

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K11034

研究課題名(和文)時刻情報伝達物質であるメラトニンによる象牙質の組織構造と象牙芽細胞の制御機構

研究課題名(英文)Control mechanism on structure, composition, and calcification of dentin and odontoblasts by time information transmitter melatonin

研究代表者

三島 弘幸(MISHIMA, Hiroyuki)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：30112957

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：メラトニン投与群では象牙芽細胞内のメラトニン受容体MT1の発現がより強かった。メラトニン投与群では象牙芽細胞の背が高く、象牙芽細胞数が増加していた。象牙前質中の石灰化球の数が増加し、大きさも増大していた。象牙質のアパタイト結晶が均一な大きさで規則的に配列し、結晶性がやや向上した。またコラーゲン線維が増加した。メラトニン投与により血清中のCaやP濃度の挙動に変化をもたらし、メラトニン代謝産物の量が増加した。メラトニンが体内の血中組成に変化をもたらし、象牙質や象牙芽細胞に影響を与え、基質のコラーゲン線維の分泌、石灰化機構、アパタイト結晶の結晶性を変化させる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The expression of MT1 and MT2 melatonin receptor was confirmed in the odontoblasts of the control group. In addition, the expression of MT1 was stronger than that of MT2. A strong expression of MT1 was detected in the odontoblasts in the melatonin-treated groups. In the melatonin-treated groups, the height of odontoblasts was high and the number of odontoblasts increased. The number and size of calcospherites in predentin increased in proportion to the concentration of melatonin. The crystallinity and orientation of apatite crystal in dentin were improved by administration of melatonin. The odontoblasts were activated by melatonin, and the secretion of collagen fibers was promoted. Melatonin administration changed the behavior of Ca and P concentration in serum at night. Melatonin is efficiently incorporated into odontoblasts. The present study suggests that melatonin changed the blood composition in the body and influenced the structure, calcification, and crystallinity of dentin.

研究分野：口腔組織学

キーワード：メラトニン 象牙質 象牙芽細胞 アパタイト結晶 メラトニン受容体 石灰化機構 石灰化球 コラーゲン線維

1. 研究開始当初の背景

(1) メラトニンとは、分泌量が夜間に高く昼間に低いといった明確な日周変化を示すホルモンである(服部, 2007; 2010)。この日周変化は、概日時計の存在部位である視床交叉核が光情報を受け取る事により生じ、血液だけでなく脳脊髄液、唾液などあらゆる体液中に認められる(服部、鈴木ら, 2006)。メラトニンの主な作用には、概日(サーカディアン)リズムの同調効果、フリーラジカルのスカベンジ効果、破骨細胞抑制効果、骨密度促進効果(Tresguerres, et. al., 2013)などがある。しかしながら、メラトニンの象牙質に対する作用を研究した報告はない。

(2) 成長線とは、成長に伴い膠原線維の配列の規則性と密度差及び石灰化度の強弱によって観察される構造を指す(三島ら, 2010)。象牙質では4種(1日周期、2-3日周期、14日周期、月齢(28日)周期)の周期性を報告している。しかし、象牙質の成長線の周期性、定義、あるいは名称では国内外で議論がある。メラトニン投与群の歯では、新たな成長線の形成が確認でき、さらに成長線の間隔が有意に狭くなった。メラトニンが象牙芽細胞の石灰化機構や成長線の形成に関与していると考察された。このような背景から、メラトニン投与による象牙質の組成変化、象牙芽細胞の形態変化、あるいは象牙芽細胞突起のネットワーク形成を追及し、メラトニンによる象牙質の組織構造や象牙芽細胞の制御機構を明らかにする本研究計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、歯の形成にメラトニンがどのように制御しているのかを調べることである。メラトニンは約24時間周期のサーカディアンリズムの同調因子であることから、歯の形成にもメラトニンが関与している可能性がある。そこで平成23-25年度基盤研究(C)において、メラトニンの新規作用として成長線の形成機構に影響することを報告した(三島ら, 2013)。本研究では、成長線形成の機構を解明するために、メラトニン投与による象牙質の組織構造や組成変化、象牙芽細胞の形態変化、突起のネットワーク形成の有無、さらに石灰化に関するタンパク質や遺伝子発現を解析する。形態学専門家(研究代表者)と微細分析学及び分子生物学の専門家(研究分担者)が役割分担をして、メラトニンの象牙質に対する新規な機構解明を目指す。本研究の目的は、象牙質の形成にメラトニンがどのように制御しているのかを調べることである。

3. 研究の方法

(1) 本研究には出生後5日齢、6日齢、7日齢のSDラットを用いた。これらのラットを対照群、低濃度群、高濃度群のメラトニン投与群に区分し、3群の妊娠SDラットに胎齢19日からメラトニンを溶解した飲料水を常時経口投与した。屠殺は昼間(12時以降)及び夜間(0時以降)に行い、昼間に摘出した標本を昼間標本とし、夜間に摘出した標本を夜間標本とした。摘出した試料は10%中性緩衝ホルマリン液にて固定した。

(2) 脱灰標本用試料は0.5%EDTA脱灰液にて脱灰を行い、既知の方法に従ってパラフィン包埋を行い、薄切をして染色を行った。染色はHE染色、鍍銀染色(渡辺法、PAM染色)、TIブルー染色や免疫染色(メラトニン受容体免疫染色: MT1とMT2)などを行った。染色した標本は光学顕微鏡で観察し、画像解析用ソフトWinROOFで免疫染色の発現変化、石灰化球の測定を行った。PAM染色やTIブルー染色、導電性コーティング剤を施した試料はSEMで歯髄の構造及び象牙芽細胞を観察した。

(3) 研磨標本は固定後、切歯を抽出し、砥石で片面及び両面研磨した。さらにダイヤモンドラッピングフィルム、ダイヤモンドペーストにて研磨を行った。CMR法で石灰化度を分析した。偏光顕微鏡やSEMにて象牙質の微細構造を解析した。X線回析法、EBSD分析や顕微レーザーラマン分光装置でアパタイト結晶の結晶性や配向を解析した。AFMによる結晶表面の解析を行った。摘出し薄切した歯根部を導電性コーティング処理し、象牙細管を観察した。またMALDI TOF-MS分析にて象牙質のコラーゲンのペプチド分子を解析した。

(4) 屠殺前に血液を採取し、SPOT-Chem分析で血清中のCa, P, Mgの変動を分析し、LC-MS/MSにて血清中のメラトニン代謝産物(Tryptophan-Serotonin-N-Acetylserotonin-Melatonin-6-Hydroxymelatonin-6-Sulfatoxymelatonin)の分析を行った。

4. 研究成果

(1) 昼間標本において対照群とメラトニン投与群で明瞭な差は認められなかったが、夜間標本では、メラトニン投与量の増加に伴い石灰化球数が増加した。また、Bonferroni補正とTukey検定により、石灰化球数は夜間標本において対照群と高濃度群で有意差が認められた。対照群では、昼間標本と夜間標本で有意差が認められた。光学顕微鏡やSEM解析から対照群に比べて高濃度群では石灰化球が大きくなっていた。石灰化球の直径は対照群では10~18 μ m、高濃度群は13~25 μ mであった。メラトニン投与によって象牙芽細胞が活性化され、有機質の分泌や石灰化球形成が促進したと考えた。PAM染色標本とTI

ブルー染色標本の観察結果では、対照群と比較し投与群では象牙芽細胞の背が高く、より密集しており、毛細血管の分布量が多くなっていった。またコルフ線維も投与群で明瞭に確認された。メラトニン投与により象牙芽細胞の分化が促進され、コルフ線維が増加し、象牙芽細胞に Ca や有機 P を供給するための毛細血管が増加したと考えられる。導電性コーティング剤を施した試料の観察では、対照群と比較し低濃度群で象牙細管の幅が狭くなっていた。メラトニン投与群で象牙細管の幅が狭くなり、また管周象牙質が観察された。対照群で平均 $0.77 \pm 0.22 \mu\text{m}$ 、メラトニン低濃度群で平均 $0.18 \pm 0.03 \mu\text{m}$ 、メラトニン高濃度群で平均 $0.87 \pm 0.34 \mu\text{m}$ であった。

(2) 免疫染色では対照群の象牙芽細胞において MT1 と MT2 両方の発現が確認され、MT2 に比べ MT1 の発現が強かった。夜間標本ではメラトニンの投与量が増えるにしたがい発現が強くなった(対照群: 37.9 ± 1.3 、低濃度群: 40.6 ± 1.4 、高濃度群: 42.6 ± 0.9)。昼間本においては対照群(38.2 ± 1.8)と比較し低濃度群(40.9 ± 1.3)は発現が強かったが、低濃度群と比較し高濃度群(36.1 ± 0.7)は発現が弱かった。夜間では MT1 の発現濃度の比較より、メラトニンの量に応じてメラトニン受容体はより発現し、メラトニンの濃度依存性が認められた。メラトニンを効率よく細胞内に取り入れていることが示唆された。メラトニンが象牙芽細胞の生理的機能に影響を与えていると考えられる。

(3) 偏光顕微鏡で成長線を観察した結果、夜間標本の高濃度群は成長線における層ごとの干渉色の違いがみられた。複屈折性の違いから干渉色が変化するため、メラトニンを投与することによって象牙質のアパタイト結晶とコラーゲン線維の組織構造に変化があることが示唆された。CMR 分析では昼間標本においてメラトニンの投与量が増えるに従い石灰化度(mineral-Volume%)がわずかに高くなっていった(対照群: 29.1、低濃度群: 30.0、高濃度群: 29.5)。また、対照群と比較し、高濃度群で石灰化球の増加が認められた。夜間標本の対照群とメラトニン投与群で明瞭な差が認められず、個体によって逆に低下する傾向があった。メラトニンが一様に影響せず、個体間で変異がある可能性が認められた。

(4) 夜間標本において、SEM-EDS 分析(元素マッピング)では、対照群と比較し、メラトニン投与群で象牙質の表層や内層の Ca や P の分布密度が増加した。AFM 解析において夜間標本の高濃度群の結晶表面の直径は 161-258 nm であった。対照群と比較し、高濃度群で結晶表面の形態はほぼ均一の大きさで一定方向に配列していた。顕微ラマン分光法では、昼間と比較し夜間標本において対照

群と比べてメラトニン投与群においてリン酸基のピークの上昇が認められた。ピークの高さは分子配向性を表現し、夜間の投与群でより配向性が強くなった。X 線回析において、夜間標本では対照群と比較し高濃度群では象牙質のアパタイト結晶の (002) と (211), (112), (300) の 2 つのピークが検出された。(002) は結晶の長軸、(211), (112), (300) は結晶の短軸の長さに対応する。高濃度群の結晶性が良いと判断された。結晶の配向性解析の EBSD 分析の結果、金属や天然鉱物結晶で見られるキクチパターンは確認できなかった。象牙質のアパタイト結晶が非常に小さいことや、コラーゲンのような有機物が結晶周囲に存在することが原因と考えられる。

(5) 象牙質の有機成分は全成分の 20% を示し、型コラーゲンを主体とした構成である(18)。型コラーゲンは 2 本の 1 鎖と 1 本の 2 鎖から構成されている。Shweitzer ら(2009) は骨を試料として MALDI TOF-MS 分析を行った結果、789 m/z と 805 m/z のピークは型コラーゲン 2 鎖の成分であると報告した。今回、MALDI TOF-MS 分析で検出した 795 m/z と 818 m/z のピークは、型コラーゲンの 2 鎖が分解されたペプチドが検出されたと推定される。ペプチドの検出強度はメラトニンの投与量に比例して高い値となったため、メラトニンの投与により象牙質のコラーゲン分泌が促進されていると考えられる。

(6) SPOT-Chem 分析では血清中の Ca と P の濃度は昼間標本では対照群と比較しメラトニン投与群が高かった。しかし、夜間標本では Ca 濃度において対照群に比較し低濃度群が高く、高濃度群で低かった。P 濃度において対照群に比較しメラトニン投与群では低かった。メラトニン投与により夜間や昼間において血清中の Ca と P の挙動変化が生じたと推察された。また四重極型質量分析計(LC-MS/MS)での血清中のメラトニン代謝産物の分析では、特に夜間では高濃度メラトニン投与群は対照群に比較し、メラトニン代謝産物(6-Hydroxymelatonin: HaMT)の量が増加した(図)。

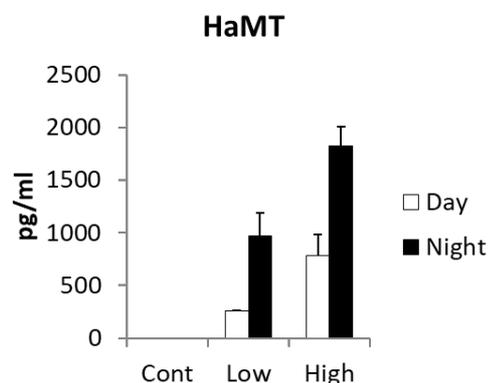


図 メラトニン代謝産物 HaMT の濃度

メラトニンが体内の血中組成に変化をもたらし、象牙芽細胞に影響を与え、細胞の形態や毛細血管の分布密度に変化をもたらし、コラーゲン線維の分泌の促進にも関与していると考察した。メラトニンは象牙質の組織構造、石灰化機構やアパタイト結晶の配列や結晶性に影響を及ぼす可能性(服部、2017)があると考えられる。

引用文献

Schweitzer, M. H., Zheng, W., Organ, C.L., Avci, R., Suo, Z., Freimark, L. M., Leblue, V. S., Duncan, M. B., Vander Heiden, M. D., Neveu, J. M., Lane, W. S., Cottrell, J. S., Horner, J. R., Cantley, L. C. Biomolecular Characterization and Protein Sequences of the Campanian Hadrosaur *B.canadensis*. SCIENCE, Vol. 324, 2009, 626-631

服部敦彦、メラトニンとエイジング、比較生理生化学、34巻、2017、2-11

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 13件)

Mishima H, Takei M, Sasagawa I, Miake Y, Nature of apatite crystals in the tooth of *Eusthenopteron* from Devonian, *J Hard Biol*, 査読有, Vol.26, No.4, 2017, 399-404
DOI:10.2485/jhtb.26.399

Hanmoto T, Tabuchi Y, Ikegame M, Kondo T, Kitamura K, Endo M, Kobayashi I, Mishima H, Sekiguchi T, Urata M, Seki A, Yano S, Hattori A, Suzuki N, Effect of low-intensity pulsed ultrasound on osteoclasts: Analysis with gold-fish scales as a model of bone, *Biomed Res*, 査読有, Vol. 38, No.1, 2017, 71-77
DOI:10.2220/biomedres.38.71

見明康雄、三島弘幸、天然アパタイトの組成と生体応用の可能性、*歯科学報*、査読有、Vol. 117、No. 6、2017、441-442
<http://hdl.handle.net/10130/4427>

Sato M, Hanemoto T, Yachiguchi K, Tabuchi Y, Kondo T, Endo M, Kitani Y, Sekiguchi T, Uraka M, Mishima H, Hattori A, Suzuki N, Sodium fluoride influences on bone metabolism in goldfish: Analysis by scale osteoblasts and osteoclasts. 2016 Joint Seminar on Environmental Ecology and Restoration between Taiwan and Japan Proceedings, 査読無, 2016, 53-5

三島弘幸、武内昇平、田辺咲貴、服部淳彦、鈴木信雄、筧光夫、松本敬、池亀美華、武市和彦、見明康雄、生体リズム同調因子メラトニンが象牙芽細胞、象牙質の構造及び石灰化機構に及ぼす影響、*日本再生歯科医学会誌*。査読有、Vol.14、No.1、2016、5-17
DOI: 10.11223/jard.14.5

Suzuki N, Somei M, Seki A, Sekiguchi T, Tabuchi Y, Mishima H, Kase Y, Kaminishi A, Yachiguchi K, Kitamura K-I, Oshima Y, Hayakawa K, Yano S, Hattori A, Novel tryptophan derivatives as potentially effective therapeutic drugs to treat bone diseases, *American J Life Sci*, 査読有, Vol. 3, No. 3-2, 2015, 31-38
DOI: 10.11648/j.ajls.s.2015030302.16

三島弘幸、尾碓真帆、武内昇平、武市和彦、服部淳彦、鈴木信雄、筧光夫、松本敬、池亀美華、見明康雄、メラトニン投与における象牙質の組織構造、象牙芽細胞や成長線周期に及ぼす影響、*日本再生歯科医学会誌*、査読有、Vol.13、No.1、2015、2-14
DOI:10.11223/jard.13.2

[学会発表](計 19件)

三島弘幸、服部淳彦、鈴木信雄、松本敬、池亀美華、見明康雄、松本由樹、象牙質や象牙質結晶に対するメラトニンの影響、第123回日本解剖学会総会全国学術集会、2018

三島弘幸、見明康雄、笹川一郎、筧光夫、*デボン紀肉鱗類 *Eusthenopteron foodi* の歯の組織と歯の支持様式*、平成29年度高知大学海洋コア総合研究センター共同利用・共同研究発表会、2018

Mishima H, Tanabe S, Hattori A, Suzuki N, Takei M, Matsumoto T, Ikegame M, Miake Y, Matsumoto Y, Effect of circadian rhythm synchronous factor melatonin on structure, composition, and calcification of dentin and odontoblasts, *Biomim14 (14th International Symposium on Biomineralization)*, 2017

Ishikawa N, Nishi C, Mishima H, Yamauchi K, Matsumoto Y, Relationship between bone morphology and bone quality in female, Implication for additive risk of alternative forced molting. *Biomim14 (14th International Symposium on Biomineralization)*, 2017

三島弘幸、見明康雄、松本由樹、天然アパタイト結晶と生体硬組織におけるアパタイト結晶の比較、第 59 回歯科基礎医学学会学術大会、2017

三島弘幸、田辺咲貴、服部淳彦、鈴木信雄、筧光夫、松本敬、池亀美華、見明康雄、松本由樹、概日リズム同調因子メラトニンによる象牙質や象牙芽細胞の組織構造、第 35 回化石研究会総会・学術大会、2017

三島弘幸、田辺咲貴、服部淳彦、鈴木信雄、松本敬、池亀美華、見明康雄、メラトニンによる象牙質や象牙芽細胞への影響、第 122 回日本解剖学会総会全国学術集会、2017

三島弘幸、見明康雄、松本由樹、寺林優、大久保厚司、新藤恵美、顕微ラマン分光分析装置による天然アパタイト結晶と生体硬組織のアパタイト結晶の解析、第 14 回日本再生歯科医学会総会学術大会、2017

Hanemoto T, Tabuchi Y, Ikegame M, Kondo, T, Kitamura K, Endo M, Mishima H, Sekiguchi T, Urata M, Seki A, Yano S, Hattori A, Suzuki N, Effects of low-intensity pulsed ultrasound on osteoclasts: Analysis with goldfish scales as a model of bone, 日本動物学会 89 回年次大会, 2016

三島弘幸、近藤康生、見明康雄、魚類の耳石化石に観察される成長線に関する形態学及び分析学的研究、第 58 回歯科基礎医学学会学術大会、2016

Mishima H, Takeuchi S, Takechi K, Hattori A, Suzuki N, Kakei M, Matumoto T, Ikegame M, Miake Y, Effect of melatonin on structure, composition, and calcification of dentin. TMD2016 (12th Tooth Morphogenesis and Differentiation Conference), 2016

三島弘幸、武内昇平、服部淳彦、鈴木信雄、筧光夫、松本敬、池亀美華、見明康雄、時刻情報伝達物質メラトニンが象牙質の構造や石灰化機構に及ぼす影響、第 121 回日本解剖学会総会全国学術集会、2016

武内昇平、三島弘幸、服部淳彦、鈴木信雄、筧光夫、松本敬、池亀美華、見明康雄、生体リズム伝達物質であるメラトニ

ンが象牙質の組織構造に及ぼす影響、第 10 回バイオミネラリゼーションワークショップ、2015

Kakei M, Sakae T, Mishima H, Yoshikawa M: The mechanism of osteoporotic change caused by exposure to harmful chemicals such as Cd and F ions, Animal model of postmenopausal women, 13th International Symposium on Biomineralization, 2015

Mishima H, Osaki M, Hattori A, Suzuki N, Kakei M, Matumoto T, Ikegame M, Takechi K, Miake Y, Correlation between the structure and composition of teeth dentin and the melatonin of circadian rhythm synchronous factor. 13th International Symposium on Biomineralization, 2015

三島弘幸：爬虫類(ワニ)の象牙質形成、成長線形成機構を中心に、第 57 回歯科基礎医学学会学術大会サテライトシンポジウム、2015

三島弘幸、見明康雄、松本由樹、寺林優、新藤恵美、大久保厚司、天然アパタイトの生体応用の可能性、化石研究会 33 回総会・学術大会、2015

Mishima H, Osaki M, Hattori A, Suzuki N, Kakei M, Matsumoto T, Miake Y, Ikegame M, Histological and analytical studies on the role of melatonin in the structure and composition of teeth dentin. The 92th Annual Meeting of the PSJ/the 120th Annual Meeting of the JAA, 2015

鈴木信雄、矢野幸子、大森克徳、北村敬一郎、清水宣明、西内 巧、染井正徳、関口俊男、渡辺良成、池亀美華、近藤 隆、田淵圭章、鈴木 徹、遠藤雅人、竹内俊郎、江尻貞一、三島弘幸、嶋津 徹、関あずさ、舟橋久幸、高垣裕子、笠原春夫、永瀬 睦、田谷敏貴、長野慎太郎、宮下知之、服部淳彦、魚類のウロコを用いた宇宙生物学的研究：キンギョのウロコ及び骨疾患モデルラットの骨代謝に対するプロメラトニンの新規作用、第 29 回宇宙環境利用シンポジウム、2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三島 弘幸 (MISHIMA, Hiroyuki)

鶴見大学・歯学部・非常勤講師

研究者番号：30112957

(2) 研究分担者

見明 康雄 (MIAKE, Yasuo)
東京歯科大学・歯学部・准教授
研究者番号：00157421

鈴木 信雄 (SUZUKI, Nobuo)
金沢大学・環日本海域環境研究センター・
教授
研究者番号：60242476

服部 敦彦 (HATTORI, Atsuhiko)
東京医科歯科大学・教養部・教授
研究者番号：70183910

池亀 美華 (IKEGAME, Mika)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号：70282986