

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 9 月 15 日現在

機関番号：32202
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2021
課題番号：18K09842
研究課題名(和文) チューイングの脳内ストレス抑制機構を担う神経回路の解明と生体ストレス抑制への応用
研究課題名(英文) Elucidation of the neural circuit for the stress suppression mechanism in of chewing and its application to biological stress suppression
研究代表者
笹栗 健一 (sasaguri, kenichi)
自治医科大学・医学部・准教授
研究者番号：10235286
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ストレス下でのチューイングによる咀嚼器官の活性化は、扁桃体GABA作動性ニューロンを介して直接もしくは間接的に視床下部室傍核のp-ERK1/2の発現を制御している機構の一部である可能性が示唆された。しかしながら、その詳細な神経ネットワークと全身のストレス応答に及ぼす影響に関してはまだ不明である。そこで本研究では、ストレス下におけるチューイングによる扁桃体でのGABA作動性ニューロンの賦活化による脳内神経ネットワーク機構の可塑的な賦活化もしくは不活性化に及ぼす影響を検討し、その下流に位置するOut putとしての全身ストレス応答の抑制を制御している機構の詳細を明らかにすることを目的とした

研究成果の学術的意義や社会的意義
ストレス下のチューイングにより、情動機構の上位中枢である扁桃体のGABA作動性ニューロンとExtended amygdalaと考えられているBNSTのGABA機構を賦活誘導し、自律神経調節機能の上位中枢であるPVNを制御する機構が存在する可能性が示唆された。特に、扁桃体のGABA作動性ニューロンの選択的破壊に伴い全身性のストレス下のチューイングによるストレス抑制機構が阻害されたことは、日常生活における簡便な口腔機能によるストレス発散療法に昇華できる可能性があり、歯科領域から一般社会に対して新規性の高い口腔機能療法の可能性を示唆したものと考えられる。

研究成果の概要(英文)： It is suggested that chewing-induced activation of the masticatory organs during stress may be part of the mechanisms that control the expression of p-ERK1/2 in the hypothalamic paraventricular nucleus directly or indirectly via GABA neurons on amygdala. However, it is still unclear regarding its detailed neural networks and its impact on the systemic stress response.
Therefore, this study aimed to investigate the effects of chewing on the plastic activation or inactivation of neuronal networks in the brain by activating GABA neurons in the amygdala during stress and to elucidate the mechanisms controlling the inhibition of the systemic stress response as a downstream out puts.

研究分野： 歯科矯正学

キーワード： ストレス チューイング 扁桃体

1. 研究開始当初の背景

Vincent G.P.ら (Vincent et.al; *Physiol Behav.* 1982)は、実験動物に対して拘束・浸水ストレスを加えると同時に Nylon brush をかませることで、ストレスを単独に加えたものに比べ、胃潰瘍数が減じ、潰瘍長の短縮化が起こるとともに体温が維持されることを報告した。すなわち本報告は、身体的・精神的ストレス下でのチューイングによる主に三叉神経から入力される求心性情報の増大は、何らかの経路を経てストレスによる生体ストレス応答を減弱させる機構を誘導する可能性を示唆していることから、咀嚼器官を活用した新たなストレス発散法になる可能性を示唆したものと考えられた。

そこで本申請者は、これまでに Vincent G.P.の実験方法を改変し拘束ストレスを付与したうえで咀嚼器官を活性化する(チューイング)実験系を構築し、全脳的にその抑制機構の機序の解明を検討してきた。特に、ストレスによって惹起される興奮性応答を情動機構の最上位中枢である扁桃体と、その投射部位で Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis (HPA Axis) の賦活に大きな影響をおよぼす視床下部室傍核 (PVN) に着目して検討を行ってきた(基盤研究 C チューイングによる扁桃体を中心としたストレス減弱効果の脳内機構の解明 研究課題番号 : 26463124 研究期間 2014 ~ 2017)。その結果、拘束ストレス負荷により 5 分で速やかに PVN での p-ERK1/2 陽性細胞を誘導するが、ストレス負荷と同時にチューイングさせることにより誘導される p-ERK1/2 陽性細胞が速やかに減少する実験系を確立した。次に、興奮毒性薬であるカイニン酸を PVN の上位に存在する情動中枢の扁桃体に作用させ同様の実験を行ったところストレス下のチューイングによる PVN での p-ERK1/2 陽性細胞の減少現象が抑制されることを明らかにした。さらに、扁桃体の γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid, GABA) 作動性ニューロンを Anti-GABA-transporter-1-saporine (anti-GAT1-sap) を用いて選択的に機能破壊を行ったところ、カイニン酸実験と同様にその減少現象が抑制されることを見出した。すなわち、ストレス下でのチューイングによる咀嚼器官の活性化は、扁桃体 GABA 作動性ニューロンを介して直接もしくは間接的に PVN の p-ERK1/2 の発現を抑制し、その下流に存在する血清中のストレスホルモンの挙動も一致することが明らかとなり、将来的に脳内神経回路を解明し科学的根拠を持たせることで日常生活における簡便なストレス発散療法に昇華できる可能性があると考えられた。

2. 研究の目的

これまでの検討から、ストレス下でのチューイングによる咀嚼器官の活性化は、扁桃体 GABA 作動性ニューロンを介して直接もしくは間接的に視床下部室傍核の p-ERK1/2 の発現を制御している機構の一部である可能性が示唆された。しかしながら、その詳細な神経ネットワークと全身のストレス応答に及ぼす影響に関してはまだ不明である。そこで本研究では、ストレス下におけるチューイングによる扁桃体での GABA 作動性ニューロンの賦活化による脳内神経ネットワーク機構の可塑的な賦活化もしくは不活性化に及ぼす影響を検

討し、その下流に位置する Out put としての全身ストレス応答の抑制を制御している機構の詳細を明らかにすることを目的とした。

3 . 研究方法

(a) anti-GAT1-sap を用いた両側性扁桃体の選択的 GABA 作動性神経破壊に伴う全身性ストレス応答抑制機構に及ぼす影響の検討

これまでに、ストレス下にチューイングを行うと、PVN 下流にある HPA 系を中心としたストレスの全身性応答の一つの指標である血清中ストレスマーカーホルモンの Corticosterone・ACTH が減少することが明らかとなっている。そこで、扁桃体の GABA 作動性神経を選択的に破壊することを目的に anti-GAT1-sap を両側扁桃体に作用させ、コントロールとして人工脳脊髄液 (artificial cerebrospinal fluid: acsf)を用いて、GABA 作動性神経を特異的に破壊することで、ストレス負荷とともにチューイングさせることによる全身性ストレスに及ぼす影響を血清中の Corticosterone と ACTH を指標として検討することとした。

(b) マイクロダイアリシス法による、PVN および分界条床核 (BNST) における GABA の計測

Anti-GAT1-sap により扁桃体の GABA 作動性神経を特異的に破壊した結果、ストレス下におけるチューイングによる p-ERK1/2 減弱効果が抑制した。そこで、PVN および Extended amygdala と考えられている BNST の GABA の機能を検討することを目的にストレスタスク負荷 (S) とストレス負荷とともにチューイングさせる (SC) の開始直後から解放後 30 分までの PVN と BNST の GABA を 10 分間隔で Eicom HTEC500 を用いてマイクロダイアリシス法により採取し測定した。

4 . 研究結果

ストレス負荷と共にチューイングを行うことで、中枢神経性ストレス反応およびその下流にある全身性ストレス性応答を減弱させることを明らかにしてきた。これまでに、精神的・肉体的ストレス負荷が速やかに視床下部室傍核での p-ERK1/2 陽性細胞を誘導するが、チューイングさせる ことにより減少し、情動の上位中枢である扁桃体の GABA 作動性ニューロンの選択的神経細胞破壊薬である Anti-GAT1-sap により、p-ERK1/2 の減少現象が抑制されることを見出した。そこで、扁桃体 GABA 作動性ニューロンの選択的機能破壊がストレス負荷単独とそれと共にチューイングすることによる全身的なストレス応答の変化に及ぼす影響に関して血清中のストレスマーカーである Corticosterone と ACTH を用いて検討した。その結果、両側扁桃体の GABA 作動性ニューロンの選択的破壊に伴い、ストレス下でのチューイングによる ACTH 抑制機構が有意に減少し(Fig.1)、Corticosterone も同様な傾向が認められた。すなわちストレス下のチューイングは、扁桃体の GABA 作動性ニューロンを賦活し、自律神経系の上位調節中枢である PVN のストレスによる p-ERK1/2 の発

現を抑制し、全身性のストレス応答する可能性が示唆された。

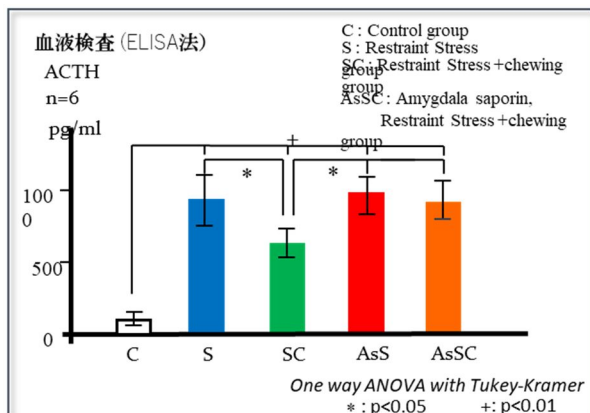


Fig.1

次に、扁桃体 GABA の機能がどのような神経ネットワークを介して機能しているかを検討するため、ストレス単独 (S) およびストレス + チューイング群 (SC) のストレス付与直後から解放後 90 分までの GABA を 15 分間隔で EicomHTEC500 を用いてマイクロダイアリシス法により採取した。その結果、予想に反し PVN ではストレス下のチューイングによる GABA の増強は認められず、BNST で GABA の増強が認められた (Fig.2)。すなわち、扁桃体で産生された GABA が直接的に視床下部におけるストレス受容を軽減させているのではなく、BNST を介して間接的に作用している可能性が示唆された。BNST は、Extended amygdala と呼ばれ、不安・嫌悪・恐怖などの Negative な情動発動に扁桃体と共に重要な働きを有していることが明らかとなり、今後の口腔内機能との関連を詳細に検討する必要があると思われる。

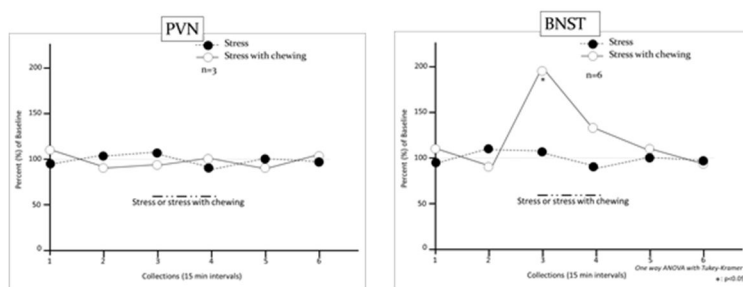


Fig2

以上の結果から、ストレス下のチューイングによる三叉神経からの求心性入力の増加が、情動機構の上位中枢である扁桃体の GABA 作動性ニューロンと Extended amygdala と考えられている BNST の GABA 機構を賦活誘導し、自律神経調節機能の上位中枢である PVN を制御する機構が存在する可能性が示唆された。特に、扁桃体の GABA 作動性ニューロンの選択的破壊に伴い全身性のストレス下のチューイングによるストレス抑制機構が阻害されたことは、口腔機能が中枢を介して全身性に影響を及ぼす新しい機構の側面を提供したものであり、今後咀嚼器官の機能が高次脳へ及ぼす影響をより多角的に精査し、口腔器官と

全身との関連を神経科学的に解明していく必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 1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 Hatanaka R, Onuki M, Sasaguri K, Yamada K, Saruta J, Yamamoto T.	4. 巻 727
2. 論文標題 Chewing augments stress-induced increase of pERK-immunoreactive cells in the rat cingulate cortex.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuroscience letters	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） 10.1016/j.neulet.2020.134921.	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 -
1. 著者名 Yamamoto Toshiharu, Sasaguri Kenichi, Mizumoto Natsuki, Suzuki Hirohumi	4. 巻 53
2. 論文標題 The Chemokine CXCL14-like Immunoreactivity Co-exists with Somatostatin, but not NPY in the Rat Dorsal Horn and Has Intimate Association with GABAergic Neurons in the Lateral Spinal Nucleus	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 121 ~ 129
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1267/ahc.20-00004	査読の有無 無
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 Onuki Masami, Yamamoto Toshiharu, Sasaguri Kenichi, Yamada Kentaro, Okada Naruo, Kawata Toshitsugu	4. 巻 674
2. 論文標題 Chewing ameliorates the effects of restraint stress on pERK-immunoreactive neurons in the rat insular cortex	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuroscience Letters	6. 最初と最後の頁 60 ~ 65
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.neulet.2018.03.008	査読の有無 無
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 Sasaguri Kenichi, Yamada Kentaro, Yamamoto Toshiharu	4. 巻 54
2. 論文標題 Uncovering the neural circuitry involved in the stress-attenuation effects of chewing	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Dental Science Review	6. 最初と最後の頁 118 ~ 126
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jdsr.2018.03.002	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究 分担者	久保 金弥 (Kubo Kin-ya) (00329492)	名古屋女子大学・健康科学部・教授 (33915)	
研究 分担者	山本 利春 (Yamamoto Toshiharu) (50111901)	神奈川歯科大学・歯学部・特任教授 (32703)	

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