

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H06959

研究課題名(和文) コラーゲン糖化修飾における定量評価法の確立

研究課題名(英文) Distribution of pentosidine in dentin collagen

研究代表者

清水 真人 (Shimizu, Masato)

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70380277

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：還元糖は生理条件下でタンパク質と結合し、不可逆的に糖化最終産物(Advanced Glycation End products, AGEs)を生成する。AGEsの蓄積は動脈硬化や骨粗鬆症などの一因となる。象牙質は代謝がほとんどなく、AGEsの経年的増加はほとんどないと考えられてきたが、加齢や、う蝕時のエナメル質の喪失に伴い増加が認められた。2型糖尿病モデルラットを用いたAGEsの分布解析によって、通常の象牙質の糖化は歯髄中の血液より供給される糖のよることが示唆された。また歯周組織においてはAGEsは骨小腔に多くみられたことから骨細管を経て供給される糖による糖化と考えられる。

研究成果の概要(英文)：Reducing sugar binds to proteins under biological conditions, and through rearrangement and oxidation it reacts irreversibly to form advanced glycation end products (AGEs). As dentin collagen does not undergo extensive metabolism after eruption, it has been reported that the amount of AGEs in human dentin remains stable regardless of age. However, we have observed that the amount of AGEs differs significantly between dentin from patients of different ages or from dentin in dental caries. Analyzing the glycation process in dentin requires the calculation of the temporal correlation between glycation stress and dentin collagen. Therefore, we used type 2 diabetes model rats to analyze the temporal correlation of AGEs through the quantitation of pentosidine. The results indicated that in contrast to normal rats, the distribution of pentosidine spreads from the predentin to the enamel side in the molars of diabetes rats, and is also deposited in the periodontal tissues.

研究分野：保存治療系歯学

キーワード：象牙質 コラーゲン 糖化最終産物 ペントシジン 蛍光 2型糖尿病 加齢

### 1. 研究開始当初の背景

アミノ酸と還元糖を加熱すると褐色の色素が生成する。メイラード反応として知られるこの反応によって、アミノ酸は糖化(glycation)され不可逆的に糖化最終産物 (Advanced Glycation Endproducts: AGEs) となる。糖化反応はこれまで食品の加熱によって生じる着色や、香りに関わる反応として食品化学の領域で注目されてきた。生理的条件下でもメイラード反応は進行し、生体内に蓄積することで、全身疾患 (認知症、癌の転移、高血圧、動脈硬化症など) への関与している考えられている。AGEs により修飾された蛋白質が、糖尿病性血管合併症や動脈硬化などの多くの疾患病変部位に沈着することが明らかになり、医科の分野で急速に研究が展開され始めている。歯科分野において象牙質、歯周組織への蓄積が認められているが、経年変化や組織内分布、歯科疾患との関連など詳細な解析行われていない。

### 2. 研究の目的

歯や骨等の硬組織においては加齢にともないコラーゲンの「糖化」反応が進行して脆性化が起こることが明らかになりつつある。また糖尿病においては細胞内への糖の取り込みが困難になることで、細胞外マトリックスのコラーゲンの糖化が促進され、組織、臓器の機能に深刻な影響を与えることが知られている。本研究の目的は、

- (1) 象牙質の「糖化」影響を調べるため、抗糖化物質抗体を用いた形態学的手法や象牙質コラーゲンや糖化物質を分離分析する分析化学的手法で糖化を定量化する。
- (2) 糖化進行のメカニズムや、糖化に関連する石灰化誘導の現象を明らかにする。
- (3) 石灰化をコントロールすることでう蝕進行を阻害する医薬品の開発や、動脈硬化症など病的な石灰化を軽減する方法を開発する。

### 3. 研究の方法

- (1) 象牙質の構造及び AGEs 修飾の加齢変化、分布の検討
  - ①透過型電子顕微鏡による象牙質の観察結果を比較し、加齢による相違を明らかにする。
  - ②象牙質の微小領域から抽出したコラーゲンを酸完全分解し、高速液体クロマトグラフィー (以下 HPLC) で象牙質に含まれる蛍光性 AGEs の定量を行った。
  - ③AGEs の量と石灰化度の評価を透過型電子顕微鏡で解析を行った。
- (2) 糖尿病患者の歯牙、糖尿病モデルマウスにおける糖化修飾ならびに石灰化の評価。
  - ①免疫組織化学染色法にて糖尿病罹患状態と健常な状態の AGEs の局在の比較評価を行った。
  - ②象牙質のコラーゲンの石灰化度の違いをマ

イクロ CT、電子顕微鏡散乱のパターンにて行った。

### 4. 研究成果

ヒトの歯の象牙質より微小部分 (1mg 以下) より抽出したコラーゲン中に存在する糖化最終産物 (AGEs) を AGEs の一種であるペントシジンの蛍光をターゲットとした高速液体クロマトグラフィー (HPLC) により定量化に成功した。高齢者象牙質より若年者象牙質に AGEs が多く認められ、2型糖尿病患者においては若年者よりも多く、高齢者よりは少ない量の AGEs が認められた。2型糖尿病患者においては発症時年齢や血糖コントロールの良否によって糖化ストレスのが違うため年齢や抜歯時における HbA1c 値との相関は見いだせなかった (図 1)。

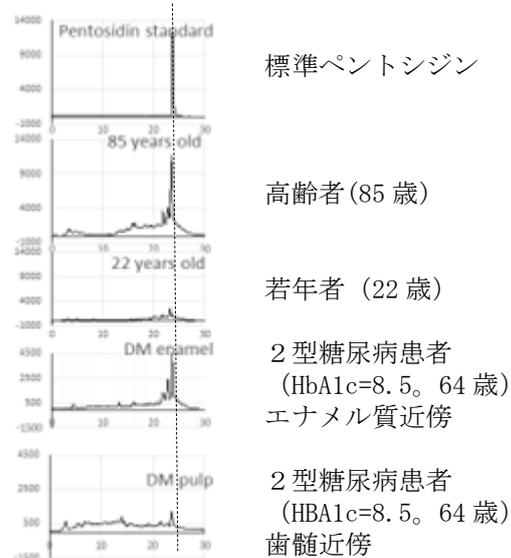


図 1. 酸分解後の象牙質コラーゲンの HPLC 分析。ex. 335/em. 385 蛍光検出。

免疫組織染色は付加型 AGEs である CML に対する抗体 (図 2)、架橋型、蛍光性の pentosidine の抗体 (図 3) を用いて行った。

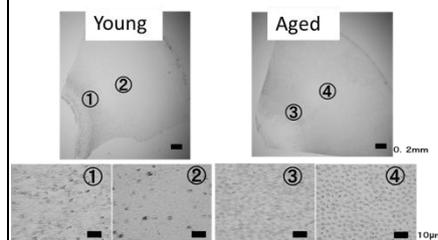


図 2. 抗 CML 抗体による免疫組織染色

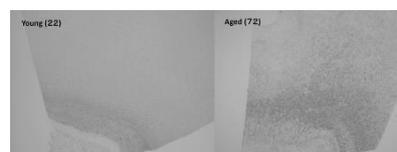


図 3. 抗 pentosidine 抗体、免疫組織染色。

CML、pentosidine ともに高齢者における密度が高く、歯髄に接している象牙質から表層の象牙質に向かって濃度勾配を持って分布していた。

高血糖ストレスによる継時的な AGEs の変化を調べるには高血糖状態を維持する必要がある。しかし、このことは血糖値のコントロールを放棄することになり実際の患者では倫理的に許されない。そこで2型糖尿病モデルラット:SDT-Fatty(日本クレア)を用いて免疫組織染色(図5)ならびに、血液、尾髄コラーゲン中のAGEsをHPLCで分析した(図6、7)。

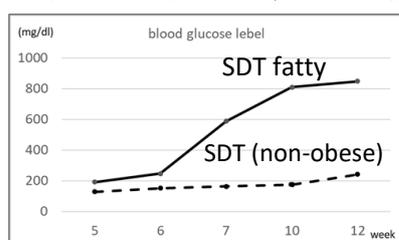
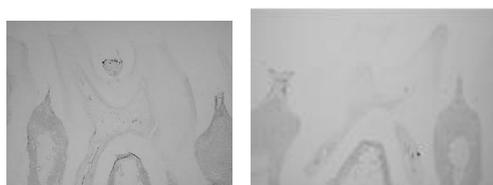


図4. 糖尿病モデルラット血糖値の推移



SDT (non-obese) SDT-fatty

図5. 12週齢ラット臼歯における抗ペントシジン抗体による免疫組織染色

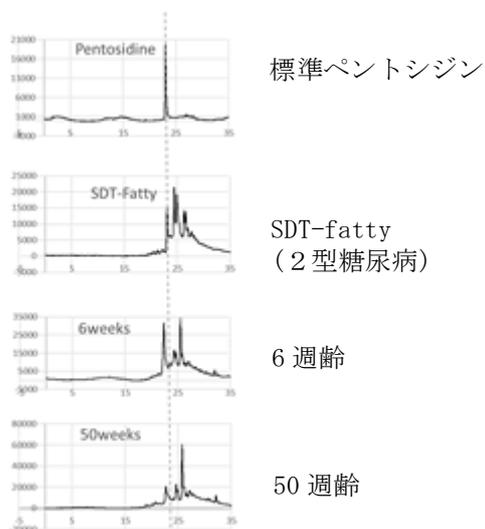


図6. ラット血中のペントシジン。HPLC分析 ex. 335/em. 385 蛍光検出。

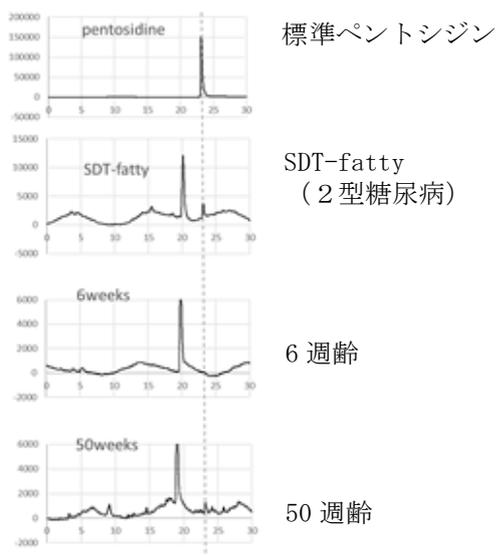
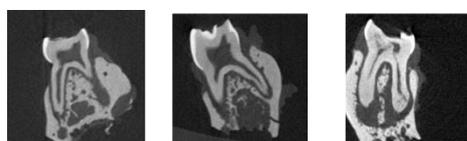


図7. ラット尾髄中のペントシジン HPLC分析 ex. 335/em. 385 蛍光検出。

血糖値が 800mg/dL を越え2型糖尿病を発症した12週齢のラット(図4)の臼歯で抗ペントシジン抗体で免疫染色をした結果、2型糖尿病発症ラットの方が濃く染色された。また血中のペントシジンは2型糖尿病発症ラットでは明らかに増加、検出されたものの2型糖尿病を発症していないラットの血中からはペントシジンのピークは週齢にかかわらず検出できなかった。ラットの尾髄中のペントシジンの分析では2型糖尿病発症ラットと50週齢のラットからペントシジンが検出された。

また糖尿病患者では歯髄内結石が多発することが報告されているが、患者では歯髄内結石があるからといって抜歯して解析することは許されない。歯髄内結石についても2型糖尿病モデルラット(SDT fatty)で解析を進めた。マイクロCT(図8)、SEMによる反射で電子解析を行った。



6週齢 50週齢 SDT-fatty(2DM)

図8. マイクロCTによるラット臼歯の歯髄内結石の観察

マイクロCTでは週齢に相関して歯髄象牙質の肥厚、歯髄内結石が多くなっていることが認められた。SEM反射電子による解析から、歯髄内結石は、正常な象牙質とほぼ同一組成であることが示唆された。

ヒトの象牙質では加齢や糖尿病によってAGEsの蓄積が認められているが、本研究により実際に架橋型蛍光性AGEsであるペントシジンを検出することができた。

2型糖尿モデルラットを用いた解析により高血糖値が維持されている状態でのAGEsの蓄積の状態を免疫組織染色で観察することができた。ラットの臼歯は象牙質壁が薄くコラーゲン抽出が困難なため、現在条件検討中であるが、血中においてAGEsは2型糖尿病モデルラットでのみ確認できた。ラット尾腱においては2型糖尿病、週齢に相関してAGEsが認められた。血液では代謝の影響を受け、加齢による増加がみられなかったが、尾腱コラーゲンには蓄積がみられたので加齢に伴い血管壁にAGEsが蓄積している可能性がある。マイクロCTにより糖尿病モデルラットでも歯髄内での石灰化や異所性石灰化を促進することが示唆されたが、ラットのライフスパン内の加齢による石灰化は認められなかった。糖尿病の糖化ストレスや、加齢による糖化の蓄積がヒトで認められていたが、糖尿病モデルラットでも糖化ストレスによってAGEsが象牙質に蓄積し、尾腱などのその他の組織にも蓄積することが分かった。またヒトと同様に糖化ストレスによってラットでも生じる歯髄内石灰化を生じ、その成分は象牙質に類似したものであることがわかった。糖尿病モデルラットを用いることで、さらなる糖化ストレスに対する象牙質内石灰化機構の解明ができると考えられる。

#### 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)

Matsuda Y, Miura J\*, Shimizu M, Aoki T, Kubo M, Fukushima S, Hashimoto M, Takeshige F, Araki T. Influence of Nonenzymatic Glycation in Dentinal Collagen on Dental Caries. *J Dent Res*. 95: 1528-1534, 2016.

[学会発表] (計 6 件)

①. 久保美寿穂、三浦治郎、清水真人、松田祐輔、竹重文雄：ナノインデンテーションにおける象牙質コラーゲン線維の物性評価、第145回日本歯科保存学会 秋期学術大会、2016年10月28日、長野

②. 清水真人、三浦治郎：象牙質コラーゲン中の架橋型AGEsの検出、第58回 歯科基礎医学会、2016年8月26日 札幌

③. 松田祐輔、三浦治郎、清水真人、久保美寿穂、竹重文雄：齶蝕罹患象牙質における糖化最終産物AGEs蓄積に関する研究、日本歯科保存学会 2016年度春季学術大会(第144回)、2016年6月10、11日、栃木

④. Miura J, Matsuda Y, Shimizu M, Kubo M, Takeshige F, Enomoto S, Arai S, 3-dimensional Analysis of Non-enzymatic

Glycation in Caries Using Immunohistochemical FIB/SEM, , 95<sup>th</sup> General Session of the IADR, March 24, 2017, San Francisco.

⑤. Miura J, Kubo M, Shimizu M, Matsuda Y, Takeshige F, Araki T, Influence of dentinal collagen cross-linking on human dentin with non-enzymatic glycation, XXVI Congress of the International Society of Biomechanics July 23-27, 2017, Brisbane, Australia.

⑥. 清水真人、三浦治郎、象牙質コラーゲン中の糖化最終産物ペントシジンの分布 歯科基礎医学会学術大会 2017年9月16~18日 松本歯科大学キャンパス、塩尻市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等  
なし

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者  
清水 真人 (SHIMZU, Masato)  
大阪大学・歯学部附属病院・医員  
研究者番号：70380277

(2) 研究分担者 ( )

研究者番号：

(3) 連携研究者 ( )

研究者番号：

(4)研究協力者

三浦 治郎 (MIURA, Jiro)

大阪大学・歯学部附属病院・助教

研究者番号：70437383