エナメル芽細胞の分化を観察するための培養法の確立

諸 富 孝 彦

九州歯科大学歯科保存学第1講座 (指導: 寺下正道教授)

九州歯科大学口腔解剖学第2講座 (指導: 豊島邦昭教授)

平成13年12月25日受理

Establishment of Primary Culture for Observing Ameloblast Differentiation

Takahiko Morotomi

Department of Operative Dentistry (Director: Prof. Masamichi Terashita)

Second Department of Oral Anatomy (Director: Prof. Kuniaki Toyoshima)

Kyushu Dental College, Kitakyushu, Japan

The culture system is a very useful method for elucidating differentiation mechanisms of ameloblast which is associated with induction of odontoblast and/or production of enamel matrix. The aim of this study is establishment a primary cell culture system using isolated cervical loop and dental mesenchymal cells in growing end of rat incisors, which make it possible to observe the process of ameloblast cell lineage. To monitor growth and differentiation of epithelial cells, antibodies against cytokeratin 14 and ameloblastin were used as markers of dental epithelial cells and ameloblasts respectively. In this culture, the number of epithelial cells gradually decreased and became 50 % at 10 days. However, all of their remaining cells were ameloblastin expressing cells. When cells were cultured in the presence of skin fibroblasts, they did not express ameloblastin. This culture system is useful for investigation of ameloblast differentiation mechanism in the epithelial-mesenchymal interactions.

Key word: Ameloblast / Differentiation / Cell culture / Cytokeratin 14 / Ameloblastin

緒 言

エナメル質を形成するエナメル芽細胞の増殖分化の調節機構は、いまだ解明されてはいない。未分化なエナメル上皮細胞が、エナメル芽細胞へと分化する過程には各種調節因子の関与が推測されるが¹⁻⁴⁾、それらの同定には、エナメル上皮細胞からエナメル芽細胞への分化過程を観察しうる細胞培養法が有用である。

Limeback (1985)⁵⁾ は、ブタ臼歯歯胚より摘出したエナメル上皮細胞を、歯乳頭の線維芽細胞様細胞と共培養し、エナメル基質タンパクであるアメロゲニン⁶⁻¹⁰⁾の発現を報告した。MacDougall ら (1991, 1993, 1994)¹¹⁻¹³⁾ は、

マウス臼歯歯胚の内エナメル上皮細胞を歯乳頭細胞の非存在下で培養し、アメロゲニンの発現と石灰化小結節の形成を報告した。Kukita ら (1992)¹⁴⁾ は、ラット切歯歯胚のエナメル器の細胞を、無血清培地を用いて培養し、アメロゲニンを発現させることに成功した。Chen ら (1992)¹⁵⁾ はマウス臼歯歯胚のエナメル上皮細胞を用いて、アメロゲニンを発現し続ける不死化エナメル芽細胞様細胞を樹立した。さらに Den Besten ら (1997)¹⁶⁾ は、ブタ臼歯歯胚より摘出したエナメル器の上皮細胞を用いて、アメロゲニンおよびアメロブラスチン^{17,18)}の分泌を高める培地の条件について報告した。しかしながら、これらの培養法では様々な分化段階のエナメル上皮細胞が

Fig. 1 Schematic appearance of the incisor in a sagittal section through the rat mandible.

混在しているので、どのような因子がエナメル芽細胞の分化に関わっているかを検討するには適していない。

ラット切歯エナメル器のサービカルループには (Fig. 1), 組織幹細胞様の特徴を備えた未分化上皮細胞の存在が報告されている¹⁹⁻²¹⁾。そこでこのサービカルループのエナメル上皮細胞と歯乳頭細胞を用いて、未分化エナメル上皮細胞からエナメル芽細胞への分化を観察しうる培養法を検討した。

材料および方法

以下の動物実験は、「九州歯科大学における動物実験に関する指針」に従った。

I. 初代細胞培養

実験動物には3日齢のWistar系SPFラット(九動)を用いた。麻酔下(pentobarbital, 40 mg/kg)で断頭後、無菌下で切歯を傷つけずに摘出し、2% Collagenase (Wako) -Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 Ham (DMEM/F-12: GIBCO BRL) 酵素液に摘出切歯を浸漬し、4℃で8時間処理した。滅菌 Phosphate buffered saline (PBS) 内で歯乳頭およびエナメル器を、精密ピンセットを用いて機械的に分離した後、26G注射針(Termo)を用いて、エナメル器よりサービカルループ唇側膨隆部を、歯乳頭から形成端側をそれぞれ切除した (Fig. 2)。ともに Accumax (Sigma Chemical) で37℃, 15分間処理し、ピペティングにて細胞を分散させた。20 μ l の培養液中でサービカルループの細胞 (3.0×10^3 個) と歯乳頭細胞 (1.2×10^4 個) を混合し、Poly-L-Lysin-coated cover glass 12 mm type (IWAKI) 上に播種した。またサービカルループ細胞 (3.0×10^3 個) とヒト歯肉由来線維芽細胞(ヘルシンキ宣言に準拠) (1.2×10^4 個) を混合し、同様に播種した。さらに歯乳頭細胞 (1.2×10^4 個) のみの

Fig. 2 The method of the cervical loop cells and dental papilla cells.

培養も行った。

細胞を播種してから2時間後、細胞がカバーガラス上に定着したことを確認し、1 ml の液体培地を加え37℃, 5% CO₂ 下で培養した。培地はDMEM/F-12に10% Fetal bovine serum (Valley Biomedical), 100 IU/ml Penicillin and 100 μ g/ml Streptomycin (GIBCO BRL), 100 μ g/ml Ascorbic acid (Sigma Chemical), 2 mM L-glutamine (GIBCO BRL), 500 μ M β -glycerophosphate (Sigma Chemical) を添加したものを使用し、2日ごとに交換した。

II. 免疫組織化学的染色法

A. 組織切片の免疫染色

1日齢のWistar系SPFラットを麻酔下(pentobarbital, 40 mg/kg)で断頭、下顎を摘出しO. C. T. Compound (SAKURA) に浸漬後、急速凍結した。厚さ10 μ m で凍結切片を作製し、4% paraformaldehyde (PFA: Merck KgaA) /PBSに30分浸漬固定した後、1.5% Goat serum (Vector Laboratories) /PBSで30分間ブロッキングし、免疫染色に供した。

1次抗体には200倍に希釈したマウス由来モノクローナル抗サイトケラチン14抗体(NCL-LL002 NOVO CASTRA)と、2000倍に希釈したウサギ由来ポリクローナル抗アメロブラスチン抗体(広島大学、内田隆教授より供与された)を用いて、室温で2時間反応させた。2次抗体には200倍に希釈したヤギ由来抗マウスIgG-Alexa Fluor 546 (Molecular Probes)と200倍に希釈したヤギ由来抗ウサギIgG-Alexa Fluor 488 (Molecular Probes)を用い、室温で1時間反応させた。すべて

の抗体の希釈には 1.5 % goat, serum/PBS を用いた。

染色後、蛍光顕微鏡 (BX60: OLYMPUS) にて観察した。

B. 培養細胞の免疫染色

培養細胞は 4 % PFA/PBS で 20 分間固定後、0.1 % Polyoxyethylene (10) Ocyphenyl Ether (Wako) / PBS を用いて室温で 5 分間処理し、組織染色と同様に免疫染色を行い観察した。

結 果

I. ラット切歯歯胚におけるサイトケラチン 14 およびアメロブラスチンの発現

1 日齢ラットの下顎切歯歯胚におけるサイトケラチン 14 およびアメロブラスチンの発現を、免疫組織化学的手法を用いて検索した。

A. サイトケラチン 14 の発現

サービカルループよりエナメル芽細胞へ至るすべてのエナメル上皮細胞で、その発現が確認された (Fig. 3a)。

細胞内のサイトケラチン 14 の局在は、細胞により 2 種に分けられた。星状網細胞や中間層細胞、外エナメル上皮細胞、そしてエナメル芽細胞では、細胞質全体でフィラメント状に発現が認められ (Fig. 3b), 一方サービカルループの基底膜側の細胞と内エナメル上皮細胞では、細胞膜側の細胞辺縁部でのみ発現が見られた (Fig. 3c)。

B. アメロブラスチンの発現

アメロブラスチンの発現は特異的にエナメル芽細胞で認められ、細胞内での発現は象牙質側 (分泌極側) で顆粒状に見られた (Fig. 4a, b)。他のエナメル上皮細胞や間葉細胞では、発現を認めなかった (Fig. 4a-d)。

II. 培養エナメル上皮細胞の経日的観察

A. ラット切歯歯胚のサービカルループ細胞と歯乳頭細胞の共培養

3 日齢ラットの切歯歯胚より得たサービカルループの細胞を、形成端側の歯乳頭細胞と共培養し、免疫細胞化学的手法を用いてサイトケラチン 14 とアメロブラスチンの発現を経日的に確認した。

Fig. 3 Localization of cytokeratin 14 in the postnatal 1 day rat lower incisor tooth germ. Sagittal sections.

a : The apical end of the lower incisor. All epithelial cells express cytokeratin 14 (arrow head).

b : Higher magnification of ameloblasts.

c : Higher magnification of the cervical loop. Cervical loop cells adjacent to basement membrane are stained weakly (arrow).

DP: dental papilla

O : odontoblasts

A : ameloblasts

Bars: (a) 200 μ m; (b and c) 50 μ m.

Fig. 4 Localization of ameloblastin in the postnatal 1 day rat lower incisor tooth germ. Sagittal sections.

a : Phase-contrast micrographs of ameloblasts.

b : Ameloblastin is expressed in ameloblasts.

c : Phase-contrast micrographs of cervical loop.

d : Ameloblastin is not detected in the cervical loop cells.

DP: dental papilla

O : odontoblasts

A : ameloblasts

IEE: inner enamel epithelium

Bars: 50 μ m.

1. サイトケラチン 14 陽性細胞

細胞播種直後に免疫染色を行い、サイトケラチン 14 を発現するエナメル上皮細胞が、歯乳頭細胞中に散在していることを確認した。培養 2 日目以降、サイトケラチン 14 陽性細胞の数は培養日数の経過とともに減少し、10 日目には播種時のおよそ半数となった (Fig. 6a)。

2. アメロブラスチン陽性細胞

細胞播種直後には、アメロブラスチン陽性細胞は観察されなかった。培養 2 日目、サイトケラチン 14 陽性細胞の中にアメロブラスチンにも陽性を示す細胞が出現したが、その数は極めて少なく (0.53 %), 染色程度も非常に弱かった (Fig. 5a-c)。培養 4 日目では発現細胞がわ

Fig. 5 Immunocytochemical staining for cytokeratin 14 and ameloblastin in culture of cervical loop cells and dental papilla cells.

a-c: 2 days culture. Cytokeratin 14 positive cells (b) and ameloblastin positive cells (c).

d-f: 4 days culture. Cytokeratin 14 positive cells (e). Ameloblastin positive cells are detected, however the degree of staining is weak (f).

g-i: 10 days culture. All cytokeratin 14 positive cells (h) express ameloblastin (i).

a, d, g: Phase-contrast micrographs

Bars: 200 μ m.

ずかに増加したが (2.8%), 染色性の変化は認めなかった (Fig. 5d-f). しかし培養6日目にはアメロブラスチン陽性細胞の数は急増し, その染色性も増強した (Fig. 6a). このときサイトケラチン14陽性細胞中, 73%がアメロブラスチン陽性を示した. 6日目から10日目までは, アメロブラスチン陽性細胞の数はほとんど変化しなかった (Fig. 5g-i). 培養10日目にはアメロブラスチンの発現は細胞質全体に, 顆粒状に認められた (Fig. 7a, b). サイトケラチン14陽性細胞のうちアメロブラスチン陽性細胞の割合は, 4日目から6日目の間に顕著に増加した (Fig. 6b). これは, サイトケラチン14陽性細胞の減少にも関わらず, アメロブラスチン陽性

細胞が急増した結果である. 10日目には, ほとんどすべてのサイトケラチン14陽性細胞がアメロブラスチンにも陽性を示すようになった (Fig. 6b). 培養期間中のすべてのアメロブラスチン陽性細胞は, サイトケラチン14にも陽性を示した.

共培養と同時に, 形成端の歯乳頭細胞のみの培養も行い, 歯乳頭細胞中にはエナメル上皮細胞の混入がないことを確認した (Fig. 8a-c).

B. ラット切歯歯胚のサービカルループ細胞とヒト皮膚由来線維芽細胞との共培養

3日齢ラットの切歯歯胚より得たサービカルループ細胞を, ヒト皮膚由来線維芽細胞と共培養し, サイトケラ

Fig. 6 Change of the cytokeratin 14 and ameloblastin positive cells.

a : Change the number of cytokeratin 14 and ameloblastin positive cells. While cytokeratin 14 cells gradually decrease for 10 days culture, ameloblastin positive cells increase between 4 and 6 days distinctively.

b : The change of the rate of cytokeratin 14 positive cells expressing ameloblastin time-dependently. The value is increased between 4 and 6 days distinctively, and almost all cytokeratin 14 positive cells express ameloblastin at 10 days.

Fig. 7 Higher magnification of cervical loop cells after 10 days culture.

a : The expression of cytokeratin 14 is fibriform appearance.

b : The expression of ameloblastin is granular appearance.

Bars : 20 μm.

Fig. 8 Dental papilla cells at 10 days.
Cytokeratin 14 (b) and ameloblastin (c) positive cells were not appeared.
Bar: 200 μ m.

Fig. 9 Cytokeratin 14 and ameloblastin expression in the culture of cervical loop cells and skin fibroblasts.

b, e: Expression pattern of cytokeratin 14.

c, f: Expression pattern of ameloblastin.

a, d: Phase contrast micrographs.

a-c: 2 days culture.

d-f: 10 days culture. While cytokeratin 14 positive cells was appeared, both ameloblastin and cytokeratin 14 positive cells were not.

Bars: 200 μ m.

チン 14 およびアメロプラスチンの発現を観察した。本実験でも培養 2 日目より 10 日目まで、それぞれの発現を確認した。培養期間中すべての日数において、サイトケラチン 14 陽性細胞は多数認められたが、アメロプラスチン陽性細胞は出現しなかった (Fig. 9a-f)。

考 察

エナメル質形成は、エナメル上皮細胞のエナメル芽細胞への分化、その後のエナメル基質タンパクの分泌、さらに石灰化と続く一連の現象である。このエナメル質形成機構を解明する目的で、現在まで各種のエナメル上皮細胞培養法が考案されている。しかしこれまでに、未分

化な上皮細胞を単離、培養し、エナメル芽細胞への分化を確認したという報告はなされていない。そこで本実験では、ラット切歯サービカルループに存在する未分化なエナメル上皮細胞を用いて、エナメル芽細胞への分化を観察しうる培養法を確立し、その過程を観察した。

本研究では、培養細胞のエナメル上皮マーカーとして、サイトケラチン14を用いた。サイトケラチン14は、表皮や口腔粘膜上皮の中間径フィラメントを構成するサイトケラチンポリペプチドの1種であり²²⁾、エナメル上皮にも発現することが報告されている²³⁻²⁵⁾。1日齢ラット切歯歯胚におけるサイトケラチン14の発現は、すべてのエナメル上皮細胞で認められ (Fig. 3), Tabata ら (1996)²⁶⁾ や Domingues ら (2000)²⁷⁾ の報告と同様であった。エナメル芽細胞の分化マーカーには、アメロプラスチンを用いた。エナメル基質タンパクは、その90%がアメロゲニンより構成され²⁸⁾、それについてアメロプラスチンの含有量が多い^{17, 29)}。これまで培養細胞におけるエナメル芽細胞の分化マーカーとしてはアメロゲニンが多く用いられてきたが、Inai ら (1991)³⁰⁾ や Nakamura ら (1994)³¹⁾ は、その免疫染色が歯乳頭細胞でも検出されることを報告している。1日齢ラット切歯歯胚でのアメロプラスチンの発現を観察したが、Krebsback ら (1996)¹⁷⁾ の報告と同様に、分化したエナメル芽細胞のみに特異的に認められた (Fig. 4)。この結果より、アメロプラスチンはエナメル芽細胞のマーカーとして、アメロゲニンよりも有用であると考えられる。

Kukita ら (1992)¹⁴⁾、Chen ら (1992)¹⁵⁾、そして Den Besten ら (1997)¹⁶⁾ はエナメル上皮細胞の単独培養によりエナメル基質タンパクが発現することを報告しているが、これらの培養では様々な分化段階のエナメル上皮細胞が混在しており、未分化なエナメル上皮細胞のエナメル芽細胞への分化過程を観察する方法としては適していない。一方、本研究では組織幹細胞様のエナメル上皮細胞が存在するとされるサービカルループの細胞のみを用いることで²⁰⁾、アメロプラスチンを発現する細胞が出現し、増加する過程を観察できた。

本培養法ではエナメル上皮細胞の増殖は認められず、10日後には半数に減少する (Fig. 6a)。Harada ら (1999)²⁰⁾ は、サービカルループに存在している組織幹細胞様細胞の維持には、周囲の歯乳頭細胞より分泌される線維芽細胞増殖因子 (FGF)-10が必要であることを報告している。歯乳頭細胞より分泌された FGF-10 は、基底膜のヘパラン硫酸プロテオグリカンに濃縮された上でサービカルループの細胞に効果を与えられ

いる³²⁾。本培養法ではコラゲナーゼによって基底膜を消化した結果、間葉細胞の発現した FGF-10 は拡散すると考えられ、そのため効果的に作用せず、サービカルループの細胞の多くはアポトーシスに陥ったと考えられる。しかしながら歯乳頭細胞の作用で分化の方向性を獲得した細胞はアポトーシスには陥らず、生存したと推測する。

サービカルループの細胞を形成端側歯乳頭細胞と共培養し、生存し続けた上皮細胞は、10日目までにすべてがアメロプラスチン陽性を示した (Fig. 5, 6)。一方、サービカルループの細胞を皮膚線維芽細胞と共培養すると、アメロプラスチン陽性細胞は出現しなかった¹⁴⁾。このことから、エナメル芽細胞への分化誘導には、歯乳頭細胞の存在が必要であることが示唆される。これまでに、歯の発生における上皮組織と間葉組織の相互作用の重要性と、それに関与する多種の成長因子や細胞外基質タンパク、転写因子が報告されている^{1, 2, 33, 34)}。本研究では、歯乳頭細胞が未分化エナメル上皮細胞をエナメル芽細胞へと分化させることを確認した。今後、歯乳頭細胞とサービカルループの細胞との相互作用による増殖と分化の機構の解明に、ここに確立した培養法は有用であると考えられる。

結 論

本研究では未分化エナメル上皮細胞の、エナメル芽細胞への分化を *in vitro* で観察が可能となる培養法を確立し、以下の結論を得た。

I. ラット切歯サービカルループには、エナメル芽細胞への分化能を保持する未分化エナメル上皮細胞が存在する。

II. ラット切歯サービカルループに存在する未分化上皮細胞が、*in vitro* でエナメル芽細胞へと分化するためには、歯乳頭細胞の存在が必要である。

III. サービカルループの未分化上皮細胞を分散し、歯乳頭細胞集団中で培養すると増殖はせず、生存したすべての上皮細胞がエナメル芽細胞へと分化する。

以上の結果より、本培養法はエナメル器の未分化エナメル上皮細胞の、エナメル芽細胞への分化を *in vitro* で再現しうる方法であり、エナメル上皮細胞の増殖や分化に関わる因子を解明する上で、有用な実験法であることが示された。

稿を終えるにあたり、終始懇篤なる御指導、御校閲の労を賜りました九州歯科大学歯科保存学第1講座寺下正

道教授および口腔解剖学第2講座豊島邦昭教授に深甚なる感謝の意を表します。またご懇切な御助言、御指導下さいました口腔解剖学第2講座原田英光助教授、貴重な抗体を御供与頂きました広島大学歯学部内田隆教授に謹んで感謝の意を表します。さらに、実験の遂行に御協力を賜りました歯科保存学第1講座ならびに口腔解剖学第2講座の皆様に、厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は平成13年度九州歯科大学後援会大学院生研究援助費により、また加藤記念バイオサイエンス研究振興財団の補助のもとに行われた。

本研究の要旨は、第43回歯科基礎医学会学術大会(2001年9月19日、さいたま)、第115回日本歯科保存学会秋季学会(2001年11月9日、福岡)で発表した。

引用文献

- 1) Peters, H. and Balling, R.: Teeth where and how to make them. *Trends Genet.* 15: 59-65, 1999.
- 2) Jernvall, J. and Thesleff, I.: Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech. Dev.* 92: 19-29, 2000.
- 3) Zechner-David, M., Diekwisch, T., Fincham, A., Lau, E., MacDougall, M., Morakian-Oldak, J., Simmer, J., Snead, M. and Slavkin, H. C.: Control of ameloblast differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 39: 69-92, 1995.
- 4) Ahamad, N. and Ruch, J. V.: Comparison of growth and cell proliferation kinetics during mouse molar odontogenesis *in vivo* and *in vitro*. *Cell Tissue Kinet.* 20: 319-329, 1987.
- 5) Limeback, H.: Enamel protein and collagen production by cells subcultured from porcine tooth bud explants. *Biochem. Cell Biol.* 65: 698-709, 1987.
- 6) Fincham, A. G.: A simple procedure for the isolation of a major amelogenin polypeptide component. *Biochem. J.* 181: 171-175, 1979.
- 7) Fincham, A. G.: Changing amino acid profiles of developing dental enamel in individual human teeth and the comparison of the protein matrix of developing human and bovine enamel. *Archs. Oral Biol.* 25: 669-675, 1980.
- 8) Fincham, A. G., Belcourt, A. B., Termine, J. D., Butler, W. T. and Cothran, W. C.: Amelogenins. Sequence homologies in enamel-matrix proteins from three mammalian species. *Biochem. J.* 211: 149-154, 1983.
- 9) Fincham, A. G., Hu, Y. Y., Lau, E., Pavlova, Z., Slavkin, H. C. and Snead, M. L.: Isolation and partial characterization of a human amelogenin from a single fetal dentition using HPLC techniques. *Calcif. Tissue Intl.* 47: 105-111, 1990.
- 10) Snead, M. L., Luo, W., Lau, E. C. and Slavkin, H. C.: Spatial- and temporal- restricted pattern for amelogenin gene expression during mouse molar tooth organogenesis. *Development* 104: 77-85, 1988.
- 11) MacDougall, M., Zechner-David, M. and Slavkin, H. C.: Tissuespecific matrix production by dental epithelial and mesenchymal cell *in vitro*. *J. Dent. Res.* 70: 370, 1991.
- 12) MacDougall, M., Slavkin, H. and Zeichner-David, M.: Characterization of ameloblast-like cells using RT-PCR. *J. Dent. Res.* 72: 203, 1993.
- 13) MacDougall, M., Theimann, F. and Diekwisch, T.: Enamel biomineralization *in vitro* in the absence of mineralized dentin. *J. Dent. Res.* 73: 112, 1994.
- 14) Kukita, A., Harada, H., Kukita, T., Inai, T., Matsushashi, S. and Kurisu, K.: Primary and secondary culture of rat ameloblasts in serum-free medium. *Calcif. Tissue Intl.* 51: 393-398, 1992.
- 15) Chen, L. S., Couwenhoven, P., Hsu, D., Luo, W. and Snead, M.: Maintenance of amelogenin gene expression by transformed epithelial cells of mouse enamel organ. *Archs. Oral Biol.* 37: 771-778, 1992.
- 16) Den Besten, P. K., Mathews, C. H. E., Gao, C. and Li, W.: Primary culture and characterization of enamel organ epithelial cells. *Connective Tissue Res.* 38: 3-8, 1997.
- 17) Krebsbach, P. H., Lee, S. K., Matsuki, Y., Kozak, C., A., Yamada, K., M. and Yamada, Y.: Full length sequence, localization and chromosomal mapping of ameloblastin. *J. Biol. Chem.* 271: 4431-4435, 1996.
- 18) MacDougall, M., Simmons, D., Gu, T. T., Forsman-Semb, K., Mardh, C. K., Mesbah, M., Forest, N., Krebsbach, P. H., Yamada, Y. and Berdal, A.: Cloning, characterization and immunolocalization of human ameloblastin. *Eur. J. Oral Sci.* 108: 303-310, 2000.
- 19) Morrison, S. J., Shah, N. M. and Anderson, D. J.: Regulatory mechanisms in stem cell biology. *Cell* 88: 287-298, 1997.
- 20) 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.
- 21) Fuchs, E. and Segre, J. A.: Stem cells: A new lease on life. *Cell* 100: 143-155, 2000.
- 22) Hu, C., Fukae, M., Uchida, T., Qian, Q., Zhang, C. H., Ryu, O. H., Tanabe, T., Yamakoshi, Y., Murakami, C., Dohi, N. et al.: Sheathlin: cloning, cDNA/polypeptide sequences, and immunolocalization of porcine enamel sheath proteins. *J. Dent. Res.* 76: 648-

- 675, 1997.
- 23) Banks-Schlegel, S., P.: Keratin alterations during embryonic epidermal differentiation. *J. Cell Biol.* 93: 551-559, 1982.
 - 24) Clausen, H., Moe, D., Buscard, D. and Dabelsteen, E.: Keratin proteins in human oral mucosa. *J. Oral Pathol.* 15: 36-42, 1986.
 - 25) Gao, Z., Mackenzie, I. C., Williams D. M., Cruchley, A. T., Leigh, I. and Lane, E. B.: Patterns of Keratin-expression in rests of Malassez and periapical lesions. *J. Oral Pathol.* 17: 178-185, 1988.
 - 26) Tabata, J. M., Matsumura, T., Liu, J.-G., Wakisaka, S. and Kurisu, K.: Expression of cytokeratin 14 in ameloblast-lineage cells of the developing tooth of rat, both in vivo and in vitro. *Archs Oral Biol.* 41: 1019-1027, 1996.
 - 27) Domingues, M. G., Jaeger, M. M. M., Araujo, V. C. and Araujo, N., S.: Expression of cytokeratins in human enamel organ. *Eur. J. Oral Sci.* 108: 43-47, 2000.
 - 28) Termine, J. D., Belcourt, A. B., Christner, P. J., Conn, K. M. and Nylen, M. U.: Properties of dissociatively extracted fetal tooth matrix proteins. 1. Principal molecular species in developing bovine enamel. *J. Biol. Chem.* 255: 9760-9768, 1980.
 - 29) Snead, M. L., Bringas, P., Bessen, C. and Slavkin, H. C.: *De novo* gene expression detected by amelogenin gene transcript analysis. *Dev. Biol.* 104: 255-258, 1984.
 - 30) Inai, T., Kukita, T., Ohsaki, Y., Nagata, K., Kukita, A. and Kurisu, K.: Immunohistochemical demonstration of amelogenin penetration toward the dental pulp in the early stages of ameloblast development in rat molar tooth germs. *Anat. Rec.* 229: 259-270, 1991.
 - 31) Nakamura, M., Bringas, P., Nanci, A., Zeichner-David, M., Ashdown, B. and Slavkin, H. C.: Translocation of enamel proteins from inner enamel epithelia to odontoblasts during mouse tooth development. *Anat. Res.* 238: 383-296, 1994.
 - 32) Kettunen, P., Laurikkala, J., Itaranta, 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.
 - 33) Thesleff, I., Partanen, A. M. and Vainio, S.: Epithelial-mesenchymal interactions in tooth morphogenesis: the role of extracellular matrix, growth factors, and cell surface receptors. *J. Craniofac. Genet. Dev. Biol.* 11: 229-237, 1991.
 - 34) Thesleff, I. and Shape, P.: Signalling networks regulating dental development. *Mech. Dev.* 67: 111-123, 1997.