

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 5 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25463044

研究課題名(和文) 歯肉退縮予知のための歯肉の質的評価法の確立

研究課題名(英文) In vitro investigation for future development to evaluate gingiva quality

研究代表者

佐藤 博信 (Sato, Hironobu)

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：00145955

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：歯肉退縮は審美的問題を呈する頻度の高い症状であり，その要因の一つに歯肉の質的性質が挙げられる．退縮しにくい厚みのある歯肉の角化度は高く，角化と上皮の厚みを決定する因子を探ることができる in vitro の実験系の確立が将来の歯肉の質的評価の実践のために重要である．我々はケラチノサイト単独培養による三次元培養系を確立し，角化重層扁平上皮の形成に必須因子を明確にした．カルシウムは上皮の重層化とケラチノサイトの分化に必須であった．Keratinocyte growth factor (KGF) はケラチノサイトの寿命を延長させ，アスコルビン酸と協調して上皮組織の健全な構築に必須であることが判明した．

研究成果の概要(英文)：Gingival recession is a frequent symptom and disturbs the patients' satisfaction, a cause of which is believed quality of gingiva. As thick and highly keratinized gingiva withstands recessing, 3D culture system of keratinocyte could be useful to detect the factors determining thickness and keratinization of gingival epithelium and to develop the future diagnostic method of gingival quality. We have established a 3D culture model using keratinocytes alone creating a proper keratinized epithelial equivalent, and further have identified some essential factors to produce the equivalent. Calcium is the essential for stratification and differential of keratinocytes. Addition of keratinocyte growth factor (KGF), but not ascorbic acid, prolongs a life span. Further addition of ascorbic acid improves the tissue architecture in cooperation with KGF.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：歯肉 角化 上皮 ケラチノサイト 三次元培養 カルシウム KGF アスコルビン酸

### 1. 研究開始当初の背景

前歯補綴治療の審美的成功に欠かせない歯肉退縮の予知性の判断基準は主に歯肉の量的評価(バイオタイプ)に依存しているが、その方法は科学的根拠に欠けると言わざるを得ず、予知性には限界がある。歯肉退縮を起こしにくい flat thick type の歯肉は厚みが大きいだけでなく、角化度も大きい。そのような歯肉がなぜ退縮を起こしにくいのか、細胞および分子レベルでのメカニズムが分かれば、歯肉の質的評価が可能となる。しかしながら上皮組織の形成のメカニズムが複雑なのは、上皮組織内のメカニズムのみならずその下部組織である結合組織の影響を受けているからである。従って、動物を用いた系よりも、研究条件を制御しやすい細胞培養の系が有益である。上皮組織の形成のメカニズムを探求するには、単層培養ではなく、3次元培養の系を用いる必要がある。しかしながら、現状の3次元培養系はそのほとんどが上皮細胞の下部に結合組織あるいはその代用物を使用しており、より単純な系である上皮細胞のみによる培養系は、培養自体が困難であり、その系を用いた研究成果は十分といえない。我々は、ケラチノサイト単独の3次元培養系の確立を目指し、さらに上皮の重層化および角化層の形成に最低限必要な因子を確定して、将来の歯肉の質的評価法の確立に向けた in vitro のモデルを作製することとした。

### 2. 研究の目的

ケラチノサイト単独の3次元培養モデルを確立し、同時に上皮の重層化と角化に最低限必要な因子を確定することである。

### 3. 研究の方法

- (1) 細胞：当初ブタの歯肉および歯槽粘膜から分離したケラチノサイトを使用したが、下記の実験条件下での培養が困難であったため、ヒト由来の株化ケラチノサイトである HEKa 細胞を使用した。
- (2) 3次元細胞培養：3次元培養の培地には培地中の成分とその分量が明らかにされている無血清の EpiLife 培地 (ThermoFisher Scientific 社)を用い、気液界面培養および液浸培養を行った。カルシウム (CaCl<sub>2</sub>, 最終濃度 1.5 mM), アスコルビン酸 (L-Ascorbic acid phosphate magnesium salt *n*-hydrate, 最終濃度 0.283 mM, 0.05 mg/ml ascorbic acid), keratinocyte growth factor (KGF, 最終濃度 10 ng/ml) をそれぞれ 1 種類加えた培地, 2 種類ずつ加えた培地, および 3 種類全てを加えた培地を用いて気液界面培養を 3 週間まで行った。また, 3 種類全てを加えた液浸培養を 2 週間まで行った。
- (3) 免疫組織学的分析：以下に示す分子に

対する抗体を用いて、分子の局在を観察した；keratin 1 (K1), K2, K4, K5, K10, K13, K14, Ki67, involucrin, integrin 4。

### 4. 研究成果

- (1) 気液界面培養下での上皮の重層構造形成に及ぼすカルシウム, アスコルビン酸および KGF の影響

カルシウムを含まない培地では、たとえアスコルビン酸や KGF が含まれていても、培養産物が重層化した上皮の構造を呈することはなかった。しかし、カルシウムのみ含む培地での 2 週間までの培養によって、上皮が重層化し、角化した。従って、上皮の重層化に最低限必要な因子は 1.5 mM 以上のカルシウムの存在であることがわかった。しかし、カルシウムのみ添加条件では、培養 3 週間で重層に乱れが生じ、同時に keratin や involucrin の局在も乱れ、さらに基底細胞層の細胞から Ki67 が消失した。このことから、カルシウムのみ添加ではケラチノサイトの寿命が 3 週間まで持たないことがわかった。培養 3 週間でのこれらの変化は、アスコルビン酸の添加では改善しなかったが、KGF の添加によって改善することが判明した。さらに、アスコルビン酸を加えることによって角化層での細胞の核が喪失するなど、本来の角化重層扁平上皮に近い構造となる (図 1) ことから、

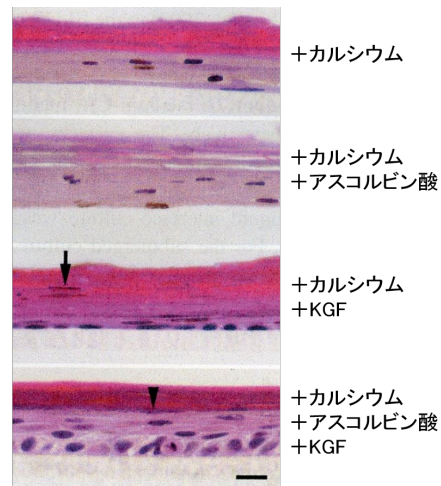


図1 気液界面培養3週間後の角化重層扁平上皮様構造—カルシウム, アスコルビン酸, KGFの影響—

カルシウムによって初めて角化重層扁平上皮様構造が形成可能であるが、3週間の培養では構造が破たんする。これに KGF を加えて初めてその破たんが抑制される。さらにアスコルビン酸を加えることで、角化層の核が消失し、基底細胞層とその上層の構造が明確となり、きれいな角化重層扁平上皮様構造となる。矢印:角化層の扁平化した核, 矢じり:ケラチン顆粒, バー: 20 μm

アスコルビン酸は KGF と協調して上皮の重層構造形成の完遂に寄与することがわかった。

(2) 気液界面培養と液浸培養で形成される重層扁平上皮の違い

気液界面培養で、角化層の核が消失して完全な角化重層扁平上皮用構造が構築されるカルシウム、アスコルビン酸およびKGFの3種類の因子を含んだ培地で、液浸培養を行い、気液界面培養によって得られた上皮構造の違いを調べた。当初、上皮の表層が乾燥した状態では皮膚に類似した完全な角化層が構築され、その反対に上皮表層が乾燥することのない液浸培養では非角化上皮の構造が形成されると予測した。ところが、予想に反して液浸培養でも角化層が形成された。しかし、その角化層には所々に核が残存しており、錯角化という現象と類似していた。核が残存しない皮膚と比べて、角化している歯肉の角化層は核が残存する錯角化を呈しており、本研究での液浸培養によって錯角化した角化重層扁平上皮様の構造が形成できることが示された(図2)。

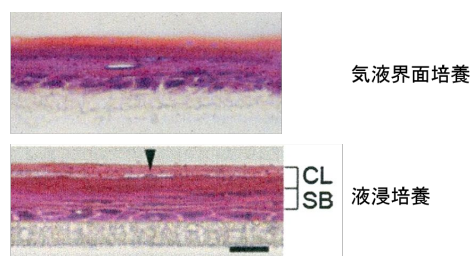


図2 培養2週間後の角化重層扁平上皮様構造  
—気液界面培養と液浸培養での違い—

気液界面培養では角化層に核の残存はなかったが、液浸培養では角化層に扁平化した核の残存があり、錯角化の状態を呈していた。矢じり:角化層内の扁平化した核、バー:20μm

これらの現象は、口腔内の歯肉や歯槽粘膜などの上皮の形成のメカニズムを探るうえで、本モデルが非常に有用となりうることを示している。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計1件)

1. Seo A, Kitagawa N, Matsuura T, Sato H, Inai T. Formation of keratinocyte multilayers on filters under airlifted or submerged culture conditions in medium containing calcium, ascorbic acid, and keratinocyte growth factor. *Histochem. Cell Biol.* 査読有, 146, 2016, 585-597. DOI: 10.1007/s00418-016-1472-1

[学会発表](計7件)

1. 瀬尾 皓. ケラチノサイトの3次元培養におけるカルシウム, アスコルビン酸, KGFの作用. 第43回福岡歯科大学学会総会,

2016年12月18日, 福岡歯科大学(福岡県・福岡市)

2. 宮園 祥爾. 気液界面培養, 液浸培養におけるタイトジャンクションタンパク質の局在. 第43回福岡歯科大学学会総会, 2016年12月18日, 福岡歯科大学(福岡県・福岡市)
3. 瀬尾 皓. ケラチノサイトの3次元培養におけるカルシウム, アスコルビン酸, KGFの作用. 日本バイオマテリアル学会シンポジウム, 2016年11月21~22日, 福岡国際会議場(福岡県・福岡市)
4. 瀬尾 皓. ケラチノサイトの3次元培養系における角化, 重層化の解析. 第15回日本再生医療学会総会, 2016年3月17~19日, 大阪国際会議場(大阪府・大阪市)
5. Matsuura T. A 3D keratinocyte culture model creating a keratinized epithelial equivalent. The 16th meeting of the International College of Prosthodontists, 2015年9月19日, Seoul (Korea)
6. 松浦 尚志. ケラチノサイト単独培養による口腔粘膜角化モデル. 第124回日本補綴歯科学会学術大会, 2015年5月31日, 大宮ソニックシティ(埼玉県・大宮市)
7. 瀬尾 皓. 口腔の角化重層扁平上皮と非角化重層扁平上皮の比較解析. 日本補綴歯科学会平成26年度九州支部学術大会, 2014年8月24日, 福岡県歯科医師会館(福岡県・福岡市)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等掲載なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 博信 (Sato Hironobu)  
福岡歯科大学・口腔歯学部・教授  
研究者番号: 00145955

(2) 研究分担者

松浦 尚志 (Matsuura Takashi)  
福岡歯科大学・口腔歯学部・准教授  
研究者番号: 60330966

徳富 健太郎 (Tokutomi Kentaro)  
福岡歯科大学・口腔歯学部・助教  
研究者番号: 20508981

水町 栄美理 (Mizumachi Emiri)

福岡歯科大学・口腔歯学部・助教  
研究者番号：40631700

(3)連携研究者  
なし

(4)研究協力者  
瀬尾 皓 (Seo Akira)  
福岡歯科大学・大学院生

宮園 祥爾 (Miyazono Shoji)  
福岡歯科大学・大学院生