

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K21063

研究課題名（和文）コラーゲン糖化修飾を用いた新規歯髄内石灰化誘導法の開発

研究課題名（英文）Development of new induction method for promoting pulp calcification using glycated collagen

研究代表者

杉山 敬多（Sugiyama, Keita）

大阪大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：70910800

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、糖化最終産物（Advanced Glycation End products；AGEs）による石灰化メカニズムのさらなる解明のため、8週齢の雄SDラットの上顎大白歯に対して糖化ゼラチンスポンジを用いた直接覆髄実験を行い、マイクロCT撮影による評価、走査型電子顕微鏡（SEM）観察および光学顕微鏡観察を行った。

実験の結果から、糖化ゼラチンは歯髄細胞に対してオステオポンチンを介して石灰化を促進しつつ、IL-6による炎症の制御下で、異栄養性石灰化を引き起こすことが分かった。この新たな石灰化機構は、より効率良く、短期間で硬組織を誘導する新たな方法の創造につながると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

AGEsを含む糖化ゼラチンスポンジによる歯髄細胞の石灰化促進のメカニズムはオステオポンチンの発現にみられる、象牙芽細胞への分化と増殖の促進が主体ではなかった。糖化ゼラチンスポンジはスキファールドとして自ら石灰沈着を引き起こし、周囲の歯髄細胞への壊死を誘導しつつ、非炎症性に異栄養性石灰化を促進した。

この石灰化メカニズムの解明は、糖とゼラチンから作製される生体由来材料が、現在までの主流である生物学的活性を介した石灰化機構とは別のメカニズムで、より短期間で効率よく、安全に硬組織を誘導する可能性を示唆した。

研究成果の概要（英文）：Advanced glycation end products (AGEs) are formed by Maillard reactions, non-enzymatic reactions between proteins and sugars in human body. They have been reported to enhance biological calcification and pathological factors of metabolic diseases, such as diabetes. We have already shown that glycated collagen-containing AGEs promote calcification on cultured rat dental pulp cells (RDPCs) (Sugiyama et al. Oral Dis. 2021). To further elucidate the mechanism, we applied glycated gelatin sponge as a capping material on maxillary molars of 8-week-old male SD rats. In the glycated collagen group, tertiary dentin was thicker and denser. Calcified tissues formed with some necrotic cell debris. These results suggest that glycated gelatin sponge containing AGEs may lead to formation of hard tissue through a new calcification mechanism associated with dystrophic calcification.

研究分野：歯髄生物学

キーワード：AGEs コラーゲン 異栄養性石灰化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糖化最終産物 (Advanced Glycation End products ; AGEs) は還元糖とタンパク質のアミノ基が非酵素的糖化反応 (メイラード反応) することにより形成され、Pentosidine や Carboxymethyl lysine (CML) など約 40 種類以上に及ぶ。

AGEs は糖尿病等の代謝性疾患のリスク因子であり、そのものが生理活性をもつ分子として病態に大きく関与するだけでなく、コラーゲン等の生体内の基質タンパク質に架橋構造を形成し、骨や皮膚、血管壁など様々な生体組織の物性を変化させることが分かっている。

申請者らは、AGEs が生体内において骨や象牙質等の硬組織形成に影響を及ぼすという報告から、慢性糖尿病患者に認められる歯髄内石灰化に着目し、コラーゲンを糖化して作製した AGEs について培養歯髄細胞の石灰化への影響を検討した。

そして、その研究成果から新たな石灰化のメカニズムを発見した (Sugiyama et al. Oral Dis. 2021)。このメカニズムは以下の 3 つのプロセスを経ると考えられた。

細胞に作用させた AGEs に早い段階から Ca^{2+} を含む結晶が析出し、石灰化物形成の核が形成される。

AGEs 周囲の歯髄細胞が Ca 不足に起因する細胞死を起こし、壊死細胞周囲への石灰沈着が生じる。

と の相互作用により異栄養性に石灰化物が成長していく。

以上は in vitro での研究結果による考察であり、AGEs と細胞周囲の Ca^{2+} 動態と異栄養性の石灰化へ至るメカニズムは不明な点が多かった。

2. 研究の目的

申請者らがこれまでに発見した AGEs による歯髄細胞の石灰化促進のメカニズムには MTA セメントを用いた直接覆髄のメカニズムのように、材料が周囲の歯髄細胞に対して分化や増殖を促進する「生物学的活性」の影響は認められず、AGEs 自体への Ca^{2+} 結晶の析出と、その後の壊死細胞への壊死性石灰化が主体であった。

そして、このメカニズムには従来の覆髄材に比べ、より効率的で早期に石灰化物を誘導する可能性があることが示唆された。

本研究課題の目的は AGEs を含む石灰化誘導媒体として、糖化ゼラチンスポンジによるラット臼歯部への直接覆髄実験を行うことで AGEs の in vivo における石灰化の影響を評価することである。

そして、機序のさらなる解明から、新規覆髄材等の医療応用に向けた AGEs を含む石灰化誘導媒体の開発を目指すことである。

3. 研究の方法

(1) 糖化ゼラチンスポンジの調製

糖化ゼラチンスポンジはゼラチンスポンジ (Spongel, Astellas Pharmas) を 5 mM の DL-glyceraldehyde (Sigma-Aldrich) にて 37 °C、5 % CO_2 条件下で 7 日間糖化反応した後に、PBS (-) に 1 日浸漬することで作製した。コントロールは糖化処理を行わないゼラチンスポンジとした。

(2) 直接覆髄の手順

8 週齢の雄 SD ラット (CreaJapan Inc.) を 0.3 mg/kg の塩酸メドミジン、4.0 mg/kg のミダゾラム、5.0 mg/kg の酒石酸ブトルファノールにて腹腔内麻酔し、さらにエピネフリン (1/80,000) 含有 2 % 塩酸リドカイン (歯科用キシロカインカートリッジ, Dentsply Sirona, Tokyo, Japan) 0.5 mL を用いて局所浸潤麻酔を行った。

ラット左右上顎第一臼歯を 75 % エタノールを用いて消毒後、滅菌されたスチールラウンドバー (ISO #008, Shofu, Kyoto, Japan) 用いて、咬合面より露髄するような深さ 1 mm、直径 1 mm の窩洞を形成した。窩洞を止血し、生理食塩水で洗浄後、窩洞を覆う大きさの糖化ゼラチンスポンジまたはゼラチンスポンジにて直接覆髄し、ボンディング処理後、フロアブルコンポジットレジン (CLEARFILMAJESTY ES flow, Kuraray medical) にて歯冠修復を行った。また、処置歯への咬合力の負荷を避けるために対合歯の咬頭を最小限削合した。

(3) 石灰化物の解析

直接覆髄後の 2 週目と 4 週間後にペントバルビタールナトリウムを腹腔内に過剰投与しラットを屠殺した。処置歯を顎骨ごと離断し、マイクロ CT を用いて断層写真撮影 (管電流 90 kV1, 管電流は 160 μ A, スライス幅 10 μ m) を行い、石灰化物の形成を確認した。その後、エポキシ包埋法を用いた走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察およびパラフィン切片法によるヘマト

キシリン・エオジン（H-E）染色および石灰化関連タンパク質を主体とした免疫組織化学染色を行い、光学顕微鏡観察を行った。

4. 研究成果

(1) マイクロCTによる解析

4週目の糖化ゼラチン群では、コントロール群に比べて材料直下に形成された石灰化物が厚く、緻密であった（図1）。

(2) SEM観察

SEMによるBFI画像において、糖化ゼラチン群では、コントロール群に比べて材料直下に象牙質と類似する高信号領域が確認された。また、同部位は不定形であり、明らかな細管構造は認められなかったが、象牙質との連続性が認められた。また高信号領域の内部には歯髄組織成分と類似した低信号領域も認められた（図2）。

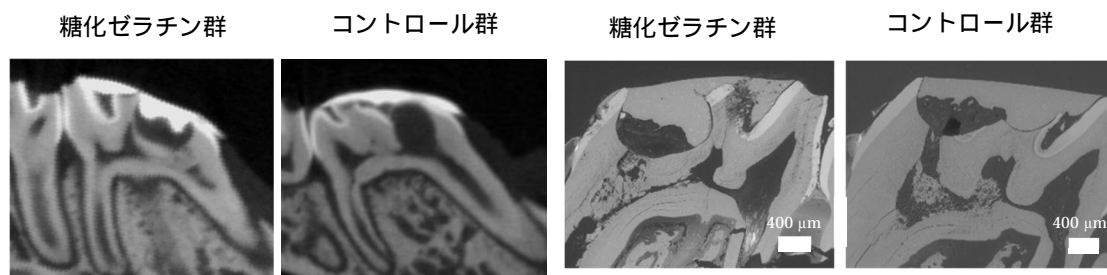


図1. マイクロCTによる石灰化物の観察

図2. SEMによるBFI像の観察

(3) 光学顕微鏡観察

4週目のH-E染色像において糖化ゼラチン群では材料直下に細管構造をもたない不定形の石灰化物の形成が確認された。

また、石灰化物の内部には細胞成分が確認された（図3）。石灰化物周囲の細胞の配列に乱れはなく、炎症性細胞の浸潤や血管の拡張などの炎症性の所見はみられなかった。

コントロール群では石灰化物は形成されておらず、細胞の融解壊死や空胞変性に伴う炎症所見が認められた。

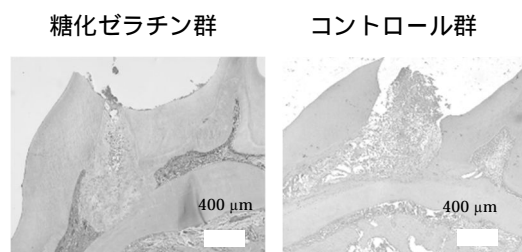


図3. H-E染色像

2週目の免疫組織化学染色像において、糖化ゼラチン群ではコントロール群に比べ、石灰化物の内部にオステオポンチン陽性細胞が多数認められた。また、コントロール群では糖化ゼラチン群に比べて歯髄内全体にIL-6陽性細胞が多数認められた。

以上の結果から、AGEを含む糖化ゼラチンによる直接覆髄実験において、AGEsは直下の歯髄組織に不定形の石灰化物の形成を促進することが分かった。また、確認された石灰化物は象牙質と接しているが、細管構造を有さず、不定形で、内部にオステオポンチン陽性の細胞を含むことが分かった。

さらに、石灰化物の中心部にはエオジン陽性の壊死細胞が多数認められるが、コントロール群に比べてIL-6の発現が抑制されていたことから、炎症反応の制御下で、異栄養性の石灰化が引き起こされていることが分かった。

本研究課題ではin vivoの実験により、AGEsによる歯髄内の石灰化現象について新たな知見が得られた。今後さらに研究を進めていき、機序を明らかにすることで、効率良く、短時間で象牙質や骨組織を誘導する新たな方法の創造につながると考えられる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Aoi Takashima, Jiro Miura, Keita Sugiyama, Masato Shimizu, Misa Okada, Tomohiro Otani, Tadashi Nagashima, Tetsuya Tsuda, Tsutomu Araki	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉山 敬多
2. 発表標題 糖化ゼ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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------