

令和元年9月6日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05517

研究課題名(和文)象牙質におけるコラーゲン糖化反応の解明と次世代歯科治療法への応用

研究課題名(英文)Elucidation of the glycated collagen reaction in dentin and its application to next dental treatment

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) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：長期的に糖尿病に罹患している人の歯髄内には顆粒状石灰化が認められ、病理組織学的には進行性病変の副産物として考えられている。しかし、周囲が硬組織かつ未脱灰での観察が必要であるため試料加工が難しく電子顕微鏡による超微形態観察の報告は少ない。本研究では、2型糖尿病モデルラットの臼歯の石灰化結石に対して、多面的な解析を行った。結果として、石灰化時期は糖尿病ラットにおいて10週齢前後＝高値(1000mg/dl付近)あたりで歯髄内石灰化が観察され始めることが分かった。石灰化メカニズムを解明することで新規治療法の提案や全身疾患、加齢やう蝕に関連する歯の糖化現象についての詳細な研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

糖化反応は、糖尿病ラットの歯髄内石灰化などから石灰化に関与することが示唆されてきた。本研究では、糖化コラーゲンにおける石灰化の影響を調べ、歯髄由来細胞を糖化コラーゲン上で培養することで有為に石灰化が誘導されることが分かった。これらの技術は、石灰化を誘導することで覆髄や骨造成といった技術に将来応用できると考えている。

また、齲蝕罹患象牙質において象牙細管に沿う形でAGEsが蓄積し、齲蝕罹患象牙質では蛍光寿命の顕著な短縮が認められたことから、コラーゲンより蛍光寿命の短いAGEsの蓄積が起きていると考えられ、蛍光寿命測定が齲蝕領域を判断する指標として利用できると示唆された。

研究成果の概要(英文)：Granular calcification is formed in the dental pulp of diabetic patients. Histopathologically, these are thought to be by-products of severe diabetes. In this study, the pathological calcification in dental pulp of Type2 diabetes model rat was evaluated using electron microscopy and immunohistochemical analysis of pentosidine, a kind of Advanced Glycation End products (AGEs) which is thought to be related calcification. The composition of pulp stone was examined with Energy Dispersive X-ray Spectroscopy. In the type2 diabetes model rats, it was found that pathogenic calcification in pulp occurs with the high blood glucose level for 10 weeks in SDT fatty rats. Pentosidine which is a kind of AGEs strongly expresses in the pulp of diabetic rats. And granular calcification was also observed in the surrounding area of pulp stone. From these results, Glycation was related with calcification in dental pulp, suggesting that these are related to ectopic calcification in diabetic patients.

研究分野：総合歯科学

キーワード：糖化 象牙質 石灰化 老化 細胞障害

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

長期的に糖尿病に罹患している人の歯髄内には顆粒状石灰化が認められ、病理組織学的には進行性病変の副産物として考えられている。近年、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（認知症、癌、高血圧、動脈硬化症など）に関与しており、糖化最終生成物である AGEs (Advanced Glycation Endproducts) 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。しかし、歯科領域において象牙質を対象とした AGEs に関する研究はほとんどされていない。さらに分光学的手法や形態学的手法を融合して解析ができ、AGEs に関するナノ秒蛍光法による自己蛍光評価技術や免疫組織化学、分析化学的による蛋白質局在の可視化の技術を用いて象牙質糖化研究を進めていく予定である。これまで我々は、象牙質における老化現象（歯質の脆性化、色調の変化）において糖化が大きく関与していること、また象牙質内の加齢に伴う AGEs の沈着に関して、蛍光寿命特性から評価する手法についての報告を行った (Miura et al, Arch Oral. Biol. 2014, Fukushima et al, Biomed. Opt. Express 2015)

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、ラット培養歯髄細胞がもつ石灰化誘導能において AGEs がどのように関与しているかを多面的に解析することである。さらに、これらの糖化において二次的に起こる現象を利用することで、蛍光寿命測定の実原理を応用した齶蝕罹患象牙質の検出や、基質糖化による歯髄における石灰化を誘導することを目的とする。

### 3. 研究の方法

2型糖尿病モデルラット (SDT-Fatty) の歯髄内に形成された病的石灰化物について以下の方法を用い観察・解析を行った。コンピューター断層撮影 (CT) により歯髄内結石の三次元的形態を観察、評価した。【BFI、EDX】歯髄内石灰化の発生メカニズムに関与している様相を反射電子を用いた Block Face Imaging (BFI) を用いて観察および、エネルギー分散型元素分析 (EDX) を行い組成分析を行った。

高血糖状態による歯髄内の変化、歯髄内結石の形態を染色にて観察し、さらに免疫組織化学的手法にて AGE/RAGE 系に関連して石灰化と関連があるとされている糖化最終産物 (AGEs) の一種である pentosidine の局在、カルシウム結合タンパクである S100A8 の局在を調べた。さらに、マイクロアレイを用いてラット上下切歯の歯髄の高血糖状態によるタンパク質の変化を将来に調べた

### In vitro における歯髄細胞石灰化実験

6週齢の雄 SD ラットの上下顎切歯から歯髄細胞を取り出し初代培養を行い、3代継代したものを本実験に用いた。豚腱由来のペプシン可溶性コラーゲンをウェルプレートにコーティング後、DL-glyceraldehyde を作用させ AGEs を作製した。AGE/RAGE 系において石灰化への関与が報告されている AGEs の一種である pentosidine を高速液体クロマトグラフィーにより確認した。コラーゲン間に AGEs が形成されたウェルプレート上でラット歯髄細胞を培養し、confluent に達した後、象牙芽細胞分化誘導培地で 21 日間培養し分化誘導を行った。ラット歯髄細胞への AGEs の影響を検討するために WST-1 を用いた細胞増殖試験、Alkaline Phosphatase (ALP) 染色、Alizarin Red 染色およびその吸光度測定、並びにリアルタイム PCR による石灰化関連遺伝子発現の比較を行った。また 14 日後、21 日後に形成された細胞外基質の石灰化物について透過型電子顕微鏡 (TEM)、走査型電子顕微鏡 (SEM) による観察、エネルギー分散型元素分析 (EDX) による解析を行った。

#### 蛍光寿命測定法の歯の影響（う蝕罹患象牙質における蛍光寿命の変化測定）

人歯を 1mm 厚に切断した後、透過型電子顕微鏡（以下 TEM）用試料は未脱灰のまま観察を行った。なお本研究に用いる歯は、大阪大学歯学研究科倫理委委員会の承認のもと、研究に同意された患者の治療歴のない齲蝕罹患歯を対象に行った。TEM 用観察試料は固定処理後にエポキシ樹脂に包埋、ultramicrotome を用い超薄切し透過型電子顕微鏡にて観察を行った。免疫電顕法は、低温紫外線重合レジンによる包埋後、超薄切を行い、切片に AGEs 抗体処理および金コロイドを用いた 2 次抗体を反応させた。光学顕微鏡用の試料は脱灰後にパラフィン包埋を行いミクロトームで薄切した。観察はグラム染色の他、type1 コラーゲンと AGEs に対する免疫組織化学染色を行った。ウエスタンブロット用の試料は脱灰後、黒変している部位を齲蝕罹患部、変色が認められない部位を健全部とし、それぞれから直径 1mm の円柱型試料を採取した。1 M 塩酸にて分解した後、アセトン沈殿法にてタンパク質を抽出、回収されたタンパク質についてウエスタンブロット法を用いて type1 コラーゲンおよび AGEs の変化を検出した。さらに、脱灰した齲蝕象牙質に対して Time correlated single photon counting (TCSPC) 法を用いて蛍光寿命の測定を行った。

#### 4 . 研究成果

##### 2 型糖尿病モデルラットにおける歯髄内石灰化の観察

石灰化の時期は 2 型糖尿病モデルラットにおいて、11 週齢以降の血糖値が高値（800mg/dl）に安定した状態で急激な石灰化が起こることがわかった。CT による三次元的な観察により、歯髄内結石と象牙質の間には間隙を認めた。HE 染色にて SDT-Fatty の歯髄内細胞は週齢が進むにつれ減少・失活することが観察され、また免疫染色により pentosidine は cont. に比べ SDT-Fatty では早期より歯髄内に明らかな増加がみられた。S100A8 は、cont. 群では象牙前質に沿って沈着しているのに対し SDT-Fatty 群においては週齢が進み歯髄内細胞が減少するとともに歯髄内全体に沈着することが観察された。BFI による観察では、歯髄内石灰化が象牙前質から離れた歯髄内に多く存在しており、周囲に顆粒状の石灰化と思われる構造も観察された。また象牙前質から離れた部位から形成されたと考えられる石灰化物には細管様構造がみられず病的石灰化であることが示唆された。エネルギー元素分析より歯髄内石灰化物と骨・象牙質の Ca/P の組成が類似していることがわかった。また 16wSDT-Fatty 上下切歯歯髄のマイクロアレイの結果より、S100A8 遺伝子、RAGE 遺伝子に有意な発現差を認めた。

##### 歯髄細胞における AGEs の作用（糖化コラーゲンの石灰化作用）

AGEs はラット歯髄細胞の細胞増殖に有意な影響を及ぼさなかった。また分化誘導後 14 日までの ALP 染色に有意な影響を及ぼさなかった。誘導後 14 日、21 日の Alizarin Red 染色において AGEs は石灰化結節の形成を有意に促進した。誘導後 14 日、21 日の TEM 像ではウェルプレートの AGEs 形成側に細胞と接するように基質小胞様の石灰化物が観察された。また SEM 像では細胞周囲や凝集したコラーゲン線維間に石灰化物の沈着が観察され、同領域の元素分析においてカルシウム (Ca) とリン (P) が検出された。糖化により基質コラーゲン内に生成される AGEs はラット歯髄細胞の増殖、分化に影響を与えないが、石灰化を促進することが明らかになった。これは AGEs が分化後の歯髄細胞において石灰化基質の形成やカルシウムの沈着に直接影響を与えている可能性を示唆している

##### 蛍光寿命測定によるう蝕検出法の開発

TEM 観察では齲蝕罹患象牙質の細管内に多くの細菌が侵入しているとともに、象牙細管の拡大や管間象牙質へのバクテリアの侵入が確認された。同時に基質の破壊も認められ type1 コラ

ーゲンに特徴的な縞模様が不明瞭になっていることが確認された。同一部位における免疫電顕法により、齶蝕罹患象牙質の管間象牙質にまで細菌が侵入した部位においては、細管内までもしくは健全部位よりも多くの AGEs の沈着を認めた。グラム染色では、齶蝕罹患象牙質のエナメル象牙境より歯髄側に向かって細菌が象牙細管に沿って侵入している像が認められた。免疫組織化学染色では、菌侵入部位が抗 AGEs 抗体で強く染まり、また、抗コラーゲン抗体では弱く染まっていた。ウエスタンブロット法においては、齶蝕罹患象牙質における AGEs の蓄積および基質の減少を認めた。さらに、同部位に行った蛍光寿命測定では齶蝕罹患部において pentosidine に由来すると考えられる顕著な蛍光寿命の短縮および蛍光強度の減少を認めた。

本研究から、歯髄内石灰化の測定や状態分析、糖化コラーゲンによる歯髄由来細胞の培養や石灰化様相が明らかになった。特に培養系に関しては石灰化マーカーの顕著な増加は認められず、細胞外の因子、糖化による架橋されたコラーゲンが石灰化物形成の足場として役割を果たしている可能性も考えられる。また、AGEs の蛍光寿命減衰を用いることでう蝕により起こった糖化を選別でき、象牙質う蝕検出の指標としても用いることが可能であるということも分かった。本研究で確認された AGE/RAGE 系を介した石灰化誘導のメカニズムはいまだ不明な点が多いが、今後新たなシグナル経路やターゲット分子の同定を通じて研究を進めていく予定である。

## 5 . 主な発表論文等

< 原著論文 > ( 12 件 )

1. Uemura, R., Miura, J., Ishimoto, T., Nakano, T., Hayashi, M. UVA-activated riboflavin promotes collagen crosslinking to prevent root caries *Scientific Reports* 9(1) 125210.1038/s41598-018-38137-7 2019
2. Iwashita T, Mine A, Matsumoto M, Nakatani H, Higashi M, Kawaguchi-Uemura A, Kabetani T, Tajiri Y, Imai D, Hagino R, Miura J. Minamino T, Yatani H. Effects of three drying methods of post space dentin bonding used in a direct resin composite core build-up method. *J Prosthodont Res.*62(4) 449-455 2018
3. Okawa R, Miura J Kokomoto K, Nakano K Evaluation of avulsed primary incisor in 3-year-old girl with hypophosphatasia who received enzyme replacement therapy. *Pediatric Dental Journal*28(3) 136-140 2018
4. Matsumoto M, Mine A, Miura J. Minamino T, Iwashita T, Nakatani H, Nishida T, Takeshige F, Yatani H. Bonding effectiveness and multi-interfacial characterization of two direct buildup resin core systems bonded to post-space dentin. *Clin Oral Investig.* 21(1):309-317 2017
5. Nakatani H, Mine A, Matsumoto M, Kabetani T, Kawaguchi-Uemura A, Higashi M, Tajiri Y, Imai D, Hagino R, Minamino T, Miura J. Yatani H, Effectiveness of NaOCl and sulfonic acid sodium salt treatment on dentin-resin bonding: Long-term durability of one-step self-etching adhesive. *Dental Material Journal* 29;36(6):842-850 2017
6. Kawaguchi-Uemura A, Mine A, Matsumoto M, Tajiri Y, Higashi M, Kabetani T, Hagino R, Imai D, Minamino T, Miura J. Yatani H. Adhesion procedure for CAD/CAM resin crown bonding: Reduction of bond strengths due to artificial saliva contamination. *Journal of Prosthodontic Research.* in press 2017
7. Okawa, R., Miura, J., Kokomoto, K., Kubota, T., Kitaoka, T., Ozono, K., Nakano, K.

Early exfoliation of permanent tooth in patient with hypophosphatasia, *Pediatric Dental Journal* 27:173-178 2017

8. Matsuda Y, Miura J<sup>\*</sup>, 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.
9. Okawa H, Kayashima H, Sasaki J, Miura J, Kamano Y, Kosaka Y, Imazato S, Yatani H, Matsumoto T, Egusa H<sup>\*</sup>. Scaffold-Free Fabrication of Osteoinductive Cellular Constructs Using Mouse Gingiva-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Int*. 2016:6240794.
10. Kawaguchi A, Matsumoto M, Higashi M, Miura J, Minamino T, Kabetani T, Takeshige F, Mine A, Yatani H. Bonding effectiveness of self-adhesive and conventional-type adhesive resin cements to CAD/CAM resin blocks. Part 2: Effect of ultrasonic and acid cleaning. *Dent Mater J*. 2016;35(1):29-36.
11. Wake N, Asahi Y<sup>\*</sup>, Noiri Y, Hayashi M, Motooka D, Nakamura S, Gotoh K, Miura J, Machi H, Iida T and i Ebisu S., Temporal dynamics of bacterial microbiota in the human oral cavity determined using an in situ model of dental biofilms. *npj biofilm and microbiomes* (2016) 2, 16018; doi:10.1038/npjbiofilms.2016.

<学会発表> ( 12 件 )

1. 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, SanFrancisco.
2. Uemura R, Yagi K, Shinno Y, Miura J, Matsuda Y, Hayashi M. How UVA-activated Riboflavin Inhibits Demineralization of Human Dentin. 95<sup>th</sup> General Session of the IADR, March 24, 2017, San Francisco.
3. Okawa R, Miura J, Okawa H, Kokomoto K, Nakano K. Early Exfoliation of Permanent Tooth in Hypophosphatasia Patient, 95<sup>th</sup> General Session of the IADR, March 24, 2017, San Francisco.
4. 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.
5. Okawa R, Miura J, Okawa H, Kokomoto K, Nakano K. Early Exfoliation of Permanent Tooth in Hypophosphatasia Patient, 95<sup>th</sup> General Session of the IADR, March 24, 2017, San Francisco.
6. 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.
7. 三浦治郎：3次元観察を基軸にした象牙質齲蝕の病態評価，第58回 歯科基礎医学会学術大会（シンポジウム）2016年08月24日 札幌

8. 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（第 144 回）、2016、栃木
9. 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
10. 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
11. 上村伶央、三浦治郎、八木香子、松田康裕、林美加子、UVA 活性リポフラビン処理による象牙質う蝕予防・進行抑制効果の検討。日本歯科保存学会秋季学術大会 2017 年 10 月 26 日

〔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

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：北條 裕信

ローマ字氏名：Hojo Hironobu

所属研究機関名：大阪大学

部局名：たんぱく質研究所

職名：教授

研究者番号(8桁)：00209214

研究分担者氏名：橋本 守

ローマ字氏名：Hashimoto Mamoru

所属研究機関名：北海道大学

部局名：情報科学研究科

職名：教授

研究者番号(8桁)：70237949

研究分担者氏名：久保 美寿穂

ローマ字氏名：Kubo Mizuho

所属研究機関名：大阪大学

部局名：歯学部附属病院

職名：医員

研究者番号(8桁)：60757813

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：荒木 勉

ローマ字氏名：Araki Tsutomu

大阪大学基礎工学研究科 名誉教授

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。