

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09596

研究課題名(和文) 質量イメージングによるAGEs/RAGEシグナルに関連した歯髄内石灰化機構の解明

研究課題名(英文) The pathogenic calcification mechanism in the dental pulp through AGEs/RAGE signal pathway elucidated by the imaging mass spectroscopy

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：糖化の歯への影響を調べるため、生理学的条件下で無酵素的に象牙質に結合する糖化最終産物(AGEs)に注目し解析を行ってきた。糖化の詳細な糖化メカニズムの解析を行うため2型糖尿病モデルラット(SDT-fatty)を用いて解析を行った。象牙質コラーゲンの中のAGEsの分布の時間的変化や血糖値の上昇と歯髄内結石形成を相関をとらえることができた。また硬組織への応用は難しいとされていた質量イメージングの手法を試料作製条件や測定条件を検討することでラット象牙質中のAGEsの詳細な分布、また糖尿病ラット象牙質中に特異的な質量シグナルをとらえることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯は完成された組織であり、糖化の影響を受けにくいと考えられてきた。しかしながら加齢や糖尿病における高血糖ストレスにより象牙質コラーゲンの糖化最終産物(AGEs)が蓄積し歯の脆弱化への関与などがわかった。また糖尿病モデルラットを用いることで象牙質-歯髄複合体に対しても糖化が影響し、歯髄内結石の増加と関連していることが示された。また質量イメージングの手法が象牙質のような硬組織や細胞外マトリックスにも応用が可能であり、歯のみならず骨や血管などの全身の組織の異所性石灰化の研究に応用の可能性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to determine the influence of glycation stress in dentin-pulp complex. We focused on advanced glycation end-products (AGEs) that form crosslinks with dentin collagen without enzymatic reactions. By using SDT fatty rats as an obese type 2 diabetic model, we found temporal correlations of AGEs through the quantitation of pentosidine and the correlation of blood sugar level and irregular calculus in the pulp. And we adapted imaging mass spectrometry to hard tissue, as a results we got the diabetes mellitus specific mass signals in dentin of the SDT-fatty rat.

研究分野：総合歯科学

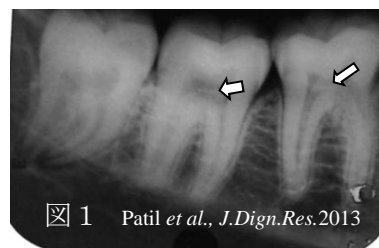
キーワード：糖化最終産物 AGEs 質量イメージング MALDI イソソース分解質量分析 象牙質コラーゲン 2型糖尿病モデルラット 歯髄内結石 ラット尾腱コラーゲン

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

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。生体にとって糖はエネルギー源として不可欠であるが、過剰な摂取や加齢によって身体の各所に蓄積する。AGEs の蓄積は動脈硬化症、骨粗鬆症、後縦靭帯骨化症、白内障など、神経系においては認知症など老化に関連した疾病に関与していると考えられている。糖尿病においては細胞に取り込まれなかった余剰の糖が前記の疾病の罹患、進行を早めることが知られている。歯科臨床領域においても糖尿病患者にしばしば歯髄内結石が多くみられることが報告されており (Patil *et al.*, *Journal of Diagnostic Research*. 2013, 7(6): 1228-1231、図1)

このような異所性石灰化のメカニズムとして AGE/AGEs 受容体 (RAGE) のシグナル伝達系の関与が示唆されているが、*in situ* での形態学的なアプローチからの解析はなされておらず詳細なメカニズム解明には至っていない。



2. 研究の目的

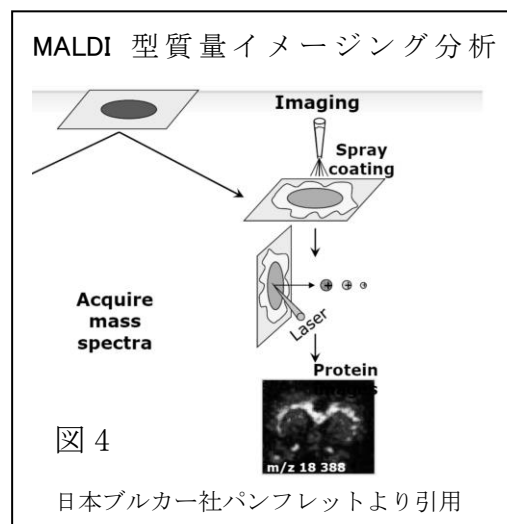
象牙質-歯髄複合体内の AGEs の分布の経時的変化の詳細や AGEs 修飾の経路の解析を行い AGEs と RAGE、オステオポンチンなどその他の関連因子との相互作用を解析することで AGEs による異所性石灰化のメカニズムの解明を行う。またこの結果に基づき歯髄内石灰化を制御し低為害性の新規覆髄法へ応用開発研究につなげる。歯髄内石灰化のみならず全身疾患に関連した異所性石灰化のメカニズムへの提案を行い病態の解明、治療法開発に寄与する。

3. 研究の方法

これまでヒトの抜去歯を試料として象牙コラーゲン内の AGEs や歯髄内結石の評価を行ってきた。しかしヒトの試料では糖尿病患者では血糖コントロールに介入する研究や、AGEs の分布変化や歯髄結石の形成の時系列を追った研究は倫理的に問題があつて困難である。2型糖尿病病モデルラット (日本クレア、SDT-Fatty rat. 図2) 長期飼育下において臼歯歯髄内に糖尿病患者と同様の歯髄内結石を認めた (図3) ことから、このラットの実験系を用いて

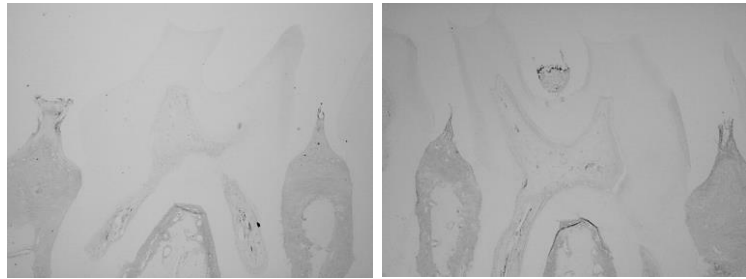


- ① 免疫組織化学的手法、ナノ秒蛍光法により AGEs および RAGE の生成量やおおまかな分布を明らかにする。
- ② 質量イメージング分析法の硬組織への応用 (図4) 凍結切片試料を用い MALDI インスソース分解 (MALDI-ISC) (図4) を応用した測定法で糖尿病モデルラットの臼歯象牙質中に特異的なシグナルを検出し、AGEs の分布状態、他の因子の検出相互作用の詳細な解析を進めた。
- ③ ハイドロキシアパタイトカラムや抗体カラムなどのアフィニティによるブルダウンアッセイなど分子間相互作用を利用し sRAGE などの石灰化関連分子を単離精製する。
- ④ AGEs の中でも蛍光特性を持つ Pentosidine をターゲットとして高速液体クロマトグラフィーを用いた蛍光検出のシステムで象牙質コラーゲン、SDT-fatty ラットの血液、尾腱コラーゲンからの Pentosidine の検出、定量を行った。



4. 研究成果

SDT-Fatty ラットでは6週齢を越えたあたりから急激な血糖値の増加を認めた。これに対応し歯髄内結石を認め免疫染色もコントロールに比して顕著な染色を認めた (図5)。



SDT (non-obese) at 12w

SDT fatty at 12w

図5 ラット12週齢臼歯の抗 pentosidine 抗体染色

質量イメージングにおいては pentosidine 分子量に近いシグナルの検出に成功し、さらに MALDI-MSD により SDT-fatty に特異的なシグナルの検出した (図6, 7)

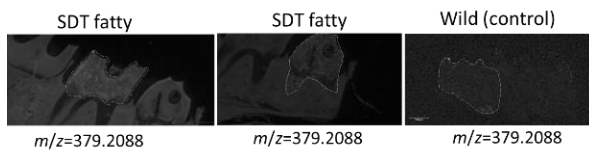


図6 ラット臼歯のペントシジンの質量イメージング

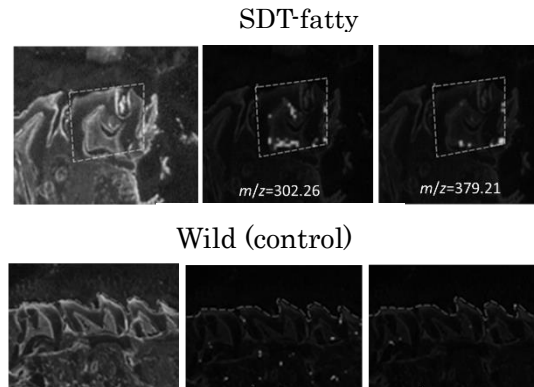


図7 MALDI - MSD による質量イメージング

また HPLC を用いた分析化学的手法によりラット尾腱、血液などその他部位における AGEs (検出は Pentosidine) も SDT-fatty ラットで増加していることを確認した (図8)

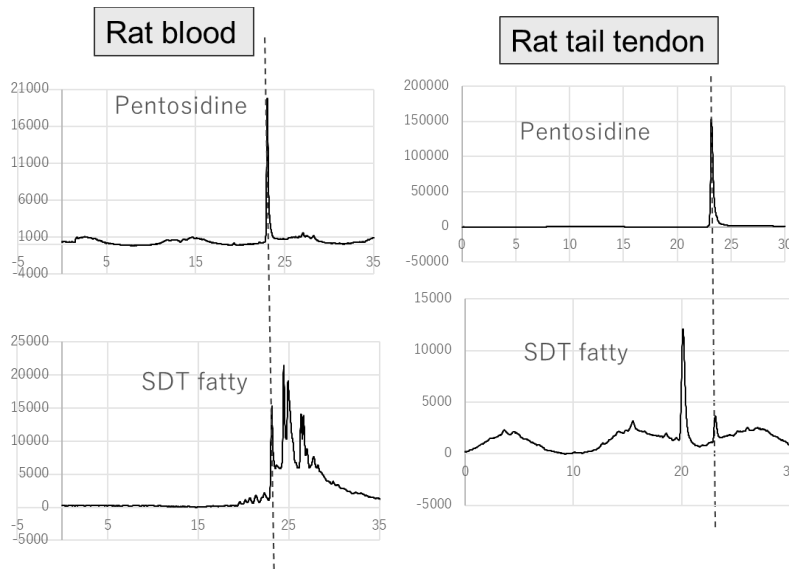


図8 完全加水分解物の HPLC クロマトグラム 蛍光検出 (ex335nm/em385nm)

免疫化学的手法、質量イメージング、マイクロ CT、液体クロマトグラフィーによる分析化学的手法で2型糖尿病モデルラットにおいて AGEs の解析が可能であることを示すことができた。2型糖尿病における高糖化ストレスの影響の詳細な解析を行うことで歯のみならず全身の疾患への応用が可能であることを示すことができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Uemura R., Miura J., Ishimoto T., Yagi K., Matsuda Y., Shimizu M., Nakano T., Hayashi M.	4. 巻 9
2. 論文標題 UVA-activated riboflavin promotes collagen crosslinking to prevent root caries	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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） 10.1038/s41598-018-38137-7	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 Uemura R, Miura J, Ishimoto T, Shimizu M, Nakano T, Hayashi M	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 UVA-activated riboflavin promotes collagen crosslinking to prevent root caries	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1252-1263
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-38137-7	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 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 1-11
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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水 真人, 三浦 治郎, 杉山 敬多, 高島 葵
2. 発表標題 糖化ストレスによって象牙質内に蓄積する糖化最終産物（AGEs）の分布検出方法の検討
3. 学会等名 第61回歯科基礎医学会（東京）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉山 敬多 , 三浦 治郎, 高島 葵, 清水 真人 , 萱島 浩輝
2. 発表標題 ラット歯髄細胞の石灰化物形成における糖化最終産物 (AGEs) の影響
3. 学会等名 第 6 1 回歯科基礎医学会 (東京)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 清水真人 三浦治郎 杉山敬多 高島葵
2. 発表標題 糖化ストレスによって象牙質内に蓄積する糖化最終産物 (AGEs) の分布
3. 学会等名 第 6 0 回歯科基礎医学会 (九州大学)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高島葵 三浦治郎 杉山敬多 清水真人
2. 発表標題 糖尿病モデルラットにおける歯髄内石灰化の多面的解析
3. 学会等名 第 6 0 回歯科基礎医学会 (九州大学)
4. 発表年 2018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	大木 進野 (Ohki Shinya) (70250420)	北陸先端科学技術大学院大学・ナノマテリアルテクノロジー センター・教授 (13302)	

6. 研究組織（つづき）

	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	三浦 治郎 (Miura Jiro) (70437383)	大阪大学・歯学部附属病院・助教 (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