

令和 4 年 5 月 24 日現在

機関番号：37114

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K10234

研究課題名（和文）口腔粘膜のメカノストレスが認知機能低下を抑制する分子機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of molecular mechanism in which the mechano-stress inhibit cognitive function decline.

研究代表者

都築 尊（Tsuzuki, Takashi）

福岡歯科大学・口腔歯学部・教授

研究者番号：70330967

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）：口腔粘膜の物理的刺激が、マウス脳内での認知症誘発物質の蓄積にどのように関わるかを調べた。口腔粘膜の物理的刺激により、歯肉上皮細胞は酸素欠乏時と同じ環境に置かれ、細胞の活性が上昇した。また、咬みあわせを悪くしたマウスの脳内では、海馬領域に認知症誘発物質の蓄積が起こり、行動実験によって認知症様行動がみられた。

これらのことから、口腔内の物理的刺激は、脳内の認知症誘発物質に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

歯の欠損の放置は認知症発症リスクを高めることが知られているが、かみ合わせが悪いことも認知症の発症リスクに関与することが本研究の結果から示唆された。また義歯を使用することや口腔ケアによる口腔粘膜の刺激は、口腔粘膜直下の細胞に伝えられる。本研究から、それらの刺激が表層の細胞活性を上昇させることがわかった。これらの細胞活性が、アミロイド やリン酸化タウなどの認知症誘発物質の蓄積に関与するかもしれない。

研究成果の概要（英文）： We investigate the effect of intraoral mechanical stress to the accumulation of dementia inciting agents in rodent brain. Intraoral mechanical stress induced hypoxia like cell environment and cell activity enhancement was observed. Occlusal disharmony leaded the dementia inciting agents accumulation in the hippocampus area. In addition, dementia-like behavior was observed.

These data suggest that intraoral mechanical stress have an important role for dementia inciting agents accumulation.

研究分野：補綴系歯学

キーワード：メカノストレス 口腔粘膜 認知症

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、歯の欠損による咬合の喪失が認知症発症リスクとなることが報告されている一方で、義歯による咬合の回復が認知症発症リスクを低下させる可能性があることが示唆されている¹⁾。これは生体が歯肉に加わるメカノストレスを感知するのを起始点として起こる一連のシグナル伝達が深く関わっていると考えられるが、その詳細なメカニズムは不明な点が多い。

(2) メカノセンシングが実行される起点は、細胞のメカノストレス感受性イオンチャネルと接着斑複合体とされている。近年、口腔粘膜や歯肉上に存在するメカノストレス感受性イオンチャネルとして、Transient Receptor Potential channel (TRP チャネル)とPiezo ion channel (Piezo チャネル)が注目されている。TRP チャネルは、細胞膜に存在するイオンチャネル型受容体のひとつであり、ヒトでは6つのサブファミリー、27チャネルでスーパーファミリーを形成している。Piezo チャネルは、Piezo1とPiezo2のサブタイプが知られており、運動刺激シグナル伝達や体性感覚の感知において重要な役割を演じている。これらのイオンチャネルが、口腔ケアでは、刷掃による清掃効果に加えてメカノセンシングによってシグナルを大脳皮質に伝達する起点になりうるということが大いに考えられる。

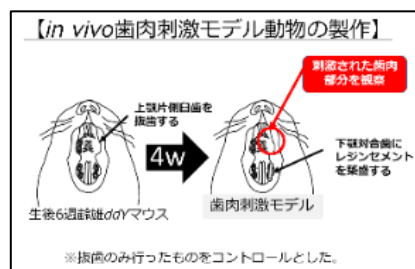
2. 研究の目的

(1) 本研究の目的は、メカノストレスを受容した口腔粘膜の細胞が、TRPチャネル・Piezoチャネルを介したシグナル伝達系により、 α 、 β の凝集を抑制するという仮説を検証することである。

(2) 生体組織へのメカノストレスにより、組織下の細胞は部分的な酸素欠乏状態におかれる²⁾ことが報告されていることから、義歯床下粘膜組織においてメカノストレスにより歯肉上皮細胞が低酸素環境におかれていることが推測される。そこでわれわれは、低酸素誘導型転写因子(HIF-1 α)に着目し、床下粘膜組織のメカノストレス感知のメカニズムを解明することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 咬合不調および歯肉刺激モデルマウスの製作
生後6週齢 ddY マウスの上顎左側臼歯を抜歯した。その後4週間治癒期間を設け、対合臼歯咬合面に歯科用接着性レジンセメントを添加したものを歯肉刺激モデルとした。抜歯のみ行ったものをコントロールとした。(右図)



(2) 免疫組織学的検討

上記マウスをイソフルランで麻酔し、生理食塩水で心臓を灌流後、4%パラホルムアルデヒド含有0.1Mリン酸緩衝生理食塩水にて灌流固定を行った。一次抗体とともに4℃において加湿チャンバー内で一晩インキュベートした。抗体は、Alexa Fluor 標識 IgG 二次抗体 (1 μ g/mL, Thermo Fisher Scientific 社製) と室温で30分間インキュベートすることで可視化した。核の染色は、4, 6-ジアミノ-2-フェニルインドール色素 (同仁堂, 熊本, 日本) を用いて行った。Frigocut CM3050S クライオスタット (Leica, Wetzlar, Germany) を用いて、連続した切片 (厚さ6 μ m) を作製した。染色した切片をBZ-X710顕微鏡 (KEYENCE, Osaka, Japan) で観察した。

(3) 分子生物学的検討

マウス口腔粘膜上皮細胞 (C57BL/6 細胞株 :CellBiologics 社) から totalRNA を抽出した。定量性 RT-PCR 分析は、Thunderbird SYBR qPCR Mix 試薬 (東洋紡績株式会社, 大阪, 日本) を使用し CFX-96 Real-Time System およびソフトウェア (Bio-Rad 社, カリフォルニア, 米国) を用い、各々の遺伝子に特異的なプライマーを用いて行った。 β -actin は、使用した mRNA 濃度の違いによる増幅のばらつきを抑制するために内部標準として用いた。遺伝子発現の相対的変化の算出には delta cycle threshold 法を用いた。相対的な mRNA の発現は、 β -actin の発現レベルに対する標的 mRNA の比率として標準化した。また、低酸素環境は低酸素培養キット (BIONIX®) を使用して製作した。

(4) マウス行動実験

①社会性と長期的記憶の検査では、8方向性放射状迷路試験 (EARMT) を用いた。マウスは迷路内を自由に移動させ、すべてのアームに入るまでの時間をビデオ撮影にて計測した。一度進入したことがあるアームに再び入った場合は、記憶エラーとして評価した。

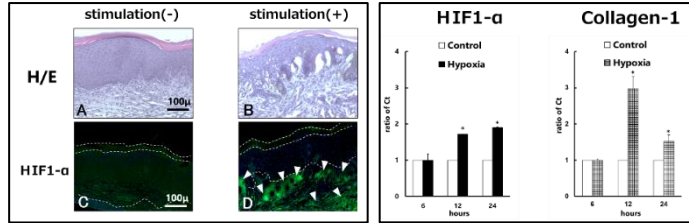
②学習と記憶の種々の側面を調べるために、行動テストとして新規物質探索試験 (ORT) を用いた。マウスは三角と丸の物体を自由に探索させた。それぞれの物体に触れた回数をカウントし、各物体に触れた回数の比率を算出した。テスト期間は、三角形のトレーニング用物体を新規のテスト用の四角形の物体に置き換え、四角と丸の物体をマウスが触った回数の比率を、学習と短期記憶の指標として評価した。

4. 研究成果

(1) 低酸素実験

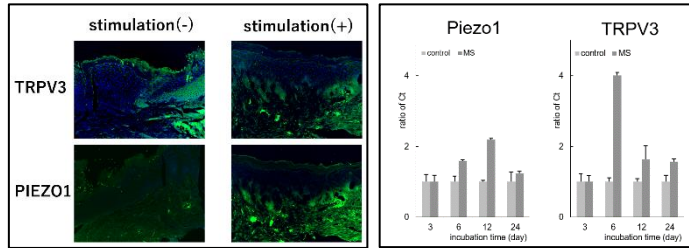
歯肉刺激モデルマウスにおいて、コントロール群の組織学的観察では、ヘマトキシリン・エオジン染色にて一定の幅の重層扁平上皮が観察された。下層の結合組織にみられる線維芽細胞の配列に乱れは観察されなかった。一方で実験群においては、重層扁平上皮の幅に乱れが生じ、多数の血管新生が観察された。線維芽細胞の配列は不規則で、丸い形態の核が多数観察された。

低酸素の指標である HIF-1 α の免疫組織学的観察においては、コントロール群では観察されなかったが、実験群において基底層周囲の上皮細胞に強いシグナルが観察された。



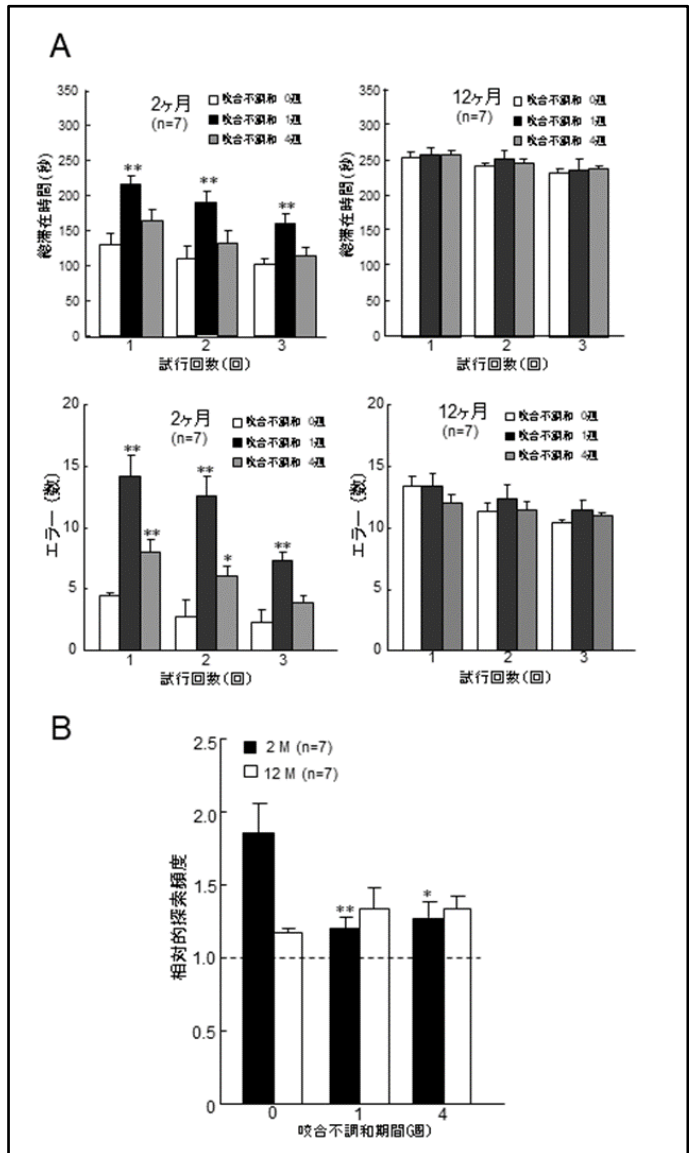
(2) 機械的伸展刺激

物理的刺激的指標として、機械的刺激受容チャネルである TRPV3, PIEZO1, PIEZO2 の発現を調べた。いずれも上皮細胞の基底層に発現が確認された。これらのことから、口腔粘膜の物理的刺激により歯肉上皮細胞は基底層において低酸素環境となると同時に、機械受容チャネルが活性化する可能性が示唆された。



(3) マウス行動実験

咬合不調後の認知能を評価するために、EARMT および ORT を用いて、社会的認知能力および長期的認知能力に対する過剰咬合負荷の影響を調べた。EARMT では、若年 2 ヶ月齢マウスでは、試行を反復するとマウスが 8 つのアームに滞在する総時間とエラー数が徐々に減少したが、12 ヶ月齢マウスではほとんど変化が見られなかった (右図 A)。さらに、EARMT ではマウス 8 つのアームに滞在する総時間は、2 ヶ月齢のマウスの方が 12 ヶ月齢のマウスよりも短かった。次に、2 ヶ月齢のマウスに過剰咬合負荷を与えると、1 週間で 12 ヶ月齢マウスのレベルまで有意に増加し、その後負荷前付近まで減少した。また、2 ヶ月齢マウスのエラー数は、負荷後 1 週間で 12 ヶ月齢マウスのエラー数とほぼ同じレベルまで一過性に増加した。一方、12 ヶ月齢マウスでは、8 つのアームに滞在する総時間やエラー数に、過剰咬合負荷の前後で有意な差は見られなかった。さらに ORT での 2 ヶ月齢マウスは、負荷をかける前の新しい物体を探索する頻度が、負荷をかけた 1 週間後に劇的に減少し、その後負荷前の探索頻度に向かってわずかに回復した (右図 B)。しかし、12 ヶ月齢のマウスにおいて頻度は過剰咬合負荷の影響を受けなかった。これらの結果から以下の成果を得た。



①マウス歯肉上皮細胞には、機械的刺激受容イオンチャネルである TRPV3, PIEZO1 が存在する。

②機械的伸展刺激で TRPV3, PIEZO1 は活性化する。

- ③歯肉上皮細胞は低酸素刺激で HIF1- α を介して活性化すること.
- ④マウス行動実験において、咬合不調和という刺激により 2 か月齢マウスは 12 か月齢マウスと同等の学習・短期記憶行動となること.

<引用文献>

- 1) Yamamoto T, Kondo K, Hirai H et al. Psychosom Med 2012; 74:241-248
- 2) Xi-Jiao Y, Chang-Jie X, Yan-Mei D et al. Int J Clin Exp Pathol 2015; 8:12929-12935

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kazuko T Goto, Hiroshi Kajiya, Takashi Tsutsumi, Munehisa Maeshiba, Takashi Tsuzuki, Kimiko Ohgi, Minoru Kawaguchi, Jun Ohno, Koji Okabe	4. 巻 30
2. 論文標題 The Stromal Cell-derived Factor-1 Expression Protected in Periodontal Tissues Damage during Occlusal Traumatism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Hard Tissue Biology	6. 最初と最後の頁 63-68
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
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 Maeshiba Munehisa, Kajiya Hiroshi, Tsutsumi Takashi, Migita Keisuke, Goto-T Kazuko, Kono Yuri, Tsuzuki Takashi, Ohno Jun	4. 巻 594
2. 論文標題 Occlusal disharmony transiently decrease cognition via cognitive suppressor molecules and partially restores cognitive ability via clearance molecules	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 74 ~ 80
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2022.01.048	査読の有無 有
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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 都築 尊、前芝宗尚、後藤加寿子、堤 貴司、平川直毅、松瀬智樹、平 貴文、宮尾知佐
2. 発表標題 歯肉刺激モデル動物における分子生物学的検討
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会第130回記念学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前芝 宗尚、堤 貴司、後藤加寿子、都築 尊、吉田兼義、小柳進祐、中 四良、都築 尊
2. 発表標題 咬合不正と認知機能との関連性について
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会第130回記念学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前芝 宗尚、堤 貴司、吉田兼義、長谷英明、木山賢歩、都築 尊
2. 発表標題 咬合不正により引き起こされる認知症誘発物質の発現増加について
3. 学会等名 一般社団法人日本老年歯科医学会第32回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 前芝宗尚、堤 貴司、都築 尊、高橋 裕
2. 発表標題 咬合不正による認知機能の低下作用
3. 学会等名 第30回日本老年歯科医学会学術大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 前芝 宗尚、鍛治屋 浩、堤 貴司、都築 尊、大野 純、高橋 裕
2. 発表標題 アルツハイマー病における認知機能と咬合力との関連性について
3. 学会等名 福岡歯科大学学会総会
4. 発表年 2019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	後藤 加寿子 (Goto Kazuko) (60389418)	福岡医療短期大学・歯科衛生学科・准教授 (47131)	

6. 研究組織（つづき）

	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	堤 貴司 (Tsutsumi Takashi) (70736652)	福岡歯科大学・口腔歯学部・講師 (37114)	

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