

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06191

研究課題名(和文)咀嚼刺激低下が海馬Wnt signal、CaMK の障害を誘発するメカニズム

研究課題名(英文) Mechanism by which masticatory dysfunction induces hippocampal Wnt signal and CaMKIIa disorder

研究代表者

沖原 秀政 (Okihara, Hidemasa)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：80754960

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,000,000円

研究成果の概要(和文)：近年、Wnt signal pathwayと記憶・認知機能低下を主症状とするアルツハイマー病との関連が注目されている。本研究においては、咀嚼刺激低下モデルとして、3週齢から14週齢まで粉末飼料で飼育したマウスを用いた。飼育時に固形飼料群との間に体重差が生じたため、食事量の調整を行う必要性があり、モデル作成に多くの時間を割いてしまった。行動実験の手技は、獲得できた。しかし、western blottingによる鮮明なバンドが検出できていないため、現段階において、タンパクの発現の傾向しかつかめていない現状である。今後継続して実験を行い、定量する予定である。

研究成果の概要(英文)：Recently, the relation between Wnt signal pathway and Alzheimer's disease, which is a major symptom of memory and cognitive decline, has been drawing attention. In this study, the control group was fed chow pellets, whereas the experimental group was fed powder food from 3 weeks to 14 weeks of age. Due to weight difference within two groups, there was a necessity to adjust the amount of food and taking much time to make models. The procedure of the behavior experiment was able to be acquired. However, at the western blotting, clear bands can not be detected at the present stage, only the tendency of protein expression is currently being obtained. We will continue to conduct experiments in the future and quantify it.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：記憶・学習機能障害 咀嚼刺激低下 Wnt 3a CaMKIIa

1. 研究開始当初の背景

咀嚼機能の低下が末梢神経系のみでなく中枢神経系においても機能低下をもたらすことが明らかになりつつある。高齢者を対象とした研究においては、歯の喪失に伴う咬合機能の低下と、記憶学習機能・認知機能の低下を主症状とする認知症・アルツハイマー病の発症に相関が認められることが報告されている。さらに、実験動物を用いた、実験において、咀嚼刺激低下が記憶・学習機能の関連分子に与える影響に関しても、近年、明らかになりつつあるが、断片的な関連性についてしか報告されておらず、総合的に評価したものは、認められない。

咀嚼刺激低下と記憶を司る海馬の機能変性に関するメカニズムを解明することは、社会的にみても今後推進すべき重要な研究分野と考えられている。

2. 研究の目的

中枢神経系において空間認知機能・記憶学習機能を司る器官は海馬であることが先行研究より報告されており、陳述記憶といわれる事実やエピソードの記憶に関連するとされている。海馬の成長・発達に伴い記憶・学習能力は向上するが、それには、neurotrophin family の一つである brain-derived neurotrophic factor (BDNF) が重要な役割を果たしている。BDNF は、成長期および成人の末梢・中枢神経系においてニューロンの結合を制御し、分化・生存を促進する。また BDNF は、Tyrosine kinase B (TrkB) receptor と親和性が高く、BDNF と TrkB の結合は中枢神経系の神経細胞の成長・シナプスの機能を発達し、記憶・学習能力を向上するが、記憶・学習機能の獲得には CaMK のリン酸化が必須である。先行研究より、咀嚼刺激低下が BDNF の発現上昇および TrkB の発現低下、ならびに行動学的な記憶・学習機能を障害するということが報告されているが、それ以上のメカニズムは不明である。

近年、Wnt signal pathway と記憶・認知機能低下を主症状とするアルツハイマー病との関連が注目されている。Wnt signal pathway とは、神経保護作用、神経分化およびシナプス形成に関連する経路であり、神経組織形成において重要な役割を担っている。Wnt signal pathway の活性化に伴い、ニューロンおよびグリア細胞において海馬の神経栄養因子である BDNF タンパクの発現が増大することが報告されている。また、記憶・学習機能の獲得には CaMK のリン酸化が必須である。現在、咀嚼刺激低下と BDNF に関連する報告はなされているが、その上流の分子伝達経路は明らかとなっていない。記憶・学習機能を司る海馬における Wnt signaling および CaMK の発現障害を誘発するメカニズ

ムを行動学的・組織生化学的に解明することを目的とした。

3. 研究の方法

実験動物

3 週齢 c57BL/6J 雄性マウスを用いる。粉末飼料で飼育する実験群 (咀嚼刺激低下モデル) および固形飼料で飼育する対照群の 2 群に無作為に分ける。粉末飼料は固形飼料と同成分を有し、飼育期間は 3 週齢から 14 週齢とする。実験期間を通じて体重変化を測定し、実験群と対照群で平均体重に有意差が生じないように食事制限を行い調整する。記憶・学習機能を行動学的、生化学的、組織学的手法を用いて総合的に評価する。

(1) 行動実験

記憶、学習機能の行動学的評価:

・Y 字迷路試験

装置は、120° の角度を呈する 3 つのアーム (300×60×150mm³) からなり、ランダムに A、B、および C と設定する。マウスは、3 つのアームを自由に 8 分間探索することができ、アームエントリーの数を記録することにより、記憶・学習機能を評価する。

・受動回避行動試験

装置は、マウスが往来のできる穴の開いた透明な箱と黒の箱から構成される。初日に順化を行う。透明の箱に放たれたマウスが黒のボックスに入り電気刺激を受けるまでの時間を記録する。黒の箱に侵入せず、電気刺激を受けなかったマウスは 5 分を時間制限として、強制的に電気刺激を与える。24 時間後に同様に透明の箱から黒の箱に入るまでの時間を計測し、1 日目と比較して記憶・学習機能を評価する。

行動実験後に Co2 麻酔下でマウスを TBS を用いて還流し、摘出した脳は右脳と左脳に分け、右脳を用いて生化学的評価を、左脳を用いて組織学的評価のためのサンプルを製作する。

(2) 生化学的評価 (western blot 法):

Wnt 3a, CaMK、phospho-CaMK のタンパク発現量の評価
Wnt3a, CaMK および phospho-CaMK の電気泳動に対してそれぞれ 12% および 15% の gel を用い SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動法にて電気泳動を行う。タンパク質は、Western blotting 法により transfer buffer を用いて polyvinylidene difluoridemembrane (PVDF) 膜に転写する。一次抗体、二次抗体を incubate し、バンドの検出を行う。

(3) 組織学的評価：

MAP-2(Microtubule Associated Protein 2) 染色

還流後に摘出した左脳は 4%パラフォルムアルデヒドで固定を行った後、paraffin 包埋を行う。先行研究に基づいて 3µm の厚さの切片を作成して染色を行い、神経細胞の樹状突起の軸索の伸長に関して、評価を行う。

4 . 研究成果

実験モデルの作製に際して、実験群である固形飼料飼育マウスにおいて、飼育期間中に体重減少が認められてしまった。そのため、実験期間中にモデル作製に際して、実験群および、対照群の体重差に有意差が生じないように、食事制限を行い、毎日体重測定を行う必要性が生じたため、モデル作製が複数回にわたってしまったため多くの時間を費やしてしまった。
行動実験、western blot 法、組織染色の実験の手技、実験条件の設定に時間がかかり、現段階において、明確な結果は得られていなく、傾向を認めるにとどまっている。

(1) 行動学的評価

Y 字迷路試験、受動回避行動実験から、対照群と比較して、実験群である粉末飼料飼育マウスにおいて記憶・学習機能が低下している傾向が明らかとなった。

(2) Western blotting 法

各タンパク質において、安定した濃度のバンドを検出することを目的に、サンプル濃度の調整、電気泳動、Western blot に用いる試薬・抗体の濃度調整に非常に多くの時間を費やしてしまった。

海馬における Wnt 3a のバンドの濃度は、対照群と比較して、粉末飼料飼育群の方が増加している傾向が認められた。

海馬における CaMK、phospho-CaMK のバンドの濃度は、実験群および、対照群の両群間に差が認められない傾向が明らかとなった。

(3) 組織学的評価

切片の作製方法は、習得できたが、いろいろな抗体濃度、染色時間の組み合わせによる条件設定にて実験を行っているものの、染色に関しては、軸索の染色像が得られなく、傾向をつかむことができていない。

抗体の変更だけでなく、神経軸索の伸長程度の評価に際して、ゴルジ染色のような他の染色方法に関しても検討する必要があると考えている。

今後、更に実験モデルの作成、およびサンプル作製を行い、それぞれの実験を継続的に遂行することにより、有意差の得られる明確な実験結果を獲得する。

そのデータを用いて、国内のみならず、国外の学会への発表を行うと同時に、論文の作製および投稿を行う。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

沖原 秀政 (OKIHARA Hidemasa)

東京医科歯科大学・歯学部附属病院・医員

研究者番号：80754960

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()