

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390548

研究課題名（和文）咀嚼が海馬歯状回のニッチェに与える影響とそのメカニズムについて

研究課題名（英文）Effect of mastication on the niche in the hippocampal dentate gyrus.

研究代表者

三留 雅人（MITOME MASATO）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：50261318

研究成果の概要（和文）：

中枢神経の再生医療の中核を担うと考えられる海馬の神経幹細胞が、外部環境因子によって増殖、分化および維持が多様に変化するという報告がある。本研究は、最初に、臼歯抜歯や粉末食投与で正常な咀嚼を阻害すると、海馬における神経幹細胞の減少を引き起こし、その要因として一酸化窒素（NO）が関与している可能性が示唆された。次に、硬質飼料やかじり木などによって咀嚼を誘発すると、神経幹細胞の生存率を上昇させ、また、記憶や学習に関する行動が活性化した。以上のことから咀嚼が外部環境因子として海馬神経幹細胞の増減に影響を及ぼすことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Several studies suggested neural stem cells in the hippocampal dentate gyrus are affected by the external circumstances. First, we suggested the reduced mastication influenced the survival of the neural stem cells in the dentate gyrus through the nitric oxide production system. Second, mice were fed hard diet or given blocks of tree for biting for 8 weeks. The survivals of neural stem cells in both of the mastication groups were significantly increased. In conclusion, these data showed possibilities that the mastication affect the neural plasticity in the central nervous system.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	6,600,000 円	1,980,000 円	8,580,000 円
2010 年度	4,600,000 円	1,380,000 円	5,980,000 円
2011 年度	2,900,000 円	870,000 円	3,770,000 円
年度			
年度			
総計	14,100,000 円	4,230,000 円	18,330,000 円

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学，小児歯科学

キーワード：咀嚼，神経幹細胞，海馬，歯状回，歯学，発生・分化

1. 研究開始当初の背景

近年、性質の異なる複数の細胞に分化する能力を持つ幹細胞（stem cells）が発見され、これらの細胞の性質を治療に応用

した再生医療が発展してきた。生体のあらゆる細胞に分化が可能な胚性幹細胞（embryonic stem cell）や iPS 細胞（induced pluripotent stem cell）は、その

中心的な役割を果たすと期待されている。しかし、これらの細胞が、臨床応用されるには倫理的問題、拒絶反応および細胞の癌化など解決しなければならない問題が多い。一方、これらの細胞以外にも体性幹細胞 (somatic stem cells) と呼ばれる幹細胞があり、骨髄中に存在する間葉系幹細胞、造血幹細胞などの多能性が証明されており、また、中枢神経においては、側脳室下帯 (subventricular zone,) や海馬歯状回の顆粒細胞層

(subgranular zone) にて神経幹細胞 (neural stem cells, 以下 NSCs) が同定され、その臨床応用が期待されている。

中枢神経は胎生期のみ形成され、一度失活すると再生は不可能だと思われていた。特に、海馬は記憶の形成に関与しており、同部に損傷が生じると、新たに経験した事柄について著明な健忘が生じることが知られている。しかし、近年、成体の海馬歯状回で NSCs が発見され、脳の再生への道が開拓されつつある。また、記憶や空間認識などに関与している NSCs を活性化させ維持することは、生涯にわたって健康的な生活を維持するために重要であると考えられる。そのため、幹細胞がその能力を発揮できるための微小環境 (ニッチェ, niche) の研究が必要不可欠といわれている。その中で、niche に影響する外部環境因子を同定することが、NSCs 研究における重要なテーマになっている。

このように、記憶、空間認識などに関与している NSCs は恒常的に分裂・増殖を繰り返しているが、豊かで適度に刺激のある環境や適度に運動のできる環境下でマウスを飼育すると、NSCs の生存率が上昇することが、注目されている。例えば、通常、研究室では、1 ケージに 3 ~ 5 匹のマウスを飼育するが、マウスを通常より広いケージで飼育し、その中に、トンネルなどの玩具を置いて豊かな環境にしたり、Running Wheel を入れ適度に運動のできる環境にしたりすると NSCs のニューロンへの分化やその生存率が高くなることが示された。これは、NSCs の分裂や維持に外部環境因子が関係することを示した点で、注目を集めている。また、上記のような飼育条件は、海馬の神経細胞のアポトーシスを抑制することも判明している。このような飼育環境は Enriched Environment と呼ばれ、豊かで適度な刺激のある環境が、NSCs の維持や増殖に不可欠であることを示している。一方、NSCs は外部環境因子により、減少することも判明している。生体にストレスが負荷されると NSCs が減少する。

しかし、NSCs の減少について、そのメカニズムはわかっていない。

2. 研究の目的

このような環境は多因子的であり、ヒトにおいて、健康な歯を維持し、豊かな食生活を送ることも、“Enriched” な環境の重要な因子であると考えられる。咬合の不調和や咀嚼の変化は、ストレス等を誘発し、中枢神経に影響するという報告がある。動物実験において抜歯や軟食を投与して飼育すると、海馬領域の神経細胞に影響を与えることが判明している。本研究は、最初に、NSCs の増減に影響を与える海馬歯状回の微小環境 (niche, ニッチェ) として一酸化窒素 (NO) に着目し、抜歯や軟食投与における NO と神経幹細胞の増減の関係を調べた (研究 1)。一方、“よく噛む” ことの効用が示唆され、咀嚼が中枢神経に与える影響についても議論されてきた。咀嚼による脳の血流量が増加、あるいは咀嚼によるストレス条件下での NSCs 分裂低下の抑制のように、咀嚼により脳が活性化するという間接的な報告も見られる。しかし、咀嚼により中枢神経が活性化されるということを示した論文は見られない。そこで、通常の飼育環境よりも咀嚼を誘発させる環境をつくり、記憶・空間認識などに関係する NSCs に与える影響についてマウスを用いた実験モデルにて検討した (研究 2)。

3. 研究の方法

研究 1 咀嚼の低下が海馬歯状回 NSCs に与える影響と NO の関係について

ラットを固形飼料群 (n = 7)、粉末飼料群 (n = 7) および抜歯 + 粉末飼料群 (n = 7) の各条件下で飼育を行った。抜歯群は、4 週齢時に両側上顎第一臼歯から第三臼歯まで抜歯を行った。15 週齢時より、海馬歯状回の分裂細胞を定量するため、BrdU (70 mg/kg) を 1 日 1 回 3 日間連続的に腹腔内投与した。その後、18 週齢時まで飼育し、BrdU 陽性細胞数および各 NOS アイソザイム陽性細胞数を調べた。

研究 2 硬質飼料及びかじり木が海馬歯状回 NSCs に与える影響

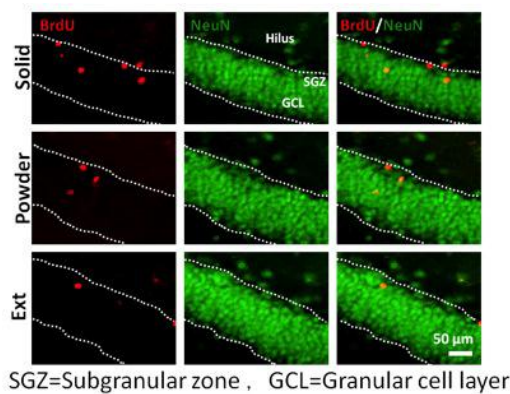
生後 5 週齢のマウスを、普通飼料群 (n=36) と硬質飼料群 (またはかじり木群) (n=36) の 2 群に分け、それぞれの群の 20 匹ずつに BrdU を 1 日 1 回、12 日間腹腔に投与し海馬歯状回における分裂細

胞を標識し、BrdU投与直後とBrdU投与5週間後のBrdU陽性細胞数を調べた。また、両群の残りの8匹ずつを用いて、Morris Water Maze Testを行った。

4. 研究成果

研究1 咀嚼の低下が海馬歯状回 NSCs に与える影響とNOの関係について

粉末飼料群および抜歯群では固形飼料群と比較し、BrdU陽性細胞数の有意な減少が認められた(図1)。また、nNOSおよびiNOS陽性細胞数の有意な増加を認められたが、eNOS陽性細胞数は変化がみられなかった(図2, 図3)。



SGZ=Subgranular zone, GCL=Granular cell layer

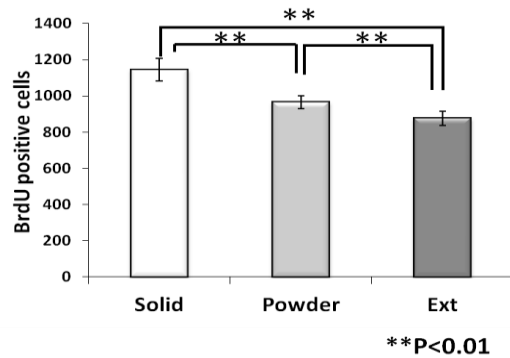


図1 海馬歯状回におけるBrdU陽性細胞数の比較

上段に各群の海馬歯状回顆粒細胞層におけるBrdU陽性細胞の免疫染色像を、下段にBrdU陽性細胞数のグラフを示す。赤：BrdU、緑：NeuN (SGZ：顆粒細胞層下帯、GCL：顆粒細胞層、Hilus：歯状回門)

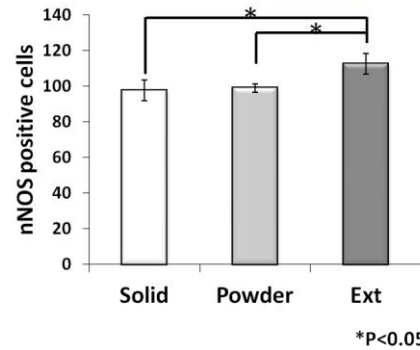
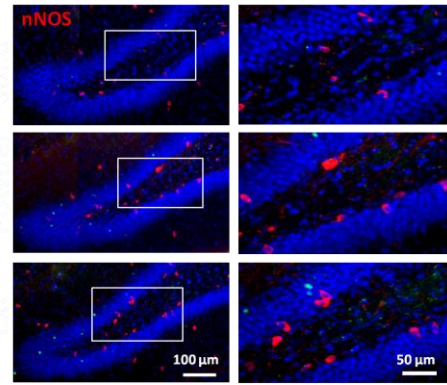


図2 海馬歯状回におけるnNOS陽性細胞数の比較

上段に各群の海馬歯状回顆粒細胞層におけるnNOS陽性細胞の免疫染色像(上段：Solid, 中段：Powder, 下段：Ext)を、下段にnNOS陽性細胞数を示す。抜歯群では、固形飼料群および粉末飼料群と比較し、nNOS陽性細胞数の有意な増加を認めた($P < 0.05$)。赤：nNOS、青：DAPI

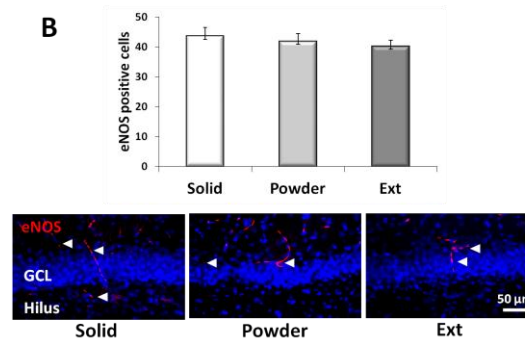
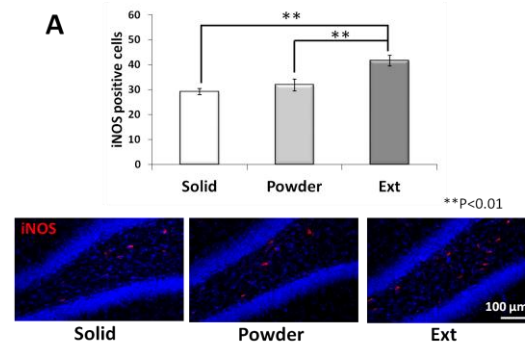


図3 海馬歯状回におけるiNOS陽性細胞数の比較

A : 抜歯群では、固形飼料群および粉末飼料群と比較し、iNOS陽性細胞数の有意な増加を認めた (**, $P < 0.01$)。

赤 : iNOS, 青 : DAPI

B : eNOS陽性細胞は固形飼料群, 粉末飼料群および抜歯群の順に多く認められたが、各群間での有意差は認められなかった。赤 : eNOS, 青 : DAPI

研究2 硬質飼料及びかじり木が海馬歯状回に与える影響

硬質飼料投与群では、BrdU投与直後では、BrdU陽性細胞数には変化はなかったが、BrdU投与5週間後において、硬質飼料群のBrdU陽性細胞数が有意に増加していた(図4)。さらに、Morris Water Maze Test を行った結果、硬質飼料投与群では、プラットフォームへの到達時間が早い傾向がみられた(図5)。かじり木を与えた群でも同様の結果が得られた(図7, 8)。

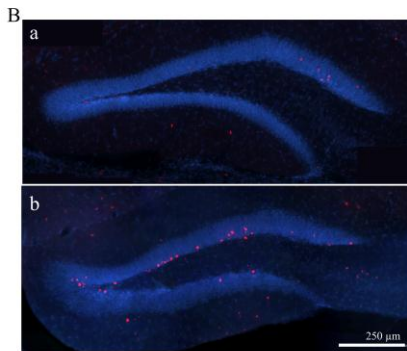
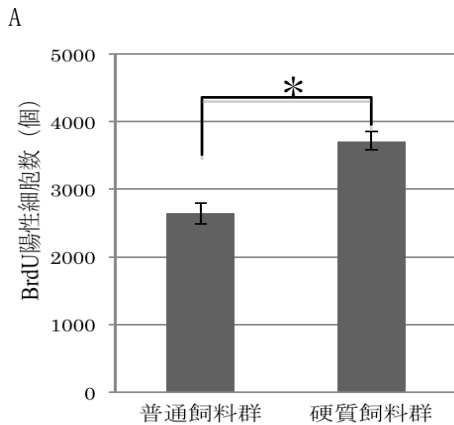


図4 普通飼料群と硬質飼料群における

BrdU陽性細胞の比較

A : BrdU投与5週間後の普通飼料群と硬質飼料群のBrdU陽性細胞数。普通飼料群に対し、硬質飼料群は分裂細胞が有意に多く生存していた (*, $P < 0.05$)。

B : BrdU投与5週間後の普通飼料群と硬質飼料群の海馬歯状回

a : 普通飼料群 b : 硬質飼料群

Red : BrdU Blue : DAPI Scale : 250 μm

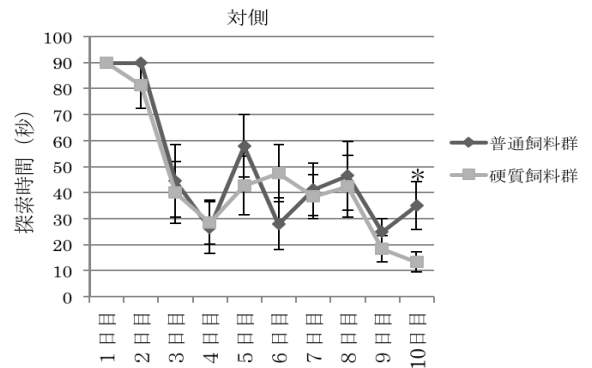


図5 普通飼料群と硬質飼料群における Morris Water Maze Test の結果 (*, $P < 0.05$)。

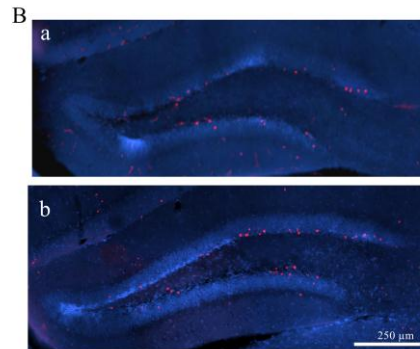
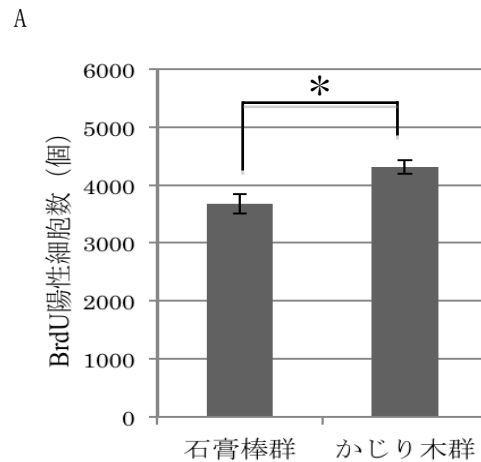


図6 コントロール群とかじり木群におけるBrdU陽性細胞の比較

A : BrdU投与5週間後のコントロール群とかじり木のBrdU陽性細胞数。コントロール群に対し、かじり木群は分裂細胞が有意に多く生存していた (* , P<0.05)。B : BrdU投与5週間後の普通飼料群と硬質飼料群の海馬歯状回

a : 普通飼料群 b : 硬質飼料群
Red : BrdU Blue : DAPI Scale : 250 μm

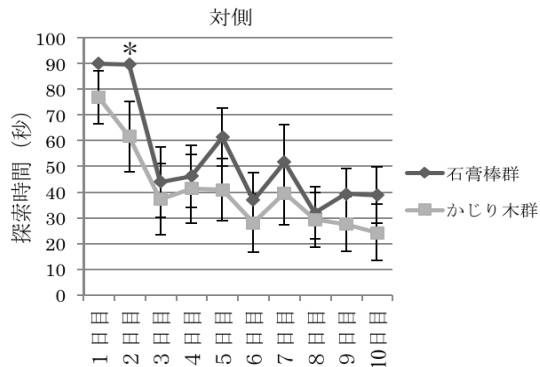


図7 コントロール群とかじり木群における Morris Water Maze Test の結果 (* , P<0.05)。

考察

研究1では、BrdU投与3週間後のラット海馬歯状回におけるNSCsの生存率を調べた結果、固形飼料群と比較し、粉末飼料群および抜歯群で有意に減少することが判明した。また、本研究において抜歯群でnNOS陽性細胞数およびiNOS陽性細胞数の増加が認められたことから、抜歯野粉末食群の海馬歯状回NSCs数の減少に、NOが関与し、nNOSやiNOSが関係している可能性が示唆された。

研究2では、咀嚼の誘発実験を行い、海馬歯状回NSCsの分裂・生存状況を調べた。BrdU投与直後ではNSCsの分裂数を、BrdU投与5週間後では分裂した細胞の生存数を観察した。硬質飼料群、およびかじり木群とも、BrdUの投与直後にはBrdU陽性細胞数に、コントロール群と比較して有意差は見られなかったが、BrdU投与5週間後に有意差が生じていた。このことから、咀嚼はNSCsの分裂数には影響せず、分裂したNSCsの維持に関与していることが示唆された。NSCsを維持することにより、海馬歯状回での細胞数が増加し、多くのシナプスが形成され、記憶の形成・維持に影響を与えられられる。NSCsの増殖・維持・分化に関する様々な

因子が発見されているが、咀嚼がどのような因子に影響を与えるかは、わかっていない。しかし、今回の研究により、外部環境因子がニッシュに影響を与え、NSCsの増減に何らかの影響を与えた可能性が示唆された。

まとめ

今回の研究によって、海馬NSCsは、海馬歯状回のNO産生細胞との関係が示唆され、また、咀嚼を誘発させることにより、分裂したNSCsがより多く生存し、記憶・空間認識能力が向上した。咀嚼の重要性が再認識されつつある近年、

“Evidence-based medicine (EBM)” を実践するために、咀嚼と脳の密接なメカニズムの解明が必要であると考えられる。

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10件)

1. 赤澤友基, 北村尚正, 塚本亮一, 三留雅人: 摂食が海馬神経幹細胞に与える影響について 第49回小児歯科学会大会, 盛岡 (いわて県民情報交流センター), 2011.11.28
2. 塚本亮一, 北村尚正, 赤澤友基, 三留雅人: 臼歯抜歯が海馬神経新生に与える影響 ~ NOS アイソフォームの局在に関する検討~ 第49回小児歯科学会大会, 盛岡 (いわて県民情報交流センター), 2011.11.28
3. 北村尚正, 塚本亮一, 赤澤友基, 三留雅人: ヒト脱落乳歯歯髄細胞 (SHED) を用いた中枢神経再生の可能性 第27回日本障害者歯科学会総会および学術大会, 東京 (タワーホール船堀), 2010.10.23
4. Karen Lora, Kitamura Takamasa, Akazawa Yuki, Tsukamoto Ryouichi and Mitime Masato: Unpaired mastication affect c-fos expression in the mouse dentate gyrus. 第48回小児歯科学会大会, 名古屋 (名古屋国際会議場), 2010.5.19
5. 赤澤友基, 北村尚正, カレン・ローラ, 塚本亮一, 三留雅人: 咀嚼が海馬神経幹細胞に与える影響について. 第48回小児歯科学会大会, 名古屋 (名古屋国際会議場), 2010.5.19
6. 北村尚正, カレン・ローラ, 塚

本亮一，赤澤友基，三留雅人：ヒト脱落乳歯由来幹細胞（SHED）の新生児マウス脳内における神経細胞への分化．第48回小児歯科学会大会，名古屋（名古屋国際会議場），2010.5.19

7. 塚本亮一，北村尚正，カレン・ローラ，赤澤友基，三留雅人：カニン酸投与によるラット海馬歯状回でのNO産生動態およびc-fos発現の関連について．第48回小児歯科学会大会，名古屋（名古屋国際会議場），2010.5.19

8. 塚本亮一，北本眞史，北村尚正，カレン・ローラ，赤澤友基，三留雅人：拘束ストレス下におけるラット海馬歯状回でのNO産生の動態について．第47回小児歯科学会大会，大阪（大阪大学コンベンションセンター），2009.5.4

9. 北村尚正，カレン・ローラ，赤澤友基，北本眞史，塚本亮一，三留雅人：マウス脳内に移植した神経幹細胞の神経細胞への分化．第47回小児歯科学会大会，大阪（大阪大学コンベンションセンター），2009.5.4

10. カレン・ローラ，北村尚正，赤澤友基，三留雅人：神経幹細胞の移植による延髄弧束核での分化動態について．第47回小児歯科学会大会，大阪（大阪大学コンベンションセンター），2009.5.4

〔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
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三留 雅人（MITOME MASATO）

徳島大学・大学院ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号： 50261318

(2) 研究分担者

須田 直人（SUDA NAOTO）

東京医科歯科大学・医歯（薬）学総合研究科・講師

研究者番号： 90302885

(3) 連携研究者

なし

研究者番号：