

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月24日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592028

研究課題名（和文）歯根形成における上皮・間葉細胞の分化・相互作用・組織構築のパラダイムシフト

研究課題名（英文）Verification of paradigm for differentiation, interrelation, tissue organization of epithelial and mesenchymal cells in root formation

研究代表者

山本 恒之（YAMAMOTO TSUNEYUKI）

北海道大学・大学院歯学研究科・准教授

研究者番号：80200822

研究成果の概要（和文）：ヘルトビッチ上皮鞘の断裂機構及び上皮鞘断裂後の上皮細胞と歯小嚢細胞の動態を調べた。形成途上のラット臼歯根を数種の基質分解酵素、及びアルカリフォスファターゼに対する抗体を使って免疫組織化学的に検索した。結果、(1)上皮鞘細胞が酵素を分泌し接着装置を壊して上皮鞘が断裂すること、(2)上皮細胞はセメント芽細胞に形質転換せずにマラッセの上皮遺残として存続すること、(3)セメント芽細胞は歯小嚢に由来すること、が示唆された。

研究成果の概要（英文）：This study was designed to investigate the mechanism of disintegration of Hertwig's epithelial sheath and the behavior of the epithelial sheath cells and dental follicle cells. Developing rat molars were examined by immunohistochemistry using antibodies to several kinds of matrix-degrading enzymes and alkaline phosphatase. Findings suggest that: (1) The epithelial sheath cells secrete the enzymes to break intercellular attachment devices and the sheath disintegrates. (2)After the sheath disintegration the epithelial cells do not transform into cementoblasts and survive as epithelial rests of Malassez. (3)Cementoblasts derive from the dental follicle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：ヘルトビッチ上皮鞘・セメント芽細胞・セメント質

1. 研究開始当初の背景

歯根形成におけるヘルトビッチ上皮鞘の役割については、従来、「ヘルトビッチ上皮鞘は歯根形成に伴い断裂し、その間隙に歯小嚢細胞

の一部が入り込みセメント芽細胞に分化してセメント質を分泌する。上皮鞘の断裂とともに上皮鞘細胞は歯根膜へと移動しマラッセの上皮

遺残となる」と説明されている。

近年、ヘルトビッチ上皮鞘について多くの研究がなされ従来の記述に対する修正意見も出されている。しかしながら以下の2点についてはいまだ意見の一致をみていない。

(1)ヘルトビッチ上皮鞘の断裂機構について

ヘルトビッチ上皮鞘は、①歯小囊細胞が突起を上皮細胞間に侵入させ上皮鞘を分断する(Cho and Garant 1988), ②ヘルトビッチ上皮鞘自体が酵素を分泌し細胞間接着を破壊し断裂する(Hirata and Nakamura 2006), との二説がある。

(2) 上皮鞘断裂後の上皮細胞と歯小囊細胞の動態について

大きく二説に分けられる。①上皮細胞はマラッセの上皮遺残となり歯小囊細胞がセメント芽細胞に分化する(Cerri and Katchburian 2005; Yamamoto and Takahashi 2009)。②上皮細胞の一部はEMT (epithelial-mesenchymal transition) によりセメント芽細胞に分化する (Zeichner-David et al. 2003; Huang et al. 2009)。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、本研究は次のことを解明することを目的とした。

(1)ヘルトビッチ上皮鞘の断裂機構

(2) 上皮鞘断裂後の上皮細胞と歯小囊細胞の動態、特に EMT の可能性について

3. 研究の方法

生後 20 日齢雄性ウイスター系ラット 20 匹をネブタール腹腔内麻酔下で、4%パラフォルムアルデヒド(0.1M リン酸緩衝液で pH7.4 に調整)を用いて灌流固定した。上顎を取り外し同固定液に 12 時間浸漬した後、10%EDTA で3週間脱灰し通法に従い脱水、パラフィン包埋した。第一臼歯の矢状断連続切片を 5 μ m 厚で作成し、一部は組織観察のためにヘマトキシリン-エオジン(H-E)染色を施し、残りは TUNEL 染色(アポトーシスの判定)と免疫染色に使用した。TUNEL 染色には Takara の In situ Apoptosis Detection Kit を使用した。免疫染色の一次抗体として、上皮を同定するために抗ケラチン抗体(ニチレイ)を、上皮鞘の断裂を調べるために抗 ADAM10(A Disintegrin and Metalloproteinase10) 抗体(Sigma), 抗 MMP7 (Matrix Metalloproteinase7) 抗体(Bioss), 抗 KLK7(Kallikrein7 抗体)(Bioss) を使用した。EMT の可能性を調べるためには抗 TNALP (Tissue Non-specific Alkaline Phosphatase)抗体(新潟大学 歯学研究科 織田公光教授からの御提供)を使用した。二次抗

体として抗マウス IgG または抗ウサギ IgG 抗体(いずれもニチレイ)を使用した。発色材として DAB(3,3'-Diaminobenzidine,tetrahydrochloride : 同人化学)あるいは Vector® VIP substrate Kit(Vector)を使用した。二重染色では一次染色切片を写真撮影した後に二次免疫染色を施した。

4. 研究成果

結果

(1)ヘルトビッチ上皮鞘の断裂過程

①H-E 染色(図1)

上顎第一臼歯近心根近心面を観察した(図1a: 枠内)。歯根形成を便宜的に Stage I, Stage II, Stage IIIに分ける。

Stage I (図 1b): 上皮鞘がまだ断裂していない時期。上皮鞘(矢印で挟まれた部分)は内エナメルおよび外エナメル上皮細胞からなり、先端部で両細胞は移行する。Stage II に近づくにつれて上皮細胞は小型化し上皮鞘幅は狭くなる。歯小囊細胞は上皮鞘先端部付近では未分化・小型であるが、次第に大型の細胞へと分化する。Stage II (図 1c): 象牙質形成が開始する時期。象牙芽細胞が象牙前質(*)を形成し始めるとともに上皮鞘は分断し始める。この時点でH-E染色では歯小囊細胞と上皮細胞の厳密な区別はできなくなる。

Stage III(図1d): セメント質形成が開始する時期。象牙質の石灰化開始(**)とほぼ同時にその表面にヘマトキシリンに濃染する無細胞セメント質(矢印)が出現する。細胞質部が豊かな細胞が歯根表面に現れる。これらは一般にセメント芽細胞とみなされる。

②ケラチン免疫染色(図2)

上皮鞘断裂後、マラッセの上皮遺残(矢印)は歯根表面近くに留まり歯根膜に分散しない(図2:a は根尖側半, b は歯頸側半)。Stage II から III にかけて歯根表面の上皮細胞数は明らかに減少する(図2c)。

③TUNEL 法(図3)

Stage I の断裂前の上皮鞘(図3a: 矢印で挟まれた部位)も Stage II, III の象牙質表面の細胞(図3b, c: *)もアポトーシスを示さない。

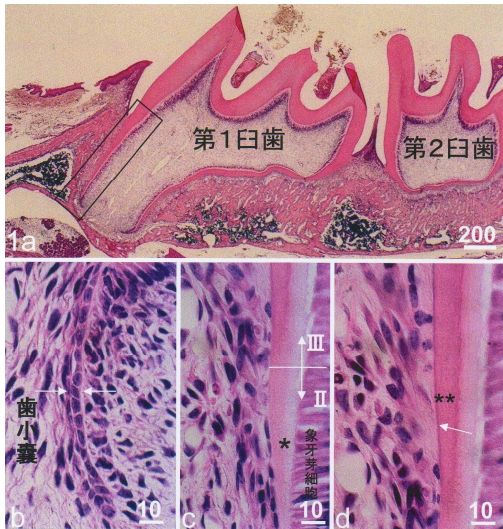


図 1

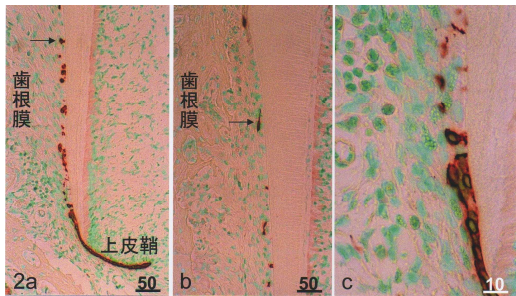


図 2

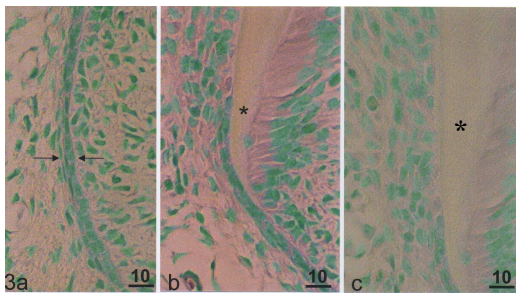


図 3

(2) 上皮鞘における基質分解酵素の免疫組織化学

①MMP7, KLK7, 及び ADAM10

低倍像で MMP7 の染色性の概観を述べる(図4: a は根尖側半, b は歯頸側半)。根尖部では上皮鞘と歯小囊に反応が見られる。歯根形成が進むにつれて歯根膜全体がより強く反応するようになる。この所見は他の二酵素についても同じように認められる。

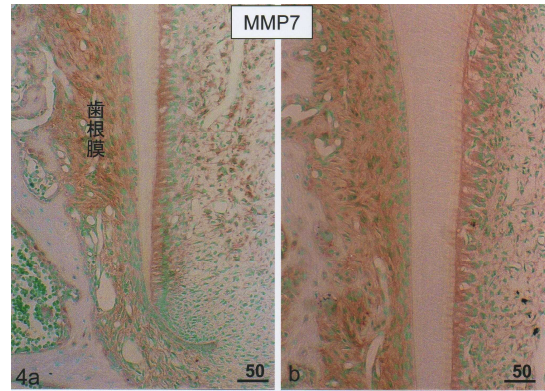


図 4

高倍像では, Stage I (図5)では上皮鞘(矢印で挟まれた部分)と歯小囊ともにいずれの酵素に対しても反応する。特に上皮鞘先端部(楕円の部分)が最も強く染まる。Stage IIとIII(図6:ケラチンとの二重染色)では歯小囊細胞も上皮細胞(楕円中の紫色の細胞群)も反応する(ADAM 10 の図は略)。

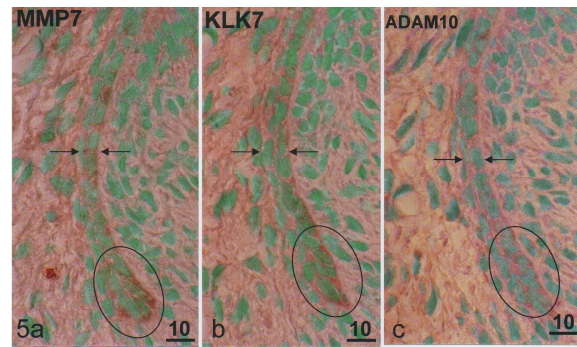


図 5

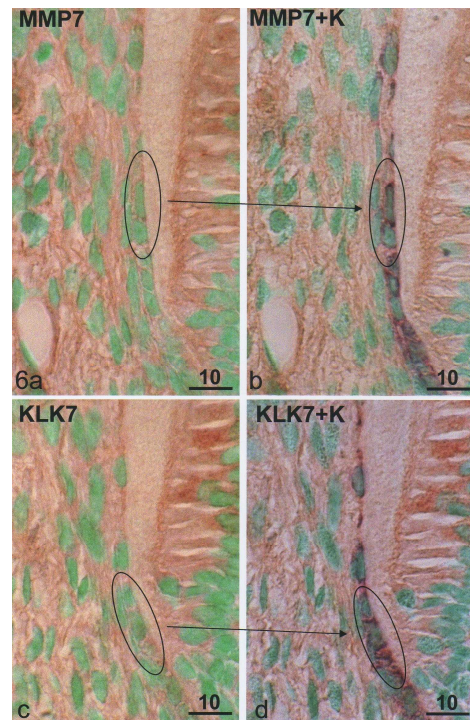


図 6

②TNALP

低倍像で染色性の概観を述べる(図7)。根尖では上皮鞘は反応し、特に先端部が強い陽性を示す。歯小囊の上皮鞘側(*)は歯槽骨側(**)よりも反応は弱い。歯根形成とともに歯根膜全体がより強く反応するようになるものの(楕円の部位)、骨表面を除いて次第に反応は弱くなる。

高倍像での所見をケラチンとの二重染色切片で述べる(図8a, b)。Stage I からIIにかけて上皮鞘(ケラチン陽性)は反応が弱くなる。断裂前の上皮鞘近くの歯小囊細胞のなかにも TNALP に強く反応するものが現れる(黒矢印)。Stage II からIIIにかけて強い反応を示す歯小囊細胞(白矢印)が歯根表面近くにもみられるようになり、Stage III ではセメント芽細胞とみなされる細胞(黄矢印)は強い陽性反応を示す。

考察

(1) ヘルトビッチ上皮鞘の断裂機構について

ヘルトビッチ上皮鞘の主要な接着装置はデスマゾームである。本研究ではデスマゾーム破壊に関わるとされる KLK7 と ADAM10、および基底成分であるラミニンとコラゲン Type IV を破壊する MMP7 の局在を調べた。上皮鞘は上記3つの酵素いずれにも反応を示した。したがって上皮鞘は歯根形成とともに酵素により自壊してゆくことが示唆された。上皮鞘先端部で最も酵素活性が強いのは上皮細胞の増殖に伴う上皮鞘の伸長に関わるものと思われる。

(2) 上皮鞘断裂後の上皮細胞と歯小囊細胞の動態について

本研究でも明らかにされたように、上皮鞘細胞はアポトーシスを起こさないか、起こしてもごくわずかである(Kaneko et al. 1999)。上皮細胞はアポトーシスを起こさないにもかかわらず、上皮鞘断裂後の上皮細胞数は断裂前よりも減少する。この矛盾を説明するために EMT (Zeichner-David et al. 2003; Huang et al. 2009) は好都合であった。報告者は以前に「EMT が上皮細胞に起こるのであれば、上皮鞘細胞はある時期に上皮と間葉の両方の性質を同時に示すはずである」という仮説を立て実験を行った。上皮細胞が持ち間葉細胞は持たない因子としてケラチン、間葉細胞が持ち上皮細胞は持たない因子としてビメンチンを選び免疫染色により調べた。結果、二重染色される、すなわち両方を発現する細胞はなく EMT は起こらないことを示唆した(Yamamoto and Takahashi 2009)。

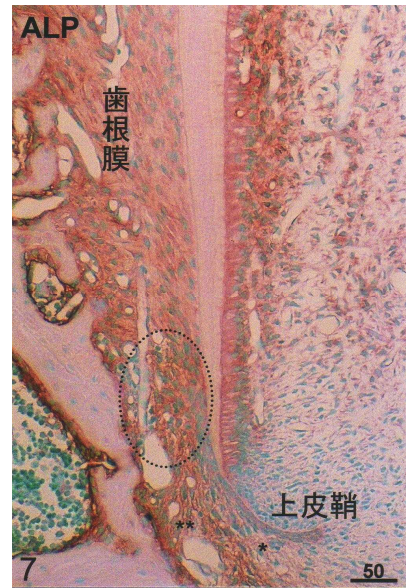


図 7

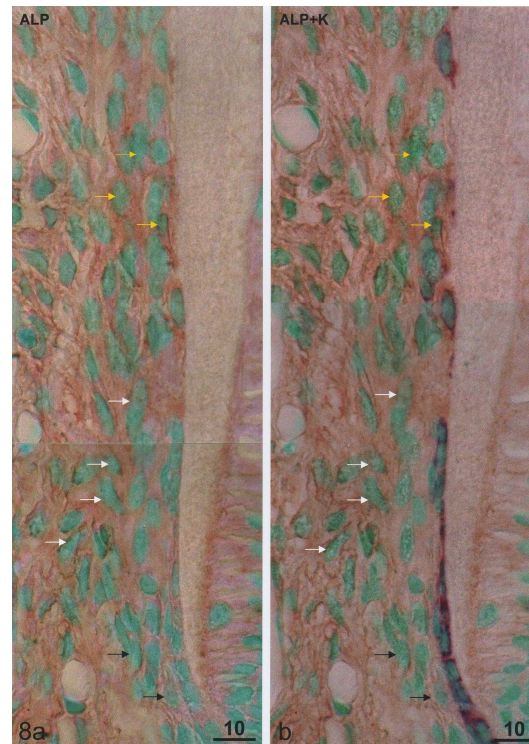


図 8

本研究では EMT の可能性を調べるために TNALP を使った。この酵素は骨芽細胞、象牙芽細胞、エナメル芽細胞といった硬組織形成細胞に必ず強く発現する。ラット臼歯無細胞セメント形成においても、Stage III でセメント芽細胞は強く TNALP を発現することが確かめられている(Yamamoto et al. 2007)。この酵素の局在を調べることでセメント芽細胞の由来を解明できると考えた。

本研究において、①上皮細胞は歯根膜へと

遊走する兆候はみられない, ②上皮細胞も TNALP 活性を持つもののいずれの Stage においても歯小囊細胞よりは弱い, ③上皮鞘断裂前に上皮鞘近くの歯小囊細胞は強い TNALP 活性を示し始める, ④歯小囊細胞の強い TNALP 活性は歯根形成に伴い歯槽骨側から歯根表面へと広がってゆくようにみえる, という所見を得た。これらの所見は, セメント芽細胞は従来の説どおりに歯小囊に由来し, 上皮鞘細胞は EMT あるいはアポトーシスのいずれも起こすことなく上皮遺残となることを示唆する。

上皮細胞数が減少する理由は, 歯根の表面積と上皮鞘の表面積との間に差が生じることに関係するものと考えられる。断裂前の上皮鞘は歯髄側へと折れ曲がっている。一方で歯根はほぼ垂直に根尖に向かって伸びる。断裂前に根尖を取り囲んでいた上皮鞘は垂直に伸びる歯根を覆いきれなくなる。必然的に上皮細胞で覆われていない歯根表面が現れ, 切片ではその部分で細胞数が減少したように見えるものと思われる。

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 12 件)

- ① Hasegawa T, Sasaki M, Yamada T, OOkido I, Yamamoto T, Hongo H, Yamamoto T, Oda K, Yokoyama K, Amizuka N. Histochemical examination of vascular medial calcification of aorta in klotho-deficient mice. J Oral Bioscience 55: 10-15, 2013(査読あり) DOI:10.1016/j.job.2012.12.003
- ② Sasaki M, Hongo H, Hasegawa T, Suzuki R, Liu Z, Freitas Paulo HL, Yamada T, Oda K, Yamamoto T, Li M, Totsuka y, Amizuka N. Morphological aspects of the biological function of osteocytic lacunar canalicular system and osteocyte-derived factors. Oral Science International 9:1-8, 2012(査読あり) DOI:10.1016/S1348-8643(12)00009-2
- ③ Guo Y, Li M, Liu Z, Sasaki M, Hasegawa T, Hongo H, Tabata C, Suzuki R, Oda K, Yamamoto T, Kawanami M, Amizuka N. Immunolocalization of sclerostin synthesized by osteocytes in relation to bone remodeling in the intraradicular septa of ovariectomized rats. J Electron Microsc 61:309-320, 2012 (査読あり) DOI:10.1093/jmicro/dfs052
- ④ Yamamoto T, Hasegawa T, Sasaki M, Hongo H, Tabata C, Liu Z, Li M, Amizuka N. Structure and formation of the twisted plywood pattern of collagen fibrils in rat lamellar bone J Electron Microsc 61: 113-121, 2012(査読あり) DOI:10.1093/jmicro/dfs033
- ⑤ Hasegawa T, Li M, Hara K, Sasaki M, Tabata C, de Freitas Paulo HL, Hongo H, Suzuki R, Kobayashi M, Inoue K, Yamamoto T, Oohata N, Oda K, Akiyama Y, Amizuka N. Morphological assessment of bone mineralization in tibial metaphysis of ascorbic acid-deficient ODS rats. Biomedical Res 32:259-269, 2011(査読あり) <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biomedres>
- ⑥ Narimatsu K, Li M, Freitas Paulo HL, Sultana S, Ubaidus S, Kojima T, Liu Z, Guo Y, Suzuki R, Yamamoto T, Oda k, Amizuka N. Ultrastructural observation on cells meeting the histological criteria for preosteoblasts - a study in the mouse tibial methaphysis. J Electron Microsc 59: 427-436,2010(査 読 あ り)DOI:10.1093/jmicro/dfq021
- ⑦ Harahashi H, Odajima T, Yamamoto T, Kawanami M. Immunohistochemical analysis of periodontal reattachment on denuded root dentin after periodontal surgery. Biomedical research 31: 319-328, 2010(査読あり) <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biomedres>
- ⑧ Masuki H, Li M, Hasegawa T, Suzuki R, Guo Y, Liu Z, Oda K, Yamamoto T, Kawanami M, Amizuka N. Immunolocalization of DMP1 and sclerostin in the epiphyseal trabecule and diaphyseal cortical bone of osteoprotegerin deficient mice. Biomedical Res 31:307-318, 2010(査読あり) <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/biomedres>
- ⑨ Yamamoto T, Li M, Liu Z, Guo Y, Hasegawa T, Masuki H, Suzuki R, Amizuka N. Histological review of the human cellular cementum with special reference to an alternating lamellar pattern. Odontology 98:102-109, 2010 (査 読 あ り) DOI:10.1007/s10026-010-0134-3

〔学会発表〕（計 27 件）

- ① 山本恒之、長谷川智香、佐々木宗輝、因幡千尋、本郷裕美、山田珠希、網塚憲生：長骨の部位による骨細胞ネットワークの立体微細形態の違いについて 第30回日本骨代謝学会 京王プラザホテル 東京 2012年 7月19-21日
- ② 本郷裕美、佐々木宗輝、長谷川智香、山田珠希、因幡千尋、山本恒之、中野貴由、網塚憲生：副甲状腺ホルモン投与で誘導される骨小腔周囲の骨基質溶解について 第30回日本骨代謝学会 京王プラザホテル 東京 2012年 7月19-21日
- ③ 長谷川智香、織田公光、佐々木宗輝、田幡千尋、柳鑄晟、郭穎、井上貴一朗、李敏啓、小守壽文、山本恒之、網塚憲生：アルカリフォスファターゼトランスジェニックマウスにおける基質石灰化機構の解明 第29回日本骨代謝学会学 大阪国際会議場 大阪 2011年 7月28-30日
- ④ 佐々木宗輝、田幡千尋、長谷川智香、郭穎、柳鑄晟、李敏啓、山本恒之、井上農夫男、網塚憲生：Klotho-/- 環境における骨細胞は基質ミネラル維持不能を示す 第29回日本骨代謝学会 大阪国際会議場 大阪 2011年 7月28-30日
- ⑤ 長谷川智香、李敏啓、佐々木宗輝、田幡千尋、大城戸一郎、郭穎、柳鑄晟、山本恒之、横山啓太郎、網塚憲生：血管石灰化における微細構造学的機序の解明—Klotho-/-マウス血管平滑筋細胞の trans-differentiation と基質小胞形成— 第29回日本骨代謝学会 大阪国際会議場 大阪 2011年 7月28-30日

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

（計 0 件）

〔その他〕

（計 0 件）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 恒之 (YAMAMOTO TSUNEYUKI)
北海道大学・大学院歯学研究科・准教授
研究者番号：80200822

(2) 研究分担者

(なし)