

総 説

Hertwig 上皮鞘の特性と発達に関わる因子

藤原 尚樹, 熊上 深香, 大津 圭史, 原田 英光

岩手医科大学解剖学講座発生物・再生医学分野

(主任: 原田 英光 教授)

1. はじめに

ヒトの歯は歯種により歯冠のサイズ, 咬頭の数などが異なるのであるが, 歯根もまた形態や数などバリエーションに富んでいる。また, マウス・ラットの切歯やハタネズミの臼歯のように, 独立した歯根を持たずに, 一生伸び続ける歯も存在する。しかし, これらの発生はいずれも口腔上皮から発達する歯原性上皮と神経堤由来の外胚葉性間葉との間の上皮間葉相互作用により進行する¹⁾。そして, これらは BMP, Fgf, sonic hedgehog, wnt, Msx などさまざまな遺伝子の時空間的な発現・消失による調節を受ける²⁾。歯の発生は歯冠形成から開始し, その際, 歯原性上皮からエナメル芽細胞が分化してエナメル質を, 外胚葉性間葉に由来する象牙芽細胞が象牙質を形成することで歯冠の外形を決定する。歯根形成は歯冠形成の終了後に開始するが, この時期の歯原性上皮はエナメル質を形成せず, 周囲の間葉系細胞の分化と歯周組織形成の調節に関わる³⁾。この上皮を Hertwig 上皮鞘と呼び, 歯根形成に必要な不可欠な組織である。本稿では Hertwig 上皮鞘の名称の由来や細胞特性, また発達に関わる成長因子の作用などについて, 我々が行ってきた研究も含めて概説したい。

2. Hertwig 上皮鞘とは

歯胚の発生に関わる上皮は, 歯冠の形態形成においてエナメル質形成が中心的役割であることから「エナメル器」と呼ばれている。1874年にドイツ人の Oscar Hertwig が両生類で歯根の発生にも「エナメル器」の端に位置する上皮が関わることを見だし, その後 1891年に von Brunn がほ乳類でもその現象を確認したことから, 最初にその存在を提唱した Hertwig の名を冠して, 歯根形成に関わる上皮を Hertwig 上皮鞘というようになった⁴⁾。「鞘」という字が使われており, 一見, 結合組織性の膜を想像するが, 実際は歯乳頭を「鞘」のように取り巻く, 内エナメル上皮と外エナメル上皮に連続する2層の上皮細胞シートからなる筒状の突起である。最近では英語名の Hertwig's epithelial root sheath の頭文字をとり, HERS (ハース) と呼ばれることが多い。また, HERS が小塊状に分断され, 歯根膜に存在する上皮を Malassez の上皮遺残 (epithelial cell rests of Malassez) と呼ぶ。この Malassez の上皮遺残が最初に記載されたのは 1817年で, 成人になると消失する "cell debris" として記載された。そのため, 1885年にヒト成人の歯根膜に網目状に見られる

The characteristics of Hertwig's epithelial root sheath and the developmental mechanism
Naoki Fujiwara, Mika Kumakami-Sakano, Keishi Otsu, Hidemitsu Harada
Division of Developmental Biology and Regenerative Medicine, Department of Anatomy, Iwate Medical University
(Chief: Prof. Hidemitsu HARADA)
2-1-1, Nishi-Tokuta, Yahaba, Shiwa-Gun, Iwate, 028-3694, Japan

028-3694 岩手県紫波郡矢巾町西徳田 2-1-1

上皮遺残として報告した Malasséz の名を冠されることになった。しかし、Malasséz が報告した上皮遺残は断片化した HERS だけでなく、歯堤、外側歯堤など歯肉や歯根膜にみられるすべての上皮由来の細胞成分に対して、広く命名されたもので、現在の教科書にある Malassez の上皮遺残の定義と異なるのであるが、現在でもそのまま使用されている⁵⁾。

3. HERS の発達

ではどのように HERS は発達するのであろうか。我々が実験に用いているマウス下顎第一臼歯の歯根形成過程を例に述べる。歯の発生初期のエナメル器は、歯胚の発達に伴って口腔上皮から離れるように、深部へ向かって成長していく。この過程でエナメル器の内エナメル上皮はエナメル質を産生するエナメル芽細胞へ分化し、鐘状期の後期になるとエナメル質を形成する。歯冠形成終盤のエナメル器の先端はサービカルループ（歯頸彎曲部）と呼ばれ、歯髄側から内エナメル上皮、中間層、星状網、外エナメル上皮から構成されている（図 1 A）。生後 5 日齢 (PN5d) 頃に歯冠形成が終了するとともに、

サービカルループの先端に内外 2 層（中間層と星状網は存在しない）の上皮からなる HERS が形成される（図 1 B）⁶⁾。その長さは形成当初 100 μm 程度であるが、外胚葉性間葉から分化した歯乳頭と歯小囊の間を分け入るよう発達し、わずか 5 日ほどの間に 400 μm 程度まで急激に伸長する（図 1 C）⁷⁾。HERS はこれら 2 つの間葉組織と相互作用をしながら歯の形成に関わる。すなわち、HERS は歯乳頭の細胞を歯根象牙質の形成に関わる象牙芽細胞に誘導し、一方 HERS が断裂した領域では、歯小囊細胞が歯根象牙質へ近づき、その後セメント芽細胞へ分化する³⁾。一方、HERS の歯冠側では PN9d 頃から断裂が始まり、その後も HERS の断裂が継続するにも関わらず、PN15d 頃までは活発な細胞増殖により HERS を構成する細胞数が維持され、一定の長さを保つ（図 1 D）。PN16d 頃には歯根の伸長も進み、歯冠部が口腔内へ萌出する。その後、PN21d でほぼ成獣と同程度の歯根の長さに達し、有細胞セメント質形成が開始するが、このとき根尖部には短い HERS が観察される。根尖の HERS はその後も生後 2~3 か月頃まで残存し続けるが、その後次第に消失す

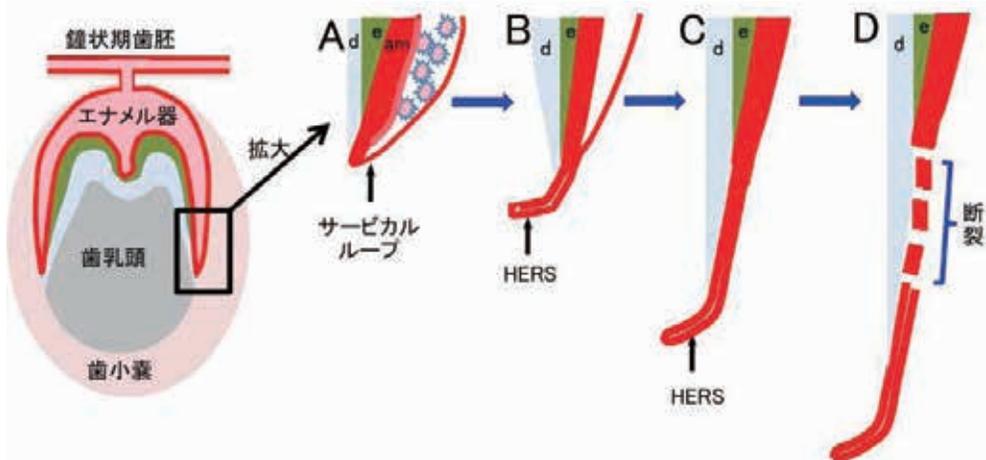


図 1: HERS 発達の模式図

A: 生後のマウス下顎第一臼歯において、歯冠形成終盤のエナメル器の先端はサービカルループ（歯頸彎曲部）と呼ばれ、歯髄側から内エナメル上皮、中間層、星状網、外エナメル上皮から構成される。B: PN5d 頃、歯冠形成が終了後、サービカルループから内外 2 層の上皮シートからなる HERS が発達する。C: HERS はその後、伸長し、歯乳頭と歯小囊の間を分け入るよう発達する。D: PN10d 頃から HERS の歯冠側で断裂が始まり、その後、歯根膜へ移動し Malassez の上皮遺残となる。am: エナメル芽細胞, d: 象牙質, e: エナメル質

る。また、上皮細胞塊は断裂しても、しばらく歯根象牙質上に留まるが、その後歯根膜へと移動してMalassezの上皮遺残を形成し、これは生涯歯根膜に残ることとなる。

4. HERS細胞の特性

HERS内層の細胞は、扁平で細胞質のほとんどを核が占め、細胞内小器官は少なく、歯冠で見られるようなエナメル基質の産生はしない。しかし、微細構造的な観察から無細胞セメント質が形成される前に一過性に粗面小胞体が見られ、amelogenin, ameloblastinなどのエナメル関連タンパクを産生する能力があることが知られている^{8,10}。Hammarström¹⁰は、HERSから産生されたこれらのタンパク質に歯小囊細胞が接触することで、無細胞セメント質形成を誘導することを報告し、現在、歯周組織再生材料として臨床で用いられているエナメルマトリックスステリパティブ（エムドゲイン[®]）を開発した。

またヒトとマウスのHERSや、HERSに由来するMalassezの上皮遺残細胞は、cytokeratin 14（図2A）、E-cadherinなどの上皮系マーカーの他に、間葉系マーカーであるvimentin（図2B）、N-cadherinも発現しており、非常にユニークな細胞特性を持つ^{11,12}。この上皮系マーカー

と間葉系マーカーが共に発現する部位は、HERSの先端部ではなく、歯冠側に位置する細胞である（図2C、矢頭）。このことはHERSが部位により特性が異なる細胞から構成されている可能性、あるいは歯冠側で上皮から間葉への形質変化を起こしやすい細胞が存在している可能性を示唆している。

5. HERS形成に関わる新たなセオリー

HERSはサービカルループの先端で内エナメル上皮と外エナメル上皮が増殖し、合わさることで形成される、というセオリーが広く受け入れられている¹³。しかし最近、リアルタイムイメージングを用いた研究から、新たなHERS形成に関するセオリーが提案された。それは、以下の3ステップにまとめられる。まず、歯冠形成の間、内エナメル上皮と外エナメル上皮は活発に細胞増殖を行う。次いで、内エナメル上皮は、象牙芽細胞とともに歯冠の外形をつくり終えると、細胞増殖が停止し、エナメル芽細胞へ分化する。しかし、外エナメル上皮の細胞はこれまでと同じように細胞増殖を継続する結果、最終的に、サービカルループの先端を超えて外エナメル上皮シートが伸長し、これがHERSとなる^{6,14}。このセオリーは、HERSを

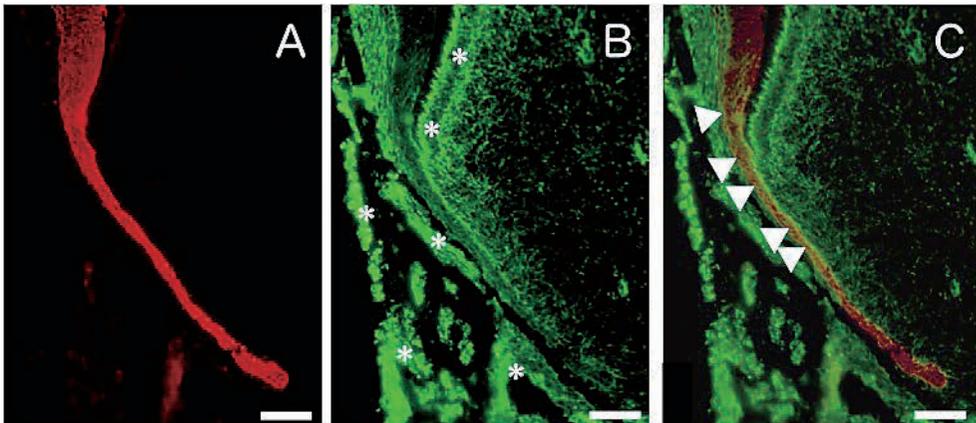


図2：歯根形成領域の非固定・非脱灰凍結切片（6 μm）の免疫組織化学

A：cytokeratin 14抗体に対する蛍光免疫組織化学像。B：vimentin抗体に対する蛍光免疫組織化学像。陽性反応はHERS、外エナメル上皮、象牙芽細胞、歯小囊に観察される。骨と象牙質の基質に見られる反応は非特異的反応（*）。C：cytokeratin 14とvimentinのマージ。HERSの歯冠側に共発現する細胞が見られる（矢頭）。Barは50 μm。

構成している細胞のソースが、内外エナメル上皮ではなく、もともとエナメル質の形成能力を持たない外エナメル上皮に由来しており、エナメル芽細胞あるいは内エナメル上皮と HERS の内層の細胞層が連続しているにもかかわらず、HERS 内層の細胞はエナメル質を分泌しない、という現象を説明できると思われる。

6. HERS 形成に関わる成長因子とその作用

サービカルループから HERS が形成された後、HERS は伸長 (elongation) と断裂 (disintegration) という2つの過程を経ながら、歯根形成を誘導するが、これらは上皮間葉相互作用によるシグナリングの変化によって調整されている。成長因子やその受容体の発現の変化を捕らえることは、HERS の形成メカニズムを理解するために重要であると考えられる。そこで、本項では HERS の組織学的変化を、1) 形成、2) 伸長、3) 断裂、の3つに分け¹⁵⁾、これらの過程でその調整に関わる成長因子の役割についてまとめる。

1) HERS 形成に関わる因子

エナメル器のサービカルループから HERS が形成される領域においては、2つの成長因子の発現の消長に大きな変化が見られる。

マウス臼歯において、Fibroblast growth factor (Fgf) -3, 10 は歯冠形成の間、歯髄に発現し、その受容体である Fgfr1b と 2b はエナメル上皮に発現している^{16, 17)}。これら Fgf の発現は生後、減少し、HERS が形成される前に見られなくなる。しかし、一生涯萌出を継続する(独立した歯根を持たない)マウスの切歯では、これと異なる発現パターンを示す。マウスの下顎骨の切歯は吻側から第3大臼歯付近まで、下顎骨下端の前後軸に沿って長く存在する。切歯は唇側だけにエナメル質を持ち、唇側の最も奥の形成端と呼ばれる部分にサービカルループ状の膨らみを持つ。この膨らみはエナメル上皮の幹細胞領域 (apical bud) であり、HERS は見られない^{18, 19)}。この切歯の形成端では Fgf-10 が

継続的に発現しており、エナメル上皮幹細胞の維持に関わる。この切歯の形成端を Fgf-10 欠損マウスから摘出し、腎被膜下へ移植したところ、形成端の幹細胞領域が消失し、連続的に形成されるはずのエナメル質も見られなくなった。また、その部位には二層の細胞層からなる HERS が形成されていた。一方で、生後すぐの臼歯歯髄の近心領域で Fgf-10 を強制発現させると、エナメル上皮は HERS を形成せず、切歯の幹細胞領域に似た膨らんだ形態の上皮を形成した²⁰⁾。

Epidermal growth factor (Egf) の歯の形態形成に関わる作用は、1962年にマウス切歯の萌出を促進する因子として初めて報告され、臼歯では歯冠の形態形成を調節する因子として知られる^{21, 22)}。最近、歯根形成期のマウス臼歯において、Egf は外エナメル上皮を除くサービカルループの内エナメル上皮、中間層、星状網に発現がみられ、一方、Egf 受容体は内エナメル上皮、星状網、外エナメル上皮に発現していることが報告された²³⁾。歯冠形成から歯根形成へ移行する時、Egf の受容体はサービカルループの内・外エナメル上皮、星状網からその発現が次第に減少し、HERS 形成が始まるとともに、その発現が消失する。培養液に Egf を添加して、PN1d や PN5d の臼歯を器官培養すると、歯冠の形態形成を継続し、エナメル器の先端には内エナメル上皮、星状網、外エナメル上皮から構成される膨らみが見られ、HERS の形成は確認できなかった。また、この膨らみの細胞は歯冠のエナメル芽細胞と途切れることなく連続しており、エナメル質基質も同様に連続しているため、形態学的に切歯に類似した形態をとっていると考えられた。一方で、Egf と共に Egf receptor の阻害剤を添加培養するとそれらをレスキューし、正常な HERS を形成した。

この二つの成長因子における Bromodeoxyuridine (BrdU) の投与による細胞増殖活性に対する分析は、各因子を添加した際にサービカルループの内層や星状網で高い活性を示し、一方でこれらの働きを抑制することで、外エナメル上皮の

細胞増殖が優位になり、HERSが形成されることが分かった^{20, 23)}。

以上のことから、歯髄のFgf-10とエナメル上皮のEgfの発現は歯冠形成の維持に必要であり、これらの因子の消失は、HERS形成を誘導する。したがって、EgfとFgf-10は歯冠形成から歯根形成へスイッチするタイミングを調節する重要なレギュレーターであることが示唆される。

2) HERSの伸長を調節する因子

先に述べたように、HERSが形成された後に起こる変化はHERSの伸長であり、HERSの伸長とともに、HERSを構成する細胞の数が急激に増加する⁷⁾。本項ではHERSの伸長の際、細胞増殖を調節する2つの成長因子であるInsulin-like growth factor (Igf) -IとHepatocyte growth factor (Hgf)について述べる²⁴⁻²⁶⁾。

歯根形成期歯胚において、Igf-Iは歯小囊に発現し、Igf-Iの受容体はHERSが形成されると同時に発現し、歯根形成の間その発現は維持される²⁷⁾。PN5dのマウス臼歯歯胚の器官培養においてIgf-Iを添加して培養すると、HERSが形成された後に見られる伸長の速度を速めることで歯根形成を促進した。この時、BrdUラベリング分析からIgf-IはHERS外層の細胞の増殖を促進することが明らかとなった。一方で、Igf-Iと同時に中和抗体を培養液に添加するとHERSの細胞増殖や長さが減少した。興味深いことに、この効果はIgf-Iの添加なしで培養した歯胚より、いっそう細胞増殖を低下させ、HERSの長さも短くした。このことは添加したIgf-Iに対する抗体は内在性のIgf-Iの効果までも抑制し、正常な歯根の発達を阻害したと考えられる²⁸⁾。

HgfはIgf-Iと非常に類似した作用を持つ。Hgfは歯小囊に、Hgfの受容体(c-met)は外エナメル上皮とHERSの外層に強く発現している^{29, 30)}。摘出されたPN5dの歯胚の歯髄にHgfをしみ込ませたビーズを埋入して、腎被膜下に移植すると、Hgfは歯根の伸長と歯周組織の形成を促進した。また、器官培養によってPN5dの歯胚を

培養すると、HgfはHERSの伸長を促進するとともに、歯根形成を促進した。この時、HgfはHERSの細胞増殖を促進し、特に外層の増殖を促進していた。これらの効果は、Hgfの受容体に対する抗体を培養液に添加することで抑制された。

これらのことから、Igf-IとHgf signalingがHERSの外層の細胞増殖を活発にすることで、HERSの伸長を促しており、これら2つの因子は歯根伸長を正常におこなうための調節因子として機能していることを示唆している。

3) HERSの断裂を調節する因子

歯根伸長に伴って、HERSが伸長する一方で、歯冠側では断裂が生じる。これまで、断裂はアポトーシスに起因するとされてきたが、TUNEL法による分析では、ほとんどアポトーシスを示す細胞が見られず、アポトーシスのみで断裂が生じるメカニズムを説明するのは難しいと考えられる³¹⁾。最近、この断裂を調節する因子が報告された。

HERSには、上皮間葉転換(EMT)を誘導する因子であるTgf- β が発現している^{11, 32)}。EMTは癌細胞などの浸潤や転移の際に見られる現象であるが、その際上皮から間葉へとその形質発現が変化し、アクチンなどの細胞骨格成分の再配列が起こり、遊走能を獲得する。HERS由来細胞株HERS01aの培養液にTgf- β を添加して培養すると、cytokeratin14(CK14)陽性細胞のコロニーの中に、vimentin(Vm)を強く発現する細胞が出現した。さらには、コロニーから遊走する細胞が見られるようになり、その細胞は複数の細胞質突起を持ち(図3B)、CK14の発現が消失し、Vmの発現だけが見られた。real-time PCR analysisでは、これらの細胞で上皮系マーカーであるE-cadherinの発現が下がる一方、間葉系マーカーであるN-cadherin, Vm, fibronectinの発現が高くなり、さらにはEMTのマーカーであるSnail 1も高い発現を示すことが明らかとなった。

HERSには上皮系マーカーと間葉系マーカー

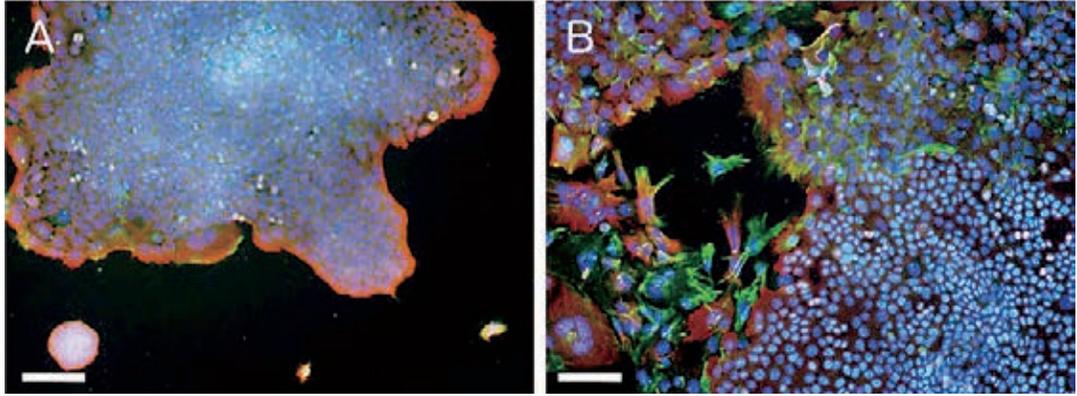


図3：Tgf- β を添加して培養したHERS由来細胞株HERS01aに対する免疫細胞化学

5日間プレカルチャーをした後、HERS01a細胞はTgf- β を添加しないcontrol培地(A)とTgf- β を添加した培地(B)とで8日間培養した。固定後のcytokeratin14(赤)とvimentin(緑)、核(DAPI, 青)蛍光免疫細胞化学像を示す。A:コロニーの境界は滑らかで、cytokeratin14を発現した細胞で構成されている。B: Tgf- β の存在下ではコロニーの輪郭が不規則になり、コロニーから遊走した細胞が多数見られる。コロニー辺縁の細胞やコロニーから遊走した細胞は細胞質突起を持ち、vimentinの発現だけが見られる。Barは100 μ m。

双方の発現が見られ、EMTの誘導に関わるTgf- β も発現している。これらの細胞特性は、HERSの断裂あるいは細胞遊走が、HERSを構成する上皮細胞に生じるEMTと深く関係しており、EMTがHERSの断裂を調節するメカニズムの1つであることを示唆している。

7. 今後のHERS研究の課題

歯冠形成から歯根形成へ移行するメカニズムの解明は、遺伝子改変マウスやさまざまな動物の歯を対象に行われており、最近の歯の発生研究における1つのトピックでもある^{15, 33)}。しかし、歯根分岐部に見られる上皮隔膜の形成と歯根形成部位にあるHERSの発達メカニズムの違い、すなわち「歯根の形態形成を調節するメカニズムの解明」や断裂をしたHERS細胞がどのように歯根膜へ移動し、網目状のMalassezの上皮遺残を形成するかなど、まだ不明な点が残っており、解明が待たれる。

HERSにEMTが生じるという報告は最近増えており、EMTを受けたHERS細胞はセメント芽細胞あるいは骨芽細胞へ分化し、それぞれセメント質あるいは骨基質を産生するとの報告もある^{11, 34)}。しかしながら、一方で、HERS細

胞がセメント基質中に埋入される場合はあるが、EMTを受けることはないとする研究^{35, 36)}もあり、いまだHERSの断裂とEMTの関連性やHERSにおけるEMTの発生メカニズムの詳細について、一致した見解が得られておらず、さらなる研究が必要である。

8. まとめ

歯冠形成が終了し、HERSが発達する際の、時期・部位特異的な成長因子による調節メカニズムの一端が徐々に明らかにされており、我々もその一端を担い研究に取り組んでいる。本稿では、(1)歯髄でのFgf-10の消失と共に上皮でのEgf signalingの消失が、サービカルループからHERSを形成するため、換言すれば歯冠形成から歯根形成へ形態形成がスイッチするために必要であること、(2)HERSの伸長には、外エナメル上皮の細胞増殖のアップレギュレートが必要で、この調節にはIgf-IやHgf signalingが関わること、さらに(3)増殖したHERS細胞の根尖方向への移動、あるいは断裂と歯根膜への遊走などには、Tgf- β により誘導される上皮間葉転換が1つの因子として関わることを紹介した(図4)。

歯根形成期は、歯冠形成期に比較し周囲組織の発達が進んでおり、HERSの周囲には、歯根象牙質、セメント質、歯根膜、歯槽骨が存在し、歯根が伸長すると共に、周囲組織の形成も進行する。HERSの発達は、これらの基質や基質を形成する細胞との相互作用の中で行われ、HERSだけの成長ではなく、周囲組織の発達も十分考慮に入れた上で、発生過程を捕らえる必要がある。

歯根形成過程のさらなる研究は、短根や長根歯など歯根形成に関わる異常の原因解明や治療法の開発、また歯根未完成歯の歯根の成長を誘導する治療法開発、再生医療などにつながると考える。

利益相反について

本論文において、開示すべき利益相反は存在しない。

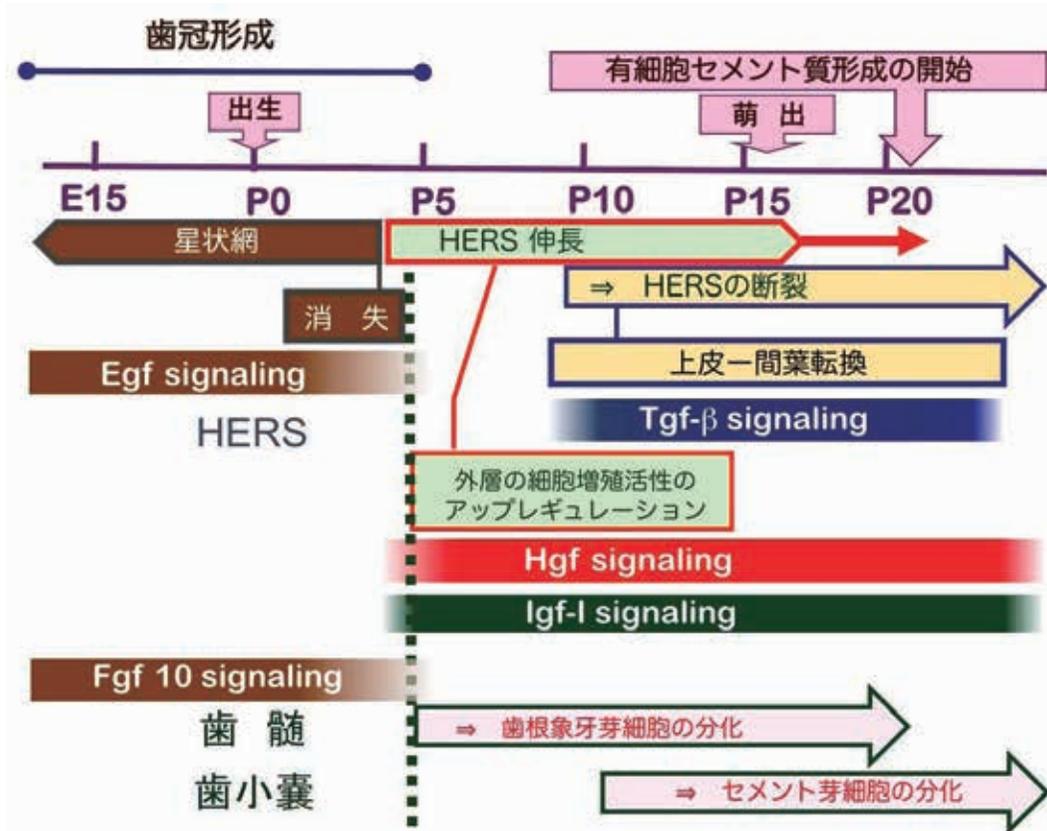


図4：歯根発達と関連する因子

歯根形成過程におけるHERSと成長因子の関係を示す。PN5d頃に、サービカルループの星状網に発現していたEgf、歯髄に発現していたFgf-10が消失すると歯冠形成が終了し、HERS形成が開始する。HgfとIgf-Iによって、HERS外層の細胞増殖がアップレギュレートして、HERSが伸長する。PN9d頃からHERSの歯冠側で断裂が生じる。HERSの断裂にはTgf- β の調節による上皮間葉転換が関係しているかもしれない。PN15d頃、歯が口腔内へ萌出し、PN21d頃から有細胞セメント質形成が開始するが、その間、上皮間葉相互作用により歯髄から象牙芽細胞、断裂したHERSの間に歯小囊細胞が進入し、セメント芽細胞が分化する。

引用文献

- 1) Jernvall, J. and Thesleff, I.: Tooth shape formation and tooth renewal: evolving with the same signals. *Development*, 139 : 3487-3497. 2012.
- 2) Thesleff, I.: Epithelial-mesenchymal signaling regulating tooth morphogenesis. *J. Cell Sci.*, 116 : 1647-1648. 2003.
- 3) Zeichner-David, M., Oishi, K., Su, Z., Zakartchenko, V., Chen, L.-S., Arzate, H. and Bringas Jr., P.: Role of Hertwig's epithelial root sheath cells in tooth root development. *Dev. Dyn.*, 228 : 651-663. 2003.
- 4) Luan, X., Ito, Y. and Diekwisch, T. G.: Evolution and development of Hertwig's epithelial root sheath. *Dev. Dyn.*, 235 : 1167-1180. 2006.
- 5) Reitan, K.: Behavior of Malassez' Epithelial Rests During Orthodontic Tooth Movement. *Acta Odontol. Scand.*, 19 : 443-468. 1961.
- 6) Sakano, M., Otsu, K., Fujiwara, N., Fukumoto, S., Yamada, A. and Harada, H.: Cell dynamics in cervical loop epithelium during transition from crown to root: implications for Hertwig's epithelial root sheath formation. *J. Periodontal Res.*, 48 : 262-267. 2012.
- 7) Yamamoto, H., Cho, S.-W., Kim, E.-J., Kim, J.-Y., Fujiwara, N. and Jung, H.-S.: Developmental properties of the Hertwig's epithelial root sheath in mice. *J. Dent. Res.*, 83 : 688-692. 2004.
- 8) Owens, P. D. A.: Ultrastructure of Hertwig's epithelial root sheath during early root development in premolar teeth in dogs. *Arch. Oral Biol.*, 23 : 91-104. 1978.
- 9) Slavkin, H. C., Bringas, P. J., Bessem, C., Santos, V., Nakamura, M., Hsu, M.-Y., Snead, M. L., Zeichner-David, M. and Fincham, A. G.: Hertwig's epithelial root sheath differentiation and initial cementum and bone formation during long-term organ culture of mouse mandibular first molars using serumless, chemically-defined medium. *J. Periodontal Res.*, 24 : 28-40. 1989.
- 10) Hammarström, L.: Enamel matrix, cementum development and regeneration. *J. Clin. Periodontol.*, 24 : 658-668. 1997.
- 11) Sonoyama, W., Seo, B. M., Yamaza, T. and Shi, S.: Human Hertwig's epithelial root sheath cells play crucial roles in cementum formation. *J. Dent. Res.*, 86 : 594-599. 2007.
- 12) Akimoto, T., Fujiwara, N., Kagiya, T., Otsu, K., Ishizeki, K. and Harada, H.: Establishment of Hertwig's epithelial root sheath cell line from cells involved in epithelial-mesenchymal transition. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 404 : 308-312. 2011.
- 13) Owens, P. D. A.: A light microscopic study of the development of the roots of premolar teeth in dogs. *Arch. Oral Biol.*, 19 : 525-538. 1974.
- 14) Fujiwara, N., Kagiya, T., Ishizeki, K. and Harada, H.: Molecular mechanisms regulating transition from crown to root formation in the development of mouse molars. *J. Oral Biosci.*, 50 : 154-159. 2008.
- 15) Luan, X., Ito, Y. and Diekwisch, T. G. H.: Evolution and development of Hertwig's epithelial root sheath. *Dev. Dyn.*, 235 : 1167-1180. 2006.
- 16) Kettunen, P., Laurikkala, J., Itäerinta, 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.
- 17) Harada, Y., Toyono, T., Toyoshima, K., Yamasaki, M., Itoh, N., Kato, S., Sekine, K. and Ohuchi, H.: FGF10 maintains stem cell compartment in developing mouse incisors. *Development*, 129 : 1533-1541. 2002.
- 18) 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.*, 147 : 105-120. 1999.
- 19) Ohshima, H., Nakasone, N., Hashimoto, E., Sakai, H., Nakamura-Ohshima, K. and Harada, H.: The eternal tooth germ is formed at the apical end of continuously growing teeth. *Archs. Oral Biol.*, 50 : 153-157. 2005.
- 20) 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 epithelial stem cell compartment, leads to the transition from crown to root formation. *Development* 133 : 1359-1366. 2006.
- 21) Cohen, S.: Isolation of a mouse submaxillary gland protein accelerating incisor eruption and eyelid opening in the new-born animal. *J. Biol. Chem.*, 237 : 1555-1562. 1962.
- 22) Hu, C.-C., Sakakura, Y., Sasano, Y., Shum, L., Bringas, P. J., Werb, Z. and Slavkin, H. C.: Endogenous epidermal growth factor regulates the timing and pattern of embryonic mouse molar tooth morphogenesis. *Int. J. Dev. Biol.*, 36 : 505-516. 1992.
- 23) Fujiwara, N., Akimoto, T., Otsu, K., Kagiya, T., Ishizeki, K. and Harada, H.: Reduction of Egf signaling decides transition from crown to root in the development of mouse molars. *J. Exp. Zool. B Mol. Dev. Evol.*, 312B : 486-494. 2009.
- 24) Tabata, M. J., Kim, K., Liu, J.-G., Yamashita, K., Matsumura, T., Kato, J., Iwamoto, M., Wakisaka, S., Matsumoto, K., Nakamura, T., Kumegawa, M. and Kurisu, K.: Hepatocyte growth factor is involved in the morphogenesis of tooth germ in

- murine molars. *Development*, 122 : 1243-1251. 1996.
- 25) Joseph, B. K., Harbrow, D. J., Sugerman, P. B., Smid, J. R., Savage, N. W. and Young, W. G.: Ameloblast apoptosis and IGF-1 receptor expression in the continuously erupting rat incisor model. *Apoptosis*, 4 : 441-447. 1999.
- 26) Nakatomi, M., Morita, I., Eto, K. and Ota, M. S.: Sonic hedgehog signaling is important in tooth root development. *J. Dent. Res.*, 85 : 427-431. 2006.
- 27) Symons, A. L., Leong, K., Waters, M. J. and Seymour, G. J. : The effect of growth hormone on root development in the rat mandibular molar. Eds. Davidovitch, Z and Norton, L.A. : *Biological Mechanisms of Tooth Movement and craniofacial adaptation*, EBSCO Media, Birmingham, USA, 449-457, 1996.
- 28) 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 elongation of the tooth root in mouse molars in vitro. *Cell Tissue Res.*, 320 : 69-75. 2005.
- 29) Sonnenberg, E., Weidner, K. M. and Birchmeier, C.: Expression of the met-receptor and its ligand, HGF-SF during mouse embryogenesis. *EXS*, 65 : 381-394. 1993.
- 30) Sakuraba, H., Fujiwara, N., Sasaki-Oikawa, A., Sakano, M., Tabata, Y., Otsu, K., Ishizeki, K. and Harada, H.: Hepatocyte growth factor stimulates root growth during the development of mouse molar teeth. *J. Periodontal Res.*, 47 : 81-88. 2011.
- 31) Kaneko, H., Hashimoto, S., Enokiya, Y., Ogiuchi, H. and Shimono, M.: Cell proliferation and death of Hertwig's epithelial root sheath in the rat. *Cell Tissue Res.*, 298 : 95-103. 1999.
- 32) Huang, X. F., Chai, Y.: TGF- β signalling and tooth development. *Chin. J. Dent. Res.*, 13 : 7-15. 2010.
- 33) Tummers, M. and Thesleff, I.: Observations on continuously growing roots of the sloth and the K14-Eda transgenic mice indicate that epithelial stem cells can give rise to both the ameloblast and root epithelium cell lineage creating distinct tooth patterns. *Evol. Dev.*, 10 : 187-195. 2008.
- 34) Huang, X., Bringas, P., Jr., Slavkin, H. C. and Chai, Y.: Fate of HERS during tooth root development. *Dev. Biol.*, 334 : 22-30. 2009.
- 35) Yamamoto, T., Domon, T., Takahashi, S., Anjuman, K. A. Y., Fukushima, C. and Wakita, M.: Mineralization process during acellular cementogenesis in rat molars: a histological and immunohistological study using fresh-frozen sections. *Histochem. Cell. Biol.*, 127 : 303-311. 2007.
- 36) Yamamoto, T., Yamada, T., Yamamoto, T., Hasegawa, T., Hongo, H., Oda, K. and Amizuka, N.: Hertwig's Epithelial Root Sheath Fate during Initial Cellular Cementogenesis in Rat Molars. *Acta Histochem. Cytochem.*, 48 : 95-101. 2015.