

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 清野 雄多  
学位 博士(歯学)  
学位記番号 新大院博(歯) 第467号  
学位授与の日付 令和2年3月23日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 Three-dimensional configuration of apical epithelial compartments including stem cell niches in guinea pig cheek teeth (モルモット臼歯における上皮幹細胞ニッチを含む形成端上皮コンパートメントの三次元立体構築)

論文審査委員 主査 教授 大島 勇人  
副査 教授 大峽 淳  
副査 教授 田沼 順一

### 博士論文の要旨

#### 【目的】

歯の発生は歯胚の上皮間葉相互作用を介して進行する。歯の形態はエナメル象牙境の形態を反映するが、その形態は歯胚上皮組織の形態によって決まる。つまり歯の形態は歯胚上皮細胞の増殖と分化により決定される。哺乳類は基本的に、切歯、犬歯、小臼歯、大臼歯を持つ。臼歯は線維性食物への適応として最も複雑な歯冠形態となり、さらに咬合に対して長冠歯と常生歯という表現型を獲得した。常生歯は生涯を通して伸び続ける歯で、齧歯類の切歯はその典型である。その矢状断では歯の発生のすべての過程(エナメル質形成と象牙質形成)を観察できる。

マウス切歯の形成端では発生中の歯胚が恒久的に維持されているが、上皮組織がヒトの頭のように丸い形態であることから apical bud と呼ばれ、幹細胞ニッチを提供することが知られている。ウサギ、モルモット、ハタネズミなどでは切歯だけでなく臼歯も常生歯であるが、臼歯での上皮組織形態と幹細胞ニッチとの関係は明らかになっていない。本研究ではモルモット臼歯を対象とし、アルカリ消化法を用いた走査電子顕微鏡法(SEM)、歯胚上皮幹細胞マーカーである Sox2 の免疫組織化学、組織三次元構築法により歯胚上皮組織形態と歯胚上皮幹細胞分布との関係を観察した。

#### 【方法】

4週齢モルモットに抱水クロラール(350mg/kg)を腹腔内投与し、深麻酔下で4%パラホルムアルデヒドによる灌流固定を行った。上下顎を取り出し、組織切片用の標本は10%EDTA(エチレンジアミン四酢酸)で4週間脱灰した。脱灰後、通常に従ってパラフィン包埋し、連続切片を作製した。次に121°C、5分間のオートクレーブ処理で抗原の賦活化を行い、抗マウス Sox2 抗体での免疫染色を施した。

得られた連続組織像を Photoshop 上で重ね合わせ、上皮組織の境界をトレースした。上皮領域を単色で塗りつぶした画像を image J へとインポートし、画像の厚みを付与することで立体化した。同手法で Sox2 陽性反応のみを抽出した立体像と上皮組織全体を重ねることで、Sox2 陽性細胞の分布を可視化した。

SEM用の未脱灰標本は、2.5%グルタルアルデヒドで12時間の追加固定を施し、30%KOH溶液(62-65°C)に8分間浸漬した。1%タンニン酸オスミウムで染色後、酢酸イソアミルで脱水、液体二酸化炭素で臨界点乾燥を施し、プラチナパラジウムを蒸着させた。

#### 【結果】

モルモット臼歯は常生歯であるため、咬合面は咬耗で平坦になる。咬合面は歯軸に直交する平面であるため、咬合面は水平断での組織切片と同様の外観を呈する。ただし臼歯自体が湾曲しており(下顎臼歯は頬側へ、上顎臼歯は口蓋側へ)、水平断が必ずしも歯軸と直交するわけではない。

モルモット臼歯の形態は複雑であり、水平断で見える象牙質はS字状あるいはジグザグ状で、頬舌的に深い溝が歯軸に沿って走る。下顎では、頬側の象牙質(歯冠アナログ象牙質)がエナメル質で覆われ、舌側の象牙質(歯根アナログ象牙質)がセメント質で覆われる。この位置関係は上下顎で逆転する。

SEMによる形成端の観察では、単純化のため臼歯を円柱としてみますと、上皮組織が外周を成し中心に歯乳頭が位置した。形成端の最も端では、上皮組織が屋根の軒のように歯乳頭側へせり出し、歯乳頭は上皮組織同士の間隙から観察された。しかし組織がひび割れ、歯胚上皮は部分的に欠如していたため、生体内での形態を観察することはできなかった。

水平断面組織切片では、M字状とΔ（デルタ）状の上皮組織が嵌合するように配向し、両者に挟まれるようにS字状の歯乳頭が位置する様態が観察された。

三次元立体構築像では、形成端の頂部には4箇所の隆部が見られたが、マウス切歯 apical bud ほどの明瞭な丸みはなかった。4つの隆部のうち、3箇所にはSox2 陽性細胞集団が局在した。また Sox2 陽性細胞の多くは形成端に局限したが、歯冠アナログ側と歯根アナログ側とで分布パターンが異なっていた。歯冠アナログ側の Sox2 陽性細胞が形成端に局限したのに対し、歯根アナログ側の陽性細胞、特に cervical loop や Hertwig's root sheath での陽性細胞はより形成端から離れた位置でも観察された。

#### 【考察】

モルモット臼歯の apical bud 相当部は、Sox2 陽性細胞を含む3箇所の歯胚上皮組織の隆部と考えられる。また歯冠アナログ側の Sox2 陽性細胞集団の方がより形成端に局限することから、歯冠アナログ側の歯胚上皮幹細胞の増殖と分化は歯根アナログ側よりも短期間で進行し、それに先立つ象牙質形成も歯冠アナログ側では速やかに進むことが予想される。以上により、類比的に異なる象牙質形成が歯の彎曲へ、歯胚上皮幹細胞の水平的な配向が複雑な断面形態へと寄与することが示唆された。

#### 審査結果の要旨

歯の形態形成メカニズムの解明は歯の再生を実現するための有効な方略である。これまで、歯の形態形成メカニズムの解明に常生歯であるマウス、ラット齧歯類切歯が用いられてきた。常生歯の形成端（ヒトの歯とは異なり、常生歯にはヒトの歯根に相当する構造がない）。そのため有根歯の根尖相当部を形成端と呼ぶ）には成層状においても幹細胞ニッチが維持されており、分子レベルで幹細胞維持機構やエナメル質形成及び象牙質形成メカニズムの解明が進められている。一方、ハタネズミ、ウサギ、モルモットなどの臼歯も常生歯であり、臼歯は類比的に入り組んだ複雑な形態をしているが、複雑な歯の形態と幹細胞ニッチとの関係は明らかになっていない。本研究は、三次元立体構築法を用いて三次元的な歯胚上皮組織の形態と幹細胞ニッチとの関係を明らかにしている。1つの幹細胞ニッチから1本の切歯様形態が作られ、複数の幹細胞ニッチからはジグザグの歯冠形態をもつ臼歯が作られることを解明した。

方法論として、本研究では形成端歯胚上皮の三次元的な観察にアルカリ消化電顕法を用いている。上皮三次元的構造を観察するためには、コラゲナーゼ処理により上皮と間葉を分離して、直接上皮を観察する方法があるが、モルモット臼歯の歯胚上皮は複雑な形態をしているために、うまく上皮と間葉を分離することができなかった。そこで今回はアルカリ消化走査電顕法を用い、歯胚上皮組織の三次元構造を直接観察することに成功した。アルカリ消化法の欠点は、組織が壊れやすくなる点である。実際今回の実験でも、組織が破壊のない完璧な上皮形態像を観察することが出来なかったが、不完全ながらも上皮組織形態を直接観察できたことは、三次元立体構築法の正確性の検証に大きく役立つことになる。本研究で用いた三次元立体構築法は、形成端上皮組織の三次元像ならびに三次元的な Sox2 発現パターンを確認することが出来た。本方法は、立体構築によるマクロレベルの三次元的形態解析に加え、ミクロレベルの観察も可能になる優れた解析方法であることが分かった。

幹細胞を含む上皮細胞塊は、齧歯類切歯の形成端 apical end に存在し、恒久的に蓄伏期、帽伏期、鐘伏期歯胚 tooth bud 様構造を含んでいるので、apical bud と呼ばれている。モルモット臼歯形成端における幹細胞ニッチを明らかにするためにブロモデオキシウリジン (BrdU) を用いた細胞自跡実験結果 (Arch Histol Cytol 71(5): 317-332, 2008.) では、幹細胞であると考えられる長期ラベル保持細胞がモルモット臼歯形成端の4つの上皮細胞塊に保持されていたが、BrdU 追跡実験の結果と、本研究での Sox2 の発現パターン解析により、上皮幹細胞ニッチ (apical bud) は、3つ存在すると考えるのが論理的であると考えるに至った。

以上、本研究結果は、三次元立体構築法を用いて三次元的な歯胚上皮組織の形態と幹細胞ニッチとの関係を明らかにしており、幹細胞ニッチの分布と複雑な歯冠形態との関係が明らかになり、モルモット臼歯が歯の形態形成メカニズム、ひいては歯の再生研究に繋がるモデル動物として有用であることが示され、学位論文としての価値を認める。