

歯胚の発育におけるVEGFとその受容体の発現

月田 秀夫 安部仁晴 中川敏浩

Immunohistochemical Localization of VEGF and VEGF Receptors in Developing Human Tooth Germ

Hideo TSUKIDA, Kimiharu AMBE and Toshihiro NAKAGAWA

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a major angiogenetic factor in both developmental and wound healing processes. Recent studies have shown the expression of VEGF mRNA in lung, kidney, heart, ovary and various organs. In order to clarify the role of VEGF in developing human tooth germ, the expression of VEGF and VEGF receptors (KDR/Flk-1 and Flt-1) were investigated on the mandibular deciduous central incisors by immunohistochemistry.

At fetal 12 weeks, immunoreactivity of VEGF was detected on many cells in the enamel organ, dental papilla and dental follicle. Immunoreactivity of VEGF in the dental papilla at fetal 14 weeks was localized at undifferentiated cells in adjacent inner enamel epithelium. As compared with immunoreactivity of VEGF at inner enamel epithelium, that of preameloblasts was weak at fetal 18 weeks. At fetal 21 weeks, ameloblasts and odontoblasts were positive for anti VEGF. Immunoreactivity of KDR/Flk-1 was similar to that of VEGF. However, it was not visible at ameloblasts and odontoblasts. Immunoreactivity of Flt-1 was not detected in tooth germ except endothelial cells penetrating dental papilla and dental follicle. It was localized on stratum intermedium and outer enamel epithelium at fetal 21 weeks.

These results suggest that VEGF, KDR/Flk-1 and Flt-1 are involved in the angiogenesis on developing tooth germ. In addition, VEGF, KDR/Flk-1 and Flt-1 may have an important role in the proliferation and differentiation of ameloblasts and odontoblasts in human tooth germ morphogenesis.

Key words : VEGF, KDR/Flk-1, Flt-1, tooth germ, human

緒 言

歯髓や歯周組織には多種の細胞が存在し、それらにさまざまな栄養や酸素を供給するため、多くの血管が侵入し、複雑な血管網を形成している。血管網の形成は歯胚の発生初期から開始され、血

管の侵入時期や歯の形態形成に伴う血管網の形成過程については、これまで色素注入法¹⁾や血管鋳型法を用いた電子顕微鏡観察^{2,3)}により、詳細に検討されている。

一方、血管内皮細胞の増殖促進および血管透過性亢進などの機能をもつ因子⁴⁾として発見された

受付：平成19年6月13日，受理：平成19年7月11日
奥羽大学歯学部生体構造学講座口腔組織学分野
(指導：山本茂久教授)

Division of Oral Histology, Department of Morphological Biology, Ohu University School of Dentistry
(Director : Prof. Shigehisa YAMAMOTO)

vascular endothelial growth factor (VEGF)は、個体発生における血管の発生^{5,6)}および成熟個体のリモデリング⁷⁾のほか、創傷治癒過程^{8,9)}や病的血管新生¹⁰⁻¹⁴⁾にも密接に関与している。VEGFは発見当初、血管周囲の平滑筋細胞や周皮細胞、腫瘍細胞で産生され、血管内皮細胞に特異的に作用すると考えられていたが、近年、肺¹⁵⁾や腎臓¹⁶⁾、心臓¹⁷⁾、卵巣¹⁸⁾などさまざまな組織でVEGF mRNAの発現が観察され、その局在と作用について詳細に研究され始めた。歯髓においてもVEGFの存在が確認され¹⁹⁾、培養細胞を用いた検索²⁰⁾からその役割が検討されている。しかし、歯胚の発育と血管構築におけるVEGFに関する研究はほとんどない。

そこで本研究では、歯胚の発育過程にVEGFおよびその受容体(VEGF receptor: VEGFR)がどのように関与しているかを解明する目的で、ヒト歯胚における局在とその推移を免疫組織化学的に検索した。

材料および方法

1. 研究材料

材料には、奥羽大学歯学部生体構造学講座所蔵のヒト胎児下顎乳中切歯歯胚を使用した。観察期間は、歯胚の帽状期である胎齢12週齢から14、16週齢および硬組織形成のみられる胎齢18、21週齢(鐘状期後期)までとした。なお胎齢は体重を考慮のうえ、国友の座高表²¹⁾を参考に決定した。

2. 研究方法

標本の作製手順は、まず下顎骨を摘出し、乳中切歯部に相当する部位のみをトリミングした後、10%中性ホルマリン緩衝液にて浸漬固定を行った。各試料を10%EDTA-2Na水溶液にて脱灰後、30%ショ糖液にて氷結防止処理を行い、Tissue Mount(白井松器機、東京)に包埋、液体窒素で急速凍結し、クリオスタット(MICROM, Germany)にて厚さ10 μ mの連続切片を作製した。

凍結切片を0.3% H_2O_2 含有メタノール溶液にて10分間処理し、内因性ペルオキシダーゼを不活性化した。次いで、10%正常ウサギ血清(HISTOFINE SAB-PO Kit, ニチレイ, 東京)にて10分間、ブロッキング処理を行い、一次抗体を反応させた。

本研究に使用した一次抗体は、rabbit anti human VEGF (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Cat # sc-152, CA, USA)、VEGFR I型であるmouse anti rabbit Flt-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Cat # sc-316, CA, USA)、II型のmouse anti human KDR/Flk-1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Cat # sc-6251, CA, USA)、血管の分布状況を検出するためにmouse anti human CD31 (CHEMICON, International, Inc. Cat # SCR023-2003788, CA, USA)の4種類を用い、それぞれ10時間反応させた。

次に、二次抗体としてbiotinylated anti rabbit mouse immunoglobulin (HISTOFINE SAB-PO Kit, ニチレイ, 東京)を30分間、その後peroxidase標識streptavidin (HISTOFINE SAB-PO Kit, ニチレイ, 東京)を15分間反応させた。0.3% H_2O_2 を含む0.05%3,3-diaminobenzidinetetrahydrochloride(DAB)溶液(0.05M Tris-HCl緩衝液pH7.6)にて発色を行い、5% methyl green(武藤化学薬品, 東京)にて核染後、顕微鏡観察を行った。また、切片の洗浄および抗血清の希釈には0.05M Tris-HCl緩衝液(pH7.6)を用いた。

対照実験は、一次抗体のかわりに正常ヤギ血清(DAKO Corp., CA, USA)を用いて同様の反応を行った。

なお、本研究の計画立案および遂行は、奥羽大学倫理審査委員会の承認を得て施行した。

結 果

1. 胎生12週齢

胎生12週齢において、下顎乳中切歯歯胚は口腔粘膜上皮から続く歯堤が増殖しエナメル器を形成、エナメル器の中央が陥入し歯乳頭もみられ、これらを取り巻く歯小嚢が区別でき、歯胚の発生における帽状期に相当していた。血管の分布は歯小嚢に散在しており、歯乳頭にも侵入するものも観察された(図1-a)。

抗VEGFの反応は、内外エナメル上皮およびエナメル髓といったエナメル器を構成するすべての細胞に陽性反応が確認された。また、歯乳頭や歯小嚢にも多くの抗VEGF陽性細胞が存在していた(図1-b)。

KDR/Flk-1の局在は、VEGFの局在とほぼ一致するようにエナメル器、歯乳頭および歯小囊に観察された。歯乳頭では侵入した血管にもKDR/Flk-1の局在が観察されたが、血管以外にも多くの抗KDR/Flk-1陽性細胞が認められた(図1-c)。

一方、Flt-1の局在は歯胚を構成する各部にはみられず、歯胚の周囲に分布する一部の血管にのみみられた(図1-d)。

2. 胎生14週齢

エナメル器の陥入はさらに進み、内エナメル上皮とエナメル髓の間には中間層が形成され、鐘状期の特徴を示していた。血管の分布は12日齢と同様に歯小囊では疎であったが、歯乳頭中央部まで侵入する血管が増加していた(図2-a, 3-a)。

VEGFの局在は、内外エナメル上皮、エナメル髓および中間層に観察され、間葉組織でも歯乳頭、歯小囊にその局在が観察された(図2-b)。歯乳頭における抗VEGF抗体の反応性は、表層の細胞で強い傾向がみられた。また歯乳頭内に侵入する血管内皮細胞にもVEGFの局在が観察された(図3-b)。

KDR/Flk-1はVEGFとほぼ同様の局在を示し、中間層を含むエナメル器、歯乳頭および歯小囊にみられた。歯乳頭における抗KDR/Flk-1抗体の反応性は、表層の細胞で強い陽性反応が確認された。歯胚周囲の血管や歯乳頭に侵入する血管でもKDR/Flk-1の局在が観察された(図2-c, 3-c)。

これらに対してFlt-1の局在は、12週齢と同様に歯胚周囲の血管ではみられるものの、歯胚では明瞭な局在は認められなかった(図2-d)。しかし、中間層の一部と歯乳頭に侵入する口径の大きい血管では弱い抗Flt-1陽性反応がみられた(図3-d)。

3. 胎生16週齢

歯胚は増大し、歯乳頭は下顎乳中切歯の外形を呈するように陥入していた。血管の分布は歯胚下部の歯小囊に多数密集しており、歯乳頭切端側では内エナメル上皮に近接するものもみられた(図4-a, 図5-a)。

VEGFの局在はエナメル器で顕著であり、外エナメル上皮やエナメル髓では抗VEGF抗体による

反応性は弱いものの、内エナメル上皮や中間層では強い陽性反応が確認された。歯乳頭の切端側に、多くの抗VEGF陽性細胞がみられ、抗VEGF陽性を示す血管が14週齢に比べ増加した(図4-b, 図5-b)。

KDR/Flk-1とVEGFの局在に差異はみられず、KDR/Flk-1の局在は内エナメル上皮、中間層および歯乳頭の切端側の細胞に多く観察された。また、歯乳頭に侵入する血管にもKDR/Flk-1の局在がみられた(図4-c, 図5-c)。

Flt-1の局在はこれまでと同様に中間層にみられたが、歯乳頭において抗Flt-1陽性を示す血管が増加していた(図4-d, 図5-d)。

4. 胎生18週齢

切端部において硬組織の形成が開始しており、これに伴い象牙芽細胞が分化、内エナメル上皮は円柱状から高円柱状へと形態変化していた。血管の分布は16週齢と同様に、歯胚下部の歯小囊で多く、上部では疎であった。また、歯乳頭に侵入する血管は象牙芽細胞直下まで分布していた(図6-a, 図7-a)。

抗VEGF抗体の反応は、中間層や内エナメル上皮に依然として強い陽性反応を認めたが、切端部において内エナメル上皮の形態が高円柱状を呈する細胞での反応性は低下していた。歯乳頭におけるVEGFの局在は、表層の未分化な細胞に多く観察され、切端側では象牙芽細胞にもVEGFの局在が観察された(図6-b, 図7-b)。

抗KDR/Flk-1抗体による反応においても内エナメル上皮や中間層では強い陽性反応がみられたが、高円柱状を呈した内エナメル上皮の細胞で反応性は低下していた。歯乳頭では血管と未分化な細胞に散在性にKDR/Flk-1の局在がみられたが、象牙芽細胞ではKDR/Flk-1の局在は観察されなかった(図6-c, 図7-c)。

一方、Flt-1の局在は中間層および歯乳頭内では口径の大きい血管にのみ限局していた(図6-d, 図7-d)。

5. 胎生21週齢

切端部でのエナメル質、象牙質形成はさらに進行していた。歯胚周囲には多数の血管が分布しており、特に歯胚下部や上部で18週齢に比べ、その

数は増加していた(図8-a)。歯乳頭に侵入した血管は切端部で分岐し、象牙芽細胞間にまで達するものも観察された。歯胚上部でも血管が多数観察され、外エナメル上皮に接する血管が増加していた(図9-a)。

内エナメル上皮における抗VEGF抗体の反応は、高円柱状の部位では反応性は弱いものの、エナメル芽細胞では反応性は若干増強していた。中間層における抗VEGF抗体の反応は、18週齢と同様に陽性反応が観察され、外エナメル上皮では分布する血管と外エナメル上皮に抗VEGF抗体による強い陽性反応が確認された。また、18週齢と同様に抗VEGF陽性を示す象牙芽細胞が多数観察され、血管や一部未分化な細胞にもVEGFの局在がみられた(図8-b, 図9-b)。

KDR/Flk-1の局在はVEGFとは異なり、象牙芽細胞やエナメル芽細胞では明瞭には観察されず、中間層と外エナメル上皮で抗KDR/Flk-1陽性反応が強くみられた。歯乳頭に分布する血管にもKDR/Flk-1の局在がみられたが、特に切端部で象牙芽細胞に達する微細な血管にKDR/Flk-1の局在が観察された(図8-c, 図9-c)。

Flt-1の局在は外エナメル上皮と中間層に観察され、歯胚周囲や歯乳頭に分布する血管でもその局在が確認された。特に歯胚上部の外エナメル上皮で反応性が強い傾向であった。しかし、切端部ではKDR/Flk-1とは異なり、微細な血管では抗Flt-1抗体による陽性反応はみられず、口径の大きな血管にのみ陽性反応が局限していた(図8-d, 図9-d)。

なお、増齢に伴うVEGF, KDR/Flk-1, Flt-1の局在の推移を表1に示す。

考 察

近年、VEGFとFlt-1およびKDR/Flk-1の発現は血管内皮細胞にとどまらず、肺¹⁵⁾をはじめとして生体の多くの組織、器官¹⁶⁻¹⁹⁾で観察されることが報告された。また、胎生期においてもVEGFとその受容体の発現⁹⁾が確認され、その機能について検討されている。その結果、VEGFの生物学的作用は血管新生のみならず、血管の誘導や血管内皮細胞以外の細胞の増殖や分化といった多岐にわ

ることが明らかにされ始めた。

歯と歯周組織には生体防御や栄養の供給源として多くの血管が侵入し、複雑な血管網を形成する。この血管網の形成過程については、色素注入法¹⁾や血管鋳型法を用いた電子顕微鏡観察^{2,3)}により、歯胚発生時より詳細に検討されてきた。しかし、歯胚の形成過程における血管の侵入と血管網の形成に関与する因子やその動態に関する研究はほとんどないのが現状である。そこで、本研究では歯胚の発育における、血管の新生過程や歯胚を構成する各種細胞の増殖・分化に、VEGFとその受容体がどのように関与するかに重点をおき、ヒト歯胚を用い検討を行った。

今回、ヒト下顎乳中切歯歯胚の発育過程におけるVEGF, KDR/Flk-1およびFlt-1の局在を時系列的に観察した結果、歯胚の発生初期である胎生12週齢よりエナメル器、歯乳頭、歯小囊の多くの細胞にVEGFとKDR/Flk-1の局在が観察された。VEGFとKDR/Flk-1の局在は類似した傾向を示し、12週齢以降、内外エナメル上皮、エナメル髓、中間層といったエナメル器を構成するすべてに両者の局在がみられたが、内エナメル上皮の形態変化に伴い、両者の反応性は低下した。また、歯乳頭では歯胚の発育に伴い、VEGFとKDR/Flk-1は歯乳頭表層の細胞に多く観察されるようになり、その後内エナメル上皮に近接する細胞に局限するようになった。歯小囊においても、増齢に伴い両者の局在は減少した。この結果は、歯胚の大きさの増大する時期と一致し、歯乳頭の細胞が増殖しエナメル器に深く陥入する部位とも一致する。したがって、VEGFとKDR/Flk-1の両者は歯胚の発生初期には、エナメル器、歯乳頭および歯小囊といった歯胚を構成するすべての細胞の増殖に広範囲に関連することが、本研究結果より明らかとなった。

歯胚の発育は胎生18週齢では石灰化が開始され、切端部では細胞は増殖から分化へと移行する。18週齢におけるVEGFとKDR/Flk-1の局在は、内エナメル上皮では円柱状から高円柱状へと形態変化した細胞で両者の反応性は低下した。歯乳頭では内エナメル上皮に近接する細胞にVEGFとKDR/Flk-1の局在が局限した。この両者の局在

と反応性は、単に内エナメル上皮細胞や歯乳頭細胞の増殖にとどまらず、エナメル芽細胞や象牙芽細胞の分化にも関連性をもつ可能性が伺える所見ともいえよう。VEGFとKDR/Flk-1が細胞の分化に関与することは、骨芽細胞²²⁾、心筋細胞¹⁷⁾をはじめ肺¹⁵⁾や眼²³⁾など*in vitro*、*in vivo*の検索から多数報告されている。歯髄においても*in vitro*の検索から、歯髄細胞の分化にVEGFが関与することが報告²⁴⁾されている。これらの報告と本研究結果から、VEGFとレセプターであるKDR/Flk-1のシグナル伝達により、内エナメル上皮のエナメル芽細胞への分化、歯乳頭細胞の象牙芽細胞への分化の一役を担う可能性が示唆された。

VEGFは血管内皮細胞に特異的に作用する増殖因子として発見された。その後、VEGFは臍帯静脈内皮細胞や大動脈由来内皮細胞、副腎皮質由来内皮細胞などすべての内皮細胞に増殖活性が認められ²⁵⁾、血管新生における主要な蛋白として、各分野において研究がなされている。血管新生は個体発生時のみならず成熟個体におけるリモデリング、創傷治癒過程のほか腫瘍細胞の増殖、糖尿病性網膜症¹⁰⁾などのさまざまな疾患においてみられる現象である。これらの観点から近年、基礎的研究のみならず臨床応用の分野にまでVEGFは用いられ、その受容体であるKDR/Flk-1による血管新生阻害剤^{26,27)}の開発も試みられている。

本研究では、歯胚における血管新生および血管網の形成に、VEGFがどのように関与するのか、歯胚に存在する血管を抗CD31抗体にて検出し、比較検討した。その結果、胎生12週齢の帽状期の歯胚で歯乳頭に侵入する血管が確認できた。連続切片での結果から12週齢に歯乳頭に侵入する血管では、VEGFおよびKDR/Flk-1の局在が観察された。その後、増齢に伴い歯乳頭内の血管数は増加、硬組織形成時には象牙芽細胞にまで達する血管網を形成していた。この血管網のほぼすべてにおいてVEGFとKDR/Flk-1の発現が観察された。また、VEGFの受容体としてKDR/Flk-1のほかFlt-1があり、KDR/Flk-1と同様にVEGFのシグナル伝達に関与する⁹⁾。Flt-1の局在は胎生12週齢の歯胚には観察されず、その後血管の増加に伴い、口径の大きいもののみにもみられた。この

ことからKDR/Flk-1とFlt-1の二種類の受容体が、歯胚の血管侵入と血管網形成においても、VEGFのシグナルを調節していることが明らかになった。

一方、胎生18週齢より象牙芽細胞にVEGFの局在がみられたが、KDR/Flk-1とFlt-1の局在は確認されなかった。この結果は象牙芽細胞がVEGFを産生、放出し、受容体であるKDR/Flk-1を発現する血管内皮細胞がパラクライン機構によりVEGFを受け取り、シグナルを伝達すると考えられる。すなわち、歯乳頭細胞から分化した象牙芽細胞が象牙質を形成するためには、リン酸塩やカルシウムなどの栄養が必要であり、その供給源として血管とのコンタクトは必須である。したがって、象牙質形成を開始した象牙芽細胞は、供給源である血管を急速に必要とし、血管の新生や誘導をもたらすシグナルを発すると考える。多くの組織、器官^{15~19)}や腫瘍組織^{10~14)}で観察される血管新生と同様に、象牙芽細胞がVEGFを発現して血管の誘導を行うことが本研究により示された。この血管の誘導に関しては、歯胚の発生初期における歯乳頭細胞でのVEGF発現も関連する可能性は否定できない。この点については、VEGFを分泌する細胞と受容体をもつ細胞を時系列的に観察し、起こる事象を観察できる器官培養法などの応用が必要であろう。

一方、エナメル芽細胞がエナメル質を形成する機序は、象牙質やセメント質、骨などの他の硬組織形成とは大きく異なる。エナメル芽細胞がエナメル質を形成するための栄養の供給源や無機成分の貯蔵と輸送など現在も不明な点がみられる²⁸⁾。また、エナメル質の形成過程も生物種によって一致をみないため、この分野の研究を妨げる一要因となっている²⁸⁾。

本研究においても観察期間当初よりエナメル器各部に強いVEGFとKDR/Flk-1の発現が観察され持続していた。先にも述べたように、両者は歯胚の発生初期にはエナメル器を構成する細胞の主に増殖に、オートクライン的に働くと考えられるが、分化したエナメル芽細胞、中間層および外エナメル上皮では、胎生21週齢において各蛋白の局在が観察された。21週齢における血管の分布は、切端部付近の外エナメル上皮に隣接した部位に密

表1 ヒト歯胚の発育におけるVEGFおよび受容体の局在

週 齢		12	14	18	21
		V KDR Flt	V KDR Flt	V KDR Flt	V KDR Flt
エナメル器	外エナメル上皮	+ + -	+ + -	+ + -	++ + +
	エナメル髓	+ + -	+ + -	+ + -	± ± -
	中間層		+ + ±	+ + ±	+ + ±
	内エナメル上皮	+ + -	+ + -	± ± -	± ± -
	エナメル芽細胞				+ - -
歯乳頭	表層	+ + -	++ ++ -	+ + -	± ± -
	象牙芽細胞			+ - -	+ - -
	中央部	+ + -	+ + -	+ + -	± ± -
歯小囊		+ + -	+ + -	± ± -	± ± -

V: VEGF KDR: KDR/Flk-1 Flt: Flt-1

-: 陰性 ±: 弱陽性 +: 陽性 ++: 強陽性

集しており、外エナメル上皮とエナメル芽細胞との距離は、エナメル髓の退縮により近接した形態をとる。げっ歯類の歯胚^{1,2)}では石灰化期に、血管は外エナメル上皮より侵入し、中間層付近で血管網を形成、エナメル芽細胞に栄養を供給することが知られている。種は異なるが、ヒトにおいてもエナメル芽細胞の栄養の供給は、外部血管より補われていると考えられている²⁸⁾。このことを裏付ける結果が、切端部の外エナメル上皮におけるVEGF, KDR/Flk-1, Flt-1の局在であり、これら蛋白の発現により血管の誘導および増殖、血管新生の過程が惹起されるものとする。

また、中間層の役割であるが、中間層はエナメル芽細胞と連携をとり、エナメル質を形成することがアルカリフォスファターゼ活性²⁹⁾やCa-AT-Pase³⁰⁾による検索から考えられている。一方、Flt-1をアフリカツメガエルの卵細胞に強発現させ、VEGFで刺激すると細胞内に保持されていたCa²⁺の細胞外への流出が観察され、ある条件下ではFlt-1から細胞膜のカルシウム輸送系へ、シグナルが伝達されることが報告³¹⁾された。この報告からみても中間層でのVEGF, KDR/Flk-1, Flt-1の発現は、血管の誘導に関連するのみならず、中間層細胞がエナメル芽細胞へのカルシウムを含む多くの物質供給の仲介を担う可能性が考えられる。

エナメル質形成を開始したエナメル芽細胞において、再び抗VEGF抗体による反応性が增強した。この結果については、上述した中間層における物質供給に関連する因子として働くのか、または一時的にエナメル質内にVEGFを分泌するのか、今後、観察期間の延長やエナメル質の詳細な成分分析等の検討をする必要性がある。

本研究より、エナメル芽細胞や象牙芽細胞の栄養供給路としての血管を増加、配列するために、VEGFとその受容体が重要であることが明らかとなった。また、エナメル質では、外エナメル上皮に近接する血管から中間層を介して、エナメル芽細胞に無機成分やエネルギーを供給するためにVEGF, KDR/Flk-1およびFlt-1のシグナル伝達に関連することが示唆された。

結 論

胎生12週齢から21週齢までのヒト下顎乳中切歯歯胚の成長発育におけるVEGFおよびその受容体の局在について免疫組織化学的に検索し、以下の結論を得た。

1. VEGFの局在は、歯胚の発生初期ではエナメル器、歯乳頭、歯小囊に広範囲に観察されたが、内エナメル上皮の分化に伴い抗VEGFの陽性反応は減弱し、エナメル芽細胞では弱陽性であった。また、象牙芽細胞にもVEGFの局在が観察された。

2. KDR/Flk-1の局在は、VEGFとほぼ類似した傾向を示したが、エナメル芽細胞、象牙芽細胞では観察されなかった。

3. Flt-1の局在は、歯胚の発生初期では歯胚周囲の血管および歯乳頭に侵入する血管に観察された。その後、歯胚の発育に伴い血管以外にも中間層や外エナメル上皮にFlt-1の局在が観察された。

以上のことから、VEGFとKDR/Flk-1はヒト下顎乳中切歯歯胚の発育過程において、初期の細胞増殖やエナメル芽細胞、象牙芽細胞への分化に関連する可能性が示唆された。加えて、VEGF、KDR/Flk-1およびFlt-1は歯胚の血管新生にも深く関連すること、特に象牙芽細胞やエナメル芽細胞の栄養供給源としての血管誘導を行うことが示された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導、御校閲を賜りました奥羽大学歯学部生体構造学講座口腔組織学分野山本茂久教授に深甚なる謝意を表します。また、本研究を遂行するにあたり、御協力をいただいた教職員各位に感謝いたします。

本論文の要旨は、日本解剖学会第52回東北・北海道連合支部学術集会（平成18年9月 秋田市）、第42回奥羽大学歯学会（平成18年11月 郡山市）において発表した。

文 献

- 1) Yoshida, S., Ohshima, H. and Kobayashi, S. : Vascularization of the enamel organ in developing molar teeth of rats -Scanning electron microscope study of corrosion casts-. *Okajimas Folia Anat Jpn* **66** ; 99-112 1989.
- 2) Decker, J. D. : The development of a vascular supply to the rat molar enamel organ. An electron microscopic study. *Arch Oral Biol* **12** ; 453-458 1967.
- 3) Takahashi, K. : Vascular architecture of dog pulp using corrosion resin cast examined under a scanning electron microscope. *J Dent Res* **64** ; 579-584 1985.
- 4) 渋谷正史 : 血管内皮増殖因子VEGFの作用機構. *実験医学* **22** ; 1056-1062 2004.
- 5) Dumont, D. J., Fong, G. H., Puri, M. C., Gradwohl, G. *et al.* : Vascularization of the mouse embryo : a study of flk-1, tek, tie, and vascular endothelial growth factor expression during development. *Dev Dyn* **203** ; 80-92 1995.
- 6) Shalaby, F., Rossant, J., Yamaguchi, T. P., Gertsenshtein, M. *et al.* : Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1 deficient mice. *Nature* **376** ; 62-66 1995.
- 7) 森 成志 : 延長仮骨形成における血管内皮細胞増殖因子及び受容体の発現. *近大医誌* **26** ; 127-138 2001.
- 8) Akita, S., Daian, T., Ishihara, H., Fujii, T. *et al.* : Leukemia inhibitory factor-transfected embryonic fibroblasts and vascular endothelial growth factor successfully improve the skin substitute wound healing by increasing angiogenesis and matrix production. *J Dermatological Sci* **36** ; 11-23 2004.
- 9) Noda, Y. : Spatial and temporal expression of vascular endothelial growth factor, angiopoietin-1, and angiopoietin-2 proteins during wound healing in rat skin : the relationship between vascular growth and regression. *京都医誌* **110** ; 59-71 2001.
- 10) 井藤英喜 : 血管新生とその病態的意義. *最新医学* **50** ; 1121-1125 1995.
- 11) Arita, K., Kurisu, K., Tominaga, A., Sugiyama, K. *et al.* : Relationship between intratumoral hemorrhage and overexpression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in pituitary adenoma. *Hiroshima J Med Sci* **53** ; 23-27 2004.
- 12) 島村 健, 齊藤 聡, 松本修平, 桐越博史ほか : 肝細胞癌におけるVEGF及びVEGF receptor (KDR及びflt-1) mRNAの発現の検討. *肝臓* **40** ; 262 1999.
- 13) 原田嘉和 : 大腸癌予後因子としての血管内皮増殖因子及びその受容体KDR (kinase domain-containing receptor)/Flk-1 (fetal liver-kinase-1) の発現の意義. *久留米医会誌* **65** ; 287 2002.
- 14) 山田英史 : 子宮体癌におけるVEGF (vascular endothelial growth factor) 産生と筋層浸潤度との関連性. *愛知医大誌* **27** ; 5-6 1999.
- 15) Marszalek, A., Daa, T., Kashima, K., Nakayama, I. *et al.* : Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in the developing rat lung. *Jpn J Physiol* **51** ; 313-318 2001.
- 16) 黒田忠敏, 茂呂修啓, 根本則道, 牛山 寿ほか : ヒト胎児腎の形態形成とbasic Fibroblast Growth Factor (bFGF), FGF-receptor (FGFR) 及びVascular Endothelial Growth Factor (VEGF) の発現. *日臨電顕誌* **31** ; S94 1998.
- 17) 飯田みどり, 平家俊男, 吉本桃子, 中畑龍俊 : マウス胚性幹細胞を用いた心筋細胞分化機構解明の試み. *炎症・再生* **22** ; 145-151 2002.

- 18) 石井康徳：ヒト卵巣腫瘍ならびに類腫瘍病変における血管内皮増殖因子(VEGF)の発現とそのサブタイプの発現様式およびその受容体について. 日産婦人科誌 **47**; 133-140 1995.
- 19) Matsushita, K., Motani, R., Sakuta, T., Yamaguchi, N. *et al.* : The role of vascular endothelial cell growth factor in human dental pulp cells : induction of chemotaxis, proliferation, and differentiation and activation of the AP-1-dependent signaling pathway. *J Dent Res* **79**; 1596-1603 2000.
- 20) 達山祥子：ヒト歯髓細胞における血管内皮増殖因子の役割—マトリックスメタロプロテアーゼ(MMP-1, -3) および、細胞外基質タンパクtenascinの発現誘導とそのメカニズム—. 日歯保存誌 **45**; 68-81 2002.
- 21) 国友 鼎：日本人胎児の月経年齢 身長および体重について. 日学術協報 **4**; 670-674 1928.
- 22) Deckers, M. M., Karperien, M., Yamashita, T., Papapoulos, S. E. *et al.* : Expression of vascular endothelial growth factors and their receptors during osteoblast differentiation. *Endocrinology* **141**; 1667-1674 2000.
- 23) Ueda, H., Kashiwagi, K. and Iizuka, Y. : Vascular endothelial growth factor and its receptors expression in the rat eye. *Acta Histochemica Cytochemica* **34**; 329-335 2001.
- 24) 茂谷理恵, 松下健二, 作田哲也, 諏訪素子ほか：ヒト歯髓細胞における血管内皮増殖因子の動態. 日歯保存誌 **40**; 1121-1130 1994.
- 25) Gospodarowicz, D., Abraham, J. A. and Schilling, J. : Isolation and characterization of a vascular endothelial cell mitogen produced by pituitary-derived folliculo stellate cells. *Proc. Natl Acad Sci USA* **86**; 7311-7315 1989.
- 26) Akamoto, T., Sasaki, M., Kuno, T. and Tamaki, N. : Flk-1 specific kinase inhibitor (SU5416) inhibited the growth of GS-9L glioma in rat brain and prolonged the survival. *Kobe J Med Sci* **47**; 181-191 2001.
- 27) 小畑 亮, 高橋秀徳, 柳 靖雄, 玉置泰裕：KDR阻害薬の脈絡膜新生血管抑制効果. 日本眼科誌 **110**; 198 2006.
- 28) Nanci, A. : Enamel : Composition, Formation, and Structure. *Ten Cate's Oral Histology* (Ed, Nanci, A.) 6th Ed ; 145-191 Mosby Press St. Louis 2003.
- 29) Ten Cate, A. R. : The distribution of alkaline phosphatase in the human tooth germ. *Archs Oral Biol* **17**; 155-163 1972.
- 30) Sasaki, T. and Garant, P. R. : Mitochondrial migration and Ca-ATPase modulation in secretory ameloblasts of fasted and calcium-loaded rat. *Am J Anat* **179**; 116-130 1987.
- 31) Vries, C. De, Escobedo, J. A., Ueno, H., Houck, K. *et al.* : The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* **255**; 989-991 1992.
- 著者への連絡先：月田秀夫, (〒963-8611) 郡山市富田町字三角堂31-1 奥羽大学歯学部生体構造学講座口腔組織学分野
Reprint requests : Hideo TSUKIDA, Division of Oral Histology, Department of Morphological Biology, Ohu University School of Dentistry
31-1 Misumido, Tomita, Koriyama, 963-8611, Japan

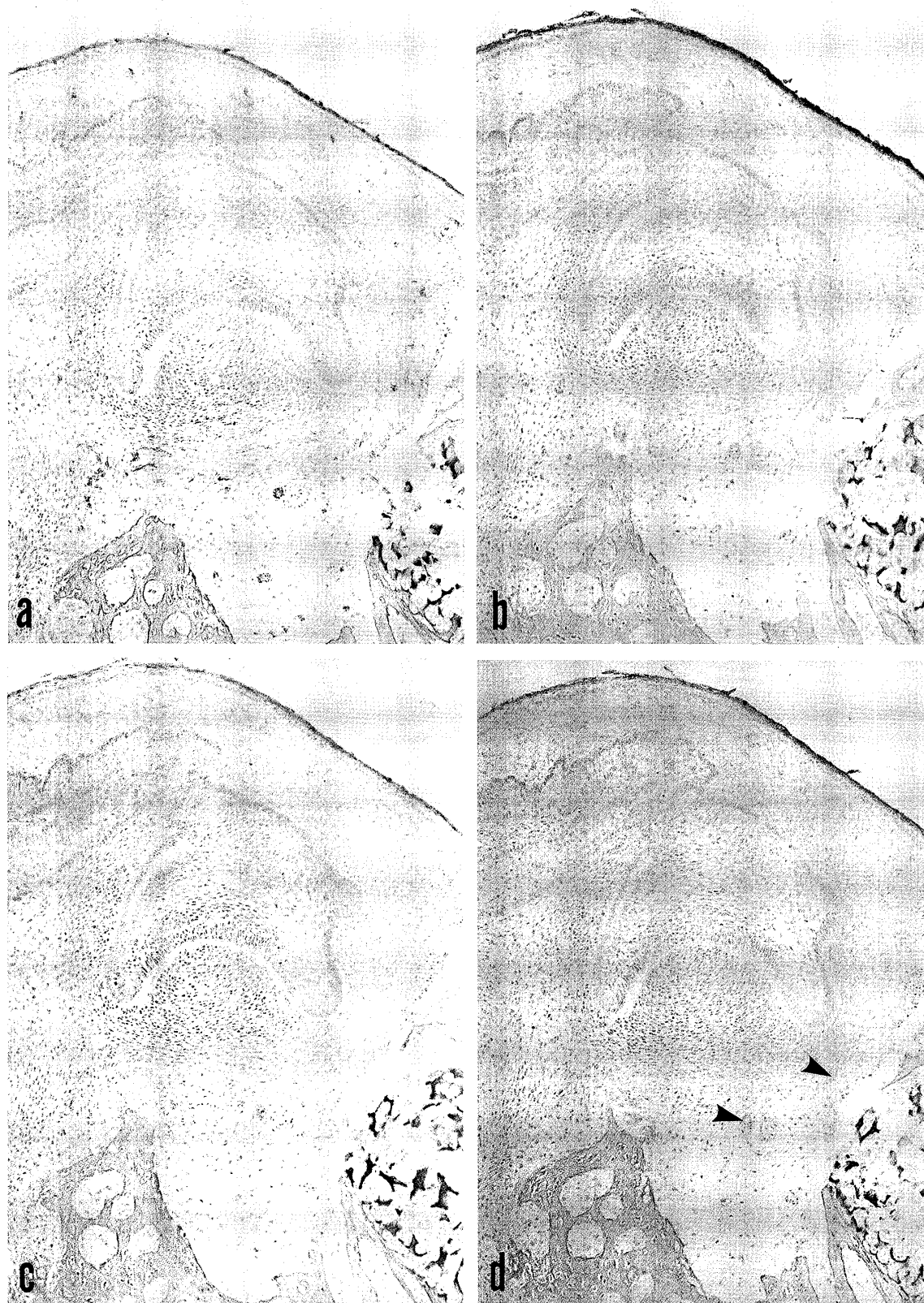


図1 胎生12週齢 下顎乳中切歯歯胚 ×10

- a : エナメル器中央が陥入し歯乳頭を形成，血管の分布は歯小嚢に散在しており，歯乳頭内に侵入するものも観察される。
- b : VEGFの局在は，エナメル器や歯乳頭，歯小嚢の多くの細胞にみられる。
- c : KDR/Flk-1の局在はVEGFと同様にエナメル器，歯乳頭，歯小嚢に観察される。
- d : Flt-1の局在は歯胚ではみられないが，一部周囲の血管（矢頭）にのみ観察される。

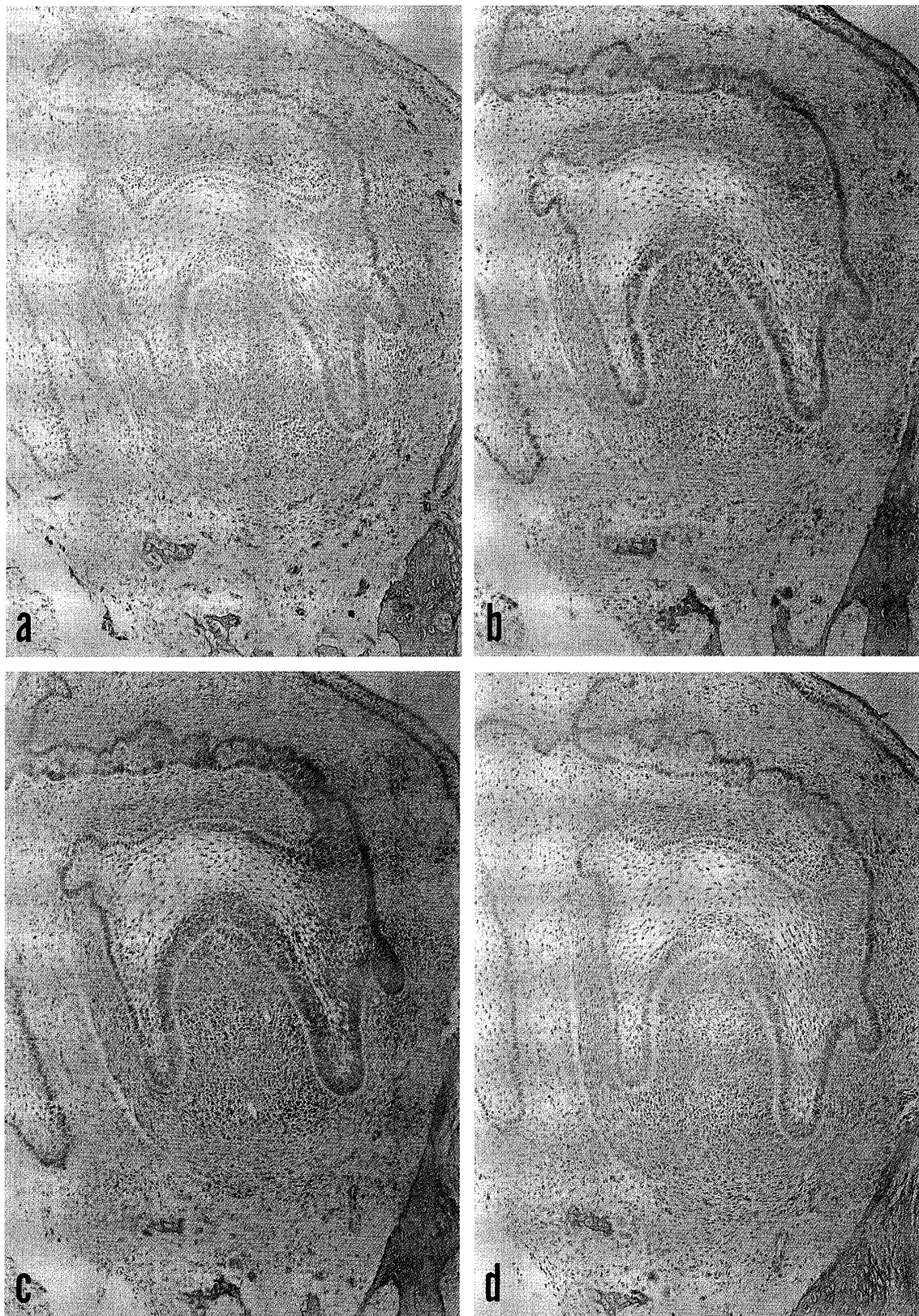


図2 胎生14週齢 下顎乳中切歯歯胚 ×10

- a : 中間層の形成がみられる。血管の分布は疎である。
- b : VEGFの局在は、12週齢と同様にエナメル器や歯乳頭、歯小嚢にみられる。
- c : KDR/Flk-1の局在もエナメル器、歯乳頭、歯小嚢に強く観察される。
- d : Flt-1の局在は、周囲の血管にのみ観察される。

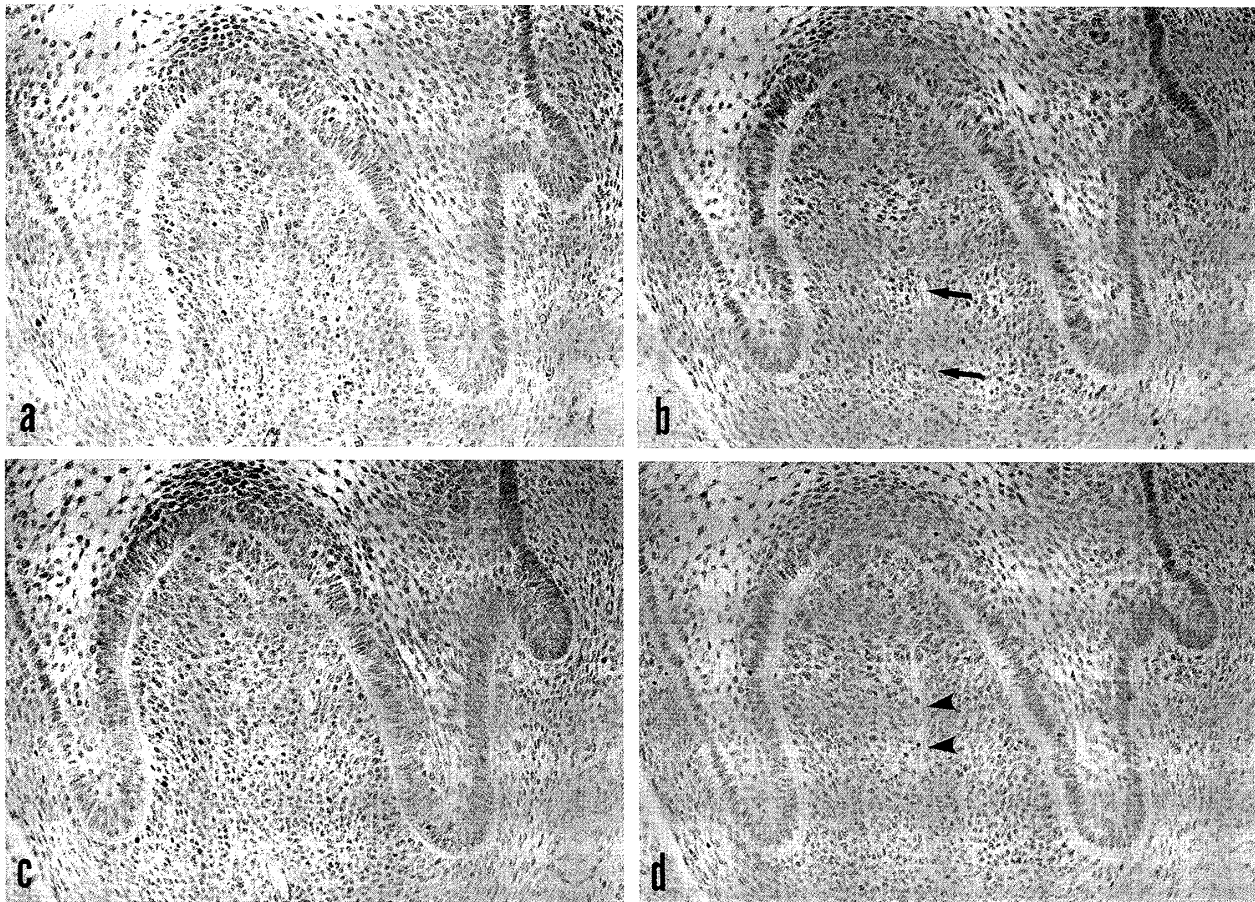


図3 胎生14週齢 歯乳頭の拡大像 ×20

- a : 歯乳頭内の血管は中央部まで侵入している。
- b : VEGFの局在は、エナメル器および歯乳頭表層の細胞に観察され、侵入する血管（矢印）にも確認される。
- c : KDR/Flk-1の局在もエナメル器や歯乳頭表層の細胞、侵入する血管で確認される。
- d : Flt-1の局在は、一部の中間層と血管（矢頭）に弱く観察される。

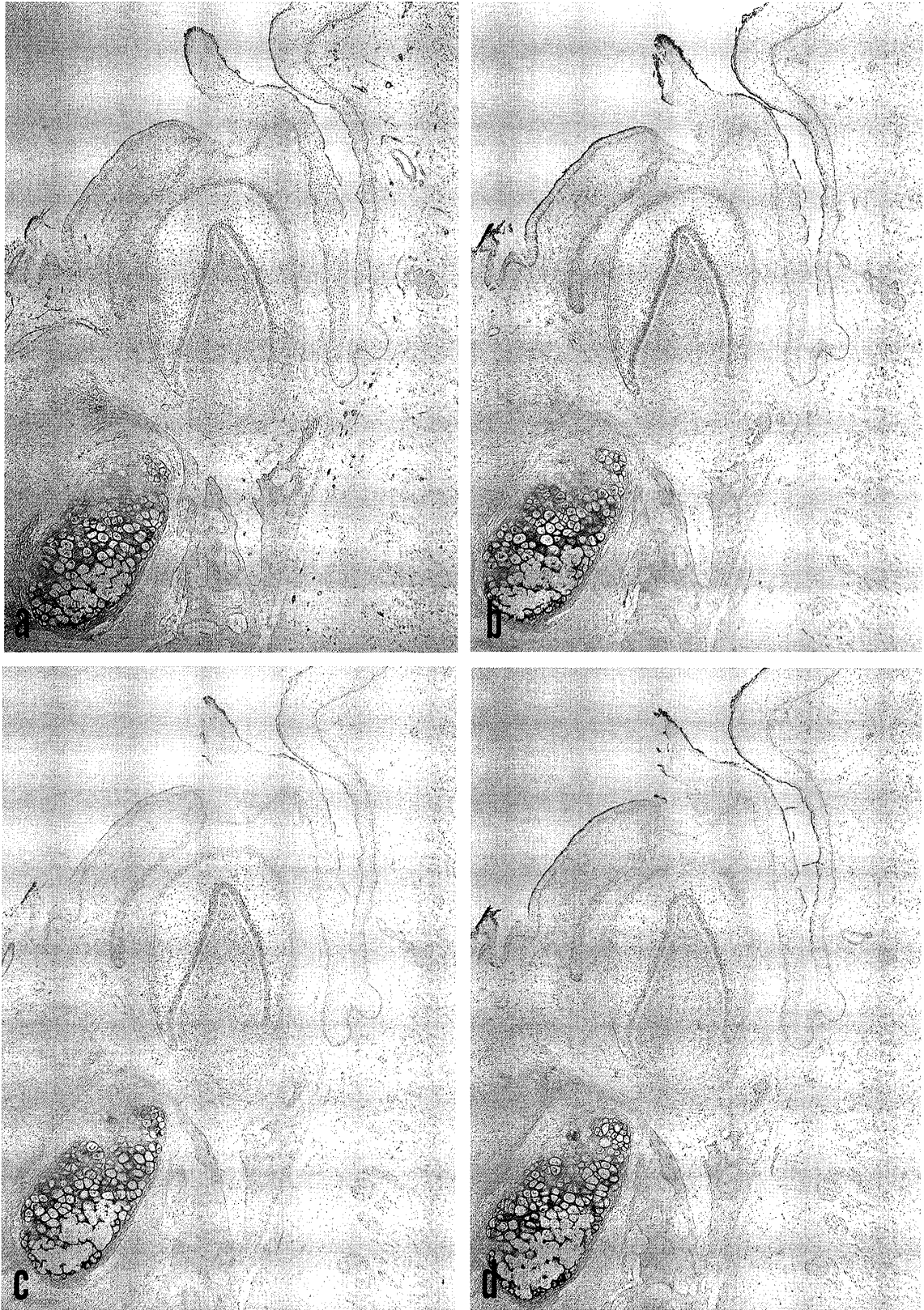


図4 胎生16週齢 下顎乳中切歯歯胚 ×4

- a : 血管分布は歯胚下部の歯小囊に密集している。
- b : VEGFの局在は、エナメル器に多く、歯乳頭では切端側に多くみられる。
- c : KDR/Flk-1の局在もエナメル器、特に内エナメル上皮に強く観察され、歯乳頭の切端側でも強い。
- d : Flt-1の局在は歯胚では明瞭にはみられず、周囲の血管にのみ観察される。

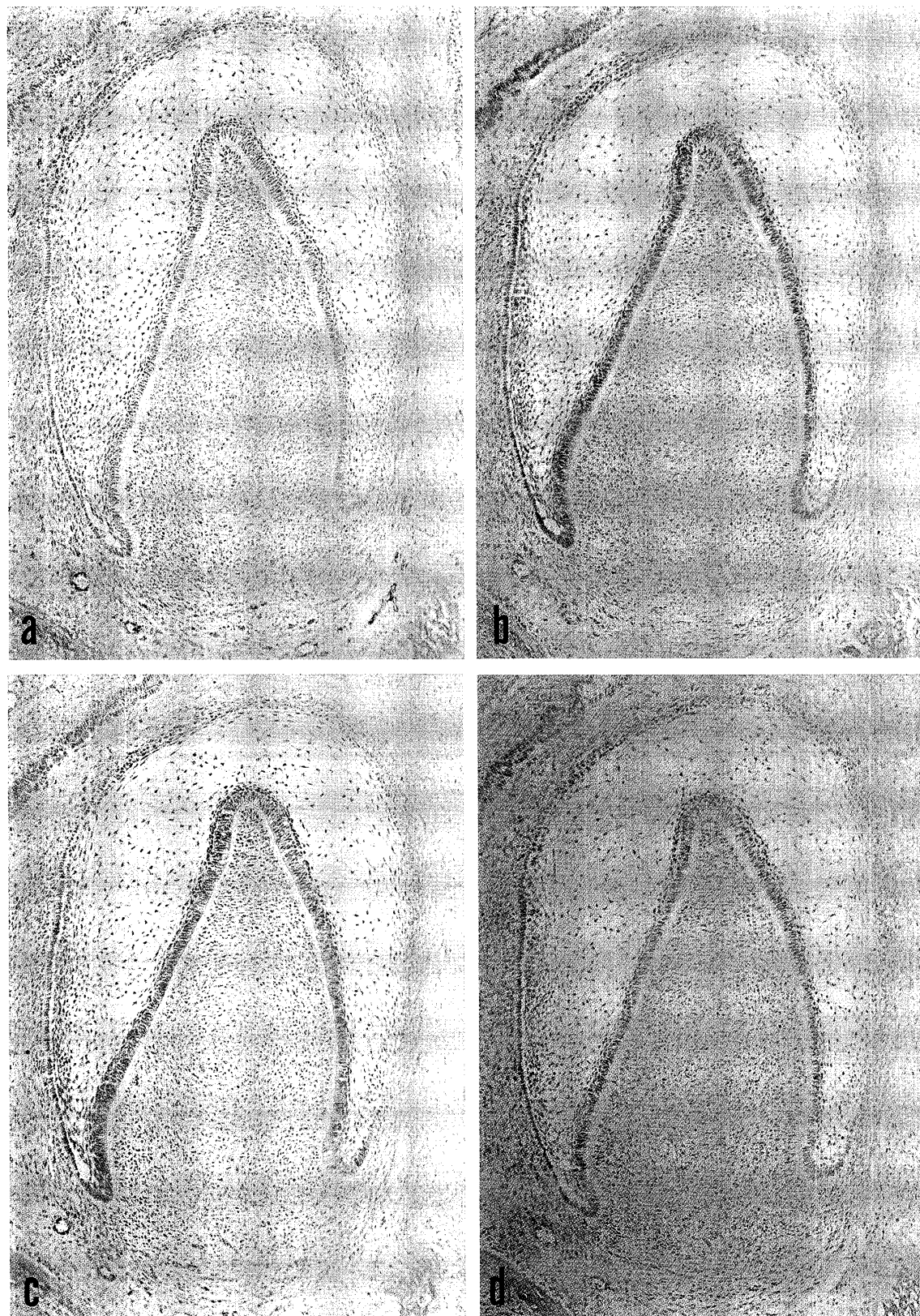


図5 胎生16週齢 歯胚の拡大像 ×20

- a : 歯胚下部に血管が密集し、歯乳頭切端側では内エナメル上皮に近接する。
- b : VEGFの局在は、内外エナメル上皮、中間層にみられ、歯乳頭では切端側に多い。また、歯乳頭内の血管にも局在が観察される。
- c : KDR/Flk-1の局在もエナメル器で観察され、歯乳頭の切端側に多くの局在がみられる。また、歯乳頭に侵入する血管にもKDR/Flk-1の局在がみられる。
- d : Flt-1の局在は、中間層と歯乳頭内の血管に観察される。

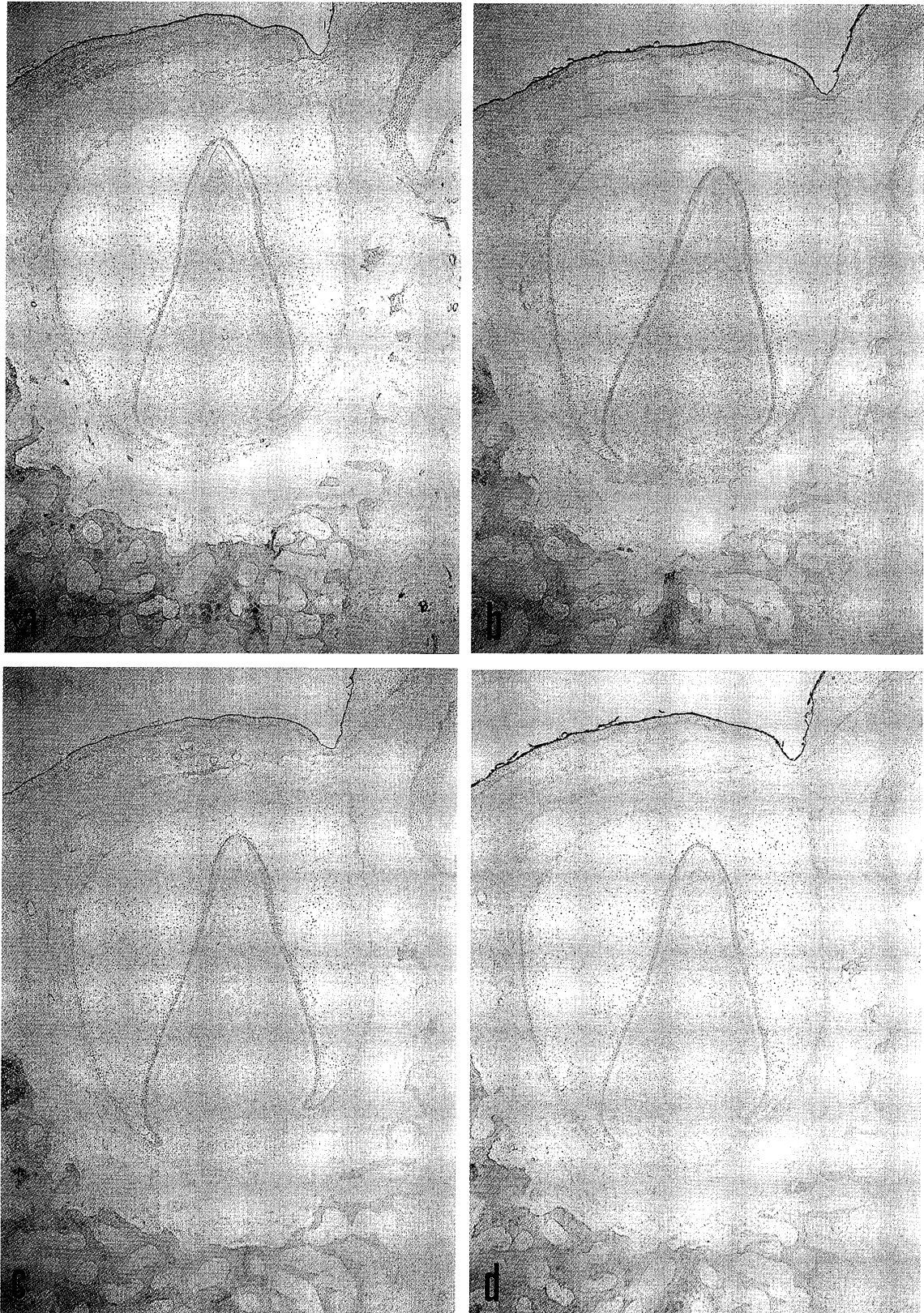


図6 胎生18週齢 下顎乳中切歯歯胚 ×4

- a : 切端部で石灰化が開始され、歯乳頭内には口径の大きい血管が複数存在し、切端部に分布する。
- b : VEGFの局在は、内外エナメル上皮、中間層にみられ、歯乳頭では表層に多い。
- c : KDR/Flk-1の局在もエナメル器で観察され、歯乳頭内にも局在がみられる。また、歯乳頭に侵入する血管にもKDR/Flk-1の局在がみられる。
- d : Flt-1の局在は、中間層と歯乳頭内の血管に観察される。

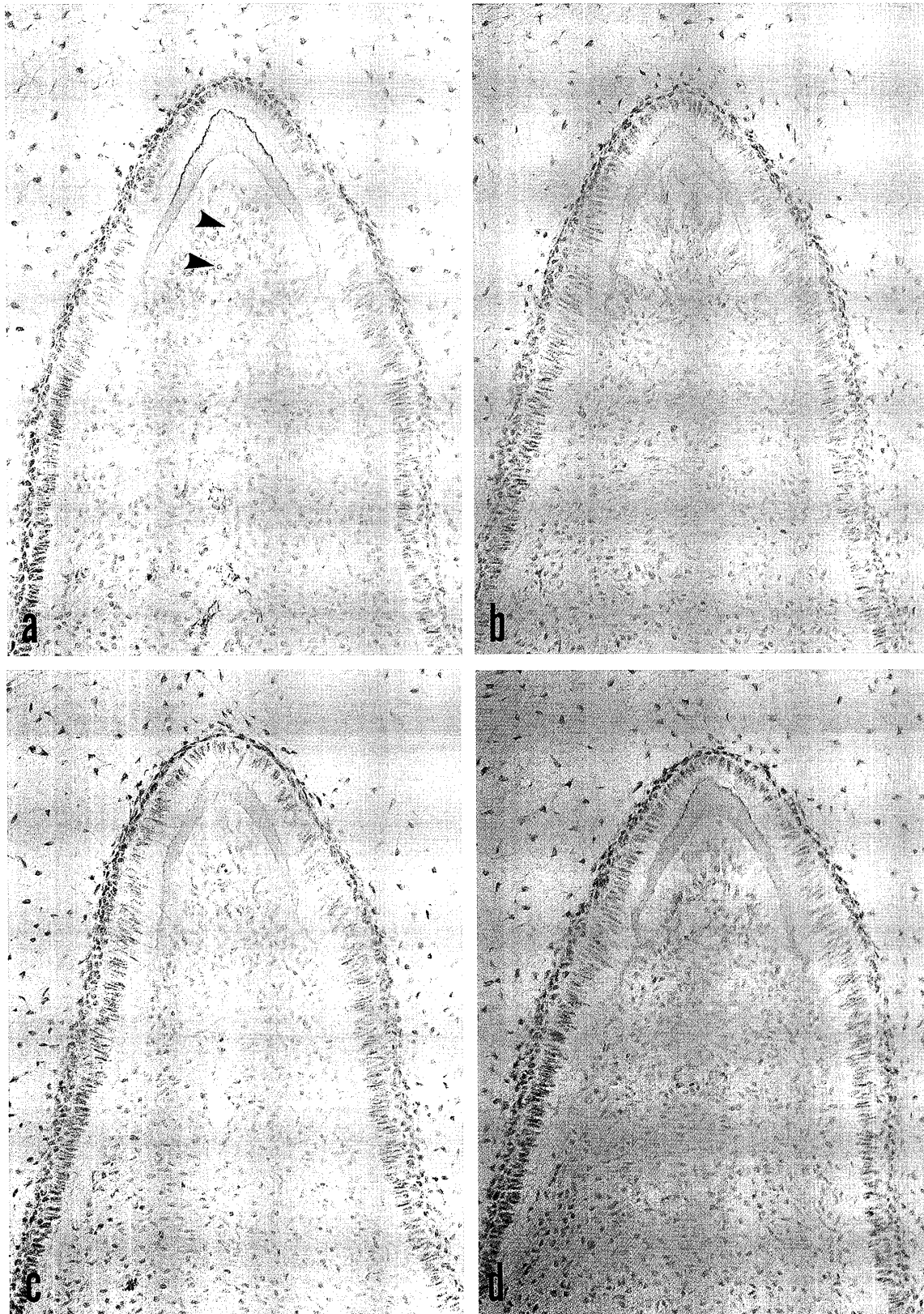


図7 胎生18週齢 切端部の拡大像 ×20

- a : 象牙芽細胞が分化し象牙質を形成、内エナメル上皮は高円柱状に分化している。歯乳頭内に侵入した血管は象牙芽細胞の直下にまで分布する (矢頭)。
- b : VEGFの局在は、中間層、内エナメル上皮にみられるが、高円柱状を呈する細胞では反応性が低下している。また、象牙芽細胞にVEGFの局在が観察される。
- c : KDR/Flk-1の局在も中間層、内エナメル上皮にみられるが、高円柱状を呈する細胞では反応性が低下している。また、象牙芽細胞では局在はみられない。
- d : Flt-1の局在は、中間層に観察される。

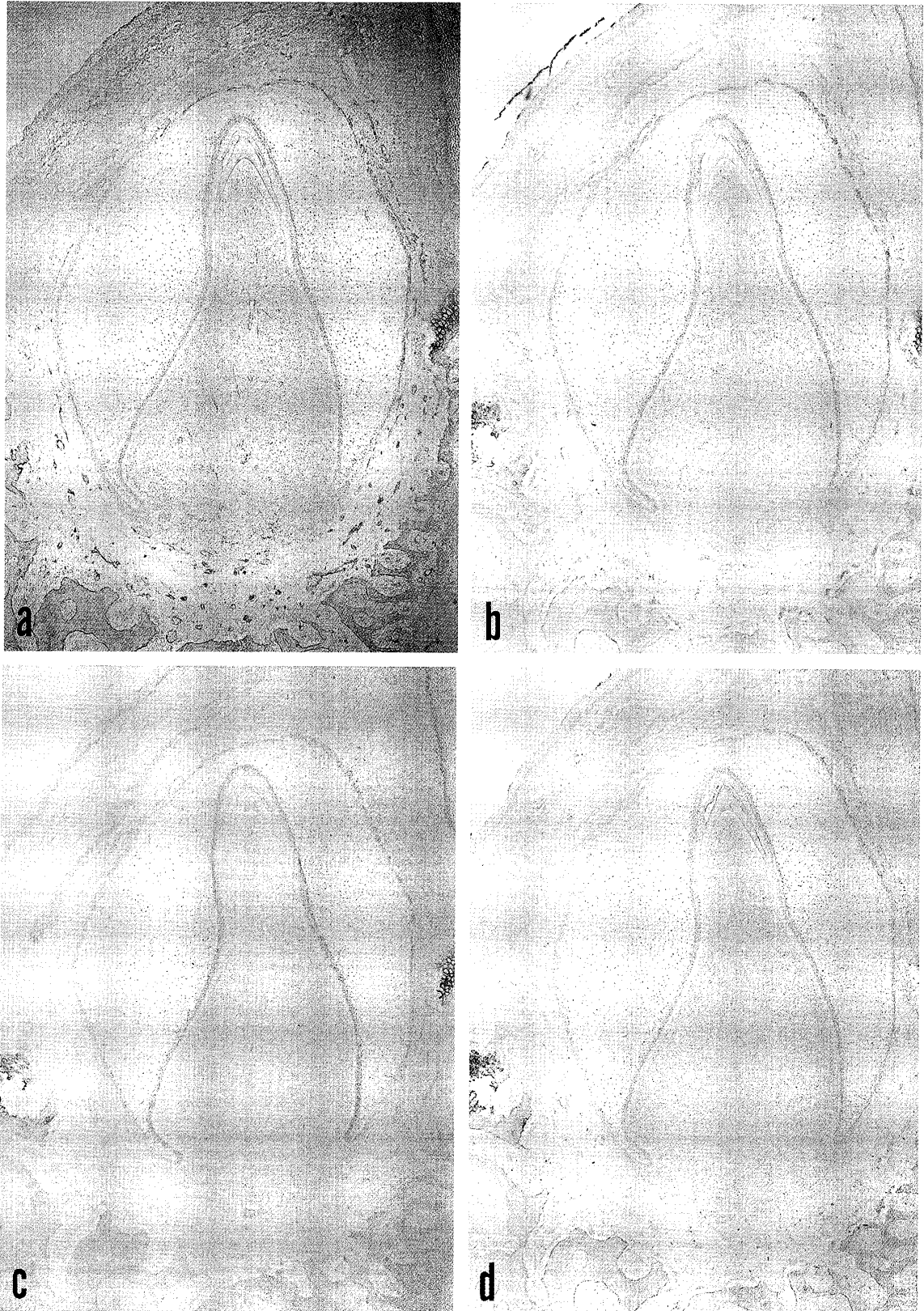


図8 胎生21週齢 下顎乳中切歯歯胚 ×4

- a : 象牙質, エナメル質の形成が進行し外エナメル上皮と中間層は近接している。血管は歯胚下部で密に配列し, 切端部の外エナメル上皮周囲でも多数確認される。
- b : VEGFの局在は, 歯胚上部の外エナメル上皮に多くみられ, 歯乳頭の血管にも観察される。
- c : KDR/Flk-1の局在は, 内エナメル上皮に多くみられ, 外エナメル上皮でも観察される。
- d : Flt-1の局在は, 歯胚周囲および歯乳頭内の血管のほか歯胚上部の外エナメル上皮にも観察される。

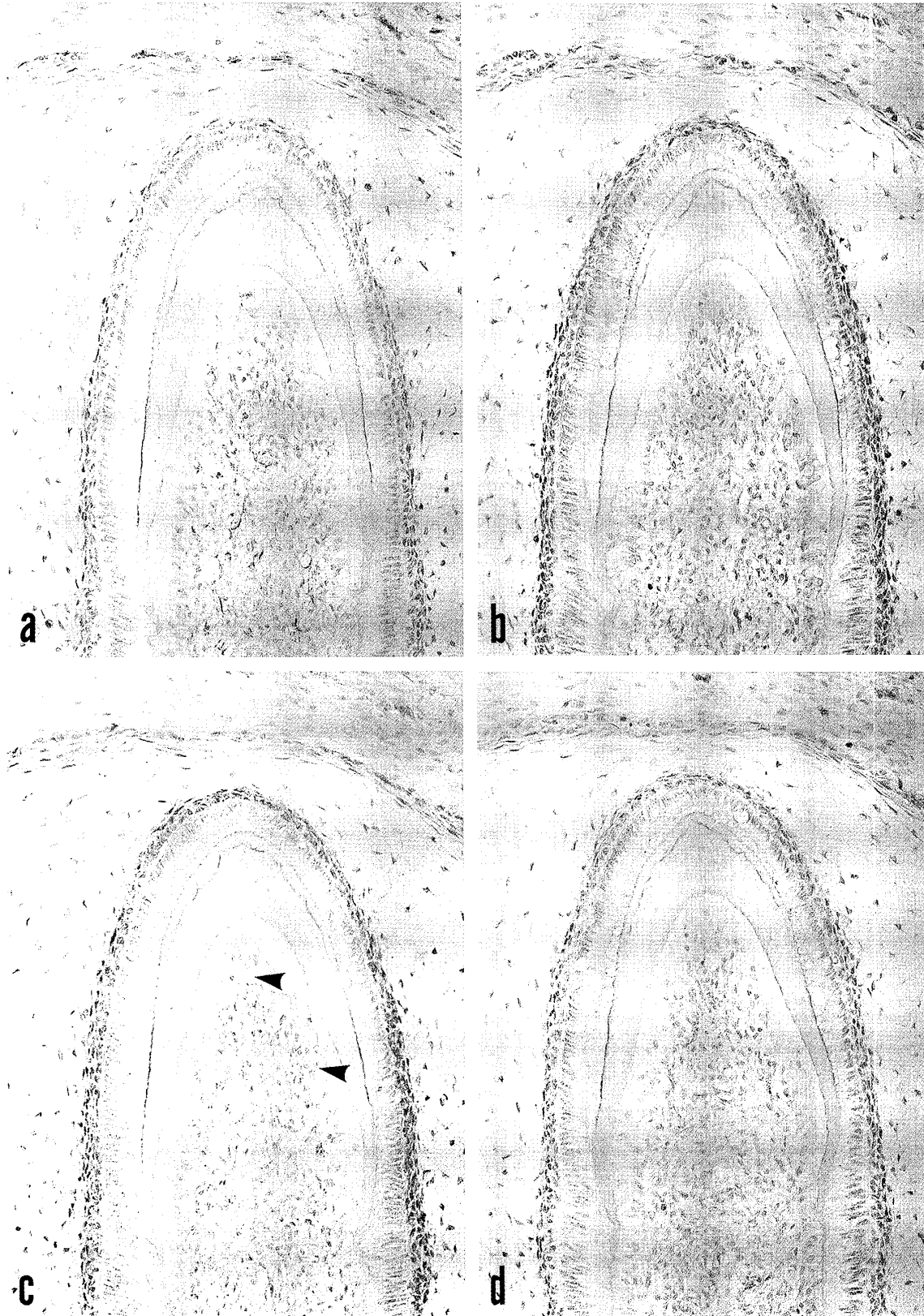


図9 胎生21週齢 切端部の拡大像 ×20

- a : エナメル髓が退縮し、外エナメル上皮と中間層は近接する。外エナメル上皮に接する血管が多数観察され、歯乳頭では密に配列し、象牙芽細胞間にまで達する。
- b : VEGFの局在は、外エナメル上皮と血管、中間層および象牙芽細胞に観察され、エナメル芽細胞にも弱い反応がみられる。
- c : KDR/Flk-1の局在は中間層では観察されるが、エナメル芽細胞、象牙芽細胞には観察されない。また、外エナメル上皮と周囲の血管にもKDR/Flk-1の局在がみられ、象牙芽細胞に達する血管(矢頭)にも観察される。
- d : Flt-1の局在は、外エナメル上皮と周囲血管および中間層に観察される。