
 総 説

歯冠形成から歯根形成に移行するメカニズム

原田 英光, 藤原 尚樹, 大島 勇人*

岩手医科大学歯学部口腔解剖学第二講座

(主任: 原田 英光 教授)

*新潟大学大学院医歯学総合研究科硬組織形態学分野

(主任: 大島 勇人 教授)

(受付: 2007年6月22日)

(受理: 2007年6月23日)

Key words : crown, root, Fgf-10, apical bud, Hertwig's epithelial root sheath

I. はじめに

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を対象にしており、歯根形成のメカニズムについてはいまだよくわかっていない。ヒトの歯やマウスの臼歯の発生では、エナメル器が釣り鐘状を呈する鐘状期歯胚の時期にヘルトヴィッヒ上皮鞘が形成され、歯根の象牙質形成が開始する。一方、マウスの切歯は臼歯のような歯冠や歯根という構造を造らないで、唇側にのみエナメル質を造りながら伸び続ける。線維芽細胞成長因子 (Fgf) ファミリーは歯の発生を制御しているシグナル分子と

してよく知られているが、我々はその中で *Fgf-10* が切歯の持続的な成長に重要な働きをしていることを明らかにした。ところが、マウスの臼歯では *Fgf-10* は歯冠発生期にだけ関わっており、歯根形成期には発現を認めない。我々は、*Fgf-10* の発現の有無が歯冠と歯根を作り分ける鍵となる因子であるとにらみ、2つの実験を行った。すなわち切歯に対しては *Fgf-10* が発現しないようにする機能喪失実験、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という機能獲得実験である。本総説ではこれらの実験系を紹介しながら、歯冠形成から歯根形成に移行するメカニズムについて我々の立てた仮説について述べる。

Mechanisms of transitional process from crown to root in tooth development

Hidemitsu HARADA, Naoki FUJIWARA, Hayato OHSHIMA*

Department of Oral Anatomy II, School of Dentistry, Iwate Medical University

1-3-27 Chuo-dori, Morioka, Iwate 020-8505, Japan

*Division of Anatomy and Cell Biology of the Hard Tissue, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

2-5274 Gakkocho-dori, Chuo-ku, Niigata 951-8514, Japan

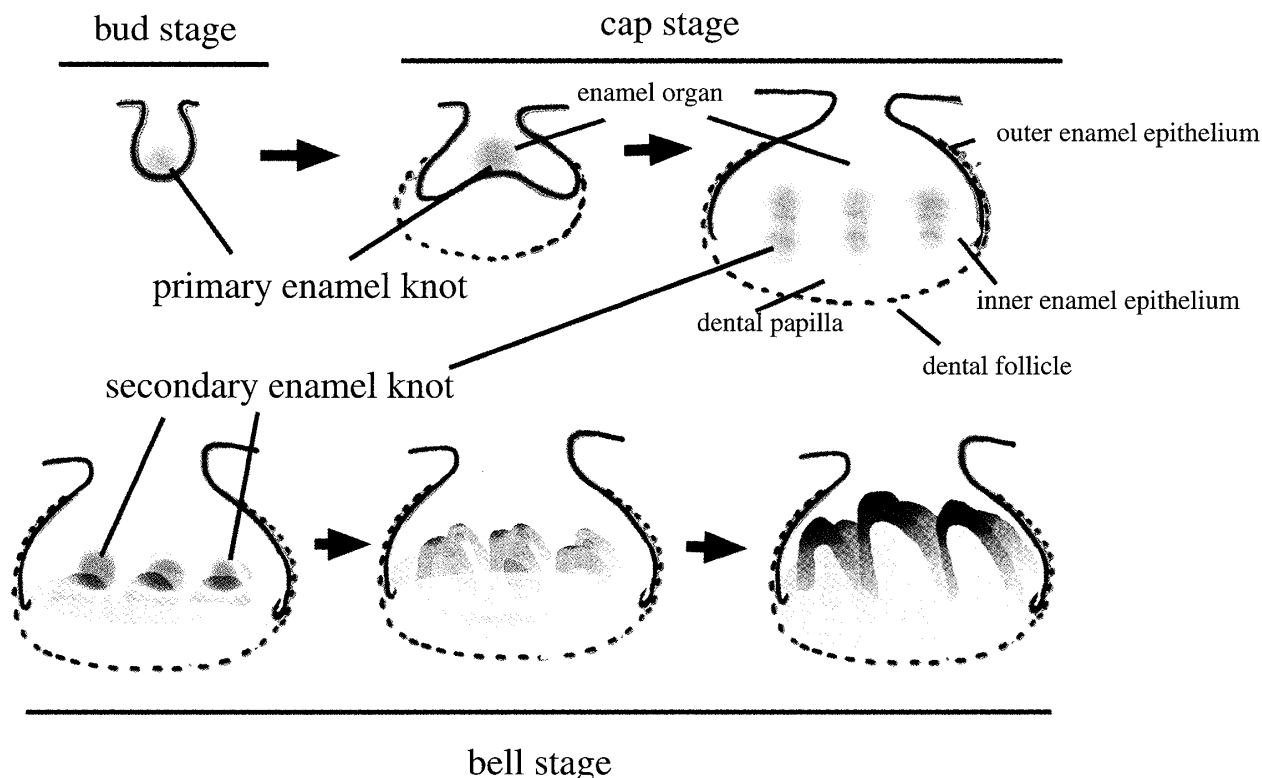


Fig. 1. Development of enamel organ and cusp formation

The mold of crown cusp is regulated by growth pattern of inner enamel epithelium in the enamel organ. The enamel knots as signaling centers are localized in the center of the enamel organ during cusp pattern formation (ref. 1-3).

II. マウス臼歯の発生と切歯の成長の違い

歯の形成は胎生期における外胚葉性の上皮組織の肥厚部である歯堤から開始する。上皮組織の増殖は間葉組織内に向かって進行し、やがて歯蕾と呼ばれる球状の上皮組織を形成する（蕾状期）。歯蕾の周囲には神経堤に由来する間葉細胞が凝集しており、細胞分裂を活発に行う。歯胚の上皮細胞もさらに分裂・増殖し、歯冠の大きさや咬頭数に応じたエナメル器を形成し、周囲の間葉組織を取り巻く形態となる（帽状期）。歯胚上皮に囲まれ球状に密集した間葉組織は歯乳頭とよばれ、その後象牙芽細胞と歯髓細胞に分化する。エナメル器と歯乳頭を取り囲んでいる間葉組織は歯小囊とよばれ、その後の歯根形成期においてセメント質や歯根膜、歯槽骨を形成する。歯胚はさらに成長を続け、エナメル器の中で歯乳頭に隣接する内エナメル上皮によってエナメル象牙境の外形が決定される

（鐘状期）。蕾状期，帽状期から鐘状期と歯胚の形態変化に伴って，エナメル器の上皮細胞も様々な細胞へ分化する。エナメル器の中央部には星形の星状網細胞，外側部には立方型の外エナメル上皮細胞が観察される。また歯乳頭に隣接する細胞は，短円柱状の内エナメル上皮細胞で，その外側に一層の扁平な中間層細胞が形成される。その後，内エナメル上皮細胞は次第に高円柱状となってエナメルタンパクを活発に分泌するエナメル芽細胞へと分化してエナメル質形成を行うようになる。

このような歯の発生に関わる遺伝子の発現はこれまでに詳細に調べられ，すでに Web サイトでも自由に閲覧が可能である (Gene expression in tooth, www database, <http://bite-it.helsinki.fi/>)。また，それらの遺伝子機能も細胞培養や器官培養，遺伝子改変マウスを用いた研究によって明らかになってきた¹⁾が，我々は遺伝子発現と歯胚の成長過程との関係を

さらに正確に理解する必要があると考えた。そこで歯の外形が決定される様子を連続して観察するために、胎生12~13日のマウスの下顎第一臼歯歯胚を10日間培養しながら30分毎のタイムラプス撮影を行った。このデータをもとにしたマウス下顎第一臼歯歯冠部の形態形成過程をFig. 1に示す²⁾。帽状期歯胚のエナメル器は近遠心と頬舌径的に拡大して歯冠全体の大きさに見合うまで成長する。このエナメル器の内エナメル上皮の中央部分には細胞の結節、すなわち一次エナメル結節 (primary enamel knot) が形成される^{1,3)}。エナメル結節の細胞は自らが積極的に増殖することはないが、ここから分泌される細胞成長因子で内エナメル上皮の増殖や歯乳頭細胞の増殖・分化を制御している。培養4日目ぐらいになると一次エナメル結節はアポトーシスによって消失し、エナメル器の外側への成長はこの時点で停止して近遠心と頬舌径が決定される (鐘状期歯胚)。次に、内エナメル上皮の数カ所に二次エナメル結節 (secondary enamel knot) が現れ^{1,3)}、これを中心に円形に取り巻くようにして細胞増殖領域が形成される。この領域をもとに内エナメル上皮が増殖し、二次エナメル結節を頂点に内エナメル上皮が外エナメル上皮に向かって隆起し始める。この隆起は徐々にその高さを増して最終的には外エナメル上皮に接するところまで成長する。この隆起の成長が止まったところが最終的なエナメル-象牙境となり、歯冠の最終的な形態のための鋳型となる。エナメル芽細胞や象牙芽細胞によるエナメル質や象牙質の形成は隆起した頂上部より始まり、徐々に咬頭の基部の方向に拡大しながら全体的にエナメル質や象牙質の厚みを生み出していく。一方、歯根形成は歯冠の形態が決定されるまで始まることはない。エナメル上皮の細胞増殖が停止すると歯根形成が開始されるが、歯根部は歯冠部と異なるメカニズムで制御されているように思われる。

鐘状期後期になると、エナメル器の辺縁で外エナメル上皮と内エナメル上皮とが連続している歯頸彎曲部 (cervical loop) とよばれる部位

だけで細胞分裂が行われ、この領域はその後の歯根形成に重要な働きを示す。歯根形成は生後、歯頸彎曲部の上皮が間葉組織の深部に伸長し、2層の上皮細胞から構成される上皮鞘を形成することから開始する。この上皮鞘はヘルトヴィッヒ上皮鞘 (Hertwig's epithelial root sheath) と呼ばれ、エナメル芽細胞に分化することはない。上皮鞘は歯乳頭を取り囲むように増殖し、歯乳頭細胞を象牙芽細胞へと分化誘導する。歯根象牙質が形成し始めるとヘルトヴィッヒ上皮鞘はやがて断片化し、歯根を取り巻く多孔性の網状構造を呈するようになる。この構造はマラッセの上皮遺残 (epithelial rest of Malassez) として知られている。

一方、マウスの切歯は生涯伸び続ける常生歯であり、上下顎正中に萌出するが、歯は顎骨の中心部を長軸方向に横たわるように存在している。切歯は唇側の象牙質の上にだけエナメル質

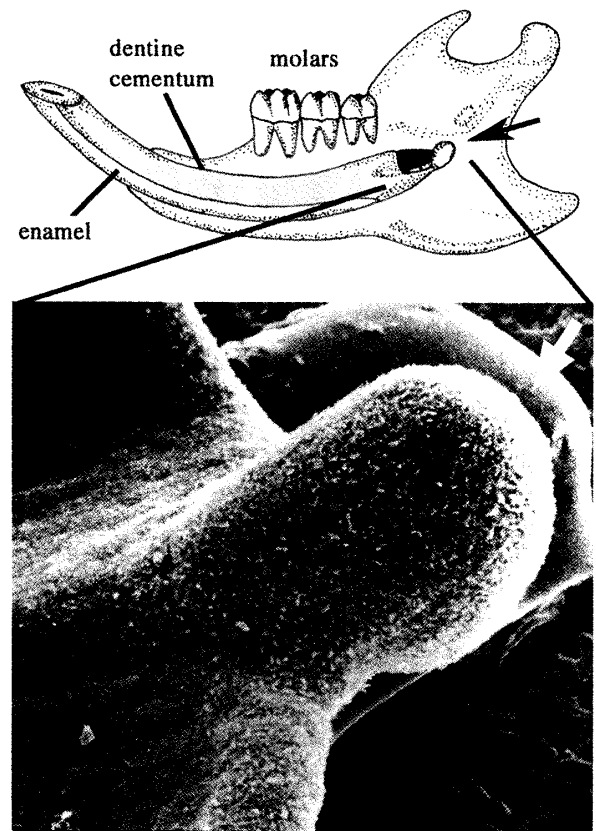
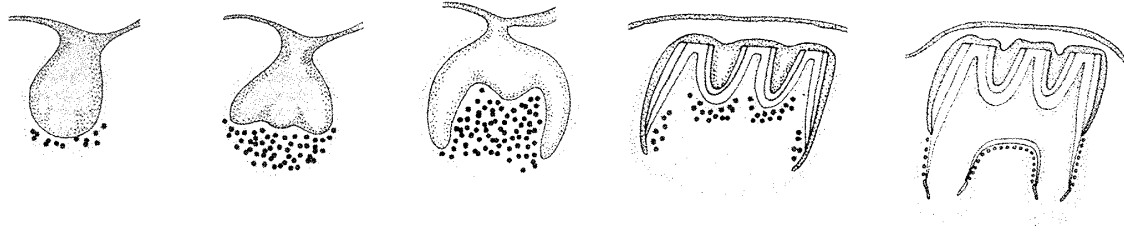
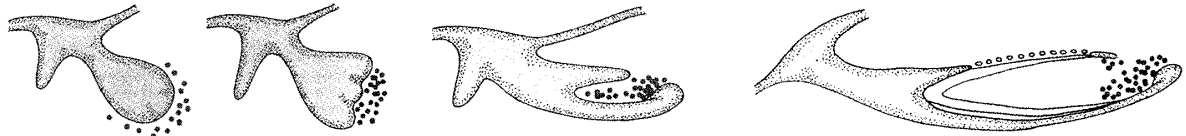


Fig. 2. Illustration of mouse incisor and scanning electron microscopic observation of an apical bud. Arrows indicate the apical bud (ref. 5, 11).

Mouse molar



Mouse incisor



bud stage

cap stage

bell stage

root development

Fig. 3. *Fgf-10* gene expression pattern in the development of mouse incisor and molar.

In molar development *Fgf-10* disappears in the transition from crown to root formation, but *Fgf-10* continues to express at the apical end in mouse incisors throughout the lifetime (ref. 5-9).

が形成され、舌側ではセメント質によって覆われる。マウスの切歯をヒトの歯と比較した場合、唇側が歯冠側 (crown analog), 舌側が歯根側 (root analog) に当たると考えれば理解しやすい。切歯の切縁部はマウスの食性により常時摩耗してゆくため、形成端 (常生歯においては、口腔側に露出している切縁・咬頭側と反対側の先端を形成端と呼ぶ) からは常に歯を形成する為の新しい細胞が供給され、切歯の恒常的な成長を補償している。唇側の形成端には apical bud と呼ばれる上皮組織が球状に膨らんだ場所があり、内部に組織型幹細胞が存在することが近年示された (Fig. 2)^{4,5)}。

III. マウス切歯と臼歯の *Fgf-10* の発現パターン

マウスの臼歯は、ヒトと同様に口腔に露出した複雑な咬合面を持つ多咬頭の歯冠部と、顎骨内の複数根の歯根部からなる。マウスの臼歯は切歯とは異なり、歯根の完成後に歯が成長することはない。発生過程における *Fgf-10* の発現パターンを切歯と比較すると、切歯では *Fgf-10* の発現が胎生期から始まり生後も維持されているのに対し、臼歯では生後の歯冠形成から歯根形成への移行期に *Fgf-10* が消失する

(Fig. 3, 赤いドット)^{6,7)}。胎生13日から15日頃までの歯胚における *Fgf-10* は歯乳頭細胞に発現して隣接する上皮細胞の増殖を誘導することで歯胚のサイズを調節していると考えられる¹⁾。さらに、胎生16日から18日の鐘状期では、*Fgf-10* はエナメル器が歯乳頭に突出した部分に隣接する歯乳頭細胞に発現して内エナメル上皮の細胞増殖に働き、咬頭形成を調節していると考えられる。生後1日を経過すると *Fgf-10* の発現は徐々に低下し始めて、歯根形成への移行期には消失する。

一方、切歯は恒常的に成長し続ける常生歯であり、エナメル上皮の幹細胞が存在する apical bud とよばれる場所が形成端にあることは前項で述べた。apical bud は、帽状期から鐘状期に移行する時期に形成され、その後も維持され続ける。Fgf ファミリーは、歯胚の形成に関与するシグナル分子として良く知られているが、我々はその中でも *Fgf-10* が apical bud の形成と維持に重要な働きをしていることを示した⁸⁾。その直接的な証拠として、*Fgf-10* の遺伝子欠損マウスの切歯には apical bud が形成されない⁸⁾。また、器官培養において *Fgf-10* の中和抗体を作用させると apical bud の細胞にア

ポトースが起きる。*In situ* hybridization による発現解析は、*Fgf-10*の発現と apical bud の形成との関係をより明確に示している (Fig. 3)。切歯歯胚発生での *Fgf-10*は、蓄状期に歯胚が90度回転することによって形成端側に移動し、そのまま維持されている。*Fgf-10*は、その後も生涯にわたって apical bud を覆うように発現し続けるので、apical bud の維持に働いていると考えられる。マウス切歯のように生涯にわたって伸び続ける臼歯を持つ動物にウサギ、モルモット、vole mouse 等が知られているが、vole mouse の臼歯の発生研究からこのような歯の形成端にも *Fgf-10*が発現していることが報告されている^{6, 9, 10}。このように、*Fgf-10*の発現は恒常的な歯の成長を制御するとともに歯冠から歯根形成に移行するメカニズムにも重要な役割を果たしていると考えられる。

IV. *Fgf-10*欠損マウス切歯の腎被膜下移植による歯根形成

上述したように、マウス切歯は臼歯のような歯根形態をとらないで恒常的に伸び続ける。それでは apical bud を持っていない *Fgf-10*欠損マウスの切歯はどのように成長するのであろうか。*Fgf-10*欠損マウスは肺が欠如しており出生直後に死亡するため、切歯を腎被膜下に移植して観察してみた。胎生19日齢の *Fgf-10*^{+/+}, *Fgf-10*^{-/-} マウスの下顎骨から切歯を摘出し、apical bud を含む形成端部を生後6週齢の C57BL/6系マウス (レシピエントマウス) の腎臓の被膜下に移植した。*Fgf-10*欠損マウスの切歯は唇側のエナメル質の形成が途中で終了し、象牙質表面にはセメント質と歯根膜線維が形成されていた¹¹。また唇側の上皮形成端部では apical bud が消失して臼歯歯胚に観察されるヘルトヴィッヒ上皮鞘に類似した2~3層の上皮細胞からなる構造が観察された。サイトケラチン14で免疫染色を行うと上皮鞘とそれに続く断裂した上皮 (マラッセの上皮遺残) が明瞭に観察できた (Fig. 4 黒矢印)。ヘルトヴィッヒ上皮鞘は *Notch 2* を発現することが知られているが、この上皮でも *Notch 2* の発現がみら

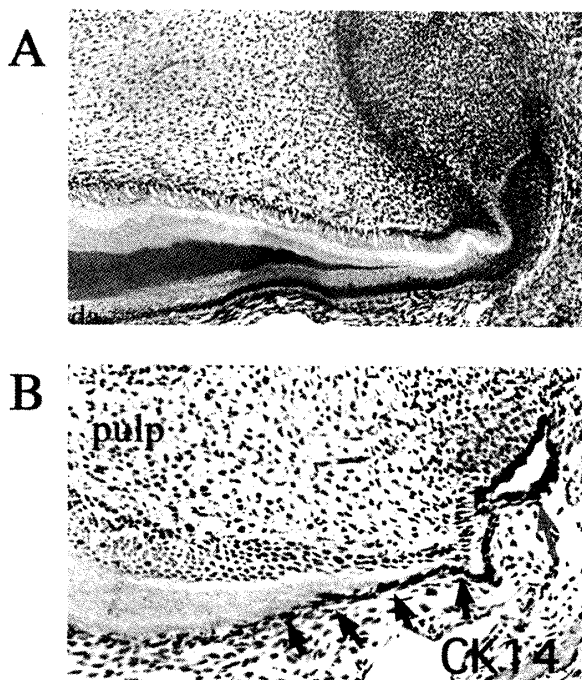


Fig. 4. HE staining of paraffin sections of *Fgf-10*^{+/+} incisors (A) and immunostaining of cytokeratin 14 in *Fgf-10*^{-/-} incisors (B) grown under kidney capsules.

In incisor of *Fgf-10*^{+/+}, an apical bud is maintain in the apical end under kidney capsules. However, in incisor of *Fgf-10*^{-/-}, Hertwig's epithelial root sheath (red arrow) and epithelial rest of Malassez (black arrow) were seen (ref. 11).

れ、ヘルトヴィッヒ上皮鞘とほぼ同じ性質をもった上皮が形成されたと考えられた。電子顕微鏡で観察すると、歯根膜細胞やまさに歯根膜線維を抱え込むセメント芽細胞なども観察されることから、この *Fgf-10*欠損マウスの切歯唇側面では歯冠形成が終了した後に、歯根が形成されたといえる。

V. 臼歯歯胚における *Fgf-10*の過剰発現

*Fgf-10*の消失に伴って歯冠から歯根形成に移行するマウス臼歯の歯胚において、*Fgf-10*が過剰に発現維持されると成長にどのような変化をもたらすかを調べた。歯冠形成から歯根形成への移行期のマウス臼歯歯胚 (生後1日) の歯乳頭に *Fgf-10*発現ベクターをエレクトロポレーションで遺伝子導入した。この発現ベクターには同時に緑の蛍光タンパクを発現するように組

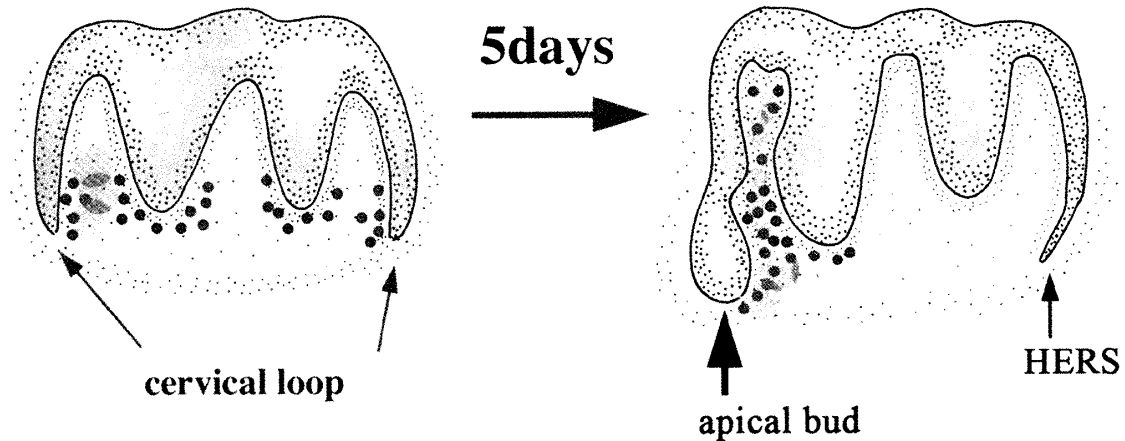


Fig. 5. Schematic illustration of the effects of *Fgf-10* overexpression.

After the morphogenesis of crown, *Fgf-10* protein (red dot) disappears and the formation of HERS starts. In the experiment, *Fgf-10* expression vector with PzGreen 1 gene was transfected at the proximal side in the dental papilla. Ectopic overexpression of *Fgf-10* protein was observed as Green fluorescent, which leads to apical bud formation. Conversely, at the distal side (control), HERS forms as *Fgf-10* disappeared (ref. 11).

み込まれているので、*Fgf-10*の発現域は緑の蛍光として観察することができる。遺伝子導入部位に隣接して apical bud に類似した球状の上皮組織が形成され、歯根形成の開始を示すヘルトヴィッヒ上皮鞘の形成が抑制された (Fig. 5)¹⁰。これより *Fgf-10*の消失が歯冠形成から歯根形成へと移行するために非常に重要な事象であると考えられた。すなわち、*Fgf-10*欠損マウスの切歯による実験結果とともに考察すると、*Fgf-10*シグナルが阻害されることによって歯冠形成から歯根形成へと移行することが可能となり、一方で *Fgf-10*が発現し続けることで常生歯になると推測できた。

VI. ヘルトヴィッヒ上皮鞘の形成過程に関する新規仮説

では、歯根形成の開始に必要なヘルトヴィッヒ上皮鞘はどのように発生するのだろうか。教科書的にはヘルトヴィッヒ上皮鞘は、歯頸彎曲部の内エナメル上皮と外エナメル上皮が接合し、増殖して形成されると考えられている¹²⁾。そこで、ヘルトヴィッヒ上皮鞘形成時期の増殖細胞の分布について検討を行った。生後3日の臼歯歯胚の器官培養1日後にBrdU (5'-bromo-2'-deoxyuridine) ラベリングを3時間行って増殖細胞を観察した結果、内エナメル

上皮よりも外エナメル上皮に陽性細胞が多く観察された。次に、生後5日の臼歯歯胚の器官培養でBrdUラベリングを行うとヘルトヴィッヒ上皮鞘の内側上皮よりも外側上皮においてBrdU陽性細胞が優位に多く観察された。また、腎被膜下移植によって形成された*Fgf-10*欠損マウスの切歯におけるヘルトヴィッヒ上皮鞘においても内側上皮よりも外側上皮においてBrdU陽性細胞が多く観察された。

歯小囊細胞から分泌されるInsulin-like growth factor (IGF)-Iによってヘルトヴィッヒ上皮鞘の形成が促進することが報告されている¹³⁾。歯乳頭からの*Fgf-10*の分泌が低下することに加えて、歯小囊からのIGF-Iによって、内エナメル上皮よりも外エナメル上皮の細胞増殖が優位になる。その結果として、歯冠歯頸部より下方で外エナメル上皮の増殖をもとにした歯胚上皮の伸長が促進され、2層の上皮からなるヘルトヴィッヒ上皮鞘が形成されると考えられた。さらに、歯根形成期における外エナメル上皮の細胞の移動と歯小囊細胞の移動とが常に協調していることから、ヘルトヴィッヒ上皮鞘の発生と伸長には歯小囊細胞が重要な働きをしていると考えられた¹⁴⁾。

これらの結果から、我々はヘルトヴィッヒ上

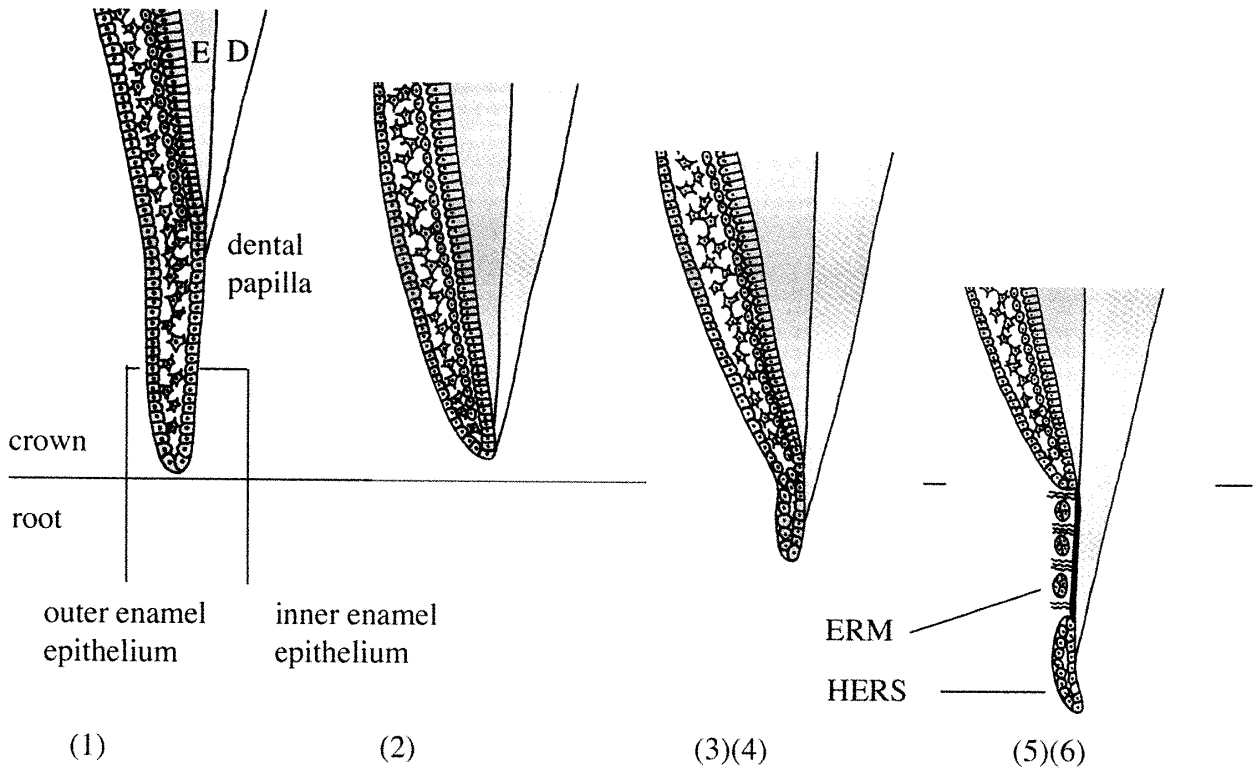


Fig.6. Schematic illustration of our hypothesis of the process of Hertwig's epithelial root sheath (HERS) formation.

The more active proliferation of outer enamel epithelium and stellate reticulum (dark yellow cells) elongates beyond the inner enamel epithelium after stop of crown formation (1, 2), leading to the formation of HERS. The epithelial sheaths proliferate (3, 4), and fragmentation occurs at the surface of the dentin. Dental follicle cells migrate among the fragmented epithelium and make up the cementum and the periodontal tissues (5, 6). A line indicates the border between crown and root. D, dentin; E, enamel; ERM, epithelial rest of Malassez.

皮鞘の発生に関する仮説を次のように提唱した (Fig. 6)。 (1)内エナメル上皮の細胞増殖が低下する。 (2)外エナメル上皮の増殖が内エナメル上皮より優位になる。 (3)外エナメル上皮が内エナメル上皮よりもより根尖方向へ移動してヘルトヴィッヒ上皮鞘が形成される。 (4)ヘルトヴィッヒ上皮鞘によって歯乳頭の象牙芽細胞への分化が誘導され、歯根象牙質の形成が始まる。 (5)ヘルトヴィッヒ上皮鞘の断裂によりマラッセの上皮遺残が形成される。 (6)歯根象牙質表面への歯小嚢細胞の遊走によってセメント質や歯根膜の形成が始まる。

Ⅶ. ま と め

歯根は歯冠や歯冠補綴物を支える重要な組織であり、また歯根周囲には様々な疾患が発症するにもかかわらず、日常の臨床治療において歯

根を修復したり再生したりする医療技術は極めて乏しい。それは歯冠の発生や組織構造に関する研究に比較して、歯根の形態形成についての研究はほとんど行われていないためと考えられる。今回我々は、歯の発生過程における *Fgf-10* の機能解析の過程で歯根発生を研究する糸口を見出し、歯根形成の分子メカニズムとヘルトヴィッヒ上皮鞘の発生における新規の仮説を提唱するに至った。これらの仮説についてはまだ検証すべき問題が残されており、今後はイメージング技術を駆使した細胞の動きを捉える研究を行いながら仮説を検証すると同時に歯根を再生する研究技術を開発したいと考えている。

謝辞；稿を終えるにあたり、本稿を執筆する機会を与えて頂いた岩手医科大学歯学会前編集委員長の加藤裕久教授と現編集委員長の杉山芳樹

教授に感謝の意を表します。また、筆頭著者が大阪大学在籍時に研究を指導して頂いた大阪大学歯学研究科脇坂聡教授、ならびに大学院生として共に研究を行ってきた田巻玉器先生（現北海道医療大学助教）に深謝します。本研究は、文部科学省科学研究費補助金基盤研究(B)（課題番号16390527）と萌芽研究（課題番号19659482）の補助を受けて行われた。本論文の要旨は、2007年2月24日に、第32回岩手歯学会総会において発表した。

文 献

- 1) Thesleff, I.: Epithelial-mesenchymal signaling regulating tooth morphogenesis. *J. Cell Sci.* 116: 1647-1648, 2003.
- 2) 原田英光, 脇坂聡: 口腔諸器官の発生と再生, 浜田茂幸, 米田俊之 編集: 先端歯科医学の創生, 大阪大学出版会, 大阪, pp 2 -13, 2005.
- 3) Jernvall, J. and Thesleff, I.: Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech. Dev.* 92: 19-29, 2000.
- 4) Harada, H., Kettunen, P., Jung, H-S., Mustonen, T., Wang, Y.A. and Thesleff, I.: Localization of putative stem cells in dental epithelium and their association with Notch and FGF signaling. *J. Cell Biol.* 14: 105-120, 1999.
- 5) Harada, H. and Ohshima, H.: New prospective on tooth development and dental stem cell niche. *Arch. Histol. Cytol.* 67: 1 -11, 2004.
- 6) Tummers, M. and Thesleff, I.: Root or Crown: a developmental choice orchestrated by the differential regulation of the epithelial stem cell niche in the tooth of two rodent species. *Development* 130: 1049-1057, 2003.
- 7) Kettunen, P., Laurikkala, J., Itaranta, P., Vainio, S., Itoh, N. and Thesleff, I.: Associations of FGF-3 and FGF-10 with signaling networks regulating tooth morphogenesis. *Dev. Dyn.* 219: 322-332, 2000.
- 8) Harada, H., Toyono, T., Toyoshima, K., Yamasaki, M., Itoh, N., Kato, S., Sekine, K. and Ohuchi, H.: Fgf-10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisor. *Development* 129: 1533-1541, 2002.
- 9) Keranen, S.V.E., Åberg, T., Kettunen, P., Thesleff, I. and Jernvall, J.: Association of developmental regulatory genes with the development of different molar tooth shapes in two species of rodents. *Dev. Genes. Evol.* 208: 477-486, 1998.
- 10) Ohshima, H., Nakasone, N., Hashimoto, E., Sakai, H., Nakakura-Ohshima, K. and Harada, H.: The eternal tooth germ is formed at the apical end of continuously growing teeth. *Arch. Oral Biol.* 50: 153-157, 2005.
- 11) Yokohama-Tamaki, T., Ohshima, H., Fujiwara, N., Takada, Y., Ichimori, Y., Wakisaka, S., Ohuchi, H. and Harada, H.: Cessation of Fgf10 signaling, resulting in a defective dental epithelium stem cell compartment, leads to the transition from crown to root formation. *Development* 133: 1359-1366, 2006.
- 12) Ten Cate, A.R., Sharpe, P.T., Roy, S. and Nanci, A.: Development of the tooth and its supporting tissues, Nanci, A. ed, Ten Cate's Oral histology. Development, structure, and formation, 6th edition Mosby, St. Louis, pp.79-110, 2003.
- 13) Fujiwara, N., Tabata, M.J., Endoh, M., Ishizeki, K. and Nawa, T.: Insulin-like growth factor-I stimulates cell proliferation in the outer layer of Hertwig's epithelial root sheath and elongate of the tooth in mouse molars in vitro. *Cell Tissue Res.* 320: 69-75, 2005.
- 14) Diekwisch, T.G.H.: Pathway and fate of migratory cells during late tooth organogenesis. *Connect. Tissue Res.* 43: 245-256, 2002.