

平成30年6月5日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K12877

研究課題名(和文) ナノ秒蛍光を指標とした非侵襲生体糖化検出法の開発と糖尿病スクリーニングへの応用

研究課題名(英文) Development of fluorescence lifetime measurement for glycation screening for diabetes in vivo

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) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：蛋白質による糖化反応は複雑で未解明の部分も多いが、最終的に非常に安定なAGE架橋がコラーゲン線維間に生成される。AGEs架橋が過度に形成されるとコラーゲン線維の色調や物性が変化する。同時にコラーゲンの自家蛍光の蛍光寿命がAGEsの産生に伴い短くなるという報告もある。AGEsの局在や組織への蓄積を光学的に分析することで組織の糖化レベルを評価ことができ、糖化現象が生体にあたえる影響を解明できそれらを応用することで生体老化の指標を策定できるのではないかと考えた。本研究で人及びラット組織のAGEs沈着状況と蛍光寿命の変化を詳細に測定し生体の糖化が蛍光寿命を基準として評価できる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Glycation, namely the Maillard reaction, is a non-enzymatic reaction between protein or lipid and reducing sugar, resulting in formation of advanced glycation end-products (AGEs). Because glycation of collagen progresses under physiological conditions in living organisms, glycation is one of the most important processes in human aging. Several AGEs bind collagen and act as cross-links between collagen fibrils, thereby changing the fluorescent lifetime of collagen-rich tissues. The purpose of this study is to identify AGEs in human dentin using electron microscopy, time-resolved fluorescence microscopy, mechanical testing and chemical analyses. Our findings suggest the potential influence of cross-linking on diabetic and aging tissue.

研究分野：生体工学

キーワード：糖化 メイラード反応 蛍光寿命

1. 研究開始当初の背景

非可逆的反応である糖化反応 (glycation) は、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メイラード反応として報告された。これらの反応は食品の加熱中に起こる着色や、香りに関わる反応として食品化学領域で注目されてきた。近年になり、糖化最終生成物である AGEs (Advanced Glycation End products) 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関係しているとの報告があり、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 (認知症、癌、高血圧、動脈硬化症など) を中心に医療分野においても急速に研究が展開され始めている。

2. 研究の目的

今回、石灰化組織及び周囲組織においても糖化現象が関与していると考え、本研究の着想に至った。蛋白質による糖化反応は複雑で未解明の部分も多いが、最終的に非常に安定な AGE 架橋がコラーゲン線維間に生成される。AGE s 架橋が過度に形成されるとコラーゲン線維の伸展性が失われ組織が硬く変化する。また、コラーゲンの自家蛍光の蛍光寿命が AGE s の産生に伴い短くなるという報告もあり、AGE s の局在や組織への蓄積を光学的に分析することで組織の糖化レベルを評価ことができ、糖化現象が生体にあたえる影響を解明できそれらを応用することで生体老化の指標を策定できるのではないかと考えた。また、AGEs の糖化反応は複雑な経路であるため、一経路の反応を阻害してもバイパス経路が活性化され、生成を抑制することができない、そのため AGE s 生成阻害法への発展を視野に入れた場合、現段階で象牙質の糖化における AGE 架橋の発生メカニズムを分子レベルで明らかにすることは重要であると考えら

れる。糖尿病などの全身疾患が口腔内の糖化に及ぼす影響を調べることで、国民への新たな歯科疾患の予防概念の提案につながると考えられる。

3. 研究手法

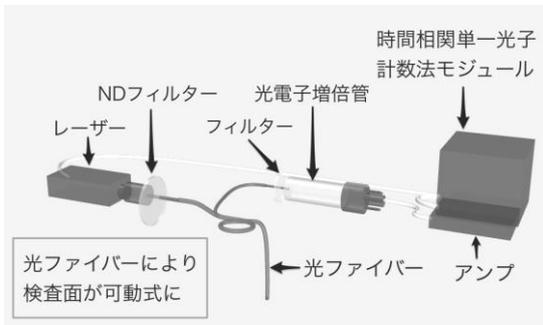
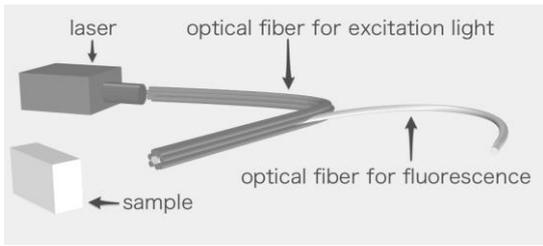
1) 電子顕微鏡による AGEs 架橋の分布 (免疫染色法による観察)

架橋構造の構造解析に関しては、象牙質コラーゲン内の架橋構造の超微形態学的観察をするために透過型電子顕微鏡用試料作成を行った。コラーゲン内における架橋構造の局在を調べるために、超薄切片加工技術とコラーゲン染色技術および免疫電子顕微鏡法の技術を用いる。架橋領域の染色方法としてコラーゲン分子間架橋構造に対してはカテキンを用いたポジティブ染色を用いることにより、コラーゲン線維の構造評価を行った。

透過型電子顕微鏡により得られた画像から、年齢による AGEs 架橋の局在の差と浸漬試験による人工的な AGEs 架橋の蓄積を比較して検討を行った。

2) AGEs 架橋の蛍光計測

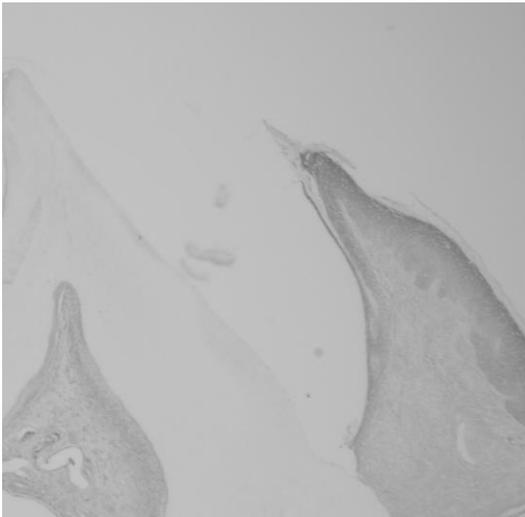
AGEs の蓄積をナノ秒蛍光法 (TCSPC法) にて蛍光寿命測定を行い可視化することを目的とした。観察しやすくするために脱灰によりハイドロキシアパタイトを除くため 1mm に薄切した歯を 37 °C の 10 % エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 中にて処理を行う。試料を蛍光顕微鏡 (Nikon Labshot-II) を用いた蛍光寿命測定装置にて自己蛍光時間の測定を行った。UV ダイオードレーザー (Hamamatsu PLP-10; 波長: 375 nm, パルス幅: 80 ps, 繰り返し周波数: 5 MHz) で励起し、放出される青色蛍光を時間相関単一光子計数法によって検出を行った。年代別の皮膚および歯肉を対象として年齢 20 才、40 才、60 才のそれぞれの世代に対してレーザープローブ型の蛍光寿命測定測定を行った。モデルの図を次に示す。



4. 研究成果

1) 免疫組織化学染色による AGEs の分布

コラーゲン線維の糖化を示す染色像が年齢に応じて年齢及びラットの歯肉などにおいても顕著に認められた。さらに免疫電子顕微鏡像においても、決闘の影響を受けやすい部位周囲に特に AGEs が沈着している様相が確認できた。歯においては歯髄腔の周囲の象牙前質の周囲近傍にコラーゲン線維の糖化を示す染色像が特に高齢の象牙質において顕著に見られた。



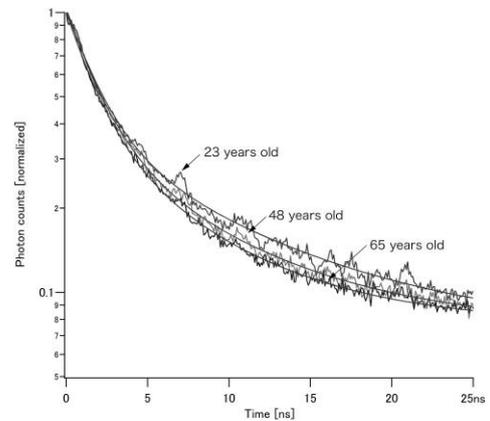
(図 1 参照) 糖尿病ラット 21W の免疫染色像 (抗 pentosidine)

歯髄においても pentosidine の沈着が認められる

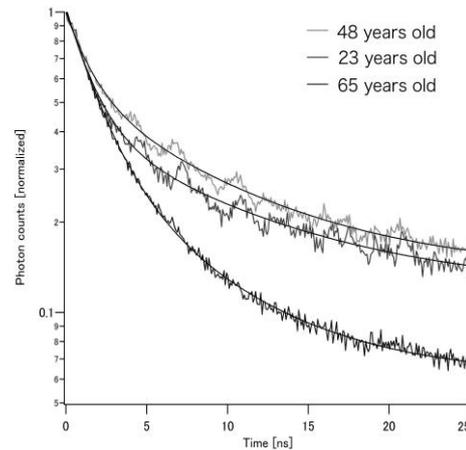
が、歯肉にも沈着が起こっている。これらのことから、歯肉においても蛍光性 AGEs の一種である pentosidine の沈着が認められることが分かった。

2) 歯肉及び皮膚の蛍光寿命測定

以前の報告より糖化コラーゲンの蛍光寿命が非糖化コラーゲンに比べて短縮したということが分かった。プローベ型の蛍光寿命測定から皮膚、歯肉ともに蛍光寿命の低寿命化が認められた。下に、両測定の結果を示す。



皮膚の蛍光寿命測定



歯肉の蛍光寿命測定

両測定とも特に高齢者において蛍光寿命の短縮が認められた。

まとめ：本研究では免疫組織化学的手法、

といった生化学的手法、コラーゲンの蛍光寿命測定といった物理化学的手法を用いて2型糖尿病モデルラットによるAGEsの蓄積測定、若年者、高齢者の皮膚及び歯肉を対象とした蛍光型AGEs蓄積様相の解析を行った。これまではラットの試料より高血糖状態が継続している環境下においては、より強いAGEsの沈着が認められることが分かった。非提示データであるが血液中におけるpentosidine量を高速液体クロマトグラフィーにおいて測定した際も高血糖状態の試料では顕著に増加しており、実際に年齢別の蛍光寿命測定を行った際にも皮膚に比べて歯肉で増加していることが分かった。これは歯肉は表皮がなく、粘膜表層近傍に微細な毛細血管が多く認められるため血液自体および血液からの糖化の影響を受けやすく構造的な影響を強く受けていると考えられる。

免疫組織化学染色においては、付加型AGEsの一つであるCMLと架橋型AGEsであるpentosidineを用いていたが染色性の関係から非蛍光性のCMLが多く用いられてきた。本プロジェクトにおいて染色環境を試薬を用いて調整することでpentosidineの精度の高い免疫染色も可能となった。

蛍光寿命は蛍光色素分子の密度が高まることにより短縮するといわれている。特に架橋型AGEsは蛍光色素分子であることが多く、糖化の影響を受けている身体の組織においては、コラーゲン間の非生理的な架橋が増加していることが本研究より免疫染色にて分かった。糖尿病や加齢に起因した糖化反応による非生理的な架橋が増加することで皮膚や血管の力学的強度の減少などを介して全身的な疾患に関与している可能性がある。また本研究における実験手法は、糖尿病における糖代謝異常に関する臨床研究にも有効であると考え、生体の高感度な

糖化および老化指標として用いられないかと検討を行っている。

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4件)
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

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 sulfinic acid sodium salt treatment on dentin-resin bonding: Long-term durability of one-step self-etching adhesive. *Dental Material Journal* 2017

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.* 2016 in press

M, Matsumoto M, Kawaguchi A, 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 1: Effects of sandblasting and silanization. *Dent Mater J.* 2016;35(1):21-8.

[学会発表] (計11件)

Reo Uemura, Kyoko Yagi, Yuko Shinno, Jiro Miura, Mikako Hayashi: How UVA-activated Riboflavin strengthen human dentin, International Association for Dental Research, 2016. 6. 24, Korea Seoul

<国内学会 シンポジウム>

三浦治郎：FIB/SEM 法を用いた歯科疾患の病態解析，第 121 回 日本解剖学会，2016 年 03 月 29 日 郡山

三浦治郎：3次元観察を基軸にした象牙質齶蝕の病態評価，第 58 回 歯科基礎医学会学術大会 2016 年 08 月 24 日 札幌

<国内学会一般講演>

上村怜央、八木香子、新野侑子、松田祐輔、三浦治郎、林美加子：UVA 活性リボフラビンによるヒト象牙質の脱灰抑制効果、日本歯科保存学会 第 144 回 2016 年度春季学術大会、2016 年 6 月 9 日、栃木県

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

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

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、(国内招待) レーザー学会 三浦

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

Glycation in Caries Using Immunohistochemical FIB/SEM, IADR2017, SanFrancisco 3/22-25

R. Uemura K. Yagi¹; Y. Shinno¹; J. Miura²; Y. Matsuda²; M. Hayashi How UVA-activated Riboflavin Inhibits Demineralization of Human Dentin IADR2017 SanFrancisco3/22-25

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.

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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

橋本 守 (HASHIMOTO Mamoru)
北海道大学・情報科学研究科・教授
研究者番号：70237949