

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11624

研究課題名(和文) マラッセ上皮遺残形成における新規仮説の提唱

研究課題名(英文) IGF-I in periodontal ligament has possibilities to accelerate the disintegration of HERS and the cell movements.

研究代表者

藤原 尚樹 (Fujiwara, Naoki)

岩手医科大学・歯学部・教授

研究者番号：20190100

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：歯根形成の誘導に関わるHertwig上皮鞘(HERS)はその発達後期に断裂を生じる。これは上皮間葉転換による細胞配列の混乱、間隙の拡大により生じ、その後断裂した細胞は歯根膜へ遊走するが、ここにはcontact inhibition of locomotionと思われる細胞動態を示すことがlive imagingにより明らかとなった。歯根膜にIGF-Iが発現しているが、培養下でIGF-Iを添加すると細胞増殖のダウンレギュレート、HERS断裂の促進、歯根膜内の上皮細胞塊の形成を促進した。IGF-Iはマラッセの残存上皮形成における上記すべての事象を調節する重要な因子であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯根形成メカニズムの解明は実験環境の構築が難しいことから、不明な点が多く残っている。本研究の成果は、短根歯や長根歯の原因解明あるいは歯根の数を決める因子の解明、タウロドント歯の形成原因の解明、アベキシフィケーションなどにIGF-Iが重要な役割を果たす可能性を示した。また、上皮間葉転換やcontact inhibition of locomotionはこれまで神経堤細胞からの報告がほとんどであったが、新生仔を用いた本実験系は、生後マウスを用いることができ、従来より簡便に細胞ソースを入手することが可能となり、歯胚の形態形成の解明に留まらない実験系の構築にも貢献できたと考えている。

研究成果の概要(英文)：Hertwig's epithelial root sheath plays important roles in root development of molar tooth germs. Some phenomenon such as disintegration of HERS, cell migration into periodontal ligament were related with epithelial-mesenchyme transition and contact inhibition of locomotion. And formation of "cell rests of Malassez" and cellular cementogenesis results after these events. Although insulin-like growth factor (IGF)-I is noted as important factor induced cell growth in the early root formation, this factor is also accelerated these events in the late stage. Especially supplemented IGF-I increased gap formation of HERS cells and disintegration of basement membrane of the cell in organ culture system. Our findings indicated that IGF-I is one of the important regulatory factors throughout root formation.

研究分野：歯の発生(歯根の形態形成)

キーワード：歯根形成 Hertwig上皮鞘 Malassezの上皮遺残 有細胞セメント質形成 上皮間葉転換 CIL IGF-I

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

歯根の成長は、1) エナメル器のサービカルループから発生する Hertwig 上皮鞘 (HERS) が伸長しながら象牙芽細胞分化を誘導し、2) 同時に歯冠側の HERS に断裂が生じ、その間に歯小囊細胞が進入してセメント質や歯根膜を形成することで進行すると考えられている。この断裂については、アポトーシスあるいは上皮間葉転換によるものと考えられているが、現在論争中である。

我々は、歯冠形成から歯根形成へ移行するメカニズムについて研究を行っており、この移行には上皮成長因子の受容体がサービカルループを構成する細胞から消失することで内エナメル上皮と外エナメル上皮の間にはさまれた星状網が無くなり、同時に形成された HERS 細胞に Insulin like growth factor (IGF)- と肝細胞成長因子 (HGF) などの成長因子とその受容体の発現し、HERS の発達を促すと言ったような成長因子の変化が主要なスイッチになっていること、HERS が外エナメル上皮の増殖によって形成されること、HERS には間葉系の細胞特性を持つ細胞が存在し、HERS の断裂に EMT が関わっていることを細胞培養により示唆した。

さらに予備実験において、サイトケラチン(k)14 をもつ細胞が赤色蛍光(Tomato)を発現するマウス(k14cre/Rosa26RtdTomato)の下顎骨を透明化して発達中の歯根を観察したところ、Malassez の上皮遺残は一般に考えられている網目状のイメージとは異なり、1個または数個の細胞が散在している像として捕らえられた。また、器官培養下でのタイムラプスによる観察は、歯根形成端にある HERS から一部の細胞が離脱して歯根膜に移動した後、その細胞が歯根膜内で Malassez の上皮遺残を形成すると思われる現象を捉えた。神経堤細胞のように上皮間葉転換(EMT)を起こした細胞が上皮から離れて間葉系の中を遊走していくための、メカニズムとして「contact inhibition of locomotion(CIL)」が最近注目されている。元々CILはニワトリの心臓形成の際に、細胞同士の接触により進行方向を変えて互いに離れていく現象として1950年代に発見された。我々は予備実験のイメージングの研究からMalassezの上皮遺残の形成にCILが関わる可能性を見いだした。この細胞移動のメカニズムは、形態形成を理解する上できわめて重要であり、本研究はそのための理想的な実験系になると考えている。また、マウスの歯胚発生は新生仔において観察可能であり、観察試料の入手は母体内での発生でしか見られない心臓などよりも簡便である。このEMTやCILの現象の一端を解明できる我々の実験系は、歯の発生に関わらず、発生現象の解明にも有意義な結果をもたらすと考えた。

さらに、歯の発生において未解明のまま残っている歯根の長さの異常であるタウロドントや長根歯・短根歯形成とHERSとの関係、あるいはMalassezの上皮遺残と根尖嚢胞形成との関係の解明にも繋がるテーマであり、HERSからMalassezの上皮遺残が形成されるメカニズムを解明することは、新しい視点での歯根の形態形成メカニズムの解明となるだけでなく、歯と歯周組織に関わる臨床的病因解明にもつながると考えている。

## 2. 研究の目的

本研究では従来の組織学的方法にオリジナル技術を合わせることで、今まで明らかにされていなかったHERS断裂とMalassezの上皮遺残形成の間をつなぐ現象の解明に挑戦する、と言う目的で実験を行なった。

HERS細胞や遊走中の細胞、Malassezの上皮遺残細胞のオリジナル特性、contact inhibition of locomotion (CIL)を制御する分子メカニズム、遊走する細胞と周囲の微小環境との関係や相互作用を解明するために、研究開始時に、cytokeratin14プロモーター制御下で赤色蛍光タンパクを発現する(cytokeratin14cre/Rosa26RtdTomato、以下k14/Tomatoと表記)マウスの臼歯歯胚、このマウスのHERS由来細胞株を用いて、アレイトモグラフィ法によって研究を展開する予定であった。しかしながら、アレイトモグラフィ法でこの赤色蛍光マウスの歯胚から得たHERS細胞では、検出に十分な蛍光強度を得られないことが判明した。そのため、AlexaFluorによりグリーン蛍光による免疫組織化学による検出に切り替えると共に、まずはHERSからMalassezの上皮遺残が形成される発生過程をコントロールし、EMTやCILの過程をより捉えやすくする実験環境の構築を最初のステップとすることに变更し、その後具体的な現象を分析することとした。

よって、CILによって遊走する細胞の組織(細胞)学的構造の解析、このステップを解析

するための器官培養系とその培養環境の確立、当該細胞の微細構造学的な解析することにより HERS が EMT によって断裂をし、CIL によって移動する過程と、それらを調節する因子を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

実験開始当初、赤色蛍光マウスの臼歯歯胚を用いたアレイトモグラフィ法による実験を予定していたが、蛍光検出感度の問題から材料を、通常免疫染色法による試料を用いたアレイトモグラフィ法に変更した。また器官培養によって、歯根形成期歯胚を観察したところ、HERS から Malassez の上皮遺残の形成過程において、興味深い結果が得られたので、HERS の断裂を促進する因子とその影響の解明にフォーカスを転換し、本研究は以下の方法によって実験を遂行した。

#### 1) HERS の断裂、Malassez の上皮遺残形成で CIL が生じているいることに対する組織学的解析とイメージング解析

##### (1) 組織透明化による蛍光実体顕微鏡による観察

生後 14 日齢の k14cre/Rosa26RtdTomato マウスから下顎を摘出し、固定脱灰後、組織を透明化し、蛍光実体顕微鏡で観察した

##### (2) 器官培養下リアルタイムイメージングによる観察

上記と同様に、生後 14 日齢の k14cre/Rosa26RtdTomato マウスの下顎臼歯歯胚を摘出し、器官培養下で蛍光実体顕微鏡によるリアルタイムイメージング観察と撮影を行なった。

##### (3) HERS 由来細胞株による live imaging による観察

k14cre/Rosa26RtdTomato マウスから樹立した HERS 細胞株 (HERS02-T) と歯根膜細胞との共培養を行って、HERS 由来遊走細胞のライブイメージング撮影を行った。

#### 2) アレイトモグラフィ法による CIL に対する解析

アレイトモグラフィ法は免疫組織化学で蛍光像を捕らえた切片を、電子顕微鏡試料として反射電子像を獲得し、広い視野で微細構造を捕らえる技術である。

##### (1) 免疫染色を施した slc/ddY マウス臼歯歯胚によるアレイトモグラフィ法による観察

#### 3) オリジナル器官培養系による HERS の断裂、Malassez の上皮遺残形成の促進因子の探索とそれを用いた形態学的解析

##### (1) slc/ddY マウス臼歯歯胚を用いたオリジナル器官培養による HERS 断裂と Malassez の上皮遺残の形態学的観察

##### (2) slc/ddY マウス臼歯歯胚を用いたオリジナル器官培養による HERS 断裂と Malassez の上皮遺残の微細構造学的観察

### 4. 研究成果

歯根発生過程で Hertwig 上皮鞘 (HERS) から Malassez の上皮遺残 (ERM) が発生するメカニズムについて解明するために、歯根成長過程における Hertwig 上皮鞘の細胞動態について観察した。

#### 1) HERS の断裂、Malassez の上皮遺残形成で CIL が生じているいることに対する組織学的解析とイメージング解析

生後 14 日齢の k14cre/Rosa26RtdTomato マウスから下顎を摘出し、固定脱灰後、組織を透明化し、蛍光実体顕微鏡で観察した。根尖には HERS が維持されている一方で、HERS の歯頸側では断裂が観察されたが、教科書での記載のような網目状の ERM は観察できなかった。そこで器官培養下リアルタイムイメージング技術を用いて観察を行った。本実験系において、根尖部にある HERS 周辺の歯根膜には、幾つかの赤色蛍光を発する上皮細胞の集塊と HERS から一部の細胞が離脱し、周囲の細胞に接触しながら歯根膜内を遊走する細胞の 2 つの状態の上皮細胞が捉えられた。

細胞の動きを詳しく解析したところ、細胞同士の接触により進行方向を変えて互いに離れていく現象が見られ、これは神経堤細胞から報告のある「contact inhibition of locomotion (CIL)」ではないかと考えた。そこでこのマウス由来の HERS 細胞株 (HERS02-

T)と歯根膜細胞との共培養を行って、HERS由来遊走細胞のライブイメージング撮影を行った。HERSの細胞集団から周囲の歯根膜組織の中に遊走するHERS由来細胞 (Tomato陽性細胞) は次のような移動パターンを繰り返した。1) 細胞はコロニーから遊走する方向へゆっくりと伸長し、その先端に複数の細胞質突起を形成しながら移動を開始する。2) 細胞集団から離れるとすぐに細胞は素早く移動する。3) その遊走細胞が近傍の細胞へ接触すると移動を停止して、細胞形態を球形に変化させる。4) 再度、接触面と反対側に細胞が伸長し、他の細胞との接触がなくなると再び速い速度で移動する。これらの結果から、HERS細胞の一部はCILと考えられる細胞動態を示すことにより、歯根膜中へ遊走する事が明らかとなった。

## 2) アレイトモグラフィー法によるCILに対する解析

アレイトモグラフィー法は蛍光像を捕らえた切片を、電子顕微鏡試料として反射電子像を獲得し、広い視野で微細構造を捕らえる技術であり、k14cre/Rosa26RtdTomatoマウスから得た歯胚に応用し観察した。本学の生命科学研究技術支援センターの協力の元、さまざまな条件で観察を試みたが、今回用いた赤色蛍光マウスからの試料では十分な蛍光強度が得られなかった。そこで、材料を閉鎖系マウスであるslc/ddY型に変更し、緑色蛍光による免疫組織化学を用いて、アレイトモグラフィー法を継続することにした。HERSの歯頸側でHERSから断裂したと思われる単独または複数の細胞からなるサイトケラチン(CK)14陽性細胞細胞の他に、歯根表面から少し距離をおいた位置にもCK14陽性細胞が観察された。この細胞は周囲に存在すると考えられる扁平な歯根膜細胞やコラーゲンの束を抱える独特の形態を持つセメント芽細胞とは異なり、多数の細胞質突起を持ち、CILの様式で遊走しつつある細胞である可能性が強く示唆された。

## 3) オリジナル器官培養系によるHERSの断裂、Malassezの上皮遺残形成の促進因子の探索とそれをを用いた形態的解析

より効果的にMalassezの上皮遺残(ERM)を観察するために、HERSからERMへ移行する過程を促進する因子と、その作用についての解析を、オリジナル器官培養系を用いて行った。これまでの報告がある因子を検討した結果、HERS形成のタイミングでHERS細胞に受容体が発現し、その後も歯根形成過程の中期、後期にわたりHERSに発現しているinsulin like growthfactor-1 (IGF-1)に注目することとした。人工環境である器官培養系は、培養期間が限定されることから、明確にERMの形成過程を捉えるため、予備実験を経て、生後20日齢のマウス下顎臼歯歯胚を用いることにした。また、実験に先立ち至適濃度を検討した結果、100ng/mlの濃度での添加が最も効果的であることが明らかとなり、以後この濃度を用いて実験を行なった。これまで、歯根形成の初期歯胚で、外因性IGF-1によりHERS内層と外層の細胞増殖が促進され、HERSの伸長が促進されることを報告されている。しかしながら、IGF-1を添加培養した生後20日齢の歯胚のHERSでは、その長さが短くなり、BrdUによって細胞増殖活性を検討した結果、HERSの細胞増殖を対照群の2/3程度にダウンレギュレーションしていることが明らかとなった。さらに興味深いことに、生後20日齢の歯胚の歯根は無細胞セメント質の薄い層がみられるものの、in vivoでまだ有細胞セメント質形成は観察されていないのであるが、このIGF-1の添加培養により、有細胞セメント質が新たに形成されその基質は対照群に比較し、その幅や厚みともに2倍程度増していることが形態計測の結果、明らかになった。有細胞セメント質形成には歯根膜のセメント芽細胞がHERSが断裂したギャップから歯根象牙質に接触する必要があることから、この現象はHERSのEMTが関わった結果と考え、近心方向から遠心に向い、頬舌的に連続切片を作成し詳細な検討を行った。その結果HERSに以下の変化が観察された。最初に、HERS内層の細胞の基底膜断裂が先行して生じ、それと同時にHERSの細胞配列が乱れ細胞間隙が増加すると共に、本来2層で構成されているHERS細胞間に複数の細胞がみられるようになった(図1)。この配列の乱れはHERSの歯頸側領域に特有の現象であり、これはこれらの細胞がERMを形成するために歯根膜へ向い遊走する前段階、すなわちこれらの細胞にEMTが生じていることを示唆する結果と考えた。我々はこれまでに細胞培養で、HERSの細胞は他の歯胚の細胞に比較し、上皮マーカーと共に間葉系マーカーが強く発現しており、TGF-などの刺激により、容易にEMTマーカーであるslagなどの発現が上昇することを報告している。したがって、これらの結果は、歯頸側のHERSにおける断裂、すなわちERM形成

を促進する事を強く示唆するものと考えた。さらに、同様の連続切片において、歯根膜に見られる上皮細胞または集塊(ERM)の数を計測した結果、ERMは対照群のみならず、intactな生後24日齢の臼歯に比べても約3倍に増加していた(図2)他、より大きな細胞集団のERMが多数観察された。これらの周辺にはコラーゲンの束を抱え込んだセメント芽細胞様細胞もみられ、正常に歯根形成が行なわれていると考えられた。この歯根膜中に見られた上皮細胞は単独のものは基底膜をもたないものの、集塊を作っているものには一部に基底膜の形成が観察された。すなわち、これら根尖部周辺の歯根膜中には、少なくとも細胞質突起をもち遊走する単独の細胞と集塊を形成する上皮細胞の2種類の形態としてHERS関連細胞が存在することが分かった。現在この2型の細胞集塊について解析を進めているが、単独の細胞は本研究の最初に観察したEMTを起こしたHERSの細胞がCILの様式で遊走しているものを捉えており、集塊状の細胞は遊走細胞がERMの形成に向け、遊走を停止し、間葉上皮転換を起こした状態を捉えたものではないかと考えている。

当初の予定ではk14cre/Rosa26R tdTomatoマウスの歯胚を用いてアレイトモグラフィー法を実施する予定であった。しかし、このマウスからの細胞はリアルタイムイメージングでの観察には有効であったが、解析のためのアレイトモグラフィー法には適さない事など、本研究を遂行するにあたり当初の予定から、計画変更を余儀なくされた。しかしながら、HERSからERMの観察に適した器官培養系を新たに構築することがで

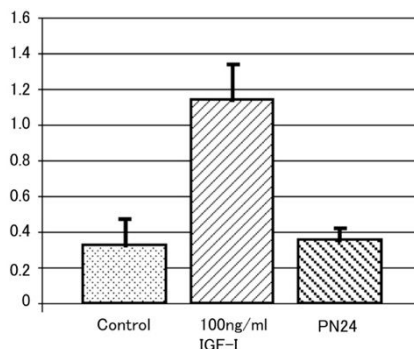
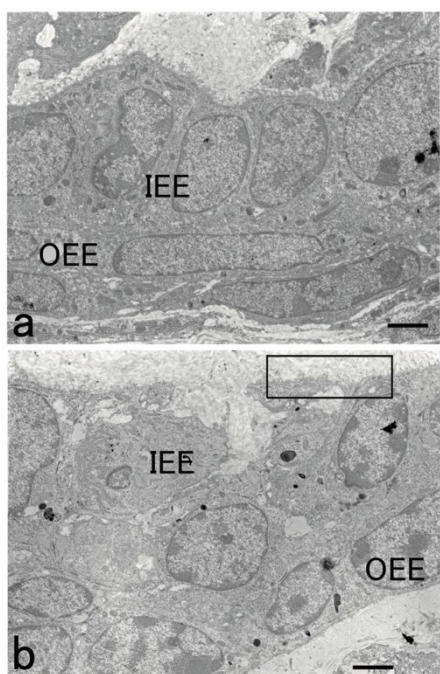


図2 ERMの単位面積あたりの数の比較

図1 IGF-1添加培養(b)と対照群(a)のHERSの電子顕微鏡写真  
aは内層(IEE)と外層(OEE)の2層からなるHERSが見られる。bは細胞配列が乱れ、基底膜が断裂し(\*)、IEEとOEEの間に複数の細胞が介在している。

き、このオリジナル器官培養によりHERSからERM形成の調節にはIGF-1が重要な因子として機能していることを明らかにすることができた。

歯根形成メカニズムの解明は実験環境の構築が難しいことから、不明な点が多く残っている。本研究で取組んだHERSの上皮間葉転換やcontact inhibition of locomotionによる細胞遊走の研究成果は、短根歯や長根歯が形成される原因解明、タウロドント形成の原因解明、アペキシフィケーションなどにつながる重要なテーマである。また、EMTやCILはこれまで神経堤細胞や胎生期の細胞由来の実験による報告がほとんどであったが、新生仔を用いた本実験系は、生後マウスを用いることができ、従来より簡便に細胞ソースを入手することが可能となり、歯胚の形態形成の解明に留まらない実験系の構築にも貢献できたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>N.Fujiwara and A. Fujimura  | 4. 巻<br>43            |
| 2. 論文標題<br>Insulin-like growth factor-I stimulates the disintegration of Hertwig's epithelial root sheath and cellular cementogenesis in mouse molars in vitro. | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Dent. J. Iwate Med. Univ.   | 6. 最初と最後の頁<br>140-152 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br><a href="https://doi.org/10.20663/iwateshigakukaishi.43.13_140">https://doi.org/10.20663/iwateshigakukaishi.43.13_140</a>            | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-             |

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

|                                    |
|------------------------------------|
| 1. 発表者名<br>藤原尚樹、大津圭史、原田英光          |
| 2. 発表標題<br>Hertwig上皮鞘から遊走する細胞動態の解析 |
| 3. 学会等名<br>歯科基礎医学会                 |
| 4. 発表年<br>2017年                    |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>藤原尚樹                                     |
| 2. 発表標題<br>インスリン様成長因子はヘルトヴィッチ上皮鞘の断裂と有細胞セメント質形成を促進する |
| 3. 学会等名<br>岩手医科大学歯学会 第87回例会（招待講演）                   |
| 4. 発表年<br>2019年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>藤原尚樹、藤村朗                          |
| 2. 発表標題<br>IGF-1はヘルトヴィッチ上皮鞘の断裂とセメント質形成を促進する。 |
| 3. 学会等名<br>第61回歯科基礎医学会学術大会                   |
| 4. 発表年<br>2019年                              |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|  | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|