

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K09858

研究課題名(和文) 食道内の酸クリアランス促進によりブラキシズムを抑制する経皮的刺激療法の開発

研究課題名(英文) Development of the percutaneous stimulation therapy to control bruxism by the acid clearance promotion in the esophagus

研究代表者

國則 貴玄 (Kuninori, Takaharu)

鹿児島大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：00626666

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、NOR testを用いて、咬合不正の認識行動への影響の評価を行った。4週齢のマウスに咬合不調モデルとしてコンポジットレジンを下顎前歯に築盛り粉末食給餌を行った群(不正咬合群)と、固形物給餌を行った偽操作群、粉体給餌を行った偽手術群にランダムに分けた。不正咬合群では他の群のマウスと比較してNOR testにおけるNOR指数が低く、視床下部におけるAgRPのmRNA発現量が高く、視床下部弓状核におけるc-Fos陽性細胞やAgRP陽性細胞が増加し、不正咬合群マウスに抗AgRP抗体を脳室内投与すると、NOR指数の低下が有意に回復したことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、成長期マウスにおいて咬合不調はNOR testにおける認識能力を低下させ、視床下部弓状核のAgRPニューロンを活性化させることが示された。この認識能力の低下は、抗AgRP抗体の中枢投与により回復したため、AgRPシグナルは咬合不調によって引き起こされる認識能力障害の治療のための新規ターゲットとなる可能性がある。また、これらの結果から、小児期における咬合不調を治療しなかった場合、認識機能の低下を惹起する可能性があることが示唆されたため、小児期の咬合不調に対する治療の重要性があらためて示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, the NOR test was used to evaluate the effect of malocclusion on cognitive behavior. 4-week-old mice were randomly divided into two groups: a powdered diet fed with composite resin built-up on the mandibular anterior teeth as a model of malocclusion (malocclusion group), a sham operation group fed with solid food, and a sham surgery group fed with powder food. The malocclusion group was randomly divided into two groups. The malocclusion group had a lower NOR index in the NOR test, higher AgRP mRNA expression in the hypothalamus, and an increase in c-Fos positive cells and AgRP positive cells in the hypothalamic arch nucleus compared to mice in the other groups, and administration of anti-AgRP antibody to the malocclusion group mice in the intracerebroventricle significantly restored the lower NOR index. The decrease in NOR index was significantly restored after intracerebroventricular administration of anti-AgRP antibodies to mice in the malocclusion group.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：Malocclusion Agouti-Related Protein Mastication Hypothalamic Hormones

## 1. 研究開始当初の背景

睡眠時ブラキシズムの治療法として、スプリント療法や薬物療法等が挙げられるが、いずれも対症療法である。これまで我々は、ブラキシズムが胃食道逆流によって生じることや、唾液の嚥下がブラキシズムの抑制に役立つことを明らかにし、根本的にブラキシズムを抑制する方法として、胃酸分泌の抑制と食道内の酸クリアランスの促進が効果的であることを報告した。一方、経皮的迷走神経刺激は唾液分泌を促進させる可能性があること、また、耳介には迷走神経の枝が分布しており、耳介を電気刺激したり、食物由来の化学物質であるカプサイシンを塗布したりすることにより、嚥下機能を改善する試みが報告されている。このことから、経皮的迷走神経刺激が唾液分泌や嚥下ならびにそれに続く食道の蠕動運動を促進して、ブラキシズムの抑制に役立つのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

咀嚼は、ヒトの認知能力を維持するための重要な機能の一つである。これまでの研究で、咀嚼は単語想起や空間作業記憶の持続時間などの認知機能を向上させることが明らかになっている。一方、高齢者における咀嚼能力の低下は、Mini-Mental State Examination、Hasegawa Dementia Scale-Revised および Frontal Assessment Battery task における認知状態の低下と関連することが報告されている。また、歯の喪失は認知機能の低下と関連することが、これまでの研究で示されている。さらに、総義歯装着者の認知機能は、Mini-Mental State examination を用いた高齢者の天然歯が揃っている人の認知機能よりも低いことが明らかになっている。これらの結果は、咀嚼刺激による口腔内からの脳への感覚入力が、認知機能の維持に重要であることを示している。また、咀嚼機能低下の原因である咬合不正は、感覚入力の異常をもたらし、認知機能の抑制と関連することが報告されている。咬合不調和と認知機能障害との関連は、動物モデルを用いた様々な研究により明らかにされている。臼歯を抜去した高齢ラットでは、放射状腕迷路試験や受動的回避試験で空間記憶が損なわれている。また、紫外線重合樹脂を上顎臼歯に装着して咬耗させた加齢 SAMP8 マウスでは、空間学習能力が低下する。咬合不正は、若年成人におけるストレスの一つである。重度の不正咬合患者だけでなく、矯正歯科に通院する若年成人にも身体的苦痛、心理的不快感、心理的障害が表れている。また、咬合不正のあるラットは、血漿コルチコステロン濃度が上昇することが報告されている。慢性的なストレスが認知機能を変化させることはよく知られている。成人が 4 週間の心理社会的ストレスにさらされると注意制御課題における注意制御が低下し、小児では累積生活ストレスが空間ワーキングメモリーを低下させるさせるという報告や、慢性ストレスは、ラットの新規物体認識 (NOR) 課題を用いて認知機能を低下させるという報告もある。しかし、慢性的なストレス状態である咬合機能不全が、老年期ではなく若年期や成人期の認知能力を低下させるかどうかを評価した研究はほとんどない。

NOR test は、報酬や罰のない状態で、マウスやラットのワーキングメモリー、注意、不安、新規物への嗜好性に基づく認識機能を調べる試験である。マウスやラットは慣れ親しんだ物体と新規の物体を接触させることで、より頻繁に新規の物体に接近し探索するようになる。そのため、NOR test により認知機能を評価することができる。NOR test は、アルツハイマー病、外傷性脳損傷、統合失調症、パーキンソン病、自閉症スペクトラム障害、老化など、様々な動物モデルにおける認知機能の評価に用いられている。以前の研究では、アグーチ関連ペプチド (AgRP) およびニューロペプチド Y (NPY) の阻害により、幼若マウスの活動性拒食によって誘発された NOR 課

題における認知機能の低下が回復することが示された。この結果は、脳内摂食調節ペプチドが若齢期の認知機能を変化させることを示唆している。しかし、認知機能に関連する摂食調節ペプチドと咬合不正との関連性を検討した研究はない。以上より、咬合不調和は、高齢者における認知行動の障害を引き起こすことが報告されており、咬合不調和は心理的不快感や障害などの口腔保健関連 QOL を低下させるが、若年者における咬合不調和と認知機能との関係やその機序はあまり理解されていないため、本研究では、新規物体認識 (NOR test) を用いて、咬合不正の認知行動への影響を評価することを目的とした。

### 3 . 研究の方法

C57BL6/J 雄性マウスを 4 週齢より、下顎前歯に切歯長が 1.0mm 増加するようレジンで咬合を築盛し、粉末食を与えたグループ(以下、不正咬合群)と、レジンで咬合を築盛せず粉末食を与えたグループ(以下、粉末食群)と、通常の固形食を与えたグループ(以下、固形食群)の 3 群に分けた。すべてのマウスに対し、1 ヶ月間、個体飼育し、毎日午前 7 時に摂餌量と体重を測定した。レジンで咬合を築盛から 28 日目に新規物体認識試験 (NOR test) を行った。NOR test は以下の手順で行った。まず、マウスを空箱(黒壁、ビデオ撮影のため上部が開いている、60cm × 60cm × 70cm)に入れ、10 分間環境に慣らす。その後、マウスをもとのケージに戻し、箱に同じ色、形、大きさの物体を 2 つ置いた。マウスは箱の中に入れ、10 分間自由に探索させた(Phase I)。その後マウスはケージに戻し、箱から 2 つの物体を取り除き、マウスを物体のない箱の中に 10 分間置いた。マウスをケージに戻し、Phase I で使用した物体を箱の中に入れた。1 つの物体は同じ位置に置かれ、もう 1 つの物体は異なる位置に置いた。マウスを箱の中に入れ、10 分間探索させた(Phase II)。マウスをホームケージに戻し、箱から 2 つの物体を取り除き、マウスを再度物体のないクリアボックスに 10 分間入れた。同じ物体(familiar object)と新規の物体(novel object)を Phase I と同じ位置に設置し、マウスを箱の中に入れて 10 分間探索させた(Phase III)。すべての物体と箱は 70%エタノールで洗浄した。物体の探索は、マウスの鼻が物体に触れること(ただし、登った物体の匂いを嗅ぐこと、物体をかじることは探索とみなさない)と定義した。NOR 指数は以下の式で算出した。
$$\text{NOR 指数} = \frac{\text{novel object の探索時間} - \text{familiar への探索時間}}{\text{新しい物体への探索時間} + \text{慣れ親しんだ物体への探索時間}}$$
30 日目に脳を摘出し、RT-PCR 法による mRNA 発現の解析を行った。視床下部切片を抗 c-Fos 抗体 (ABE457, Merck Millipore, Belize, MA, USA; 1:100) および抗 AgRP 抗体 (AF634, R&D systems, Cambridge, UK; 1:500) とともに 4 で 48 時間インキュベートし、二次抗体(Alexa Fluor 488-conjugated anti-goat IgG (51678351, Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., West Grove, PA, USA; 1:500) および Alexa Fluor 555-conjugated anti-rabbit IgG (ab150086, Abcam, Cambridge, England; 1:500)を添加した。25 で 3 時間使用した。核は 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride solution (DAPI, D523, Dojindo Molecular Technologies, Inc Kumamoto, Japan)で染色した。視床下部切片は共焦点レーザー走査顕微鏡 (LSM TCS SP8, Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて観察した。各マウスの視床下部組織の 2~5 種の片側で c-Fos 陽性細胞の数を数え、その平均を算出した。これらの数はその後の解析に使用した。また、AgRP の認識機能に与える影響を確認するため、不正咬合群に対し、25 日目から 30 日目まで抗 AgRP 抗体もしくは生理食塩水の脳室内投与を行い、30 日目に NOR test を実施した。

### 4 . 研究成果

不正咬合群 (n=8) の体重は、Day1 から Day30 まで固形食群 (n=8)、Day1 から Day11 まで粉末

食群 (n=8) に比べ有意に低かった。不正咬合群では、Day1 および Day2 からの食物摂取量が固形食群および粉末食群に比べ有意に少なかった。レジン築盛手術の影響を取り除くために、Day5 から Day30 までの総食物摂取量を算出した。総食品摂取量は全群で有意差はなかった。NOR test において、Phase I では、全群で NOR 指数に有意差はなかった。Phase II では、不正咬合群 (n=8) の NOR 指数は、固形食群 (n=9) および粉末食群 (n=10) よりも低かった。NOR index は、粉末食群が固形食群より低かった。Phase III では、不正咬合群の NOR index は、固形食群群および粉末食群の NOR 指数より有意に低かった。粉末食群の NOR 指数は、S 固形食群と比較して有意な差は認められなかった。また、不正咬合群 (n = 6) の AgRP の mRNA レベルは、固形食群 (n = 9) および粉体食群 (n = 10) のそれらに比べて有意に高かった。NYP, POMC, CART, CRF, Ucn1, Ucn2, Ucn3, BDNF, AVP, OXT, orexin の mRNA レベルは全群で有意な差はなかった。視床下部弓状核における c-Fos 陽性細胞数は、不正咬合群 (n = 6) では、固形食群 (n = 6) および粉体食群 (n = 6) に比べ有意に増加した。これらの c-Fos 陽性細胞は、AgRP 陽性でもあった。抗 AgRP 抗体を 5 日間脳室内投与したところ、不正咬合群における Phase II および III の低い NOR 指数が回復した。Phase I では、抗体投与と生理食塩水投与で NOR 指数に差はなかった。抗 AgRP 抗体の脳室内投与により、粉末食群における Phase II の NOR 指数の低下が抑制された (n = 5) また、Phase I および Phase III の NOR 指標は、抗体投与群と生理食塩水投与群で差がなかった。また、抗 AgRP 抗体の脳室内投与は、体重および摂餌量に影響を与えなかった。

以上の結果から、不正咬合群では粉末食群、固形食群の群のマウスと比較して NOR test における NOR 指数が低く、視床下部における AgRP の mRNA 発現量が高く、視床下部弓状核における c-Fos 陽性細胞や AgRP 陽性細胞が増加し、不正咬合群マウスに抗 AgRP 抗体を脳室内投与すると、NOR 指数の低下が有意に回復したことが示された。

本研究により、成長期マウスにおいて咬合不調和は NOR test における認識能力を低下させ、視床下部弓状核の AgRP ニューロンを活性化させることが示された。この認識能力の低下は、抗 AgRP 抗体の脳室内投与により回復したため、AgRP シグナルは咬合不調和によって引き起こされる認識能力障害の治療のための新規ターゲットとなる可能性がある。また、これらの結果から、小児期における咬合不調和を治療しなかった場合、認識機能の低下を惹起する可能性があることが示唆されたため、小児期の咬合不調和に対する治療の重要性があらためて示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山形勲太、大賀泰彦、権相豪、菅真有、楠元淳也、仙波伊知郎、宮脇正一
2. 発表標題 自動埋入型骨固定装置を併用した 歯科矯正用アンカースクリュー周囲骨の 組織学的解析と荷重負荷時の安定性の評価
3. 学会等名 第15回九州矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2020年

〔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	宮脇 正一  (Miyawaki Shoichi)  (80295807)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授   (17701)	
研究分担者	八木 孝和  (Yagi Takakazu)  (10346166)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・講師   (17701)	
研究分担者	菅 真有  (Suga Mayu)  (50779973)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・助教   (17701)	

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