清人、原田英光：歯胚組織中の細胞動態を観察するための imaging system の開発、第 114 回日本解剖学会学術集会、3/30 2009、岡山理科大学 (岡山)
- 2) 大津圭史、藤原尚樹、石関清人、鍵谷忠慶、原田英光：歯の再生を目的とした iPS 細胞の上皮、間葉細胞への分化誘導と分離培養、第 114 回日本解剖学会学術集会、3/30 2009、岡山理科大学 (岡山)
- 3) 藤原尚樹、大津圭史、秋元 義、鍵谷忠慶、石関清人、原田英光：歯冠から歯根形成への移行過程における EGF signaling の役割、第 50 回歯科基礎医学会学術大会、9/23 2008、昭和大学 (東京)
- 4) 原田英光、藤原尚樹、鍵谷忠慶、石関清人：マウス切歯の組織幹細胞を用いた歯

- の再生. シンポジウム S28 細胞分化と口腔領域における再生. 第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 3/27 2008、大分
- 5) 秋元 義、藤原尚樹、鍵谷忠慶、石関清人、原田英光：ヘルトヴィッヒ上皮鞘細胞の不死化、第 113 回日本解剖学会総会・全国学術集会. 3/27 2008、大分
- 6) 原田英光、藤原尚樹、鍵谷忠慶、石関清人：マウス切歯の組織幹細胞を用いた歯の再生. シンポジウム 20 歯の再生研究の最前線. 第 7 回日本再生医療学会. 3/13 2008、名古屋 (2008)
- 7) Fujiwara, N., Kagiya, T., Ishizeki, K., Otsu, K., Akimoto and T., Harada, H.: Hertwig's epithelial root sheath is made of outer enamel epithelium. Gordon Research Conference on Craniofacial Morphogenesis & Tissue Regeneration, 2/11-15, 2008, Ciocco, Barga, Italy.
- 8) 原田英光、藤原尚樹、鍵谷忠慶、石関清人：歯の幹細胞の維持機構の解明から歯の再生への展開. ワークショップ 5W6、歯の発生・再生の分子メカニズム、第 30 回日本分子生物学会年会と第 80 回日本生化学会大会合同大会. 12/15 2007、横浜
- 9) Harada, H., Fujiwara, N., Yokohama-Tamaki, T., Kagiya, T., Tabata, Y. and Ishizeki, K.: Mechanisms on maintenance of dental stem cells and how to make a biotooth. 1st Asian Biomaterials Congress (Integrated Congress of 6th Asian International Symposium on Biomaterials and 8th Asian Symposium on Biomedical Materials), 12/8 2007, Tsukuba, Japan
- 10) Fujiwara, N., Kagiya, T., Ishizeki, K. and Harada, H.: EGF prevent formation of Hertwig's epithelial root sheath during developing mouse molar tooth in vitro. 9th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation 2007. 9/8 2007, Zurich, Switzerland.
- 11) Kagiya, T., Fujiwara, N., Ishizeki, K., Xiao, J. and Harada, H.: A role of Wnt5a in continuously growing mice incisors. 9th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation 2007. 9/6 2007, Zurich, Switzerland.
- 12) Yokohama-Tamaki, T., Shibata, S., Wakisaka, S. and Harada, H.: Fgf-9 play a role for the maintenance of stem cell niche via Fgf-10 expression in the mouse incisors. 9th International Conference on Tooth Morphogenesis and Differentiation. 9/6 2007, Zurich, Switzerland.
- 13) 藤原尚樹：器官培養を用いた歯根発生メカニズムの解明. サテライトシンポジウム SS5-5、ヘルトヴィッヒ上皮鞘 (HERS) と歯根発生のバイオロジー. 第 49 回歯科基礎医学会学術大会. 8/29 2007, 札幌 (2007)
- 14) 原田英光、鍵谷忠慶、藤原尚樹、石関清人：ヘルトヴィッヒの上皮鞘 (HERS) 形成過程の新規仮説と歯根発生メカニズム. サテライトシンポジウム SS5-5、ヘルトヴィッヒ上皮鞘 (HERS) と歯根発生のバイオロジー. 第 49 回歯科基礎医学会学術大会. 8/29 2007, 札幌
- 15) 原田英光：幹細胞を用いた歯科再生研究の現状と臨床への展望と課題. 特別講演、第 24 回日本顎顔面補綴学会総会. 7/19 2007、盛岡 (2007)
- [図書] (計 3 件)
1. 原田英光、飛鳥出版、口腔・顔面と歯・唾液腺・舌の発生 (口腔内化学, 尾崎登喜雄編集・監修)、2008、PP27-34
 2. 藤原尚樹、医歯薬出版、器官培養系を用いた歯根形成メカニズムの解明 歯界展望、111(5)、2008、p957
 3. 原田英光、医歯薬出版、歯冠形成から歯根形成に移行するメカニズム 歯界展望、111(5)、2008、p961
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
藤原 尚樹 (FUJIWARA NAOKI)
岩手医科大学・歯学部・講師
研究者番号：20190100
 - (2) 研究分担者
なし
 - (3) 連携研究者
原田 英光 (HARADA HIDEIMITSU)
岩手医科大学・歯学部・教授
研究者番号：70271210
大島 勇人 (OHSHIMA HAYATO)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：70251824
石関 清人 (ISHIZEKI KIYOTO)
岩手医科大学・歯学部・准教授
研究者番号：50057775
鍵谷 忠慶 (KAGIYA TADAYOSHI)
岩手医科大学・歯学部・助教
研究者番号：30405774