

氏名 さくら ば はる な
櫻 庭 春 菜
学位の種類 博士 (歯学)
学位授与番号 岩医大院歯博第278号
学位授与の日付 平成24年3月9日
学位論文題目 Hepatocyte growth factor stimulates root growth during the development of mouse molar teeth
(肝細胞増殖因子はマウス臼歯の発生において歯根の成長を促進する)

論文内容の要旨

I 研究目的

根が短い歯や外傷等で歯根形成に影響が及んだ症例における歯の移動, さらに矯正治療中の歯根吸収は, 矯正歯科临床上, 重要な問題のひとつであると考えられている. このような症例に対処するためには, 歯根の成長を誘導する技術開発が必要である.

歯根形成は Hertwig 上皮鞘 (HERS) と周囲の間葉との相互作用により進行し, 複数の細胞成長因子が関与すると考えられている.

肝細胞増殖因子 (Hgf) は, 細胞成長因子として歯冠の形態形成に重要な役割を果たすことが報告されているが, 歯根形成に対する影響についての報告は未だない.

そこで, 本研究ではマウス臼歯の歯根形成に対する Hgf の影響について検討することを目的とした.

II 研究方法

生後5日齢のマウス下顎第一臼歯歯胚における Hgf 受容体の発現を観察するため, 未固定未脱灰急速凍結試料を作製し, フィルムトランスファー法を用いて $6\mu\text{m}$ の切片を作製後, 抗 Hgf receptor 抗体と上皮系マーカーである抗 cytokeratin (CK) 14 抗体による蛍光免疫組織化学染色を行った.

HERS 細胞の増殖に対する Hgf の影響を検討するため, HERS 初代培養細胞の抗 CK14 抗体による免疫組織化学染色を行った. その結果, Hgf 添加群では CK14 陽性細胞が多く, Hgf の細胞増殖への関与が示唆されたことから, Hgf を 0, 0.1, 1, 10ng/ml の異なる濃度で加えて HERS 由来細胞株 (HERS01a) を培養し, 2日毎に10日間, 細胞数を計測した.

歯根伸長に対する Hgf の影響を検討するために, Hgf の徐放性ビーズを埋入した生後5日齢のマウス下顎第一臼歯歯胚を SCID マウスの腎被膜下に移植し, 3週間後に摘出して歯根の長さを比較するとともに, 組織切片を作製し, H-E 染色した.

HERS 伸長に対する Hgf の影響を検討するために, 器官培養した生後5日齢のマウス下顎第一臼歯歯胚の HERS の長さの測定と BrdU-DAB で処理した HERS の全細胞数と HERS の内層, 外層の BrdU 陽性細胞数を計測し, 分裂指数を算出して HERS 全体と内層, 外層における細胞増殖活性を比較した.

III 研究成績

1. 生後5日齢マウス臼歯歯胚の Hgf 受容体の陽性反応は HERS を含めたエナメル上皮に認められ, 特に外エナメル上皮に強い反応が見られた.
2. HERS01a において, Hgf はその濃度が 0.1~10ng/ml の範囲で濃度依存的に細胞増殖を促進した.
3. Hgf の徐放性ビーズを埋入した歯胚において, Hgf 添加群では対照群と比較して長く伸長した歯根が形成された. さらに, 広い範囲で歯槽骨が形成され, 規則正しく配列した歯根膜線維, シャーピー線維が埋入されたセメント質が観察された.

4. 器官培養歯胚において、Hgf 添加群では対照群と比較して HERS の長さが伸長した。細胞増殖活性について HERS の内層、外層に分けて詳細に検討したところ、両層共に Hgf によって細胞増殖が促進され、特に HERS 外層において顕著であった。

一方、これらの作用は Hgf 受容体に対する中和抗体を添加すると抑制された。

IV 考察及び結論

本研究において、Hgf は HERS 細胞の増殖によって HERS 伸長を促し、結果として歯根伸長を誘導すること、さらにセメント質、歯根膜、歯槽骨といった歯周組織の形態形成も促進することが示唆された。

本研究で示唆された Hgf による歯根伸長の促進効果は、根未完成歯のアベキシフィケーションや矯正歯科臨床における短根歯への対応に応用できる可能性を有すると考えられる。

論文審査の結果の要旨

論文審査担当者

主査 教授 石 崎 明 (生化学講座 細胞情報科学分野)
副査 教授 原 田 英 光 (解剖学講座 発生物・再生医学分野)
副査 教授 武 田 泰 典 (病理学講座 病態解析学分野)

歯科矯正治療時の歯の移動における歯根の働きは重要であり、外傷その他の理由で歯根が吸収した症例では、歯の移動が制限される場合がある。このため、短根歯の移動に先行すべき歯根の完成を誘導する技術が新たに確立されれば、これまでに困難とされてきた短根歯の移動を容易に行うことが可能になるものと期待されている。発生学的には、歯根形成は Hertwig 上皮鞘 (HERS) とその周囲の間葉組織との複雑な相互作用により進行するとされているが、最近の分子レベルの検索により、種々の細胞増殖因子がその相互作用に関わることがわかってきた。しかしながら、肝細胞増殖因子 hepatocyte growth factor (Hgf) が歯根形成に与える影響については不明である。そこで、櫻庭らは、発生段階 (生後 5 日齢) でのマウス歯胚歯根形成部位における Hgf 受容体の発現状態の蛍光免疫組織学的方法、マウス歯胚の器官培養系ならびに HERS 由来細胞培養系を用いた方法により、マウスの歯根形成に対する Hgf の影響について検討した。

生後 5 日齢マウス臼歯歯胚の蛍光免疫組織学的観察の結果、HERS を含めたエナメル上皮に Hgf 受容体の発現が認められ、特に、外エナメル上皮における発現が顕著であった。次いで、蛍光免疫細胞学的方法を用いて HERS 細胞株 HERS01a が Hgf 受容体を発現していることに加え、Hgf がこの細胞の増殖を濃度依存的に促進することを明らかにした。さらに、Hgf 徐放性ビーズを利用した免疫不全マウス腎臓被膜下へのマウス臼歯歯胚移植実験系において、Hgf が歯根の形成を促進することを明らかにした。また、この歯胚移植実験では、Hgf による歯周組織の形成促進効果も認められた。

さらに、器官培養下の歯胚において、Hgf が HERS の伸長 (特に外層 HERS の伸長) を促進することを明らかにした。以上のごとく、櫻庭らは Hgf が HERS 細胞の増殖を促進することにより歯根の成長を誘導するだけでなく、歯周組織の形成をも誘導することを内外で初めて明らかにした。本研究結果は、Hgf の利用により根未完成歯のアベキシフィケーションや矯正歯科治療の短根歯への適用が可能になることを示唆するたいへん興味深いものであり、学位論文に値すると評価した。

試験・試問の結果の要旨

本研究の目的、概要について説明がなされ、研究方法、結果や考察に対する試問に適切な回答がなされていた。よって、学位に値する学識と研究能力を有すると判断した。