

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462957

研究課題名(和文) 蛍光計測と超微形態解析から探るヒト象牙質の糖化過程の解明

研究課題名(英文) Influence of non-enzymatic glycation in human dentin on aging

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：象牙質における老化現象(歯質の脆性化、色調の変化)においても糖化現象が関与していると考え、本研究を行った。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。AGEs架橋が過度の架橋構造を構成しコラーゲン線維の伸展性が失われ、組織の外力に対する抵抗性が低下する。象牙質におけるAGEsの局在および蓄積を光学的及び形態学的に分析することで糖化レベルを評価することが可能であることが分かり、糖化現象が象牙質の物性や構造に影響を与えるメカニズムを解明できた。

研究成果の概要(英文)：The main purpose of this study was to determine the Maillard reaction in dentin. We focused on the crosslinking of collagen; namely, advanced glycation end products (AGEs) formed by non-enzymatic glycosylation. Fluorescence signals, electrophoresis, and Western blotting can be used as probes for this research. In this study, we examined the relationship between fluorescence characteristics and immunochemical analysis of type1 collagen from decalcified human dentin with respect to glycation, and considered the possible influence of crosslinking on dentinal physiology.

The accumulation of AGEs with aging may be responsible for the changes in fluorescence lifetime and immunochemical properties. Fluorescence microscopy and electrophoresis can provide useful crosslinking information on the aging phenomenon in human dentin. These results suggest that dentinal aging might be affected by reducing sugars in the blood.

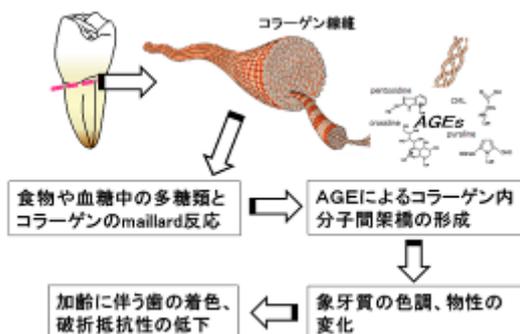
研究分野：保存修復

キーワード：加齢 象牙質 コラーゲン 糖化 AGEs

## 1. 研究開始当初の背景

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知られるようになった。食品の加熱中に起こる着色や、香りの変化に関わる反応として食品化学の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沈着しており、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) に関与していることが明らかになり、医療分野においても急速に研究が展開され始めている。

今回、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 架橋が過度の架橋構造を構成しコラーゲン線維の伸展性が失われ、組織の外力に対する抵抗性が低下する。AGE s の局在および蓄積を光学的及び形態学的に分析することで糖化レベルを評価ことができ、糖化現象が象牙質の物性や構造に影響を与えるメカニズムを解明できると考えた。



## 2. 研究の目的

本研究は、象牙質コラーゲンの AGE s 架

橋の特性を明らかにすることにより象牙質の加齢に伴う変化の理解に役立ち、象牙質内の AGEs の性質を解明することにより歯の破折や着色の予防方法の開発につながると考えられる。また、AGEs の糖化反応は多経路であるため、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極めて重要であると考えられる。さらに歯の予後を考える上で糖尿病などの全身疾患が象牙質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 架橋の種類特定 (包埋後免疫電顕法)

免疫電顕用にパラフォルムアルデヒドとグルタルアルデヒドにて固定した脱灰象牙質を、紫外線重合電顕用レジソ LowcrylK4M を用い-20℃にて紫外線低温重

合 (TUV-200、堂阪 EM) にて包埋を行う。

超薄切片作成後に抗 AGE 抗体に 18nm の金コロイド粒子を標識し、免疫染色および免疫電顕法にて免疫組織化学的検索を行った。

各種の抗 AGEs 抗体の金コロイド粒子を観察して、局所分布とコラーゲン内での結合部位を検討する。糖尿病患者の骨においてはペントジシンの発現が多いという報告から関連する数種類を対象を絞り検索を行った。

### 3) 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℃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。複数のヒト抜去歯を用いた年齢別の測定と人工的な象牙質コラーゲンの糖化反応を直接観察するため還元糖 (グルコース、リボース) 溶液中で脱灰試料の浸漬試験を行った。

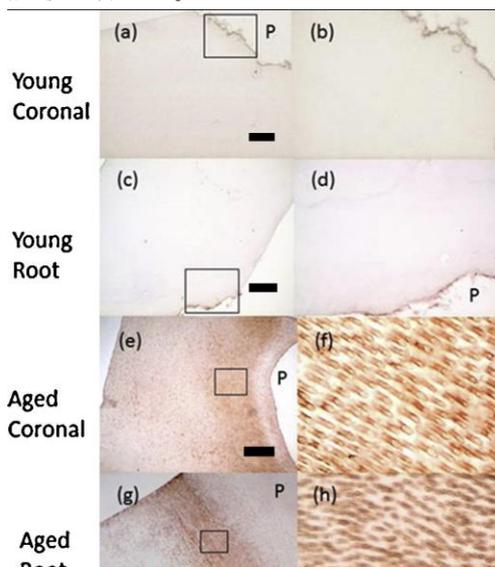
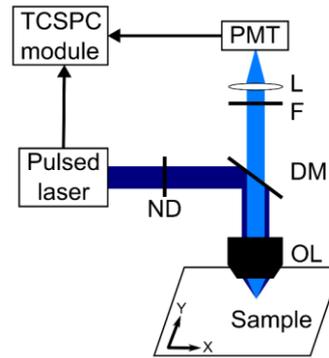


図) 高齢者の象牙質においてAGEs抗体陽性の反応が認められた。



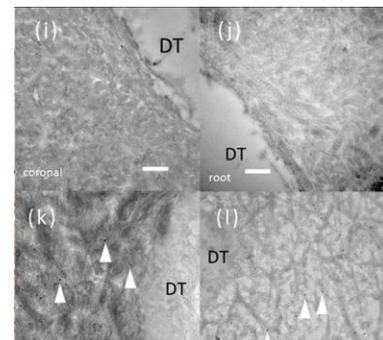
(TCSPC system)

## 4. 研究成果

### 1) 電子顕微鏡による AGEs 架橋の分布

免疫組織化学的評価においては、コラーゲン線維の糖化を示す染色像が高齢の象牙質において顕著に見られた。さらに免疫電子顕微鏡像において、高齢者の象牙細管周囲のコラーゲン線維に特に多くのAGEsが沈着している様相が確認できた。

脱灰象牙質における抗 AGE 抗体による免疫組織化学的染色では、歯髓腔の周囲の象牙前質の外側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。その分布位置はマクロ的視点で歯冠側において歯髓周囲に多く存在するのに対して、歯根部においては歯髓側からセメント質側に向かって緩やかな減少することが分かった。さらに同様の部位を免疫電子顕微鏡像において局在を調べたところ、高齢者において象牙細管周囲のコラーゲン線維に多くの AGEs が沈着している様相が確認された。



### 2) AGE s 架橋の蛍光物質の分析

象牙質コラーゲンの蛍光寿命が高齢者では若年者より短縮した。免疫組織化学染色では AGEs は歯髄近傍のみならず高齢者では象牙質全体に分布していることがわかった。さらに象牙細管近傍の AGEs に対し免疫電子顕微鏡による定量的な解析をおこなった結果、高齢者において AGEs の蓄積が若年者の 2~3 倍におよぶことが分かった。Western blot では 3 M 塩酸抽出物において AGE が高齢者で若年者に比べて多いことを認めた。脱灰象牙質を 6 週間リボース中に浸漬したものでは、若年、高齢ともに AGEs に起因すると思われる蛍光寿命の短縮が認められた。(下図)

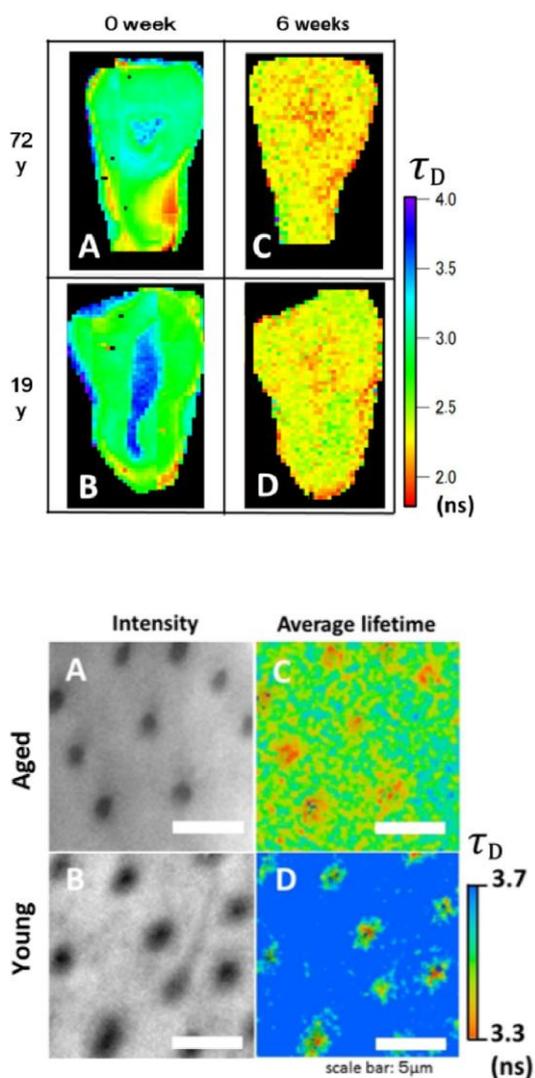
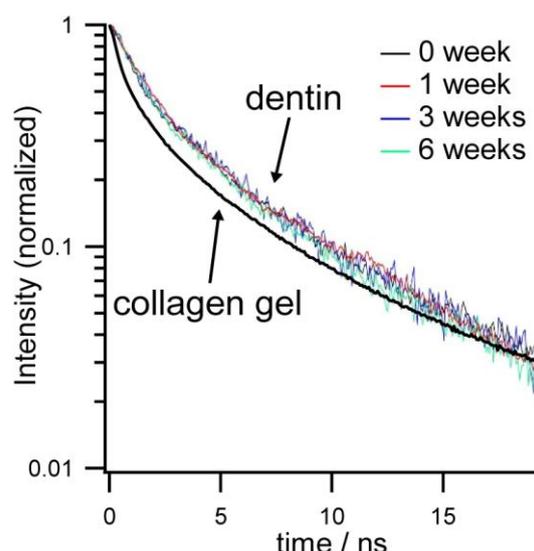


図) 象牙細管周囲における蛍光寿命の変化。高齢者において蛍光寿命の短縮が認められた。



### まとめ

象牙質は糖化ストレスに常に受ける環境にあり、ほとんど代謝しない。象牙質コラーゲンの糖化について、これまで、歯髄周囲における糖化の増加といった分布状態の差があることが報告されているが、年齢による差はほとんどないとされてきた。本研究では免疫組織化学的手法、western blot 法などの生化学的手法、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若年者、高齢者の象牙質を解析した。生化学的手法では付加型 AGEs の一つである CML と架橋型 AGEs である pentosidine が高齢者では若年者に比べて多いことを認めた。免疫組織学的方法でも高齢者において CML が増加していることが確認できた。蛍光寿命は蛍光色素分子の密度が高まると短縮することが知られている。架橋型 AGEs は蛍光色素分子であることが多く、象牙質コラーゲンの蛍光寿命が高齢者では短縮することから、コラーゲン間の非生理的な架橋が増加していることが示唆された。加齢によって糖化による非生理的な架橋が増加することが高齢者における象牙質の力学的強度の減少や、う蝕進行特性の変化にも関連している可能性がある。また本研究における実験手法は、硬組織の加齢変化だけではなく糖尿病における糖代謝異常に関

する研究にも有効であると考えられる。

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9件)

1. S Fukushima, M Shimizu, J Miura\*, Y Matsuda, M Kubo, M Hashimoto, T Aoki, F Takeshige, and T Araki, Decrease in fluorescence lifetime by glycation of collagen and its application in determining advanced glycation end-products in human dentin, *Biomedical Optics Express*, 23;6(5):1844-56, 2015.
2. Y Asahi, J Miura, T Tsuda, S Kuwabata, K Tsunashima, Y Noiri, T Sakata, S Ebisu, M Hayashi, Simple observation of Streptococcus mutans biofilm by scanning electron microscopy using ionic liquids, *AMB express*, 24;5(1):6, 2015.
3. A Obana-Koshino, H Ono, J Miura, M Sakai, H Uchida, W Nakamura, K Nohara, Y Maruyama, A Hattori, T Sakai\*, Melatonin inhibits embryonic salivary gland branching morphogenesis by regulating both epithelial cell adhesion and morphology, *PLoS ONE* 10(4):e0119960, 2015.
4. Higashi 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*: in press.
5. 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*: in press. (IF: 0.968)
6. Jiro Miura\*, Kantaro Nishikawa, Mizuho Kubo, Shuichiro Fukushima, Mamoru Hashimoto, Fumio Takeshige, Tsutomu Araki, Accumulation of advanced glycation end-products in human dentin. *Archives of Oral Biology* 59(2):119-24, 2014
7. Jiro Miura\*, Kantaro Nishikawa, Mizuho Kubo, Shuichiro Fukushima, Mamoru Hashimoto, Fumio Takeshige, Tsutomu Araki, Accumulation of advanced glycation end-products in human dentin. *Archives of Oral Biology*. 2013 in press
8. Mizuho Kubo, Jiro Miura\*, Takao Sakata, Ryuji Nishi, Fumio Takeshige, Structural Modifications of Dentinal Microcracks with human aging. *Microscopy*, 62:555-561, 2013
9. Mariko Matsumoto, Jiro Miura\*, Fumio Takeshige, Hirofumi Yatani, Mechanical and morphological evaluation of the bond-dentin interface in direct resin core build-up method, *Dental Materials*, (29) 287-293, 2013

[学会発表] (計13件)

<招待講演・シンポジウム>

1. 三浦治郎 第 35 回医学生物学電子顕微鏡学会近畿支部会「硬いサンプルを切ってみる – 未脱灰硬組織への挑戦」場所：奈良先端科学技術大学院大学 2013 年 11 月 16 日
2. Nishikawa Kantaro, Fukushima Shuichiro, Araki Tsutomu, Kubo Mizuho, Miura Jiro, Takeshige Fumio, Distribution of Advanced glycation end-products in human dentin measured by fluorescence lifetime imaging ICBME Singapore 2013 12/4-7
3. 三浦 治郎：歯科医療における未脱灰硬組織電子顕微鏡観察の有用性 医学生物学共同利用者報告会 2014 年 1 月 14 日 大阪大学生命機能研究所 大阪
4. 三浦治郎：歯科におけるイメージング手法と歯の加齢変化 日本機械学会 生物機械システム研究会 龍谷大学梅田キャンパス 大阪
5. 三浦治郎：未脱灰象牙質における 3 次元構築法 歯科基礎医学会総会 サテライトシンポジウム 2014 年 9 月 25 日 福岡
6. 三浦治郎：未脱灰硬組織の微細構造解析から探るヒト象牙質の加齢変化 医学生物学電子顕微鏡技術学会シンポジウム 2014 年 12 月 20 日 千葉

#### <国際学会>

7. M. Shimizu, J. Miura, M. Kubo, Y. Matsuda, S. Fukushima, F. Takeshige, and T. Araki, Determination of Advanced Glycation End-products in human dentin. IADR/PER congress September 11, 2014, Dubrovnik, Croatia
8. Yusuke Matsuda; Jiro Miura; Mizuho Kubo; Masato Shimizu; Fumio Takeshige; Tsutomu Araki, Localization And Quantification Of Advanced Glycation End-Products In Dentinal Caries International Association for Dental

Research, Boston 2015, 3/12

9. Jiro Miura; Yusuke Matsuda; Masato Shimizu; Mizuho Kubo; Fumio Takeshige; Sakiko Enomoto; Shigeo Arai, Ultrastructural Morphological Evaluation of Non-demineralized Human Dentin Using FIB/SEM Tomography, International Association for Dental Research, Boston 2015, 3/13

#### <一般講演>

10. 久保美寿穂、三浦治郎、清水真人、松田祐輔、竹重文雄、坂田孝夫、西竜治、保田英洋 象牙質微小亀裂進展様相の形態学的評価 医学生物学電子顕微鏡技術学会 第 30 回学術講演会および総会、2014 年 5 月 24 日、大阪
11. 清水真人、三浦治郎：象牙質基質タンパク質の糖化による加齢変化 第 54 回 歯科基礎医学会学術大会、2014 年 9 月 27 日、福岡
12. 青木拓也、福島修一郎、三浦治郎、荒木勉，“蛍光寿命計測による老化の評価” 2014 年度日本生理人類学会研究奨励発表会（関西地区） 神戸市、2015 年 2 月 7 日 ANA クラウンプラザホテル神戸
13. 清水 真人、三浦 治郎、“象牙質コラーゲンの糖化と加齢変化” 歯科基礎医学会、2015 年 9 月 11 日 朱鷺メッセ 新潟市

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

三浦 治郎 ( Jiro Miura )

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

福島 修一郎 (Shuichiro Fukushima)

大阪大学基礎工学研究科・助教

研究者番号：40362644

##### (3) 連携研究者

荒木 勉 (Tsutomu Araki)

大阪大学基礎工学研究科・教授

研究者番号：50136214