



Title	加齢に関連した象牙質コラーゲン蛋白質の非酵素的糖化修飾
Author(s)	清水, 真人
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/56125
rights	© 2015 Optical Society of America
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 （ 清 水 真 人 ）

論文題名

加齢に関連した象牙質コラーゲン蛋白質の非酵素的糖化修飾

論文内容の要旨

【研究目的】

生体内における糖化反応は、ヒトの加齢変化の一つとして考えられている。糖は生体にとってエネルギー源であるとともに、生体に取り込まれた際にタンパク質のアミノ基に結合し、メイラード反応と呼ばれる一連の反応を経て非酵素的に糖化最終産物（Advanced Glycation End products: 以下AGEs）を形成する。AGEsには1個のアミノ酸側鎖と結合する付加型と2個のアミノ酸残基間に結合し架橋構造をつくる架橋型がある。架橋型AGEsはタンパク質分子内あるいは分子間に非酵素的に無秩序な架橋を形成する。また、架橋型AGEsは芳香環を持つものが多く、蛍光性を持つことが知られている。代表的な付加型AGEsとしては、カルボキシメチルリジン（CML）、カルボキシエチルリジン（CEL）。架橋型AGEsとしてはペントシジン（pentosidine）、クロスリン（crossline）などが知られており、特にペントシジンは、現在、AGEs関連疾患のサロゲートマーカーとしての利用が始まっている。

コラーゲン分子は酵素に依存して形成される秩序だった生理的架橋によって、しなやかで高い強度の構造体を形成している。しかし架橋型AGEsによる修飾が増加すると、コラーゲン線維本来のしなやかさは失われて脆弱な構造になってしまう。またAGEsの蓄積によって正常な代謝を行うことが困難になる。骨においてはこのようなコラーゲンの質の低下が骨粗鬆症の重要な原因と考えられ、血管ではAGEs沈着が引き金となって動脈硬化や毛細血管の脆弱化などが起こる。糖尿病患者では神経系の不調の原因ともなり、アルツハイマー症や、腫瘍の浸潤転移への関与も疑われている。歯科における研究では、血糖コントロールが不良の状態であると、歯髄内に異常な石灰化が生じることが報告されている。象牙質コラーゲンにおける糖化の状態を調べた研究は、象牙質からのコラーゲンの抽出が困難であるため研究報告例は少ない。これまでの報告では象牙質コラーゲンでは加齢に伴う糖化レベルに違いは認められていたものの、定量的な評価法によってその差を評価した報告はなかった。本研究ではコラーゲンの蛍光寿命測定といった物理化学的手法、免疫組織化学的手法、ウェスタンブロットなどの生化学的手法、および高速液体クロマトグラフィーによる分離分析といった分析化学的手法を用いて、象牙質基質タンパク質のコラーゲンの糖化修飾を検出し、象牙質における加齢による糖化現象の評価を行った。

【材料と方法】

1) 象牙質からのコラーゲンの抽出、抗AGEs抗体を用いたウェスタンブロットによるAGEs化コラーゲンの検出
脱灰した象牙質をビーズクラッシャーにより粉碎し、さらに3N-HCl またはpepsin処理によって可溶化した後、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動（SDS-PAGE）によって分離し、さらに電気泳動した試料をセミドライブロットティング法にてPVDF膜に転写し、膜上で抗原抗体反応を検出した。

2) 抗AGEs抗体による免疫組織染色

脱灰した牙質を1mm厚にスライスカットし、パラフォルムアルデヒド固定を行った後、準超薄切片を作成し抗AGEs抗体を用いて抗原抗体反応を行い、DAB染色を行い観察した。

3) 抗AGEs抗体による免疫電子顕微鏡解析

脱灰試料をトリミングし低温紫外線重合にて包埋を行い超薄切片を調整した。金コロイド粒子と結合させた抗AGEs抗体を用いて、抗原に結合した金コロイド粒子を透過型電子顕微鏡で観察し、高齢者と若年者。それぞれの歯髄側、エナメル質側での金コロイド粒子数をカウントし、AGEsの分布状況を精査した。

4) 象牙質コラーゲンの蛍光強度ならびに蛍光寿命測定

抜歯直後の歯3本をそれぞれ1mm厚に低速ダイヤモンドソーで切断したのち脱灰し蛍光顕微鏡で測定した。励起光は紫外線ダイオードレーザー用い、蛍光は時間相関単一光子相関法（TCSPC法）で測定した。

5) 象牙質中のペントシジンの高速液体クロマトグラフィー (HPLC) による分離、同定脱灰した象牙質を 6 N 塩酸封管中 110°C、20 時間でコラーゲン分子をアミノ酸レベルまで完全分解し、C₁₈逆相カラム、紫外線吸収ディテクター (absorbance 325nm) を用いて高速液体クロマトグラフィー分析を行った。AGEs を含む分画を集め、蛍光強度、蛍光寿命測定を行い、AGEs の同定を行った。

【結果】

- 1) ウェスタンブロットでは 3M-HCl 抽出物において AGEs が高齢者で若年者に比べて多いことを認めた。
- 2) 免疫組織染色において、高齢者では AGEs は歯髄近傍のみならず象牙質全体に分布していることがわかった。
- 3) 象牙細管近傍の AGEs に対し、免疫電子顕微鏡による解析をおこなった結果、AGEs は象牙細管周囲の基質部分に多く局在しており、AGEs の蓄積量が高齢者においては若年者の 2 ～ 3 倍におよぶことが分かった。
- 4) 象牙質コラーゲンの蛍光強度測定では、コラーゲンの自己蛍光の強度が高く、AGEs の存在量による差を捉えることはできなかった。一方、蛍光寿命測定では、高齢者の象牙質の蛍光寿命が若年者より短縮し、蛍光寿命イメージング測定では、高齢者において歯根部周辺で顕著な短縮を認め、象牙細管周辺の蛍光寿命短縮も顕著であった。
- 5) 高速液体クロマトグラフィー解析において、標品の合成ペントシジンと同時間の保持時間を示すクロマトグラムピークが得られた。クロマトグラムピークを採取し、蛍光スペクトルを測定したところ、スペクトル形状が一致し、ペントシジンを含むクロマトグラムピークであることがわかった。またクロマトグラムから、ペントシジンは高齢者において若年者より多く存在することが示され、免疫組織染色、免疫電子顕微鏡解析の結果と一致した。

【考察および結論】

本研究の結果から加齢とともに象牙質内に AGEs が蓄積していることが明らかになった。コラーゲンの蛍光寿命の短縮は短時間寿命の蛍光体が増加することを示唆しており、AGEs の中でも特に分子間の架橋構造を形成するペントシジンが増加していると考えられる。AGEs の分布状態から歯髄側、および歯根側より供給される糖によって AGEs 修飾されることが考えられる。AGEs の架橋構造が増加することから、象牙質の加齢に伴う脆弱化に関連している可能性がある。AGEs と蛍光寿命短縮の相関が確認できたことで、蛍光寿命測定が生体組織の AGEs の検出に有効であることが明らかになった。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (清 水 真 人)			
論文審査担当者	(職)	氏 名	
	主 査	教授	竹重 文雄
	副 査	教授	豊澤 悟
	副 査	准教授	秋山 茂久
	副 査	講師	村上 智彦

論文審査の結果の要旨

本研究は、象牙質における加齢変化とコラーゲン蛋白質の非酵素的な糖化修飾との関連を解明することを目的としたものである。

形態学的手法、生化学的手法、物理化学的手法、および分析化学的手法などの多面的な解析によって、象牙質コラーゲン蛋白質の非酵素的糖化修飾が、加齢にともない増加することを明らかにした。免疫組織染色や蛍光寿命測定の結果から、歯髄を経て供給される糖によって、糖化修飾が管周象牙質に生じていることが示唆された。さらに、蛍光寿命測定法が生体物質中の糖化修飾解析に有効であることを示した。

以上の研究成果は、象牙質の加齢と非酵素的糖化修飾との関連について新しい知見を与えるものであり、博士（歯学）の学位論文として価値のあるものと認める。