

令和 3 年 5 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17047

研究課題名（和文）加齢に伴う象牙質のう蝕耐性獲得メカニズムの解明と歯科治療への応用

研究課題名（英文）Elucidation of the glycation mechanism of aging and dentin caries and its application to dental treatment

研究代表者

松田 祐輔（Matsuda, Yusuke）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：40808507

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）： 齲蝕罹患に伴い象牙質ではAGEsが蓄積する。その分布は、エナメル象牙質境より歯髄へ向かって象牙細管に沿うように蓄積しており、特に細菌の侵入の多いエナメル象牙質境付近の齲蝕罹患象牙質では、管間象牙質にまでAGEsの蓄積を認めた。AGEsの蓄積は、健全部においても加齢とともに起こるが、齲蝕罹患によって蓄積量が増加する。特に、架橋型AGEsの一つであるペントシジンが齲蝕罹患によって有意に増加していることが明らかとなった。齲蝕罹患部の蛍光寿命の短縮が認められたことから、齲蝕罹患により蛍光寿命が周囲基質より短時間であるAGEsが増加していることが考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

基質への糖化最終産物の蓄積は、う蝕罹患部位において増加することが分かった。これにより蛍光寿命は物質に特有の値を示し、コラーゲンよりも蛍光寿命の短いAGEsの沈着によって蛍光寿命は短くなる。AGEsの沈着部位と齲蝕の進行部位に関連性が見られることからAGEsの沈着を見ることで齲蝕の進行の一つのマーカーとして利用できるのではないかと考えられる。AGEsの蛍光寿命を用いる方法は、象牙質コラーゲンの質的要素を見ているため、入射光の強度や試料の表面性状に依存しない。齲蝕の除去指標の一つとして利用できるのではないかと考えられる。

研究成果の概要（英文）： AGEs accumulate in dentin during caries. AGEs accumulate along the dentin tubules from the enamel-dentin interface to the pulp, and in caries-affected dentin. The accumulation of AGEs occurs with age in healthy area, otherwise is increased and affected by dentinal caries in caries area. In particular, pentosidine, one of the cross-linked AGEs, was found to be significantly increased in caries affected and infected dentin. The shortening of the fluorescence lifetime in the caries-affected area suggests that AGEs with a shorter fluorescence lifetime than that of the surrounding substrate are increased by caries.

研究分野：総合歯科学

キーワード：糖化 象牙質 加齢 老化 コラーゲン

## 1. 研究開始当初の背景

う蝕の進行はその進行方向や進行速度、好発部位などが年齢によって異なるといわれている (Ettinger RL, 1999)。特に若年者のう蝕の進行は高齢者に比べて速く、急速に進行することが多い。若年性のう蝕の進行・発生には遺伝的要因や環境的要因との関連が多く報告されている。一方で高齢者のう蝕の進行は遅く、慢性的に進むことが多い。高齢者のう蝕の進行についての報告には歯周病や全身疾患、生活習慣との関連を示すものが多い。しかし、加齢に伴うう蝕進行の変化を象牙質のコラーゲン基質における糖化修飾に着目した研究は少ない。

加齢に伴う象牙質の形態学的な変化としてヒドロキシアパタイトの密度の変化 (石灰化亢進) や歯髄腔・象牙細管の狭窄が報告されている (Oitani et al., 2004)。さらに近年では、象牙質基質コラーゲンは加齢に伴い糖化が進行し、コラーゲン分子間に架橋構造を形成し、糖化最終産物 AGEs を蓄積すると報告されている (Miura J et al., 2014)。また、加齢に伴う AGEs の沈着が象牙質の靱性を低下させ、歯の破折を起こしやすくしていることや、う蝕罹患象牙質に特異的な AGEs の沈着が見られ、う蝕の進行に影響を与えているという報告を行った (Matsuda Y et al., 2016) (図 1)。しかし、う蝕象牙質内の基質にどのような変化が起こっているかを詳細に明らかにした報告はない。

そこで、本研究ではう蝕治療における長期的予後を考えるにあたり、象牙質のう蝕罹患部に、AGEs の沈着が存在しているか? という問いを解明する必要がありと考え、以下の実験を行った。

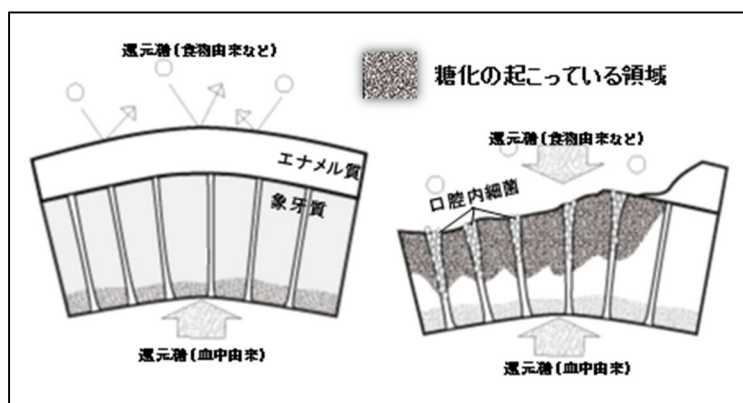


図 1 う蝕罹患象牙質におけるコラーゲンの糖化

## 2. 研究の目的

本研究では、加齢に伴う象牙質への AGEs 蓄積について、形態学的手法、分析化学的手法、そして蛍光寿命測定による検討を行ってきた。健全歯では AGEs は歯髄側より蓄積され、加齢とともに次第にエナメル象牙質境側への蓄積が増加していることが明らかとなった。また、慢性的に高血糖の状態が続く糖尿病罹患患者において象牙質内での AGEs の蓄積が健常者と比較して進行しているという報告もある。今回の研究では齲蝕に伴う象牙質コラーゲンへの AGEs 蓄積の仮説として、エナメル質を失い口腔内へ暴露した象牙質コラーゲンが、食物由来する還元糖との間で糖化反応を起こし、AGEs が蓄積していくのではないかと考えた。本研究では、齲蝕の進行と AGEs の発現部位の関連性、AGEs が齲蝕の進行に与える影響を調べることを目的とした。なお、皮膚などの糖化の評価には架橋型 AGEs のペントシジンおよび付加型 AGEs の CML が一般的に利用されている。Kleter らによる齲蝕罹患象牙質における AGEs の評価実験でもペントシジンと CML が用いられており、本研究もこの 2 種類を中心に検討を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) 高速液体クロマトグラフィーによる AGEs の検出

クロマトグラフィーは、様々な成分によって構成されている混合試料を成分ごとに分離し、分取、定量することである。分離する試料の溶媒 (移動相) が液体で、ポンプで高圧をかけて行うものは、高速液体クロマトグラフィーと呼ばれる。インジェクターよりロードされた試料はカラム内で固定相との親和性の差により分離され、その後目的の成分はディテクターにより検出される。本研究では、象牙質基質を分解し、蛍光性 AGEs であるペントシジンを蛍光検出器にて検出することを目的とした。

### 方法

ELISA と同様に 6M-HCl でアミノ酸レベルまで加水分解を行った齲蝕罹患部と健全部の試

料は、HCl の留去のため減圧乾燥を行った後に 50  $\mu$ l の水に再溶解し、孔径 0.22  $\mu$ l のフィルターでろ過し HPLC 分析に供した。また、本実験では齲蝕に罹患していない歯より採取した健全質を比較対象として用意し、同様の手順で試料とした。ポンプには (PU-4180、日本分光、東京) を使用し、ディテクターには蛍光検出器 (F-1050、日立、東京) を用いた。カラムには C18 逆相カラム (COSMOSIL C18 2mm-長さ 150mm、ナカライテスク、京都) を用いた。分離用の溶液として初期溶液 A : 2% アセトニトリル-水、0.1%HBFA、分離用溶液 B : 50%アセトニトリル、0.1%HFBA で流速 0.2ml/min、試料のロード量は 10  $\mu$ l とし、アセトニトリルを初期 2% から 1.6%/min で 50%まで濃度勾配をかけた。溶出試料に対し、ペントシジン特有の励起波長 335nm、検出波長 385nm で蛍光を検出した。各検出の間は B 液を 10 分間流しカラムに結合しない夾雑物を取り除いた。

## 結果

本実験では標準試料として合成ペントシジン (pentosidine 純度: 98%、CaymanChemical、USA) を用い、その保持時間を測定した。図 2 より、齲蝕罹患部、健全部 (齲蝕罹患歯) とともに合成ペントシジンとほぼ同一の保持時間 22 分付近に溶出ピークを認めた。また、齲蝕罹患部では健全部 (齲蝕罹患歯) と比較して大きなピークであった。健全部 (健全歯) においても同様の保持時間を示すピークが認められるが、その高さは健全部 (齲蝕罹患歯) と比較して小さかった。

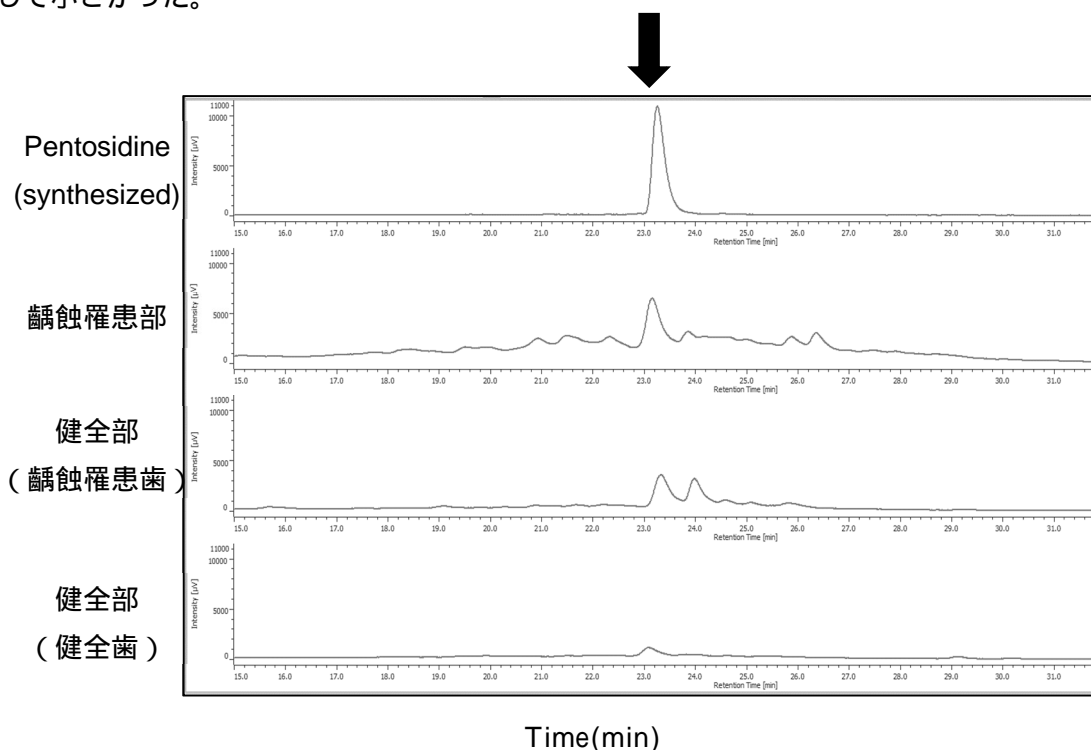


図2 高速液体クロマトグラフィー法による検出

カラム : Cosmosil®C18 ( 2mm × 150mm)

SolventA : 2%アセトニトリル、0.1%HBFA

SolventB : 50%アセトニトリル、0.1%HFBA

グラディエント : 1.6%/min、流速 : 0.2ml/min

蛍光検出条件 : Ex : 335nm、Em : 385nm

Pentosidine(synthesized) : ペントシジン標品 (化学合成品)

齲蝕罹患部 : 齲蝕罹患歯における齲蝕罹患部

健全部 (齲蝕罹患歯) : 齲蝕罹患歯における健全部

健全部 (健全歯) : 健全歯における健全部

## (2) ELISA 法

ELISA とは抗原抗体反応を利用した免疫学的測定法で、試料溶液中に含まれる抗原を検出・定量する方法である。抗原抗体反応と酵素反応による発光を測定することで象牙質に含

まれる AGEs のような微量タンパク質の検出・定量が可能である。ELISA にはいくつかの方法があるが、本実験では特異性が高く、微量タンパク質の検出に有効なサンドイッチ法を採用した。サンドイッチ法は、抗原に対する抗体をあらかじめ固相に吸着させておき、抗原と反応させる。さらに別の抗体を抗原と反応させ検出を行う方法である。本方法では同一の抗原を異なるエピトープで認識する抗体が必要となり、またエピトープどうしは立体構造上遠位にあることが望ましい。そのため付加型で分子量の小さい CML の検出は難しく、本実験では架橋型 AGEs であるペントシジンによるサンドイッチ法 ELISA を採用した。測定は、二次抗体に標識された酵素が色原性基質との酵素反応により発色したものの吸光度を測定し、定量は検量線を作成し行った。

#### 方法

ウエスタンブロット法と同様に 1mm 厚の脱灰された齲蝕罹患歯から齲蝕罹患部と健全部を直径 1mm ずつ採取した。試料を硬質ガラス試験管に入れ、それぞれ 6M-HCl を 100  $\mu$ l 加え、試験管を減圧下封管し、110  $^{\circ}$ C、20 時間反応させ、アミノ酸レベルにまで加水分解を行った。HCl を留去するため、減圧乾燥を行いリン酸緩衝液に再溶解した。抗原抗体反応はペントシジンエライザキット (Human Pentosidine ELISA Kit、CUSABIO、USA) を用いて行い、マイクロプレートリーダー (iMark マイクロプレートリーダー、Bio-rad、CA) を用いて、450nm/570nm の吸光度を計測した。定量は同時に作成した検量線で行い、Mann-Whitney 検定にて有意差の検定を行った。

#### 結果

本実験では 3 本の齲蝕罹患歯について齲蝕罹患部と健全部の AGEs (ペントシジン) 量の検出・定量を行った。図よりいずれの試料においても齲蝕罹患部の方が健全よりも AGEs (ペントシジン) の蓄積が有意に多く認められた。

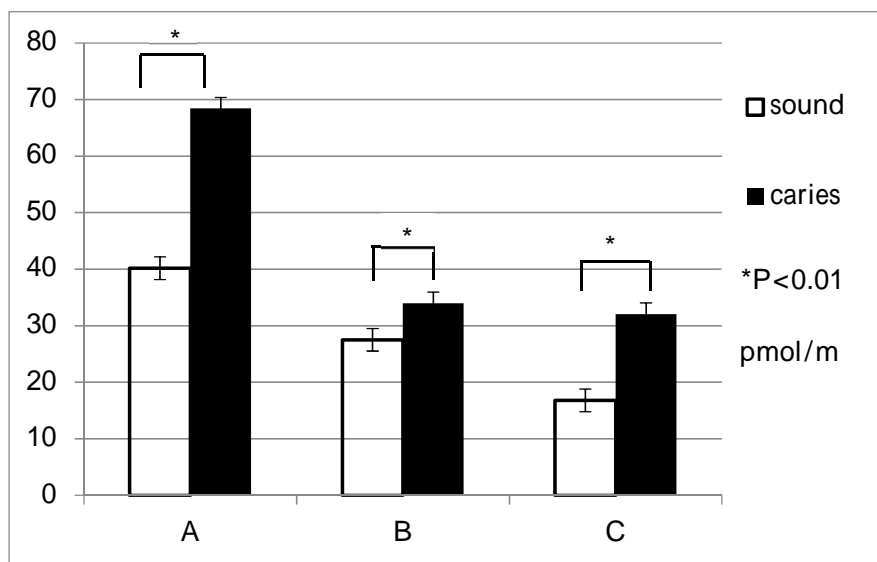


図3 ELISAによるAGEs(pentosidine)蓄積量の比較

白：健全部、黒：齲蝕罹患部

A：23歳、B：24歳、C：25歳

Mann-Whitney U test,  $P < 0.01$  (\*)

#### 4. 研究成果

ペントシジンなどの架橋型 AGEs は、コラーゲンの糖化により形成され、健全歯では歯髄における血流由来のグルコースなどの還元糖が原因と考えられている。そのため、齲蝕罹患部に限らず健全部においても量は少ないがペントシジンは検出される。結果より、齲蝕罹患部でのピークの大きさが健全部よりも大きかったことから、ELISA などの結果と同様に齲蝕罹患部ペントシジンの増加を認めた。

健全部 (健全歯) におけるピークが健全部 (齲蝕罹患歯) よりも明らかに小さかったことから、齲蝕罹患部周囲の健全象牙質においても AGEs (ペントシジン) の蓄積量が増加

していると考えられる。これは、エナメル質の喪失により外部の影響を受け細管内液の流量や組成の変化が起こり、結果として齲蝕に関連して感染の起こっていない健全象牙質においても糖化反応が起こっているからと考えられる。なお本実験で用いた健全部（健全歯）は健全部（齲蝕罹患歯）とは別個体より採取した歯であるため、個体間による AGEs（ペントシジン）蓄積の差である可能性を棄却できず今後さらに研究を深めていく必要がある。

齲蝕罹患部で健全部と比較して有意に AGEs（ペントシジン）が増加していた。ペントシジンはコラーゲンのリジン残基とアルギニン残基の 2 つの塩基性アミノ酸側鎖がクロスリンクできる位置関係になくは反応しない。そのため生成量はコラーゲン 1 分子あたり数個と、CML と比較して少ない。

CML による ELISA について、CML はアミノ残基が存在するだけで容易に形成されてしまうほか、ヒドロキシルラジカルやペルオキシナイトライトなどの存在により促進されるため、加熱処理を行う際に生成されてしまいアーティファクトとして出現する可能性があり、試料に本来含まれていた CML の定量が困難であると考えられる。CML とペントシジンはその生成過程において糖化とともに酸化を含むことをはじめ、共通した特徴が多い。

試料間において AGEs の蓄積量にばらつきがあったことに関して、本実験に用いた齲蝕罹患歯 3 本はそれぞれ別個体より抜歯したものであり、抜歯前の萌出状態や萌出時期、齲蝕罹患の期間などの歯の置かれていた環境の違いや各個体の栄養状態、嗜好食物、血糖など多くの因子が影響したと考えられる。

AGEs の蓄積は、健全部においても加齢とともに起こるが、齲蝕罹患によって蓄積量が増加する。特に、架橋型 AGEs の一つであるペントシジンが齲蝕罹患によって有意に増加していることが明らかとなった。

齲蝕罹患部の蛍光寿命の短縮が認められたことから、齲蝕罹患により蛍光寿命が周囲基質より短時間である AGEs が増加していることが考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 三浦治郎 清水真人 松田祐輔	4. 巻 1
2. 論文標題 「歯」は如何にして歳をとるのか？	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 大阪大学超高压電子顕微鏡センター年報	6. 最初と最後の頁 23-26
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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Aoi Takashima, Jiro Miura, Masato Shimizu, Keita Sugiyama, Yusuke Matsuda, Tadashi Nagashima
2. 発表標題 Multianalysis of pulp stones in type 2 diabetes model rats
3. 学会等名 97th General Session & Exhibition of the IADR（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高島葵、三浦治郎、清水真人、杉山敬多、松田祐輔 長島正
2. 発表標題 糖尿病モデルラットにおける歯髄内結石の多面的解析
3. 学会等名 第129回大阪大学歯学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 杉山敬多、三浦治郎、高島葵、清水正人、松田祐輔、長島正
2. 発表標題 糖化最終産物(AGEs)によるラット歯髄細胞の石灰化に関する多面的解析
3. 学会等名 大阪大学歯学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三浦治郎、高島葵、杉山敬多、松田祐輔、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電顕的観察
3. 学会等名 第74回日本顕微鏡学会
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

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