

ふりがな

氏名 橋本英美  
学位 博士(歯学)  
学位記番号 新大院博(歯)第100号  
学位授与の日付 平成19年3月22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

The crown shape of guinea pig molars is molded on arranged stem cell compartments, apical buds

(幹細胞を含むアピカル・バッドの配列がモルモット臼歯の歯冠形態を決める)

論文審査委員 主査 教授 大島 勇人  
副査 教授 齊藤 力  
教授 高木 律男

#### 博士論文の要旨

##### 【目的】

齧歯類切歯は常生歯であり、その形成端 apical end には歯胚 tooth bud が恒久的に維持されており、組織幹細胞を含むこの領域の歯胚上皮は apical bud と呼ばれている。この apical bud は豊富な星状網と基底細胞からなる歯胚上皮細胞群で、この部位を走査電子顕微鏡で観察すると、ヒトが頭をもたげた様な上皮の膨らみとして観察され、この上皮の膨らみには上皮組織幹細胞が存在することが明らかになっている。この様に常生歯形成端には幹細胞維持のための微小環境(ニッチ)が存在し、線維芽細胞増殖因子 fibroblast growth factor (FGF) シグナルによって維持されている。

常生歯は齧歯類切歯だけではなく、ウサギ、モルモット、ハタネズミ臼歯にも存在する。これらの動物の臼歯形成端にも齧歯類切歯と同様な上皮の膨らみが存在し、FGF シグナルが発現することが知られているが、組織幹細胞の局在については明らかにはなっていない。さらに、その複雑な臼歯形態と apical bud との関係は不明である。上皮幹細胞は非対称分裂をし、一方の娘細胞は一時的増幅細胞となり機能細胞であるエナメル芽細胞に分化するのに対し、もう一方の娘細胞は幹細胞として apical bud に残ることになる。したがって、DNA 合成期に増殖細胞の核内に取り込まれるプロモデオキシウリジン (BrdU) で増殖細胞をラベルした後に長期間ラベルされた細胞は一部の一時的増幅細胞と常生歯形成端ニッチに存在する幹細胞であると考えられる。

そこで今回我々は、常生歯であるモルモット臼歯における apical bud の存在を BrdU ラベリングにより明らかにし、複雑な臼歯形態との関連を検索したので報告する。

##### 【方法】

生後 1 日～4 週齢モルモットに麻酔下で BrdU を腹腔内投与し、2 時間、5 日後、10 日後、20 日後にアルデヒド系固定液にて灌流固定した。上下顎を摘出後、軟 X 線、マイクロ CT により臼歯の形態を三次元的に確認した後に EDTA で脱灰、脱水、パラフィン包埋後、通法に従い矢状断・水平断・前頭断切片を作製し、H-E 染色、抗 BrdU 抗体を用いた免疫染色標本作製した。また、新生仔モルモット臼歯歯胚を摘出し、コラゲナーゼ

処理後歯胚上皮を剥がし、脱水・臨界点乾燥・金蒸着後、形成端上皮を走査型電子顕微鏡にて観察した。

### 【結果および考察】

臼歯形成端水平断切片は、下顎では頬側(上顎では舌側)に2咬頭をもつ有根歯歯胚に類似した形態を示し、2つの咬頭の間には豊富な星状網からなるエナメル器が存在した。さらに形成端側を観察すると、下顎では頬側(上顎では舌側)の咬頭頂に相当する部位に2つの上皮塊が近心と遠心に存在した。一方、2咬頭をもつ有根歯歯胚様構造の咬合側の切片を観察すると、下顎では舌側(上顎では頬側)にさらに上皮塊が出現し多量の星状網を含んでいた。近遠心のヘルトビッチ上皮鞘は下顎では舌側(上顎では頬側)に伸び出して連続し、その結果、モルモット臼歯はジグザク状の象牙質の周囲をエナメル質で囲まれ、下顎では舌側に(上顎では頬側に)セメント質をもつ複雑な形態を示すことが明らかになった。

臼歯形成端の細胞増殖活性を観察すると、2時間のラベルでエナメル器、歯乳頭、ヘルトビッチ上皮鞘に BrdU 陽性細胞が数多く存在したが、5日、10日、20日のラベルでは BrdU 陽性細胞が咬合側へシフトしていった。20日のラベルにおいても形成端の4つの上皮細胞塊には BrdU 陽性細胞が残存し、これら BrdU 陽性細胞は組織幹細胞であると考えられた。したがって、モルモット臼歯形成端には、上皮組織幹細胞を含む mesial apical bud、distal apical bud、intercuspal apical bud、lingual (buccal) apical bud の4つの apical bud が存在することが明らかになった。これら apical bud の存在は走査型電子顕微鏡観察によっても確認された。

臼歯前頭断切片を観察すると、その近位部と遠位部は齧歯類切歯矢状断切片と同じ apical bud とヘルトビッチの上皮鞘の組み合わせの形態を示した。以上より、齧歯類切歯では apical bud が一つであり、水平断で丸い一つの咬頭が形づくられるのに対し、モルモット臼歯においては、頬舌側および近遠心に配列した4つの apical bud の存在によりジグザク状の臼歯の形態が形づくられることが明らかとなった。

すべての常生歯は FGF、Notch などのシグナルを共通して利用し幹細胞を維持していると考えられている。apical bud の維持・分化機構を解明することは、歯の再生医療具現化に有益な情報を与えることになるであろう。

## 審査結果の要旨

齧歯類切歯は常生歯であり、形成端での持続的細胞供給と切縁の咬耗によりその恒常性が維持されている。この形成端には組織幹細胞adult stem cellsが存在し、幹細胞維持に必要な微小環境(ニッチ)が維持されており、FGFやNotchシグナルが重要な役割を果たしていることが明らかになっている。また、筆者等は齧歯類切歯における組織幹細胞が存在する上皮細胞塊をapical budと呼ぶことを提唱している。

本研究は、複雑な形態をした常生歯であるモルモット臼歯における組織幹細胞の局在をプロモデオキシウリジン(BrdU)ラベリングにより明らかにし、その形成端には4つのapical budが存在することを示し、apical budの三次元的配列がモルモット臼歯の歯冠形態を決めることを明らかにした。BrdUラベリング法はトリチウムチミジン法と同様毛包のbulgeにおける幹細胞などの生体内における組織幹細胞の局在を明らかにする有効な方法であり、本研究ではチェイスの間隔を2時間から20日まで検索しており、組織幹細胞の局在を明確に示している。また、マイクロCT解析と水平断・矢状断・前頭断の三次元的切片作製法により、複雑なモルモット臼歯の形態を明確に示している点も特筆すべき点である。一方、前頭断切片において、部位により齧歯類切歯と同様な形態を示していることは大変興味深く、一つのapical budから一つの咬頭が形成されることが推測される。今後は、同じ常生歯臼歯をもつハタネズミについてもapical budの配列と歯冠形態との関係の解析が必要であり、幹細胞維持に働くシグナル分子の解明まで発展できると、幹細胞を利用した歯の再生研究への展開が期待できるであろう。

以上より、本研究は、卓越した形態学的手法を用いてモルモット臼歯における組織幹細胞の局在を免疫組織化学的に解明しており、常生歯におけるapical budの概念の普遍性を明らかにしたことに加え、複雑な形態をしたモルモット臼歯の歯冠形態がapical budの三次元的配列によって決まることを明らかにしており、学位論文としての価値を認める。