

ヘルトビツヒの上皮鞘(HERS)と歯根発生のバイオロジー

- 企画 大島勇人
新潟大学 大学院医歯学総合研究科 硬組織形態学分野
e-mail: histoman@dent.niigata-u.ac.jp
- 後援 歯胚再生コンソーシアム
<http://www.dent.niigata-u.ac.jp/anatomy1/regeneration/>
- 座長 原田英光(岩手医科大学)
大島勇人(新潟大学)
- 日程 平成 19 年 8 月 29 日(水曜日)16:00~19:00
- 場所 C 会場(北海道大学 学術交流会館小講堂)

【講演要旨】

歯の発生生物学研究では、歯胚上皮と神経堤由来間葉間の相互作用における骨形態形成因子(BMP)、線維芽細胞増殖因子(FGF)、Wnt、ソニックヘッジホッグ(SHH)、腫瘍壊死因子(TNF)などのツールキット遺伝子の役割が詳細に調べられ、形態形成のメカニズムの概要を分子レベルで理解できるようになってきた。一方で、将来の歯科再生医療を考えた場合、補綴処置が可能な歯冠の再生以上に歯根の再生を視野に入れなくてはならないのに関わらず、研究手技がいまだに充実しておらず、歯根発生に関するメカニズムは、歯冠形成に比べて研究報告も少なく、立ち遅れている感が否めない。

歯根発生の基本的な理解は、歯胚のサービカルループの内外エナメル上皮が癒合し二重層(ヘルトビツヒの上皮鞘[HERS])が形成されて歯胚間葉の増殖と分化を誘導し、歯根象牙質形成、セメント質形成が開始されるというものであるが、HERS 形成のメカニズムや機能についてはほとんど解明されていない。しかしながら、2005 年から 2006 年にかけて歯根発生に関する重要な論文が日本・韓国から発信されている。そこで、これらの論文の著者を招いて、独自の研究手法を用いた HERS や歯小囊細胞、歯根発生についての最新のデータを紹介して頂き、HERS や歯根発生メカニズムについて活発に議論するために、本シンポジウムを企画した。

【演者および演題】

1. 藤原尚樹(岩手医科大学 歯学部 口腔解剖学第二講座)
器官培養系を用いた歯根形成メカニズムの解明
2. Han-Sung Jung(延世大学校歯科大学 口腔生物学講座 組織学分野)
Epithelial-mesenchymal interaction of Hertwig's epithelial root sheath during root formation
3. 太田正人(東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 分子発生学分野)
歯根発生におけるソニックヘッジホッグ(Shh)経路の役割
4. 斎藤正寛(大阪大学 大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 生化学教室)
EST データベースを用いた歯根膜発生機構の解析
5. 原田英光(岩手医科大学 歯学部 口腔解剖学第二講座)
ヘルトビッチの上皮鞘(HERS)形成過程の新規仮説と歯根発生メカニズム

1. 器官培養系を用いた歯根形成メカニズムの解明

岩手医科大学 歯学部 口腔解剖学第二講座

藤原尚樹

歯根形成は歯冠の形態形成が完了するとともに始まる。しかし歯冠から歯根への移行に関わる分子メカニズムについてはよく分かっていない。エナメル器の歯頸部にはサービカルループと呼ばれる、内エナメル上皮(IEE), 外エナメル上皮(OEE), 中間層, 星状網(SR)からなる構造が見られ、歯冠の形態形成は IEE 細胞の増殖が大きな役割を果たす。そして歯根形成に移行する際には、IEEとOEEの二層の上皮層からなるヘルトビツヒの上皮鞘(HERS)が形成される。今回我々は、HERSと上皮成長因子(EGF)とインスリン様成長因子(IGF)の2つの成長因子の関係に注目した。

EGF receptor (EGFr)は免疫組織学的に SR の細胞に強く発現することが報告されている。HERS の形成過程において、サービカルループに見られる SR が消失するが、この際にサービカルループ付近の EGF の発現もしだいに減少する。この HERS 形成前の歯胚に対して器官培養系を用いて行った実験から、SR の消失が HERS 形成のタイミングをコントロールする重要な要因であること、EGF がサービカルループから HERS へ発達を促す調節因子のひとつであることを示唆する結果を得た。

一方、IGF-I receptor (IGF-Ir)はサービカルループには発現していないが、HERS に発現がみられる (Fujiwara et al, 2005)。HERS を構成する細胞は OEE と IEE とで形態が異なり、細胞増殖は IEE より OEE の活性が高い(Yokohama-Tamaki et al, 2006; 藤原, 2006)。この歯根伸長期の歯胚に IGF-I を添加して器官培養をおこなうと、HERS の伸長を促進し、細胞増殖活性は IEE よりも OEE に顕著であった。

これらのことより、EGF と IGF-I はそれぞれ時期特異的に HERS の形成と発達において重要な役割を果たすと考えられ、本講演ではこれらの研究結果を紹介するとともに、新しく考案した生後臼歯歯胚の成長を観察することが可能な器官培養系について併せて紹介する。

【参考文献】

1. Fujiwara N, Tabata MJ, Endoh M, Ishizeki K, Nawa T: Cell Tissue Res 320: 69-75, 2005.
2. Yokohama-Tamaki T, Ohshima H, Fujiwara N, Takada Y, Ichimori Y, Wakisaka S, Ohuchi H, Harada H: Development 133: 1359-1366, 2006.
3. 藤原尚樹: 歯の再生, 真與交易(株)医書出版部, pp137-145, 2006.

2. Epithelial-mesenchymal interaction of Hertwig's epithelial root sheath during root formation

Jiyoun Kim¹, Akihiro Hosoya^{1,2}, Sung-Won Cho¹, Han-Sung Jung¹

¹Division in Anatomy and Developmental Biology, Department of Oral Biology, Research Center for Orofacial Hard Tissue Regeneration, Brain Korea 21 Project, Yonsei University College of Dentistry; ²Department of Oral Histology, Matsumoto Dental University

Tooth development is regulated by reciprocal interactions between epithelial and mesenchymal cells. A number of morphological studies suggest that growth factors secreted from dental epithelium participate in the initiation of tooth development. These growth factors act on mesenchymal cells, and induce them to differentiate into tooth formative cells. It has been reported that there are many growth factors secreted from dental epithelium, but the key molecule for tooth development is still unknown.

On the other hand, Hertwig's epithelial root sheath (HERS) is formed at the lower edge of enamel organ during root formation stage. This structure consists of inner and outer enamel epithelium, and is thought to have an ability that decides the shape of tooth root formation. However, the initiator of HERS formation and the role of HERS for surrounding tissues are not clearly understood. It is thought that there are two kinds of epithelial-mesenchymal interactions during root formation. One is the interaction between HERS and dental papilla. Dental papilla cells are stimulated by inner layer of HERS and differentiate into root dentin formative odontoblasts. Another is the interaction between HERS and dental follicle. Outer enamel epithelium might secret some molecules to dental follicle cells, and provides the suitable environment to form periodontal tissues including cementum, periodontal ligament, and alveolar bone.

Recent evidence about the relationship of HERS and mesenchymal tissues will be discussed. Further understanding for HERS could assist with the development of periodontal regenerative therapy.

3. 歯根発生におけるソニックヘッジホッグ (Shh) 経路の役割

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 分子発生学分野
太田正人

歯の発生は口腔上皮とその下にある間葉組織という上皮-間葉相互作用の結果として発生することが胎生期の歯胚を用いた詳細な研究から明らかにされており、これに関わるシグナリング因子が報告されている。本サテライトシンポジウムのテーマである「歯根発生」は生後に起きる現象であり、歯根発生に重要な役割を果たすヘルトビツヒの上皮鞘 (HERS) を中心としたシグナリング因子を介した分子機構について明らかにされつつある¹⁻⁴⁾。我々は胎生期の歯冠発生において上皮-間葉相互作用のメディエーターである Sonic hedgehog (Shh) シグナリング経路が、歯根発生における HERS の機能に関与するのではないかと仮説を立てこれを検証した。まず、歯根発生過程のマウス臼歯における Shh シグナリング経路関連遺伝子の発現パターンを調べるため *in situ* hybridization を行なった結果、Shh とそのレセプターである Patched2 (Ptc2) は HERS のみで発現していたが、Patched1 (Ptc1), Smoothed (Smo) および Gli1 は HERS だけでなく増殖帯の間葉に発現が認められた^{5,6)}。Shh シグナリング経路は *in vivo* の生理的条件下で機能しているか確かめるため、Ptc1 タンパク質の c 末端に変異を持ち Shh シグナリング経路に異常のある *mes* ミュータントマウスの解析を行った。生後1週齢のミュータントマウスでは、HERS 周囲の増殖帯における増殖活性の低下が観察された。さらに生後4週齢では、ミュータントマウスにおける臼歯の萌出遅延および歯根の伸長不全が観察された。これらの結果は Shh シグナリング経路が歯根発生に重要な役割を果たしていることを示しており、さらに詳細な解析を行なった結果における新知見についても合わせて報告する⁷⁾。

【参考文献】

1. Thomas HF: Root formation. *Int J Dev Biol* 39: 231-137, 1995.
2. Yamamoto H, Cho SW, Kim EJ, Kim JY, Fujiwara N, Jung HS: Developmental properties of the Hertwig's epithelial root sheath in mice. *J Dent Res* 83(9): 688-692, 2004.
3. Fujiwara N, Tabata MJ, Endoh M, Ishizeki K, Nawa T: Insulin-like growth factor-I stimulates cell proliferation in the outer layer of Hertwig's epithelial root sheath and elongation of the tooth root in mouse molars *in vitro*. *Cell Tissue Res* 320(1): 69-75, 2005.
4. Yokohama-Tamaki T, Ohshima H, Fujiwara N, Takada Y, Ichimori Y, Wakisaka S, Ohuchi H, Harada H: Cessation of Fgf10 signaling, resulting in a defective dental epithelial stem cell compartment, leads to the transition from crown to root formation. *Development* 133(7): 1359-1366, 2006.
5. Nakatomi M, Morita I, Eto K, Ota MS: Sonic hedgehog signaling is important in tooth root development. *J Dent Res* 85(5): 427-431, 2006.
6. Khan M, Seppala M, Zoupa M, Cobourne MT: Hedgehog pathway gene expression during early development of the molar tooth root in the mouse. *Gene Expr Patterns* 7(3): 239-243, 2007.
7. Ota MS, Vivatbutsin P, Nakahara T, Eto K: Tooth root development and the cell-based regenerative therapy. *J Oral Tissue Engin* 4(3): 137-142, 2007.

4. EST データベースを用いた歯根膜発生機構の解析

大阪大学大学院歯学研究科 口腔分子免疫制御学講座 生化学教室
齋藤正寛

歯根膜は歯根と歯槽骨に介在する結合組織であり、咀嚼機能を緩衝するばかりでなく、咬合圧を中枢へ伝える感覚受容器的な働きもする。歯根膜は加齢により進行する歯周病により重篤な炎症性崩壊を受けると、機能的、生体力学的に十分に再生させるには極めて困難である。従って、歯科領域において歯根膜は骨と並んで組織再生の重要な標的になっている。しかしながら歯根膜発生・再生に関わる機能分子が同定されていなため、これまでその詳細な分子機構は殆ど解析されてこなかった。そこで演者らは歯根膜の発生および再生に関わる分子群の全貌を明らかにするために、ヒト歯根膜Expressed sequence tag (EST) libraryを作製し、歯根膜発生に関わる機能分子の網羅的解析とデータベース化を試みた。これまでに10,000 ESTについて配列を解析し、クラスタリングを行い、4,378の独立したESTクラスターを得た。その内、発現頻度3回以上のクラスター(617ESTクラスター)を抽出し、機能別に分類してヒト歯根膜ESTデータベース(KK-Periome データベース)を構築した。KK-Periomeデータベースは481種類の既知遺伝子群(78%)、101種類の機能未知遺伝子群(16%)と35種類の機能未知翻訳産物群(6%)で構成されていた。次に、歯根膜細胞系譜特異的なマーカー分子を同定するために、歯小囊および歯根膜で特異的に発現する遺伝子をスクリーニングした。その結果、F-spondinが歯小囊に局限して発現し、Tenascin Nが歯根膜に特異的に発現することを見出した。F-spondinは胎生15日齢の帽状期歯胚の歯小囊で発現が始まり、鐘状期、後期鐘状期の歯小囊で発現が特異的に上昇したが、歯根膜では顕著に発現が減少した。一方Tenascin Nは胎生期の歯小囊においては全く発現が見られず、歯根形成期の歯根膜において発現が著明に上昇した。以上の結果より、F-spondinとTenascin Nは、歯小囊と歯根膜を区別する歯根膜細胞系譜に特異的なマーカー分子であることが示唆された。このような特異的マーカーの同定により歯根膜発生の分子メカニズムの解明は大きく前進すると期待される。本シンポジウムではこれらの解析結果を中心に、歯根膜発生および再生機構について考察する。

5. ヘルトビッチの上皮鞘 (HERS) 形成過程の新規仮説と歯根発生メカニズム

岩手医科大学 歯学部 口腔解剖学第二講座

原田英光, 鍵谷忠慶, 藤原尚樹, 石関清人

歯の発生の研究は、遺伝子機能の解析が中心に行われ、歯の形成不全に関わる遺伝的疾患の原因や歯の形態形成の基本的原則などを理解できるようになってきた。しかし、これらの研究の多くは歯の初期発生に限られており、歯根発生のメカニズムはいまだに手つかずの状態である。ヒトやマウス臼歯の発生では、内エナメル上皮の増殖によって歯冠の外形が決定される。その後にエナメル器サービカルループから発生したヘルトビッチの上皮鞘によって歯根象牙質の形成が誘導される。では、どのようなメカニズムで歯冠と歯根を作り分けているのだろうか。そこで、生涯にわたってエナメル質を形成し続けるマウス切歯とマウス臼歯との遺伝子発現の違いを比較してみると、マウス切歯では線維芽細胞増殖因子(*Fgf-10*)が発現し続けるのに対して、臼歯では歯根形成期に移行すると消失していることが明らかとなった。我々は、*Fgf-10* の発現の有無が歯冠と歯根を作り分ける鍵的な因子とにらんで、切歯に対しては *Fgf-10* が発現しない場合にどうなるか(機能喪失実験)、臼歯歯胚に対しては *Fgf-10* が過剰に発現し続けた場合にどうなるか(機能獲得実験)という実験系を組み立てて検証してみた。また、歯根形成に重要な働きをするヘルトビッチの上皮鞘の発生メカニズムを探るため、鐘状期歯胚のサービカルループにおける細胞増殖活性や細胞の動態、遺伝子発現について詳細に検討した。以上の結果を総合して、歯冠形成から歯根形成に移行するメカニズムとヘルトビッチの上皮鞘発生についての新しい仮説について発表したい。

【参考論文】

1. Yokohama-Tamaki T, et al.: Cessation of *Fgf10* signaling, resulting in a defective dental epithelium stem cell compartment, leads to the transition from crown to root formation. *Development* 133(7): 1359-1366, 2006.
2. 原田英光, 脇坂聡: 口腔諸器官の発生と再生(先端歯科医学の創生, 浜田茂幸, 米田俊之編), 大阪大学出版会, 大阪, pp2-13, 2005.