

令和 5 年 6 月 21 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09973

研究課題名（和文）基質糖化に起因した歯髄の異所性石灰化メカニズムの解明と臨床応用法の開発

研究課題名（英文）Mechanism of Ectopic Calcification of Dental Pulp Caused by Glycation and Development of Clinical Application Methods

研究代表者

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

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：2型糖尿病モデルラットでは、9週齢以降に歯髄内に石灰化物の形成を認め、同時に歯髄内にAGEsの沈着を認めることから歯髄内石灰化に糖化が関与していることが考えられる。また炎症や低酸素を示す蛋白質の発現および細胞の状態から、歯髄内の血管障害に起因した血流障害の結果、酸素の供給不足から低酸素状態が起こり、歯髄内において細胞がダメージを受けることによる異栄養性石灰化が促される可能性が示唆された。これらは重度糖尿病患者における全身の異所性の石灰化と関連がある可能性があり今後より深く研究を進めていく方針である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

重度糖尿病に罹患すると異所性の石灰化により様々な障害が発生する。これらの発症メカニズムはまだ詳細には分かっておらず、歯科においても糖尿病患者の歯髄内に石灰化物が認められ、原因不明の歯痛が起こるとされるという報告もある。本研究では、糖尿病の主症状の一つである微小血管障害が歯髄内の血流を悪化させることで細胞が低酸素状態によるダメージを受けて異栄養状態におちいり石灰化が起こっているということが分かった。また歯髄内に出来る石灰化物が象牙質に近い組成であるということから、老化とともに起きる象牙質の肥厚とも関連があるということが示唆された。

研究成果の概要（英文）：In a rat model of type 2 diabetes, calcification was observed in the dental pulp after 9 weeks of age, and AGEs were deposited in the pulp at the same period. The deposition of S100A8, an inflammatory marker, and the expression of hypoxia-indicating proteins such as HIF-1 alpha suggest that blood flow disorder and hypoxia caused by vascular damage in the pulp may promote dystrophic calcification due to cell damage. These findings may be related to systemic ectopic calcification in patients with severe diabetes mellitus.

研究分野：総合歯科学

キーワード：糖化 異栄養性石灰化 加齢 老化 コラーゲン 血管障害 歯髄

## 1. 研究開始当初の背景

糖化反応(glycation)は、1912年に LC Maillard がアミノ酸と還元糖を加熱すると褐色の色素が生成することを発見し以後メイラード反応として知られるようになった。食品の加熱中により着色や、香りの変化に関連する反応として食品化学の領域で注目されてきた。近年になり、糖化反応は血流の影響を受ける部位での老化現象に関連した全身疾患に関与していることから、糖化最終生成物である 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、医療分野で急速に研究が展開され始めている(Yagi et al., Anti-aging med 2012)。象牙質基質においても糖化が起こり、糖化による基質修飾が、象牙質に影響を及ぼしているという報告(Kleter et al, J Dent Res 1998)、さらに歯髄細胞において糖化産物により石灰化を誘導されているという報告(Nakajima et al., J Endod 2013)や、AGEs が石灰化誘導を行う経路が Autophagy に関連するという報告(Meng HZ. et al., J Bio Chem 2016)もあり、AGEs の沈着と基質石灰化には関連があることが示唆されてきた。我々はこれまでの研究で 2 型糖尿病ラット(SDT.Cg-Leprfa/JttJcl)において歯髄内で異所性石灰化が発生することを確認し、免疫組織化学的手法より石灰化現象が基質に沈着した AGEs および RAGE に関連して起こっていることを現象として捉えている。我々は、これらの基質糖化に起因した二次的石灰化を利用することで、歯髄や骨芽細胞における石灰化誘導が可能であると考えた。生体内糖化による石灰化メカニズムの解明と、そのメカニズムを応用した糖化基質による歯髄内新規石灰化誘導法の開発を目指す。

## 2. 研究の目的

我々は、高血糖状態のラットにおいて、歯髄内の基質周囲においても石灰化が顕著に起こる現象を確認している。これは、細胞周囲に存在する基質に糖化修飾が関与することで、石灰化を誘導できる可能性を示唆している。このような糖化技術を石灰化誘導法に結びつけようという研究は世界的にも前例がない。そのためには生体の歯髄内での AGEs の局在や発現様相およびその成因や影響を詳細に調べる必要がある。特に本研究では、ラットを用いることで培養実験に比べて血液や血管周囲の基質修飾といったより複雑な現象をおこなうことを目的としている。さらに重度糖尿病に見られる微小血流障害が歯髄に影響している可能性を考えて血管への色素流入実験や外力が血管にどのような影響を与えるかを有限要素解析による検討を行った。

## 3. 研究の方法

糖化ストレスが組織に及ぼす詳細なメカニズムの解明を行うため、免疫組織化学的手法および分析化学的手法である western blotting 法や HPLC、質量分析などを用いて、歯髄内での糖化物質の局在や物質の定量分析、AGEs の分離および抽出を行い関連する物質の動きや歯髄組織への影響の特定を目的とした。

(1) 動物実験において、6~21 週齢のコントロールラット(雄 SD rat)と 2 型糖尿病モデルラット(以下糖尿病ラット:SDT.C g-*Lept jttjcl*)を実験に用いた。血糖値測定は週 1 回同一時間帯に尾静脈血を滴下し、グルコース分析装置(グルテストミント<sup>®</sup>)を用いて測定を行った。また血中リン濃度は、5~8 週齢のラットに対し鎮静下にて鎖骨下静脈より採血を行い、リン酸測定キットを用いて、655nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにて測定した。臼歯部顎骨を 90kV, 80 μA, FOV 10mm の条件下でマイクロ CT(R\_mCT2)にて観察した。

(2) 走査型電子顕微鏡による形態学的評価・エネルギー分散型エックス線分析(EDX分析)による石灰

化物の組成評価マイクロ CTで撮影後の試料を、樹脂包埋および鏡面研磨後に反射電子を用いた走査型電子顕微鏡にて観察を行った。また同一の試料についてEDX分析を行い、組成を評価した。

#### (3) 免疫組織化学染色による組織学的評価

脱灰処理を行った臼歯部顎骨を、パラフィン包埋を行った後、薄切切片を作製しHE染色、免疫組織化学染色では抗 RAGE 抗体、抗 pentosidine 抗体、抗 S100A8 抗体、抗 osteopontin 抗体を用いて抗原抗体反応を行い DAB で発色後観察した。

#### (4) 歯髄内の血流の評価

血糖値上昇の初期である 9 週齢での評価を行った。黒色素を生理食塩水で希釈した液と 4% パラホルムアルデヒドを混和し、灌流固定後摘出した臼歯部顎骨を、有機溶媒を用いた透明化法 (BABB 法) にて透明化後実体顕微鏡にて観察した。

#### (5) 歯髄内低酸素状態の評価

##### 塩酸ピモニダゾールを用いた評価

屠殺の 30 分前に塩酸ピモニダゾールを腹腔内注射にて投与後、摘出した臼歯部顎骨をパラフィン包埋後、抗 MAb1 抗体を用いて抗原抗体反応を行い DAB で染色後観察し、血流と低酸素状態についての評価を行った。

##### 抗 HIF-1 抗体を用いた評価

抗 HIF-1 抗体を用いて抗原抗体反応を行い DAB で発色後観察し歯髄内の低酸素状態の評価を行った。

#### (6) 有限要素解析による大白歯における応力分布

ラットの大臼歯を  $\mu$ CT にて撮影し得られた形状データより構築した有限要素モデルにより臼歯部における応力分布の解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) SD ラットに比べて SDT-fatty ラットは 7 - 8 週齢以降から急激な体重増加および血糖値の上昇が確認され、9 週齢以降においては歯髄内に石灰化物が形成されているのが分かった。

(2) 電子顕微鏡および元素分析により歯髄内の石灰化物は構造が多孔質で組成が象牙質に近いことが分かった

(3) 免疫組織化学染色より炎症性マーカーおよび代表的な架橋型 AGEs である pentosidine、AGE のレセプターである RAGE の発現が糖尿病ラットにおいて上昇していることが分かった。

(4) 血流の評価より糖尿病ラットにおいては 75% の微小血管が閉塞しており、血流障害が起こっていることが分かった。

(5) 低酸素指標であるピモニダゾール、HIF-1 とともに糖尿病ラットにおいて発現していることが分かった。

(6) 有限要素解析より、大白歯の根尖部において応力が集中していることが分かり、咬合力により糖化により脆弱化した血管に障害が誘発されている可能性が示唆された。

これらのことから、血管内への色素流入試験による血管塞栓の観察から糖化による血管損傷が起こっているといった分析を行っていたが、今回免疫電子顕微鏡法による血管内皮細胞や周囲組織にも糖化の影響が及んでいることがわかり、咬合力による歯根周囲への力学シミュレーションを行うことで血管障害の成因の一つに咀嚼時の力が関与している可能性が示唆された。糖尿病ラット 23 匹に対して歯髄内石灰化が起こる歯種を  $\mu$ CT を用いて調べたところいずれも 11 週令以上のラットで 7 割を超えているが特に M2 に関して非常に高い頻度で石灰化が出現した。咀嚼時の歯種による負担の違いや力のかかり方などに影響を受けている可能性も考えられる。2 型糖尿病ラットの特徴として過食があり、それによる血糖値の上昇と過食そのものの力の影響が重なり根尖周囲の血管損傷および歯髄内の低酸素状態の持続

さらには局所的な炎症が起こり歯髄内の環境の悪化が誘発されるという連鎖が実験より明らかになり、結果的に異栄養性石灰化が起こり歯髄内結石の産生が促進されていると考えられる。これらは治療法のみでなく、糖化のメカニズムが分かることで象牙質や歯周組織に及ぼす影響を推測し、老化研究や全身疾患との関連において、新たな疾患概念の提案に結びつくものと期待できる。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計12件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 5件／うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Wang Q, Xu L, Miura J, Saha MK, Uemura Y, Sandell LL, Trainor PA, Yamashiro T, Kurosaka H.	4. 巻 9
2. 論文標題 Branchiomic Muscle Development Requires Proper Retinoic Acid Signaling.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Front Cell Dev Biol.	6. 最初と最後の頁 596838
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fcell.2021.596838	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Yamanaka A, Mine A, Matsumoto M, Hagino R, Yumitate M, Ban S, Ishida M, Miura J, Meerbeek BV, Yatani H.	4. 巻 40
2. 論文標題 Back to the multi-step adhesive system: A next-generation two-step system with hydrophobic bonding agent improves bonding effectiveness.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dent Mater J.	6. 最初と最後の頁 928-933
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4012/dmj.2020-272.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Imai D, Mine A, Ezaki R, Nakatani H, Matsumoto M, Hagino R, Yumitate M, Yamanaka A, Ban S, Miura J, Van Meerbeek B, Higashi M, Yatani H.	4. 巻 -
2. 論文標題 Does the bonding effectiveness of a fiber post/resin composite benefit from mechanical or chemical treatment? Seven methods for saliva-contaminated surfaces.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Prosthodont Res.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2186/jpr.JPR_D_21_00015.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Higashi M, Mine A, Matsumoto M, Yumitate M, Hagino R, Ban S, Yamanaka A, Miura J, Minamino T, Van Meerbeek B, Yatani H.	4. 巻 65
2. 論文標題 Do resin core build-ups obtain the benefits of higher bonding ability from direct or indirect technique?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Prosthodont Res.	6. 最初と最後の頁 565-572
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2186/jpr.JPR_D_20_00275.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 HAGINO Ryosuke, MINE Atsushi, MATSUMOTO Mariko, YUMITATE Masahiro, BAN Shintaro, YAMANAKA Azusa, ISHIDA Masaya, MIURA Jiro, MEERBEEK Bart VAN, YATANI Hirofumi	4. 巻 40
2. 論文標題 Combination of a silane coupling agent and resin primer reinforces bonding effectiveness to a CAD/CAM indirect resin composite block	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 1445 ~ 1452
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2021-083	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 三浦治郎	4. 巻 40 (3)
2. 論文標題 歯科における老化と糖化 老化に関連する創薬の可能性	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 歯科薬物療法	6. 最初と最後の頁 59 - 64
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugiyama Keita, Miura Jiro, Shimizu Masato, Takashima Aoi, Matsuda Yusuke, Kayashima Hiroki, Okamoto Motoki, Nagashima Tadashi, Araki Tsutomu	4. 巻 -
2. 論文標題 Effects of advanced glycation end products on dental pulp calcification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.13792	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto Motoki, Matsumoto Sayako, Sugiyama Ayato, Kanie Kei, Watanabe Masakatsu, Huang Hailing, Ali Manahil, Ito Yuki, Miura Jiro, Hirose Yujiro, Uto Koichiro, Ebara Mitsuhiro, Kato Ryuji, Yamawaki-Ogata Aika, Narita Yuji, Kawabata Shigetada, Takahashi Yusuke, Hayashi Mikako	4. 巻 12
2. 論文標題 Performance of a Biodegradable Composite with Hydroxyapatite as a Scaffold in Pulp Tissue Repair	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Polymers	6. 最初と最後の頁 937 ~ 937
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/polym12040937	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamamoto Sayuri, Kurosaka Hiroshi, Miura Jiro, Aoyama Gozo, Sarper Safiye Esra, Oka Ayaka, Inubushi Toshihiro, Nakatsugawa Kohei, Usami Yu, Toyosawa Satoru, Yamashiro Takashi	4. 巻 11
2. 論文標題 Observation of the Epithelial Cell Behavior in the Nasal Septum During Primary Palate Closure in Mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fphys.2020.538835	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takashima Aoi, Miura Jiro, Sugiyama Keita, Shimizu Masato, Okada Misa, Otani Tomohiro, Nagashima Tadashi, Tsuda Tetsuya, Araki Tsutomu	4. 巻 -
2. 論文標題 Glycation promotes pulp calcification in Type 2 diabetes rat model	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Oral Diseases	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/odi.14529	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okamoto Motoki, Matsumoto Sayako, Moriyama Kiichi, Huang Hailing, Watanabe Masakatsu, Miura Jiro, Sugiyama Keita, Hirose Yujiro, Mizuhira Manabu, Kuriki Nanako, Leprince Julian G., Takahashi Yusuke, Kawabata Shigetada, Hayashi Mikako	4. 巻 14
2. 論文標題 Biological Evaluation of the Effect of Root Canal Sealers Using a Rat Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 2038 ~ 2038
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics14102038	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 YUMITATE Masahiro, MINE Atsushi, HIGASHI Mami, MATSUMOTO Mariko, HAGINO Ryosuke, BAN Shintaro, YAMANAKA Azusa, ISHIDA Masaya, MIURA Jiro, MEERBEEK Bart VAN, ISHIGAKI Shoichi, YATANI Hirofumi	4. 巻 41
2. 論文標題 Effect of tooth temperature on the dentin bonding durability of a self-curing adhesives: The discrepancy between the laboratory setting and inside the mouth	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Dental Materials Journal	6. 最初と最後の頁 317 ~ 322
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.4012/dmj.2021-184	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Miyagawa K, Ohta Y, Teramachi J, Miura J, Mark A Subler, John M Chirgwin, Jolene J Windle, G David Rodman, Kurihayra N
2. 発表標題 TAF12, a Member of TFIIID Transcription Factor Complex, Contributes to Osteoclast Differentiation and Bone Resorption In Vivo
3. 学会等名 The American society for bone and mineral research 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本紗也子、岡本基岐、杉山敬多、三浦治郎、林美加子
2. 発表標題 根管充填用シーラーが生体組織に与える影響のラット皮下埋入モデルを用いた評価
3. 学会等名 第20回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水 真人, 杉山 敬多, 高島 葵, 岡田 美佐, 三浦 治郎
2. 発表標題 架橋型糖化最終産物 (AGEs) と AGEs 阻害薬アラゲプリウムの相互作用の解析
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡田 美佐, 清水 真人, 杉山 敬多, 高島 葵, 三浦 治郎
2. 発表標題 糖尿病ラットにおける歯髄内血管糖化と阻害法の検討
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 杉山 敬多, 清水 真人, 高島 葵, 岡田 美佐, 三浦 治郎
2. 発表標題 糖化セラチンスポンジによるラット臼歯部への直接覆髄法の評価
3. 学会等名 第64回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	北條 裕信  (Hojo Hironobu)  (00209214)	大阪大学・蛋白質研究所・教授   (14401)	
研究 分担者	清水 真人  (Shimizu Masato)  (70380277)	大阪大学・歯学部附属病院・医員   (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------