



Title	Ⅱ型糖尿病モデルラットにおける歯髄内石灰化発生のメカニズムの多面的解析
Author(s)	高島, 葵
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.18910/82175
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

学位論文

Ⅱ型糖尿病モデルラットにおける 歯髓内石灰化発生のメカニズムの 多面的解析

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻

(療護歯科保健学講座 顎口腔総合医療学教室)

高島 葵

学位論文

Ⅱ型糖尿病モデルラットにおける 歯髓内石灰化発生のメカニズムの 多面的解析

大阪大学大学院歯学研究科

口腔科学専攻

(療護歯科保健学講座 顎口腔総合医療学教室)

高島 葵

目次

緒言	4
材料と方法	7
Ⅱ型糖尿病モデルラットの生化学的特徴	7
組織標本の作製	8
Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄内石灰化物の形態学的評価	8
Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄の組織学的評価	10
Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄内血流状態の評価	12
Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄内低酸素状態の評価	13
結果	15
Ⅱ型糖尿病モデルラットの生化学的特徴	15
Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄内石灰化物の形態学的評価	16
Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄の組織学的評価	17
Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄内血流状態の評価	18
Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄内低酸素状態の評価	19

考察	21
結論	27
謝辞	28
参考文献	29
図表	34

緒言

歯髄は象牙質に囲まれた非石灰化組織であり、通常は石灰化することはないが、病的環境下においては、歯髄内に歯髄結石とよばれる硬組織が形成されることが知られている。歯髄結石は、歯髄腔内において遊離性、壁着性、介在性に存在し、エックス線写真上では塊状石灰化物として観察される。さらに、根管内の解剖学的障壁¹⁾となるため歯髄に血流障害が生じ、歯髄組織への栄養供給や創傷治癒が妨げられ、歯髄の虚血、感染、壊死を惹起する²⁾。これまで歯髄結石の出現は加齢に伴いその数を増すことが報告されている¹⁾が、糖尿病²⁾や血管疾患³⁾等の全身疾患の影響を受けることも示唆されており、中でも血糖値がコントロールされていない糖尿病患者の歯髄において高頻度で石灰化物が形成されることが報告されている⁴⁾。そこで本研究では、歯髄結石の発現と糖尿病の関係に着目し研究を行った。

糖尿病は罹患率の高い生活習慣病の一つである。世界保健機関(WHO)の推定では全世界の20歳以上の糖尿病患者の割合は、2000年には2.8%であったが2030年には4.4%と、およそ1.6倍になると予想されている⁵⁾。また糖尿病には糖尿病性神経障害、糖尿病性網膜症、糖尿病性腎症の三大合併症をはじめとして、糖尿病足病変、動脈硬化性疾患、歯周病など様々な合併症があり、QOLを低下させる大きな原因の一つとなっている。

近年の研究で、糖尿病合併症の発症には、糖化最終産物(Advanced Glycation End Products:以下 AGEs) の関与が多く報告されている⁶⁾(図 1)。AGEs は、糖尿病などにより体内が慢性的な高血糖状態にさらされた場合に、血中の糖が組織を構成するタンパク質のアミノ基と非酵素的に反応して架橋などを形成するメイラード反応(Maillard 反応)によって形成される物質である^{7), 8)}。このメイラード反応はグルコース濃度に依存して進行するため、慢性的な高血糖状態にある糖尿病患者では、健常者に比べて反応が亢進している。また AGEs によるタンパク質の修飾は不可逆的であるため、そのタンパク質が代謝されない限り生体内に蓄積するという特性を持つと同時に、この代謝が緩慢であるという特性が疾病の慢性化の一因であると考えられる。

生体内で生成されて体内に蓄積した AGEs は、その受容体である receptor for AGEs (RAGE) を介して様々な細胞や組織に作用し、皮膚疾患や糖尿病血管合併症、動脈硬化、神経変性疾患、加齢関連疾患等に対して共通した原因として関与すると報告されている^{6), 9)-12)}(図 2)。AGEs には数百種類の存在が知られているが、リジン残基とアルギニン残基から生成するペントシジン(pentosidine)や、2 つのリジン残基から生成するクロスリン(crossline)¹³⁾をはじめとした架橋型 AGEs と、アマドリ化合物の酸化的分解により生成するカルボキシメチルリジン(carboxymethyllysine: CML)¹⁴⁾や類似の化合物であるカルボキシエチルリジン

(carboxyethyllysine: CEL)¹⁵⁾ 等の付加型 AGEs が、その代表とされる。架橋型 AGEs は血管や骨などに蓄積し組織の分子間架橋を増加させることによって組織伸展性を低下させ、血管損傷や骨折を惹起するともいわれている¹⁶⁾。さらに架橋型 AGEs であるペントシジン(pentosidine)¹⁷⁾は芳香環を持ち、酸加水分解に対して安定しており、蛍光性を有する特徴を持っていることから生体内の糖化指標として応用され、その血中濃度は体内での骨折の評価などに用いられている。また口腔内においては、ペントシジンが齲蝕象牙質に沈着し、その蛍光特性が齲蝕の検出指標となることが報告されている¹⁸⁾。

これらの AGEs の蓄積は、先述の糖尿病患者における歯髄内石灰化にも関与することが報告されているが^{19), 20)}、糖尿病における歯髄内石灰化のメカニズム、及び糖尿病歯髄の病態には不明な点が多い。

本研究では、糖尿病と歯髄内石灰化の関係に着目し、その形成原因を詳細に調べることを目的として、Ⅱ型糖尿病モデルラットを用いて歯髄内石灰化物に対する形態学的、免疫組織化学的評価を行った。

材料と方法

本研究は、大阪大学大学院歯学研究科動物実験委員会の承認（動物実験承認番号：動歯-28-008-0）のもと大阪大学動物実験規定に則して実施した。

Ⅱ型糖尿病モデルラットの生化学的特徴

本研究には6週齢から19週齢のオスSD rat (CLEA Japan, 東京) をコントロールラット, オスSDT-fatty rat (SDT.Cg-*Lept jttjcl*, CLEA Japan, 東京) をⅡ型糖尿病モデルラットとして供した(図3)。

各動物の体重, 血糖値の測定を週一度, 同一時間帯に行い, 週齢ごとの平均値と標準偏差を求めた。血糖値はグルテストミント®(株式会社三和化学研究所, 愛知) に尾静脈血を滴下し, グルコースオキシダーゼ法 (Trinder P. Determination of glucose in blood) にて測定した。

また本実験における血糖値上昇の早期段階における歯髄内石灰化と血清中リン濃度との関連をみるため, 6~8週齢のコントロールラット3匹とⅡ型糖尿病モデルラット3匹に対し, 採血後に血清中リン濃度の測定を行った。各ラット群より鎖骨下静脈より採血した血液を, 25℃にて30分間インキュベートし, 4℃で16時間静置した。その後, 採取した血液を4℃1000×gにて30分間遠心分離した後, リン酸測定キット (QuantiChrom™ Phosphate Assay Kit, BioAssay

Systems) と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, 655nm における吸光度を測定し, 血清中のリン酸濃度を測定した。各計測値は, Mann-Whitney の U 検定を用いて有意差を 5%として比較を行った。

組織標本の作製方法

高血糖状態を確認した 6~19 週齢のラットを 0.3 mg/kg の塩酸メデトミジン(ドミツール, 明治製菓, 東京), 4.0 mg/kg のミダゾラム(ドルミカム, アステラス製薬, 東京), 5.0 mg/kg の酒石酸ベトルファノール(ベトルファール, 明治製菓)にて鎮静後, 安楽死させ骨剪刀と外科用メスを用いて臼歯部顎骨を摘出した。摘出後速やかに, 4 %パラホルムアルデヒド(以下 PFA)に浸漬し 24 時間固定後, 5 %グルタルアルデヒド(以下 GA)にて 24 時間浸漬固定した。そして トリス緩衝生理食塩水(Tris-Bufferd Saline:以下 TBS)にて洗浄後, 各実験を行った。

II 型糖尿病モデルラットの歯髓内石灰化物の形態学的評価

糖尿病モデルラットにおける歯髓内石灰化物形成の頻度, 形成された石灰化物の構造, 組成の評価を目的としてマイクロ CT, 走査型電子顕微鏡(以下 SEM)を用いて形態学的評価を行った。

1) マイクロ CT による歯髄内石灰化物の形態学的評価

管電圧 90kV, 管電流 80 μ A, 撮影時間 180 秒の撮影条件でマイクロ CT (R_mCT2, Rigaku, 東京) を用いて歯髄内石灰化物の 3 次元的観察ならびに, 歯髄内石灰化物形成の有無について評価を行った。歯髄内の石灰化物の有無は, 髄質内に遊離性に存在する, または付着性を有し象牙質に近似した X 線不透過性を示す構造が認められた場合に, 石灰化物ありと判定した。全観察歯数に対する歯髄内に石灰化物を認めた割合を算出し Fisher の直接確率法により統計学的に歯種による石灰化物の形成頻度の比較を行った。

2) 走査型電子顕微鏡を用いた観察とエネルギー分散型エックス線分析 (EDX 分析) を用いた歯髄内石灰化物の組成分析

各試料をマイクロ CT にて撮影した後, エタノール上昇系列により脱水後, プロピレンオキサイドにて置換し, エポキシ樹脂 (Quetol 812, Nisshin, 東京) にて樹脂包埋を行った。観察面を回転切断機 (MARUTO, 東京) にて露出後, 0.1 μ m のダイヤモンド研磨シートにて鏡面研磨し, 試料表面に対して走査型電子顕微鏡 (TM-3000, 日立, 東京) を用いて石灰化物の詳細な構造の観察を行った。さらに同研磨標本について EDAX Genesis-XM2 エネルギー分散型エックス線分析 (以下 EDX 分析) 装置 (AMETEK, PA, USA) を備えた走査型電子顕微鏡 (S3400N, 日

立，東京)を用いて組成分析を行った。各試料で3回の測定結果の平均値を算出し，測定値とした。この測定結果に対して，目的元素の定量に用いる補正法である ZAF(原子番号補正 atomic number :Z, 吸収補正 absorption :A, 蛍光補正 fluorescence:F, 以下 ZAF)補正を行い，炭素(C)，酸素(O)，カルシウム(Ca)，リン(P)の構成比を得た。得られた結果を Mann-Whitney の U 検定にて有意水準 5%で比較した。

Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄の組織学的評価

Ⅱ型糖尿病モデルラットにおける歯髄内石灰化を病理組織学的に観察するとともに，歯髄内石灰化に関与するタンパク質の観察を目的として Hematoxylin Eosin 染色(以下 HE 染色) および免疫組織化学染色を行った。

ラットより摘出した臼歯部顎骨を 4 %PFA にて 24 時間浸漬固定処理し，TBS にて洗浄後，10%エチレンジアミン 4 酢酸(ethylene diamine tetra acetic acid:以下 EDTA) 溶液(pH7.4) にて 4 週間室温にて浸漬脱灰を行い，エタノール上昇系列による脱水後パラフィン包埋を行った。包埋後に，回転式マイクローム(RM2125RT, LEIKA, Germany)を用いて，厚さ 4 μ m の薄切切片を作製した。採取した薄切切片に対し，HE 染色，免疫組織化学染色を施して，光学顕微鏡(CX41, OLYMPUS, 東京)にて観察・撮影を行った。

免疫組織化学染色は、先行実験で行った 16 週齢ラットの切歯歯髓細胞の RNA マイクロアレイ解析により、Ⅱ型糖尿病モデルラットとコントロールラットの間に、糖化に関連する *RAGE* と炎症の指標となる *S100A8* の発現頻度に差が認められたことから糖化の評価として *RAGE* に加えペントシジンを、炎症の評価として *S100A8* に加え 腫瘍壊死因子 ($\text{TNF-}\alpha$)、およびインターロイキン 6 (IL-6) を、及び石灰化に関連した評価としてオステオポンチンを選択し、それらの歯髓内での発現を免疫組織化学染色により観察した。

薄切切片をキシレンにて脱パラフィン後、エタノールにて脱水し TBS で洗浄した。ブロッッキング後、AGE s の蓄積状況の観察には一次抗体に抗 *RAGE* 抗体 (Anti human *RAGE* monoclonal antibody, Trance Genic Inc., 福岡)、抗ペントシジン抗体 (Anti Pentosidine mouse monoclonal antibody, Trance Genic Inc., 福岡)、二次抗体としてビオチン標識ウサギ抗マウス抗体 (Biotinylated rabbit anti-mouse IgG, DAKO Cytomation, Denmark) を用いて染色を行った。炎症性サイトカインである *S100A8*, $\text{TNF-}\alpha$, IL-6 の局在の観察には、一次抗体として抗 *S100A8* 抗体 (polyclonal rabbit anti-*S100A8* IgG, Bioss Inc., MA, USA)、抗 $\text{TNF-}\alpha$ 抗体 (polyclonal rabbit anti- $\text{TNF-}\alpha$, proteintech group, IL, USA)、抗 IL-6 抗体 (polyclonal mouse anti- IL-6 , Santa Cruz Biotechnology, Inc., TX, USA) を用い、二次抗体として *S100A8* と $\text{TNF-}\alpha$ に

ビオチン標識ヤギ抗ウサギ抗体 (Peroxidase-conjugated affinity pure Goat Anti-Rabbit IgG, Jackson Immuno Research Laboratories Inc., PA, USA) , IL-6 にはビオチン標識ウサギ抗マウス抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。石灰化関連因子の確認には, 一次抗体として抗オステオポンチン抗体 (polyclonal rabbit anti-Osteopontin, Abcam, Cambridge, UK) , 二次抗体としてビオチン標識ヤギ抗ウサギ抗体を用いた。免疫組織化学染色後はジアミノベンジジン (3,3'-Diaminobenzidine :以下 DAB) にて発色後, Hematoxylin にて二次染色を行い, 光学顕微鏡にて観察を行った。

Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄内血流状態, 低酸素状態の評価

Ⅱ型糖尿病モデルラット歯髄の局所的な病態の評価を行うことを目的として, 歯髄内における血流障害および, 低酸素状態の評価を行うため高血糖状態を確認した 6 週齢から 9 週齢のラットを用いて以下の実験を行った。

歯髄内の血流状態の評価

0.3 mg/kg の塩酸メデトミジン (ドミツール, 明治製菓, 東京) , 4.0 mg/kg のミダゾラム (ドルミカム, アステラス製薬, 東京) , 5.0 mg/kg の酒石酸ベトルファノール (ベトルファール, 明治製菓, 東京) にて鎮静したラットを, 4% PFA と黒色色素 (墨汁液) を生理食塩水で希釈した液により灌流圧 150mmHg で,

灌流固定装置 (VPF-1, 日新 EM, 東京) を用いて, 灌流固定を行った後, 上下臼歯部顎骨を離断した。そして 4%PFA に 24 時間浸漬固定し, TBS にて洗浄を行った。ベンジルアルコールと安息香酸ベンジルを 1:2 で混和して作製した BABB 溶液を浸透させることで透明化試料を作製し, 実体顕微鏡にて根管内への黒色色素の流入を観察し, 歯髄内の血流状態を評価した。形態学的評価 1) と同条件で撮影したマイクロ CT の画像を用いて根管数を確認し, 実体顕微鏡で黒色色素の流入が観察されなかった根管を血流障害がみられた根管とし, 各歯種について χ^2 二乗検定を用いて有意水準 5% でその発現頻度についてコントロールラットと比較した。また II 型糖尿病モデルラットの歯種別の血流障害がみられた根管の発現率に対して Fisher の直接確率法にて有意水準 5% で評価を行った。

歯髄内低酸素状態の評価

1) ピモニダゾールを用いた歯髄内低酸素状態の評価

10mmHg 以下の低酸素環境で細胞に取り込まれ還元され, タンパク質などと結合する低酸素プローブの一つであるピモニダゾール²¹⁾を用いて歯髄内低酸素状態の評価を行った。

9 週齢のラットを前述の方法で鎮静し, 屠殺の 30 分前に塩酸ピモニダゾール (Hypoxyprobe™-1 (pimonidazole HCl), コスモバイオ株式会社, 東京) 60mg/kg

を生理食塩水 116mg/ml にて溶解したものを腹腔内注射にて投与した。屠殺後臼歯部顎骨を取り出し、実験 1 の方法と同様に薄切切片を作製した。そして一次抗体として抗ピモニダゾール抗体 (Anti-pimonidazole mouse IgG monoclonal antibody, コスモバイオ株式会社, 東京), 二次抗体としてビオチン標識ウサギ抗マウス抗体を用いて免疫組織化学染色を行った後, DAB による発色と Hematoxylin による二次染色を行い, 光学顕微鏡にて評価を行った。

2) HIF-1 による歯髄内低酸素状態の評価

HIF-1 (Hypoxia Inducible Factor: 低酸素誘導因子) は, 細胞内が低酸素状態に陥った際にタンパク質の安定性が向上することによって核内へと移行し, 様々な低酸素応答遺伝子の発現を誘導する転写因子である。前述の方法で作製した 9 週齢～19 週齢の薄切切片に対して一次抗体として抗 HIF-1 抗体 (Mouse monoclonal anti-HIF- α antibody, abcam, UK), 二次抗体としてビオチン標識ウサギ抗マウス抗体を用いて免疫組織化学染色を行った後に DAB にて発色し, Hematoxylin にて二次染色を行った後, 光学顕微鏡にて評価を行った。

結果

Ⅱ型糖尿病モデルラットの生化学的特徴

実験に用いたⅡ型糖尿病モデルラットは、同週齢におけるコントロールラットと比較して、肥満傾向であることが確認された(図 3)。またⅡ型糖尿病モデルラットの体重は、測定を始めた 6 週齢から 9 週齢にかけてはコントロールラットに比べて高値を示したが、その後は病状の進行に伴いコントロールラットに比べて体重のばらつきが見られ 10 週齢以降では低い値を示す個体も見られた。血糖値は、8 週齢から 19 週齢の実験期間におけるⅡ型糖尿病モデルラットでは平均して 730 mg/dl を示し、コントロールラットの平均 128mg/dl と比較して、全ての期間において高血糖状態であり、8 週齢から 16 週齢においては有意な差が認められた。またその血糖値の推移をみると、測定を開始した 8 週齢にすでに高値を示し、9 週齢から 11 週齢にかけて急激な血糖値の上昇が生じた後、高血糖状態が持続した(図 4)。

一方、急激な石灰化物の形成が始まる直前と考えられる 6 週齢から 8 週齢のラットにおいては、血清中リン濃度はコントロールラットとⅡ型糖尿病モデルラットの間に有意な差は認められなかった(図 5)。

歯髄内石灰化物の形態学的評価

1) マイクロ CT による形態学的評価

Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄内には、象牙質に連続した明らかな石灰化が観察された(図 6b 白矢頭)。血糖値に特徴的な上昇がみられた 9 週齢以降のⅡ型糖尿病モデルラットでは歯髄内石灰化が確認されたが、コントロールラットでは実験期間を通して全ての臼歯歯髄内に石灰化が確認されなかった(図 6a)。

またⅡ型糖尿病モデルラットの CT 画像について、30 歯の観察歯のうち蝕により歯冠部に実質欠損みられた歯 7 本(うち 4 本に歯髄内石灰化物あり)を除外した 23 歯を評価した結果、83%に石灰化物の形成がみられた(n=23)。歯種別の発現頻度は、M1 で 75%(n=8) , M2 で 100%(n=5) , M3 で 80%(n=10) であったが有意な差は認められなかった(図 7)。

2) SEM を用いた歯髄内石灰化物の形態学的評価, EDX 分析を用いた石灰化物の組成分析

CT の結果と同様、9 週齢以降の全てのⅡ型糖尿病モデルラットの歯髄内に石灰化物の形成が確認されたが(図 8d-g) , コントロールラットの歯髄内にはいずれの週齢においても石灰化物の形成が確認されなかった(図 8a-c)。

形成された石灰化物は象牙前質から連続して形成され、髄床底まで及んでい

た。象牙前質に連続した石灰化部位においては細管様構造を認め(図 8g※1)，髄床底に近接した石灰化部位では細管様構造を認めない無構造の石灰化物の形成がみられた(図 8g※2)。

また EDX 分析の結果より， 歯髄内石灰化物と象牙質の間に炭素， 酸素， カルシウム， リンの元素組成比に有意な差は認められず， 両者の組成は類似していることがわかった。(図 9)

Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄の組織学的評価

HE 染色の結果， 実験期間を通してコントロールラットの歯髄細胞には大きな変化はみられなかった(図 10a, b)。これに対しⅡ型糖尿病モデルラットでは， 11 週齢の歯髄内においては， 形成された石灰化物に沿って歯髄細胞の配列， 凝集を認め(図 10c)， 血管の拡張像が観察された(図 10i 白矢頭)。また形成された石灰化物は， 形態学的観察の結果と同様に象牙前質に連続した石灰化部位では細管様構造を認めたが(図 10g※1)， 象牙質から離れた部位に形成された石灰化物は細管様構造を持たない無構造で内部に細胞を含んでおり細胞周囲が石灰化していた(図 10g※2)。また 19 週齢の歯髄内には， 歯髄細胞の壊死(図 10f 白矢頭)を認め， 細胞の凝集と炎症性細胞の浸潤(図 10h※3)， 顆粒状の石灰化物(図

10j 白点線) が観察された。

また AGEs の一種であるペントシジンとその受容体の RAGE に対しての免疫組織化学染色の結果、コントロールラットではほとんど発色がみられなかったが、Ⅱ型糖尿病モデルラットにおいては歯髄全体が発色され、さらに週齢が進むにつれて強く発色されることが観察された(図 11-1 a-d)。石灰化マーカーであるオステオポンチンは象牙前質に沿って発色がみられ、コントロールラットとⅡ型糖尿病モデルラットにおいて発色部位による差は認められなかった(図 11-1e, f)。また炎症性サイトカインである S100A8 および TNF- α 、IL-6 は、Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄内にのみ発色部位を認め(図 11-2 b, d, f)、コントロールラットの歯髄内は発色されなかった。これらの結果からも、前述の HE 染色の結果と同様に歯髄内に炎症が生じていることが示唆された。

Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄内血流状態の評価

透明化試料において、コントロールラットの全ての歯の根管内への黒色色素の流入が確認できたのに対し(図 12a 矢頭)、Ⅱ型糖尿病モデルラットでは根管内に黒色色素の流入がみられない根管が観察され(図 12b※2)、一部の根管に黒色色素の流入を確認した(図 12b※1)。9 週齢におけるⅡ型糖尿病モデルラッ

トにおける血流障害がみられた根管の割合は、M1 で 75 %，M2 で 75 %，M3 で 50 %であり(図 12c)，全ての歯種においてコントロールラットと比較して，有意に歯髄内に血流障害が高頻度に存在することが明らかとなった。またその発現頻度は，歯種間に有意な差はないものの，M2，M1 はM3 よりも血流障害の発現頻度は高い傾向であることが示された(図 12d)。

Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄の低酸素状態の評価

1)ピモニダゾールによる歯髄内低酸素状態の評価

抗ピモニダゾール抗体を用いて免疫組織化学染色を行った結果，Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄内にピモニダゾールの取り込みが確認され(図 13b，d 白矢頭)，9 週齢のⅡ型糖尿病モデルラットの歯髄内において酸素分圧が 10mmHg 以下の低酸素状態の部位が存在することが明らかとなった。これに対しコントロールラットにおいては，歯髄内にピモニダゾールの取り込みは認められなかった(図 13a，c)。

2) HIF-1 による歯髄内低酸素状態の評価

抗 HIF-1 抗体を用いた歯髄内の免疫組織化学染色の結果、9 週齢以降のⅡ型糖尿病モデルラットの歯冠部歯髄および歯根部歯髄において、低酸素の指標となる HIF-1 の核移行を認める細胞が確認された(図 14c, d 白矢頭, e, f)。

一方、コントロールラットの歯髄内には、HIF-1 の核移行像はみられなかった(図 14a, b)。この結果から HIF-1 による評価においても、ピモニダゾールによる実験結果と同じく、Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄内が低酸素状態であることが確認された。

考察

本研究におけるⅡ型糖尿病モデルラットの血糖値の推移と、本研究で得られた結果の関係を図 15 に示す。

Ⅱ型糖尿病モデルラットは、離乳直後より過食・肥満を示し、正常よりやや高めの血糖値を示す²²⁾。本研究の測定では 9 週齢から 11 週齢に急激な血糖値の上昇を示し、その後も高い個体で 1000 mg/dl 付近の高血糖状態を維持していた。一方体重は、6 週齢において、Ⅱ型糖尿病モデルラットはコントロールラットに比べて 1.4 倍、9 週齢では 1.2 倍の値を示した。さらに、Ⅱ型糖尿病モデルラットは 9 週齢から白内障の初期症状や毛並みの悪さ、また個体によっては下痢などの症状が観察されるようになり、長期飼育した個体においては、20 週齢までに白内障の悪化がみられ、多くの個体が 40 週齢までに多臓器不全により死亡する。

これまでにⅡ型糖尿病モデルラットの歯髄内の石灰化物形成の時期についての詳細は明らかとなっていないが、石灰化のメカニズムを解明するためにはまずその時期を明らかにする必要があると考えた。本研究の結果からⅡ型糖尿病モデルラットで血糖値の急激な上昇が観察される 9 週齢以降のⅡ型糖尿病モデルラットの歯髄内にのみ石灰化物が形成されることが、マイクロ CT や SEM の

反射電子像の観察により観察された。このことから急激な血糖値の上昇に追従するように、歯髄内に急激な石灰化物形成が生じることが明らかとなった。

一方、AGEs と歯髄細胞における石灰化の関連については、高血糖状態においてラット歯髄に石灰化物が蓄積することが稲垣らにより報告されている¹⁸⁾。また、中島らは *in vitro* の実験において糖化アルブミンが培養歯髄細胞による石灰化を促進し、石灰化に関連する遺伝子発現を亢進させることを報告している²³⁾ が、このようなメカニズムによって生じる石灰化の組織形態学的な報告はされていない。本研究の免疫組織化学的評価において、Ⅱ型糖尿病モデルラットでは歯髄内石灰化物の形成と同時期に歯髄内に AGEs や RAGE が存在することが確認された。AGEs、RAGE の蓄積はⅡ型糖尿病モデルラットの歯髄内が糖化ストレスにさらされていることを示していると考えられる。また AGEs は RAGE-MAPK を介して血管の能動的な石灰化を引き起こすとの報告もあり²⁴⁾、糖化最終産物およびそのレセプターの発現と歯髄内石灰化には関連があることが示唆される。さらに石灰化物が確認された時期に、Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄内に細胞の凝集や炎症性サイトカインである S100A8 や IL-6、TNF- α の発現と炎症性細胞の浸潤などが観察されたこと、さらに週齢が進むにつれⅡ型糖尿病モデルラットの歯髄内では炎症性細胞の占める割合が増加し、歯髄組織の線維化や壊死がみられたことから、Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄内は週齢ともに糖化に関

連していると思われる炎症反応が起こっていることが強く示唆される。一方、AGEs の添加により血管外膜線維芽細胞や神経膠細胞、骨芽細胞において RAGE-MAPK-NF- κ β を介して S100A8/A9 や IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α などの炎症性サイトカインの発現が亢進することが報告されていることから²⁵⁾ , 本研究で観察された石灰化は、AGEs の蓄積に関連した炎症と、それに続いて起こる細胞障害に由来する石灰化であることが考えられる。

SEM による反射電子を用いた構造観察から、Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髓内に形成された石灰化物はリンとカルシウムを含む象牙質に類似した組成の構造物で、細管様構造を持つものと細管様構造を持たないものが存在することが示された。このうち細管様構造を持つ石灰化物は、象牙前質に連続もしくは近傍して起こる傾向があり、一方細管様構造を持たない石灰化物は歯髓内に遊離性に形成される傾向が観察された。細管様構造を有する石灰化物は象牙前質に連続して形成される特徴を有することから、添加象牙質様の石灰化であると推測される。Ⅱ型糖尿病モデルラットは、コントロールラットと比較して過食で摂食回数が頻回であることや、臼歯に著しい咬耗が観察される個体があることから、咬合による機械的刺激も、添加象牙質様の石灰化物形成に関与している可能性も考えられる。

一方、遊離性に形成された細管様構造を持たない石灰化物の内部には、石灰

化物内に細胞が取り込まれている像が観察されることから(図 12g), 細胞周囲に石灰化物の沈着がまず生じ, その後に糖化に由来した炎症および細胞障害に起因する異栄養性石灰化が生じるのではないかと考えられる。

ラット歯髄内の機能学的評価により, 9 週齢以降のⅡ型糖尿病モデルラットの歯髄内に血流障害や低酸素状態が生じることが観察された。また糖尿病に罹患すると全身に糖化が生じ, 架橋型の AGEs 等が組織内に沈着することで血管の伸展性が低下する。それに伴い外力に対する血管の耐久性が低下するため, 閉塞や破断といった障害が起こりやすくなることが報告されている³⁾。歯髄の組織観察からも血管の形態異常が確認できたことから, 糖化に関連した血管障害が歯髄内でも生じているものと示唆される。さらに, 糖化により血管の伸縮に重要な役割を持つエラスチンが脆性化するとの報告があることから²⁶⁾, 歯のような強い外力(咬合力)を受ける組織においては, 根尖部周囲の血管が外力による変位に耐えられずに損傷する可能性が高い。Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄細胞にピモニダゾールの取り込みが認められ, 酸素分圧が 10mmHg 以下の絶対的な低酸素状態があることが示されたことから, 根尖部周囲で血管損傷に伴う血管障害が生じ, 歯髄内が虚血状態となっていると考えられる。また歯髄内での低酸素ストレスに対する細胞の適応応答を, HIF-1 の歯髄細胞における核移行像より確認した。その結果, Ⅱ型糖尿病モデルラットの歯髄内がコントロールラッ

トと比較して低酸素状態にあり、かつ歯髄細胞が恒常的な低酸素ストレスにさらされていることを確認した。

また細胞への低酸素ストレスは、炎症と非常に密接な関係にあり、生体が高山病などの低酸素ストレスにさらされると、IL-6 や炎症性マーカーである C-reactive protein (CRP) の血中濃度が増加することが報告されている²⁷⁾。HIF は、好中球やマクロファージなどが惹起する炎症反応において重要な役割をすることが報告されており、特に HIF-1 は様々な炎症性サイトカインの発現を誘導することが知られている^{28) -30)}。本研究においてもⅡ型糖尿病モデルラットの歯髄内では、血流障害に起因した低酸素ストレスから炎症が惹起されているものと考えられ、これに起因した歯髄細胞への細胞障害や細胞死が起きていることが考えられる。この細胞死は、病的石灰化に関与するとの報告がある³¹⁾ことから、糖尿病歯髄においても障害を受けた細胞が核となり異栄養性石灰化が生じることが歯髄内石灰化の一因であることが推察された。

臨床において糖尿病患者が原因不明の歯痛を訴えることが知られており、歯髄結石と関与があるといわれている⁴⁾。モデル動物を用いた本研究で、糖尿病の病態の一つとして歯髄内の炎症や髄腔内の石灰化が生じることが明らかになったことから、今後はこれらの原因不明の歯痛に対して、疼痛の原因となりうる歯髄内石灰化物の有無を CBCT 等により診査することが望ましいと思われる。

1. II型糖尿病モデルラットでは、9週齢から11週齢にかけて急激な血糖値の上昇が観察され、それに追隨して歯髄内に石灰化物の形成を認めた。
2. 血糖値の急激な上昇が観察された時期のII型糖尿病モデルラットの歯髄内にはAGEsの発現や、血流障害に伴う低酸素領域、炎症が観察された。
3. II型糖尿病モデルラットの歯髄内には、糖化ストレスによる細胞障害や、血流障害に起因した低酸素ストレスにより生じる炎症の結果、細胞死が観察された。II型糖尿病モデルラットにおける歯髄内石灰化物形成は、死細胞を核とした異栄養性石灰化の関与が示唆された。

謝辞

稿を終えるにあたり本研究の機会を与えていただき，ご指導，ご鞭撻を賜りました大阪大学大学院歯学研究科 口腔科学専攻 長島正教授 および三浦治郎博士に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり，多大なる御協力と御助言を頂いた大阪大学歯学部附属病院口腔総合診療部の先生方に厚く御礼申し上げます。

1. Hilmann G and Geurtsen W (1997): Light-microscopical investigation of the distribution of extracellular matrix molecules and calcifications in human dental pulps of various ages. *Cell Tissue Res* **289**, 145-154
2. Bender IB and Bender AB (2005): Diabetes mellitus and the dental pulp. *J Endod* **29**, 383-9
3. Nayak M, Kumar J and Prasad LK (2010): A radiographic correlation between systemic disorders and pulp stones. *Ind Dent Res* **21**, 369-73
4. Pashley D.H. and Lieweher F.R. (2006): Structure and function of the dentin-pulp complex. S.Cohen, K.M.Hargreaves(Eds), *Pathway of the Pulp*(9th ed.), *Mosby Elsevier*, St Louis, MO, USA, 502-506
5. Wild S, Roglic G, Green A. et al. (2004): Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030. *Diabetes Care* **27**, 1047-1053
6. Nagai R, Mori T, Yamamoto Y, et al. (2010): Significance of Advanced Glycation End Products in Aging Related Disease. *Anti-Aging Med* **7**, 112-119
7. Maillard L.C. (1912): Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique. *C R Hebd. Séances Acad. Sci.* **154**, 66-68

8. Hodge, J.E. (1953): Dehydrated Foods, Chemistry of Browning Reactions in Model Systems. *J. Agric. Food Chem.* **1**, 928-943
9. Yamagishi S, Imaizumi T (2005): Diabetic vascular complications: pathophysiology, biochemical basis and potential therapeutic strategy. *Current Pharm Des* **11**, 2279-2299
10. Vigber P, Frasca F, Sciacca L, et al. (2009): Diabetes and cancer. *Endocr Relat Cancer* **16**, 1103-1123
11. Abe R, Yamagishi S (2008): AGE-RAGE system and carcinogenesis. *Curr Pharm Des* **14**, 940-945
12. Takeuchi M, Kikuchi S, Sasaki N, et al. (2004): Involvement of advanced glycation end-products (AGEs) in Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* **1**, 39-46
13. Obayashi H, Nakano K, Shigeta H, et al. (1996): Formation of crossline as a fluorescent advanced glycation end product in vitro and in vivo. *Biochem Biophys Res Commun* **226**, 37-41
14. Ahmed MU, Thorpe SR, Baynes JW (1986): Identification of N epsilon-carboxymethyllysine as a degradation product of fructoselysine in glycated protein. *J Biol Chem.* **261**(11), 4889-94
15. Ahmed MU, Brinkmann FE, Degenhardt TP, et al (1997): N-epsilon-(carboxyethyl)lysine,

a product of the chemical modification of proteins by methylglyoxal, increases with age in human lens proteins. *Biochem J.* **324**, 565-70.

16. Saito, M. and Maumo, K. (2010): Collagen cross-links as a determinant of bone quality: a possible explanation for bone fragility in aging, osteoporosis, and diabetes mellitus. *Osteoporos Int.*, **21**, 195-214.
17. Sell DR, Monnier VM (1989): Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J Biol Chem* **264**, 21597-21602
18. Matsuda Y, Miura J, Shimizu M (2016): Influence of Nonenzymatic Glycation in Dentinal Collagen on Dental Caries. *J Dent Res.* **95**(13), 1528-1534.
19. Inagaki Y, Yoshida K, Ohba H, et al. (2010): High glucose levels Increase Osteopontin Production and Pathologic Calcification in Rat Dental pulp tissues. *Journal of Endodontics*. **36**, 1014-1020
20. Nakajima Y, Inagaki Y, Kido J and Nagata T (2015): Advanced glycation end products increase expression of S100A8 and A9 via RAGE-MAPK in rat dental pulp cells. *Oral Dis* .**21** (3), 328-34
21. JA Raleigh, DP Calkins-Adams, LH Rinker et al. (1998): Hypoxia and vascular

endothelial growth factor expression in human squamous cell carcinomas using pimonidazole as a hypoxia marker. *Cancer Res.*, **58**(17), 3765-8

22. Shinohara M, Masuyama T, Shoda T, et al. (2000): A new spontaneously diabetic non- obese Torii rat strain with severe ocular complications. *Int J Exp Diab Res* **1**, 89-100

23. Nakajima Y, Inagaki Y, Hiroshima Y, et al. (2013): Advanced glycation end-products enhance calcification in cultured rat dental pulp cells. *J Endod* **39**, 873-878

24. Ren X, Shao H, Wei Q, et al. (2009): Advanced glycation end-products enhance calcification in vascular smooth muscle cells. *J Int Med Res* **37**, 847-854

25. Liu J, Zhao S, Tang J, et al. (2009): Advanced glycation end products and lipopolysaccharide synergistically stimulate proinflammatory cytokine/ chemokine production in endothelial cells via activation of both mitogen-activated protein kinases and nuclear factor- κ B. *FEBS J* **276**, 4598-4606

26. Yunjie Wang, Shahrokh Zeinali-Davarani, Elaine C. Davis, et al. (2015): Effect of glucose on the biochemical function of arterial elastin. *J Mech Behav Biomed Mater.* , **49**, 244–254

27. Eltzschig, H.K. & Carmeliet, P.(2011): Hypoxia and inflammation *N. Engl. J. Med.* **17**, 364(7), 656-665

28. Cramer T., Yamanishi Y., Clausen B, et al. (2003): HIF-1 α is essential for myeloid

cell-mediated inflammation *Cell*, **112**,645-657

29. Peyssonnaud C., Cejudo-Martin P., Doedens A., et al. (2007): Cutting edge: Essential role of hypoxia inducible factor-1alpha in development of lipopolysaccharide-induced sepsis. *J Immunol.* **178**(12), 7516-7519
30. Imtiyaz H.Z., Williams E.P., Hickey M, et al. (2010): Hypoxia-inducible factor 2alpha regulates macrophage function in mouse models of acute and tumor inflammation *J. Clin. Invest.* **120**(8), 2699-2714.
31. Fujita H, Yamamoto M, Ogino T, et al. (2014): Necrotic and apoptotic cells serve as nuclei for calcification on osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells in vitro. *Cell Biochem Funct.* **32**(1): 77-86,2014

図表

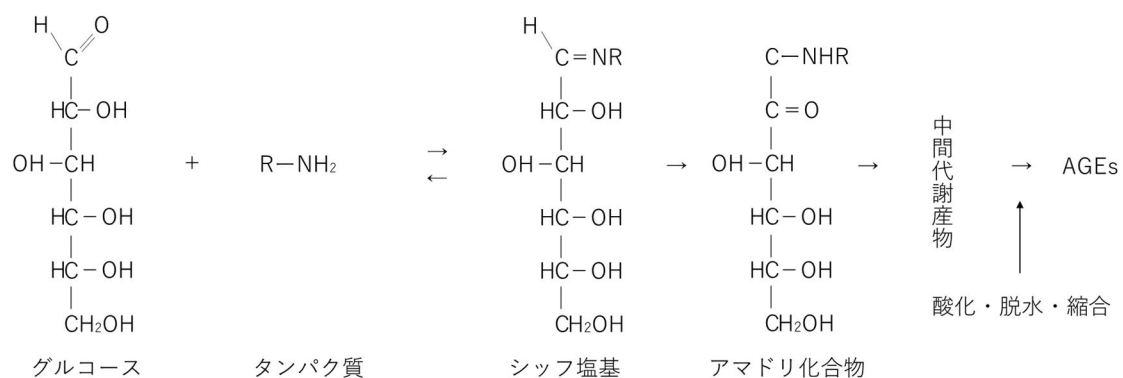


図 1: 糖化最終産物 (AGEs) の生成経路

還元糖のアルデヒド基にタンパク質のアミノ基が結合してシッフ塩基を形成後、シッフ塩基からアマドリ転位により不可逆な糖化修飾物が生成し、酸化、脱水、縮合の反応を経て糖化最終産物 (AGEs) が生成される。

図表

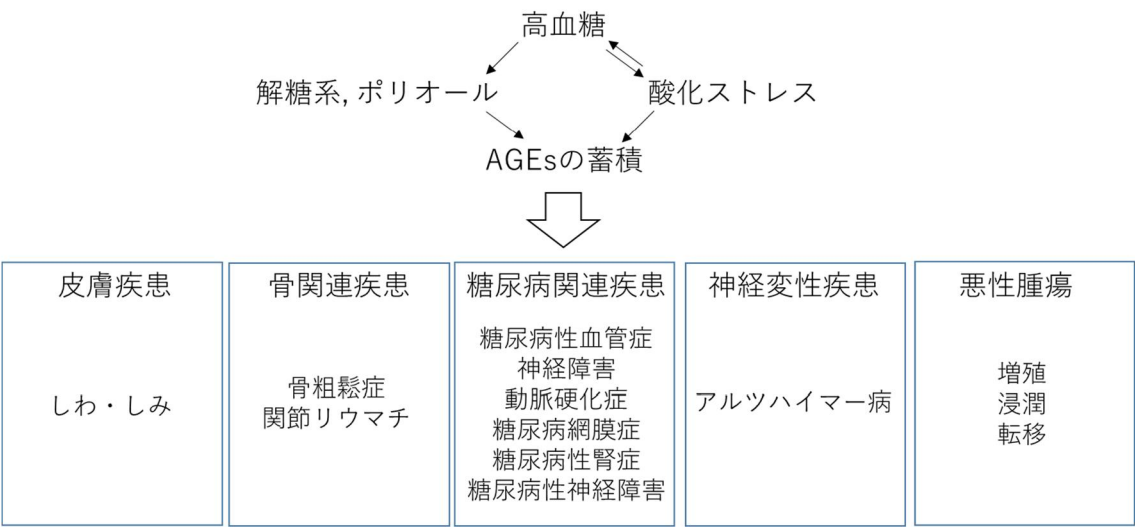


図 2 : AGEs と様々な疾患

高血糖により，体内に蓄積した AGEs は様々な疾患の発生に関与していると考えられている。

図表

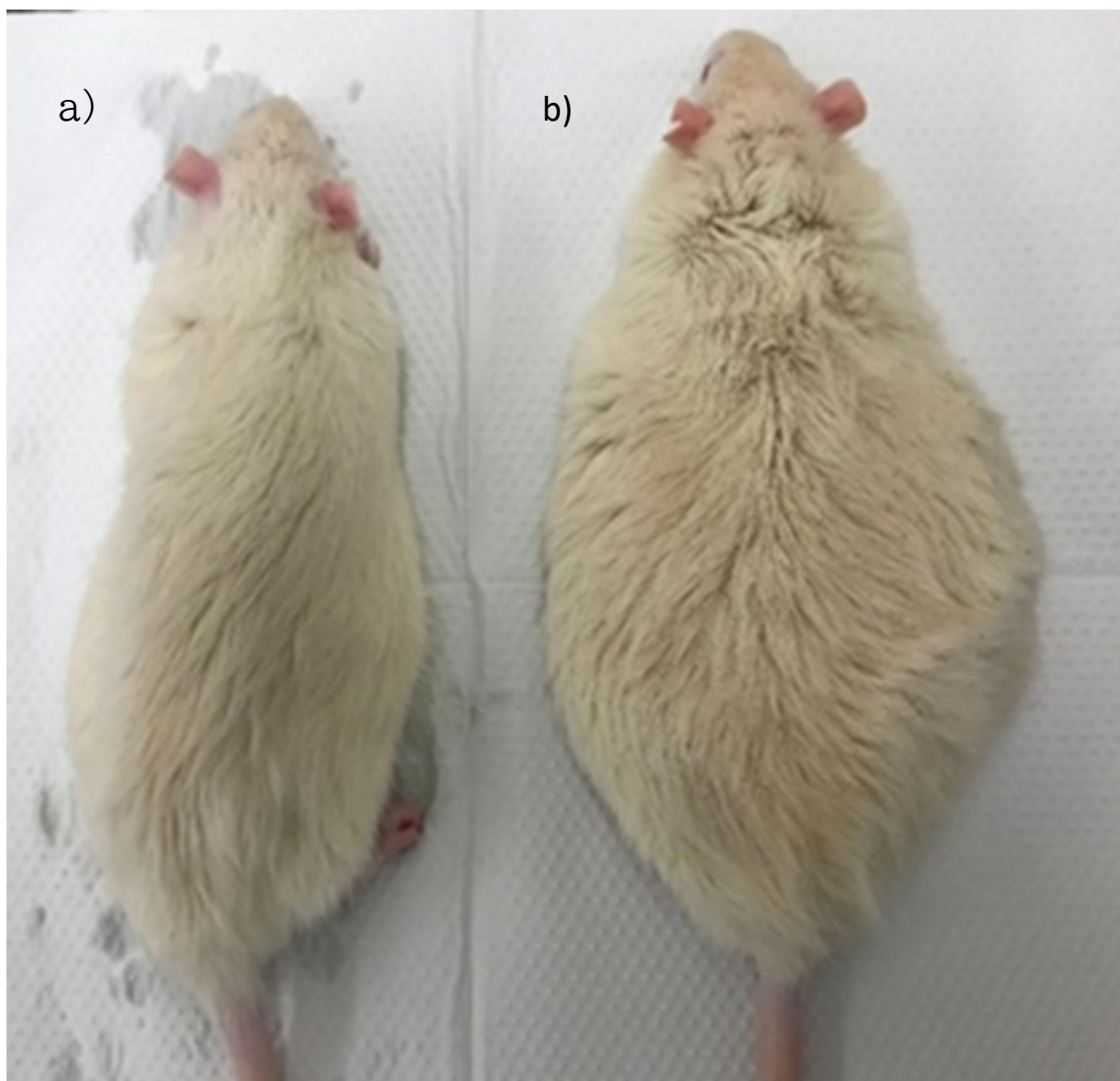


図 3：同週齢における実験動物の比較(19 週齢)

a) コントロールラット

b) II型糖尿病モデルラット

II型糖尿病モデルラットは，コントロールラットに比べ過食，肥満の傾向がみられる。

図表

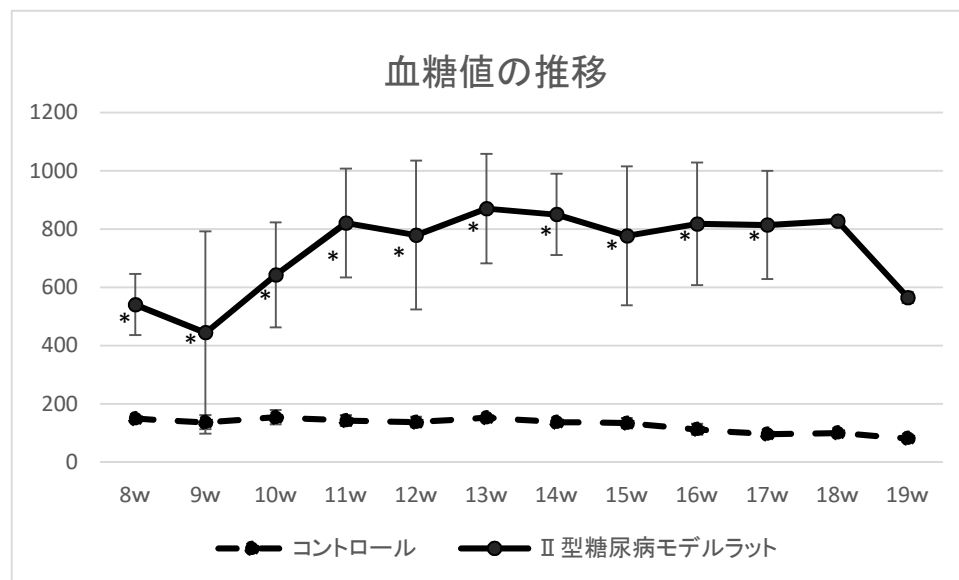


図 4: 血糖値の推移(標準偏差, *: $p < 0.05$)

点線: コントロールラット (n=7)

実線: Ⅱ型糖尿病モデルラット (n=6)

実験期間における血糖値の推移を比較した結果Ⅱ型糖尿病モデルラットはコントロールラットに比べ 8 週齢から 16 週齢において有意な血糖値の高値を示した。さらに 17 週以降も引き続き血糖値が高値となる傾向を示した。またⅡ型糖尿病モデルラットの 9 週齢から 11 週齢に特徴的な血糖値の急上昇を認めた。

図表

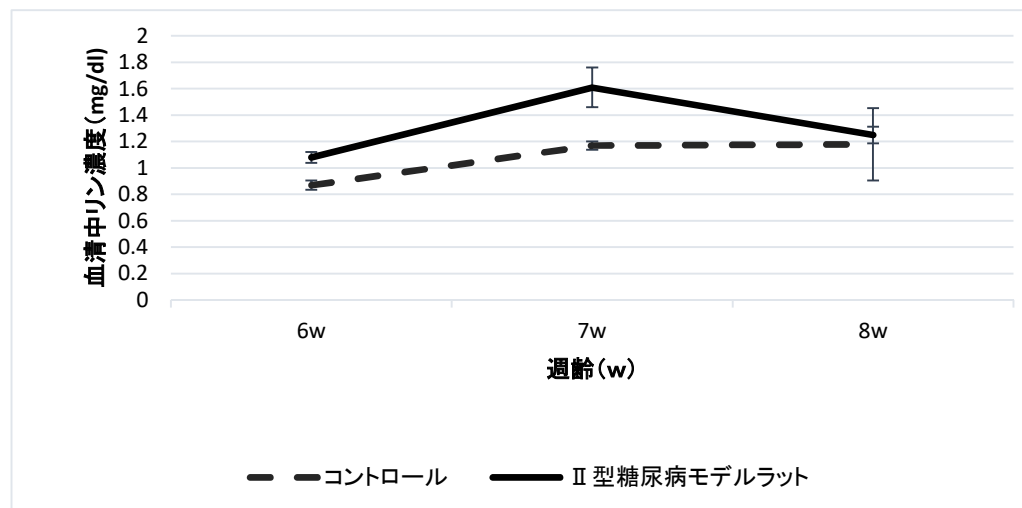


図 5: 血清中リン濃度の推移(標準偏差, $p < 0.05$)

点線: コントロール (n=3)

実線: Ⅱ型糖尿病モデルラット (n=3)

Ⅱ型糖尿病モデルラットではコントロールに比べて7週齢で血清中リン濃度が一過性に高い傾向を示したが、両者の血清中リン濃度には有意な差は認められなかった。

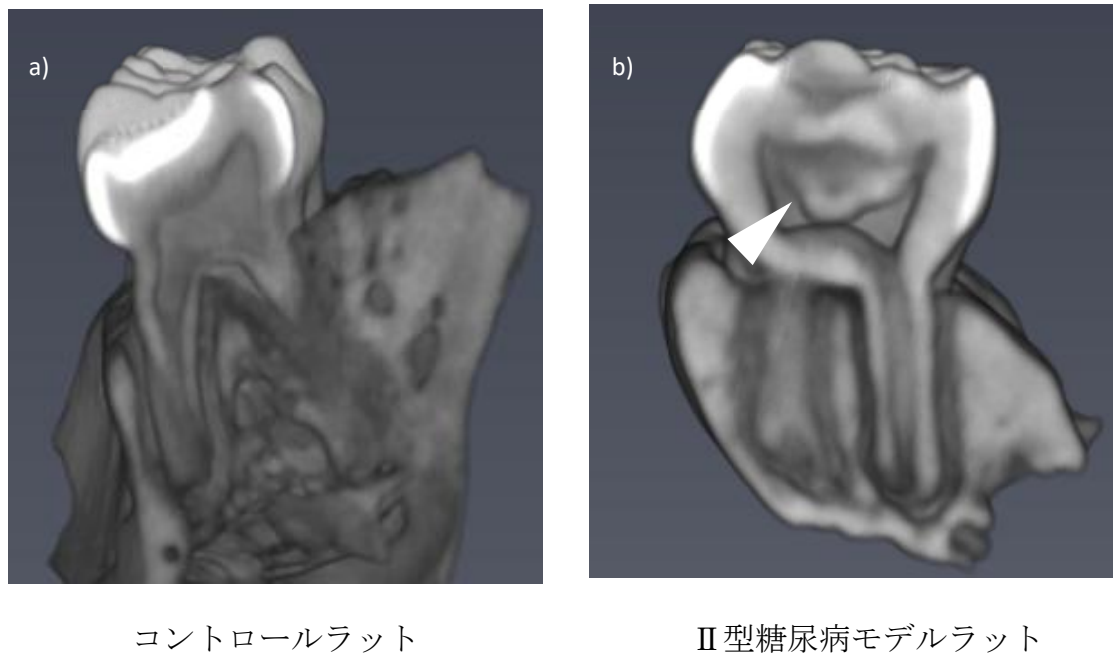


図 6： 歯髄内石灰化物 (CT 像)

代表的な画像として 11 週齢の CT 像を示す。

白矢頭：歯髄内石灰化物

図表

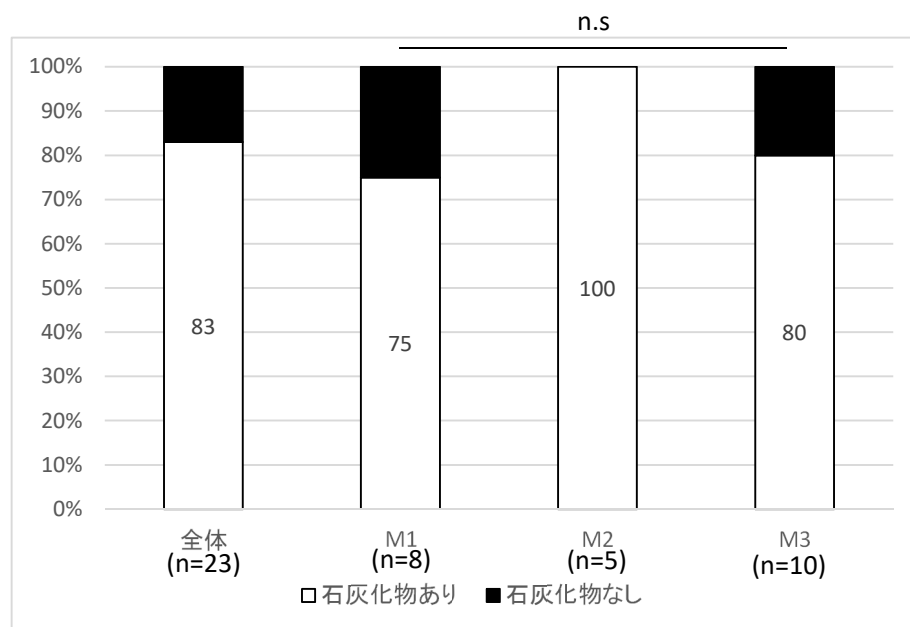


図 7：実験期間におけるⅡ型糖尿病モデルラットの歯髄内に石灰化物形成を認めた割合の歯種間の比較

実験期間においてⅡ型糖尿病モデルラットでは臼歯の歯髄内に明らかな石灰化物の形成を確認したが歯種間で有意な差は認められなかった。一方コントロールラットでは、全ての週齢において歯髄内石灰化物の形成はみられなかった。

図表

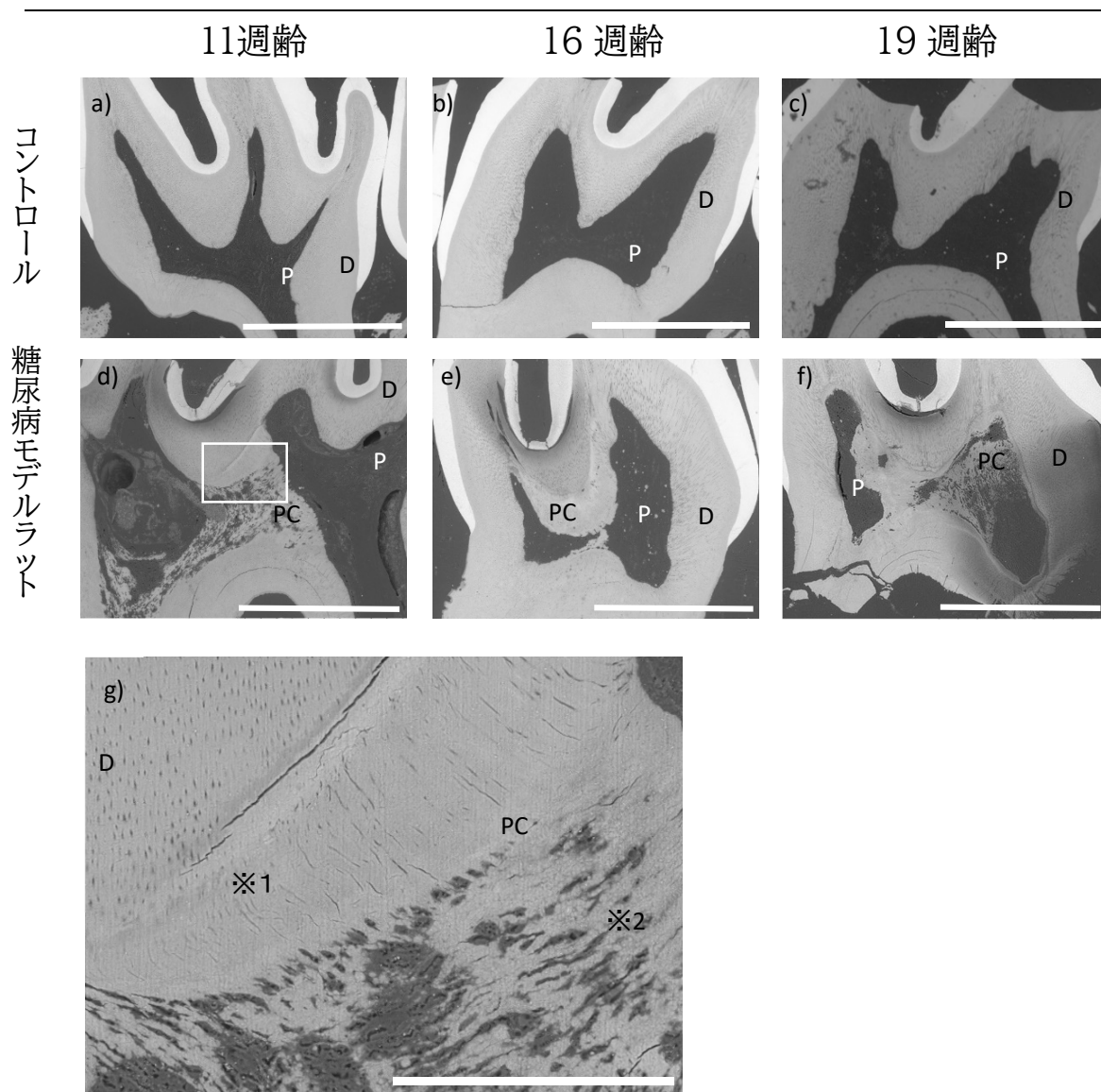


図 8 : SEM による観察像 (Scale bar : a)-f) : 1mm, g) : 20 μ m)

a)-c) : コントロール d)-f) : II型糖尿病モデルラット g) : d) の拡大像

D: 象牙質 P: 歯髄 PC: 歯髄内石灰化物

※1 : 細管様構造を有した石灰化物 ※2 : 無構造の石灰化物

図表

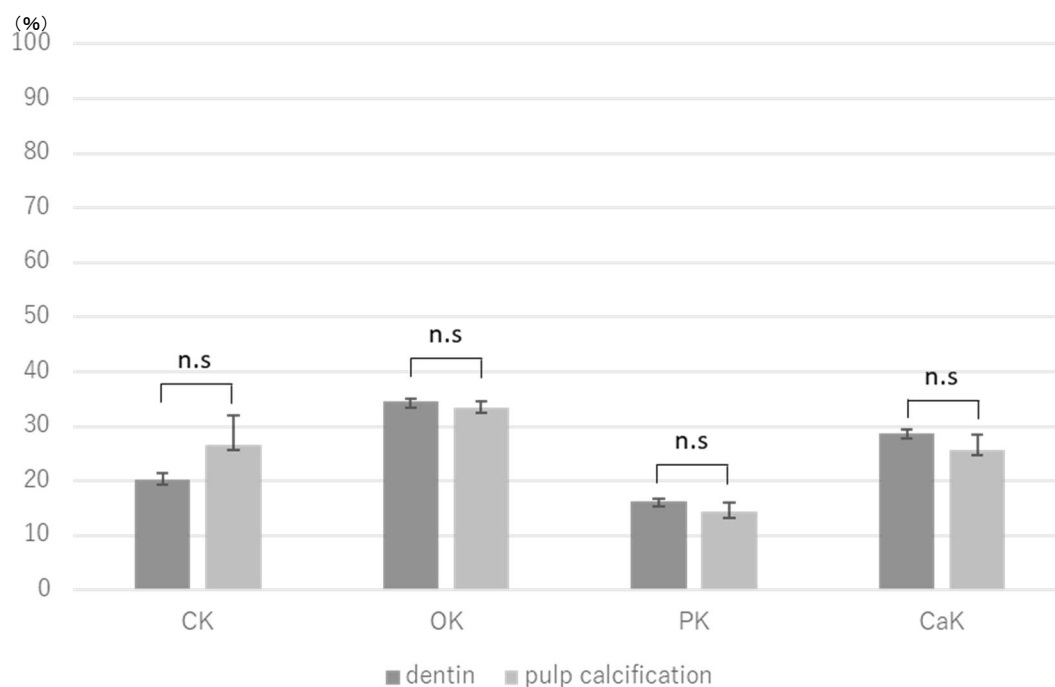
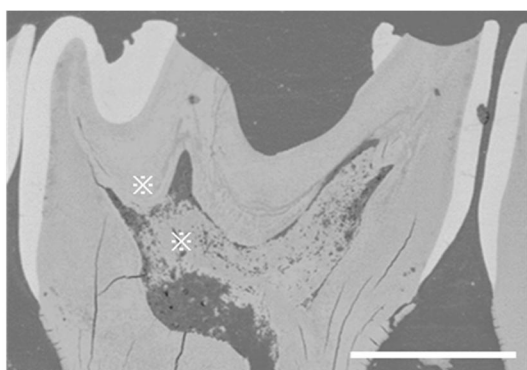


図 9 : EDX 分析 (エラーバー : 標準偏差, $p < 0.05$)

歯髄内石灰化物はリン(P) とカルシウム(Ca) を含む石灰化物で、炭素(C) , 酸素(O), リン, カルシウムの組成はそれぞれ歯髄内石灰化物と象牙質に有意な差は認めず両者の組成は類似していることが示された。

図表

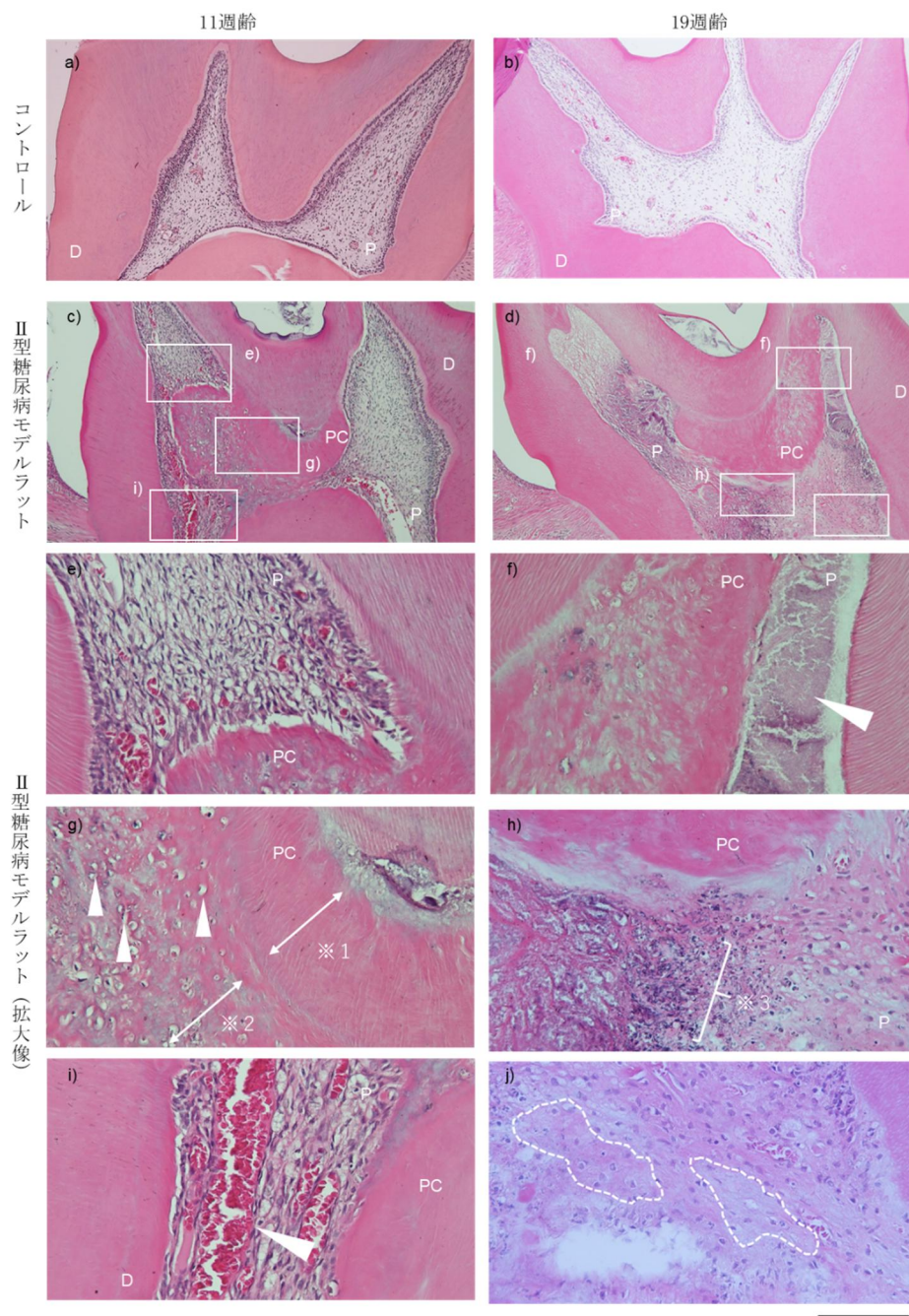


図 10 : Hematoxylin Eosin 染色による組織像 (11 週齢・19 週齢)

a), b): コントロール, c)-j): II型糖尿病モデルラット

Scale bar : a)-d) 50 μ m、e)-j) 200 μ m

図表

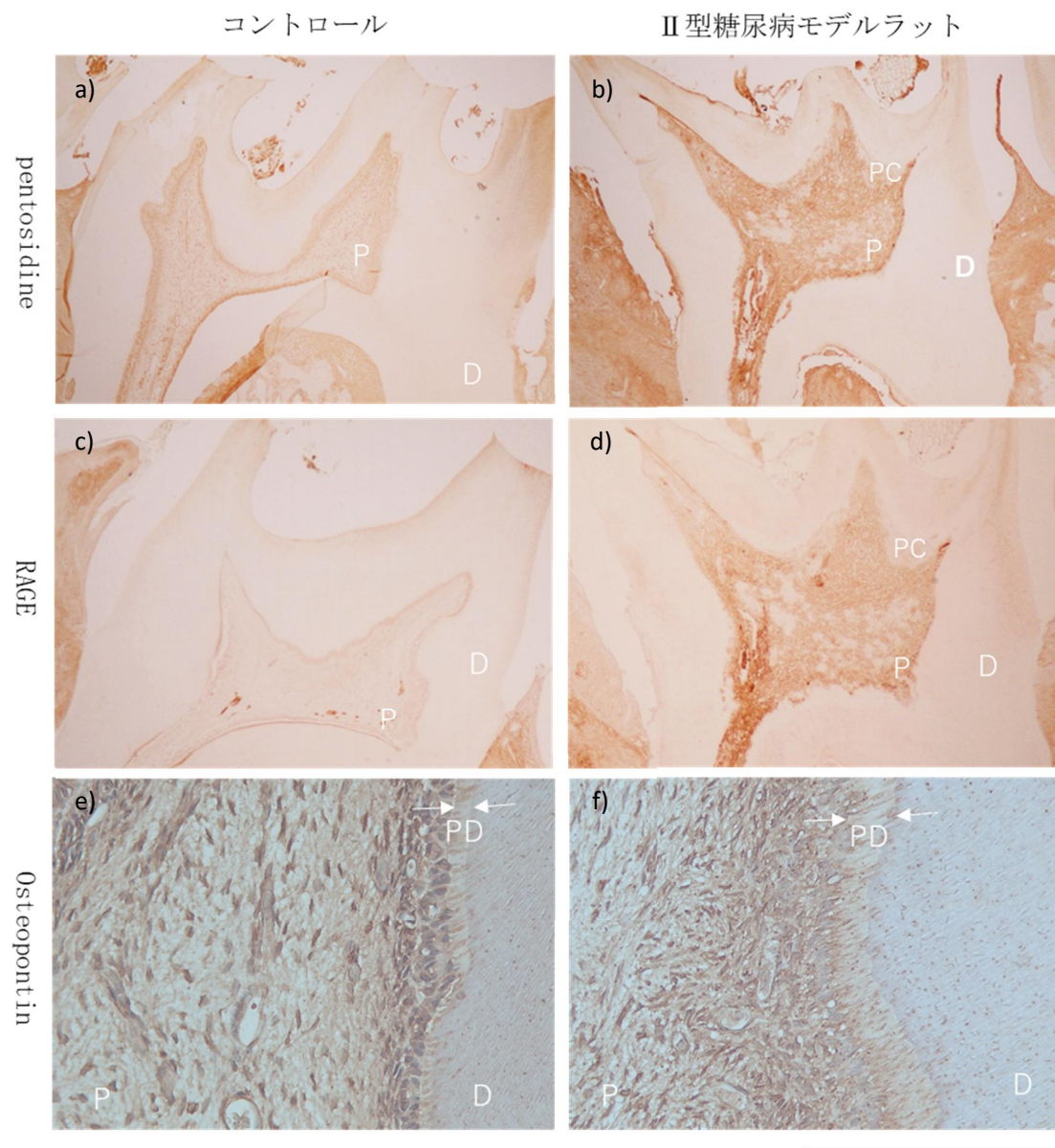


図 11-1 : 免疫組織化学染色像 (Pentosidine, RAGE, Osteopontin)

Scale bar : a) - d) 400 μ m, e) - f) 100 μ m

D: 象牙質 P : 歯髄 PC: 歯髄内石灰化物 PD: 象牙芽細胞

図表

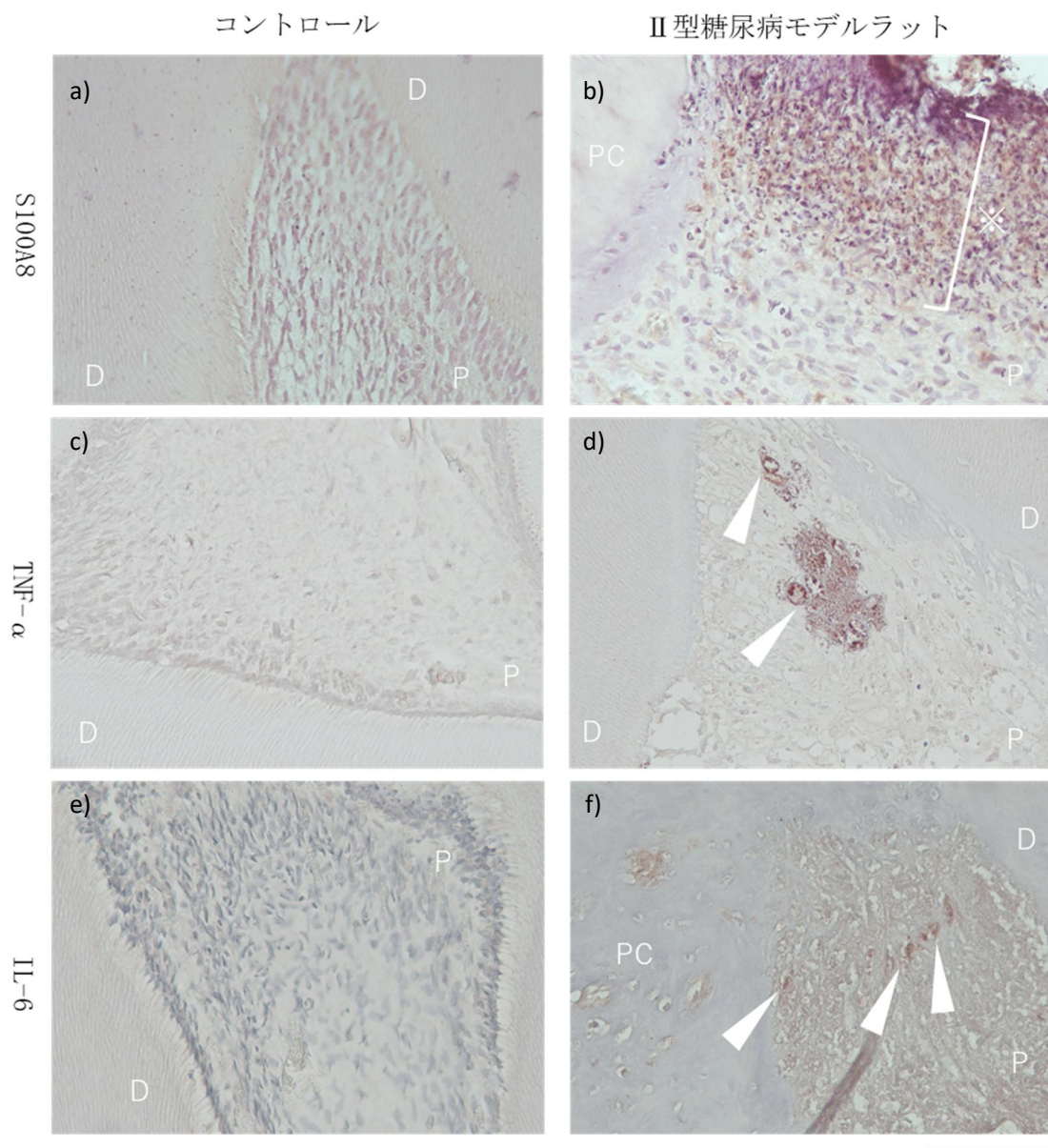


図 11-2 : 免疫組織化学染色像(S100A8, TNF- α , IL-6)

Scale bar: 200 μ m

D:象牙質 PC:歯髄内石灰化物 P:歯髄

図表

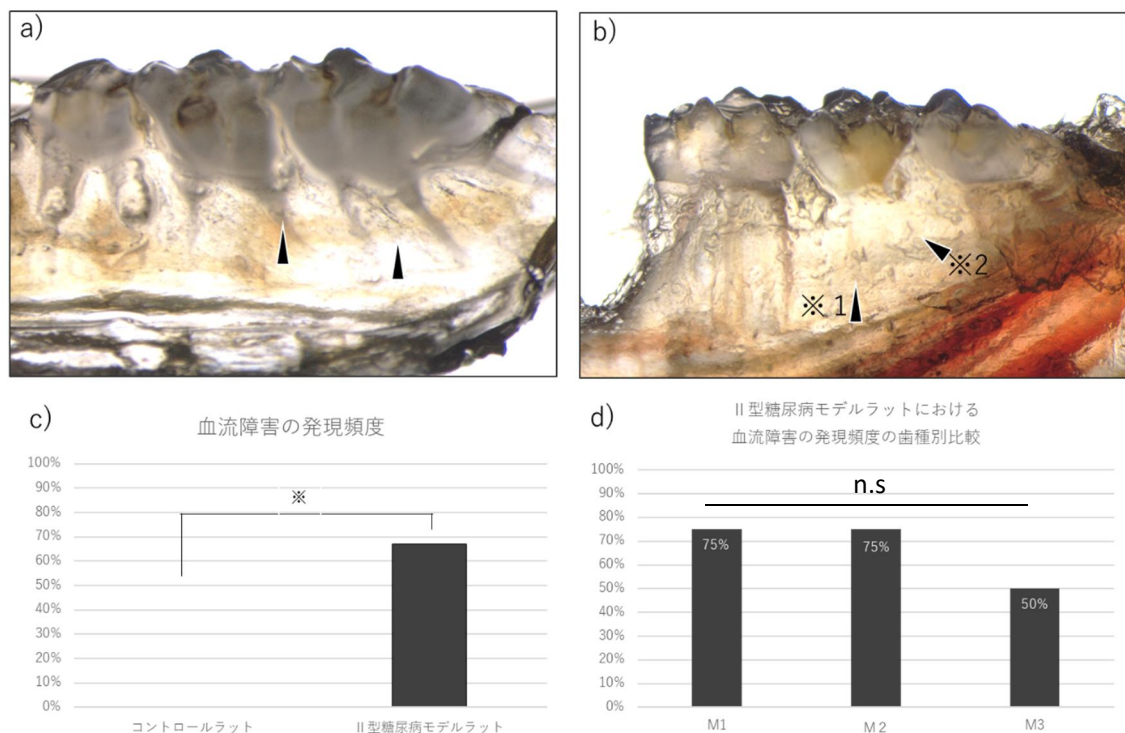


図 12：透明化試料による血流障害の観察と血流障害の発現頻度の比較

a)：コントロール

b)：II型糖尿病モデルラット

c)：血流障害がみられた根管の発現頻度の比較 (* $P < 0.05$)

d)：II型糖尿病モデルラットにおける血流障害がみられた根管の発現頻度の歯種別比較

図表

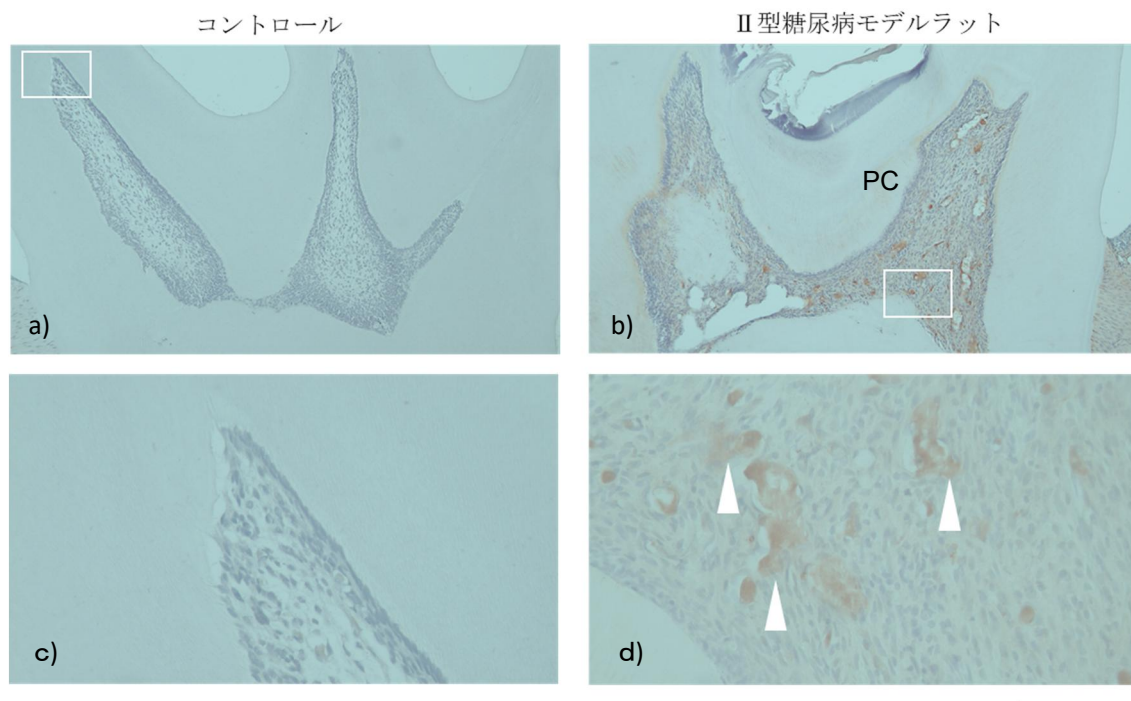


図 13 : 抗ピモニダゾール抗体による免疫組織化学染色 (9 週齢)

Scale bar: a), b) 200 μ m, c)、d): 50 μ m

a), c): コントロールラット b), d): II 型糖尿病モデルラット。

図表

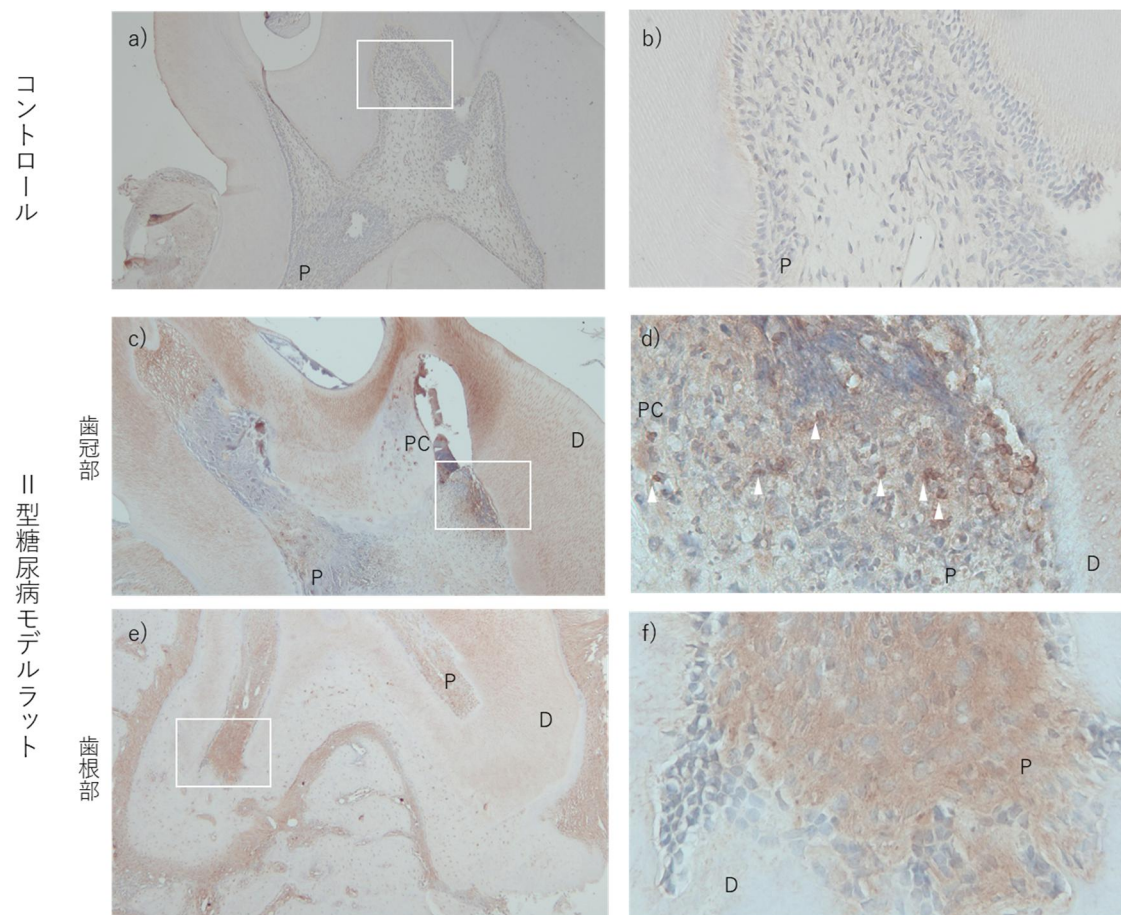


図 14：抗 HIF-1 抗体による免疫組織化学染色画像 (19 週齢)

Scale bar : a), c), e) 200 μ m b): 50 μ m d), f): 20 μ m

a), b): コントロールラット, c)-f): II 型糖尿病モデルラット

図表

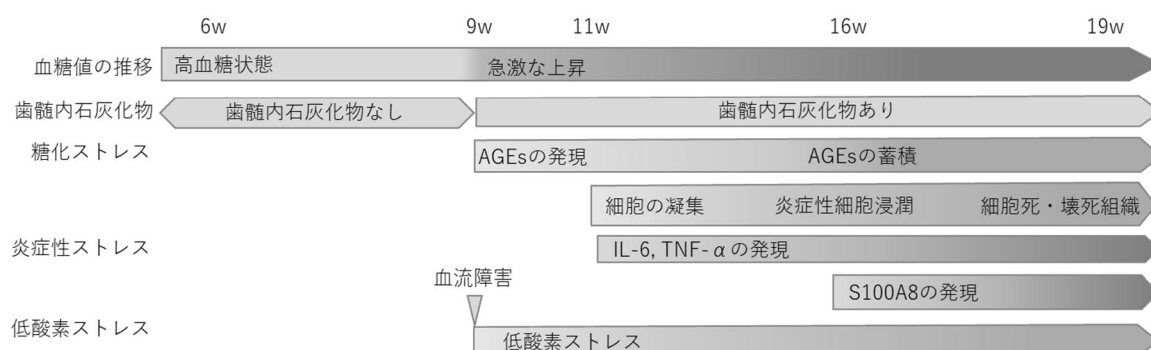


図 15：Ⅱ型糖尿病モデルラットの血糖値の推移と本研究で観察された事象

