

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 5月 6日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21592448

研究課題名（和文） 咀嚼の回復による認知症の発症予防—海馬の記憶関連遺伝子に関する分子生物学的解析—

研究課題名（英文） Prevention of dementia by the recovery of the mastication—Molecular analysis of the hippocampus on memory-related genes—

研究代表者

原 哲也 (HARA TETSUYA)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：60238160

研究成果の概要（和文）：

八方向放射状学習によってラット海馬に発現する記憶関連遺伝子を DNA microarray 法を用いて解析したところ、Trh と Tnxa の発現が増加し、Nnat ならびに S100a9 が減少した。そこで、上顎臼歯を抜歯した抜歯群、抜歯後に義歯を装着した義歯群ならびに対照群を設定して八方向放射迷路学習を行わせたところ、抜歯群では他の 2 群に比べてエラー数が多かった。この時に上記の 4 遺伝子の発現を定量 PCR 法で観察すると、Tnxa、Nnat ならびに S100a9 は行動学的実験結果と整合性を示し記憶関連遺伝子の可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The memory related gene expression in the rat hippocampus was analyzed by using the DNA microarray method. The gene expression of Trh and Tnxa increased when studying, and that of Nnat and S100a9 decreased. The number of errors of radial maze in the extraction group was more than that of the denture group and the control group. The time course of these 4 gene expression was observed by real-time PCR method. The gene expression of Tnxa Nnat and S100a9 showed the consistency with behavioral experiment result.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：歯科補綴学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：咀嚼，記憶，海馬，認知症，遺伝子，DNA アレイ

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会に突入した我が国においては、高齢者の約8%の200万人が認知症患者と言われており、その増加が社会的問題となっている。日常多く見られる認知症のタイプは脳血管性認知症とアルツハイマー型認知症であり、前者の危険因子としては高血圧、高脂血症、糖尿病、心臓病、過度の飲酒、喫煙などが報告されている。しかし、後者の危険因子についてはまだ十分な解明が行われていないが、歯の喪失もその一つとして報告されている。

抜歯によって高齢者の体力や平衡感覚が減弱することは、各種調査によって報告されている。また、補綴装置の装着によって咀嚼機能を回復すると高齢者の行動や態度に変化が生じることも経験的に知られている。しかし、歯牙の喪失や咀嚼回復が高齢者の全身機能に及ぼす影響については詳細な解明が行われていない。これは、臨床で起こる現象と脳科学との連携が十分に行われていないことによるものである。

申請者は、上顎臼歯を抜歯したラットならびに義歯を装着したラットを対象として、迷路を用いた記憶学習の変化と海馬における錐体細胞の変化について検討を加えてきた。その結果、抜歯したラットでは水迷路での記憶が低下し、錐体細胞数の減少と変性が認められた。また、抜歯後に義歯を装着して咬合を回復させたラットでは八方向放射状迷路のエラー数が減少することが明らかになった。これらの現象は、錐体細胞の数や形態の変化ですべての説明できるわけではなく、記憶に関連のある神経伝達物質、内分泌系ならびに免疫系などの詳細な検討が必要であると考えられた。

そこで、本研究では記憶学習時に変化の生じる遺伝子を網羅的に解析し、さらに歯牙喪

失ならびに咀嚼回復時におけるそれらの遺伝子の発現量を定量的に観察し、認知症予防に対する歯牙欠損ならびに咀嚼回復の及ぼす影響について検討する研究を発想した。

2. 研究の目的

記憶学習時に海馬に発現する遺伝子をDNA microarray法によって網羅的に解析し、記憶関連遺伝子を解明した。さらに抜歯あるいは抜歯後に義歯によって咀嚼を回復したラットに記憶学習を行わせ、上記の記憶関連遺伝子の経時的発現量を定量PCR法によって観察した。

これらの観察によって、歯牙喪失ならびに咀嚼回復時における記憶関連遺伝子の発現量を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1)学習時に発現の変化する記憶関連遺伝子の同定 (実験1)

実験動物にはウイスター系雄性ラット10匹を用い、無作為に対照群と実験群に分けた。学習群には八方向放射状迷路課題を1日1回5日間行わせ、エラー数の計測を行った。エラー数は一度全身が入ったアームへの全身の再侵入と定義した。5日後の迷路課題終了後に麻酔下にて動物の海馬組織を摘出し凍結保存した。その後、海馬からmRNAを抽出した。

ハイブリダイゼーション用プローブの合成に際しては各群をさらにA, B群に2分し、Cy-3あるいはCy-5によって標識した。対照群Aと実験群Aならびに対照群Aと実験群Bでディスプレイ法によって4種類のハイブリダイゼーションを行った(Rat Ver.3 G2519F, Agilent)。Agilent G2505 Scanner (Agilent)を用いて各遺伝子スポットの蛍光シグナルを数値化した。4枚のアレイ結果から迷路課題時に海馬に発現する遺伝子の同定を行った。

(2) 抜歯あるいは義歯装着後における学習時の遺伝子発現量の解析 (実験2)

実験動物にはウィスター系雄性ラット53匹を用い、上顎臼歯抜歯後に八方向放射状迷路課題を行わせた抜歯学習群、抜歯後に実験用義歯を装着して咀嚼機能を回復させ迷路課題を行わせた義歯装着学習群、抜歯の偽手術のみを行い迷路課題を行わせた学習群の3群に分けた。抜歯ならびに偽手術は7週齢時に行った。義歯装着学習群に対しては抜歯後抜歯窩の治癒を3週間待ち、その後前歯を維持装置とした義歯床を装着した。

八方向迷路課題は49週齢時から開始し、1日1回の課題を7日間行わせ、エラー数の計測を行った。0, 1, 3, 7日後に4~5匹の動物を麻酔下にて屠殺し、脳組織から海馬を取り出し凍結保存した。

その後、組織をホモジナイズ後、専用試薬を用いてmRNAを抽出した。実験1で特定された学習時に発現する遺伝子を対象として、各群における遺伝子発現量をreal time-PCR法によって経時的变化を計測した。

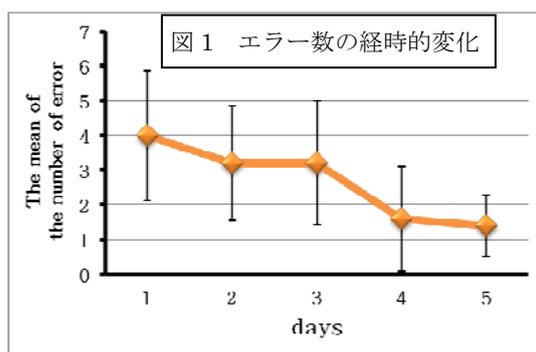
行動学的実験によるエラー数の結果と遺伝子の発現を総合的に判断し、歯牙の喪失ならびに義歯装着による咀嚼機能の回復が記憶学習機能とそれに関連する遺伝子発現について検討した。

なお、本研究は岡山大学動物実験委員会の承認を得て行った (OKU-2009224)。

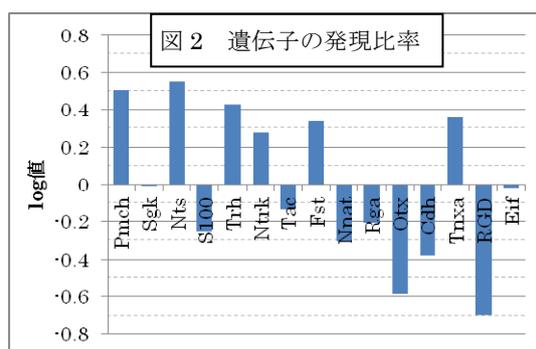
4. 研究成果

(1) 実験1

実験群の学習によってエラー数は減少しており、学習が進行することが示された(図1)。



そこで対照群と実験群から得られたmRNAをDNA microarrayを用いて比較したところ、学習によって96個の遺伝子に2倍以上の増加し、208個の遺伝子に半分以下に減少した。そのうち記憶に関連する遺伝子15個の遺伝子をピックアップし、Real Time-PCRにより差異を評価した(図2)。これらのうち個体差が大きいもの、発現量が少ないものならびに恐怖に関係するものを除外した。

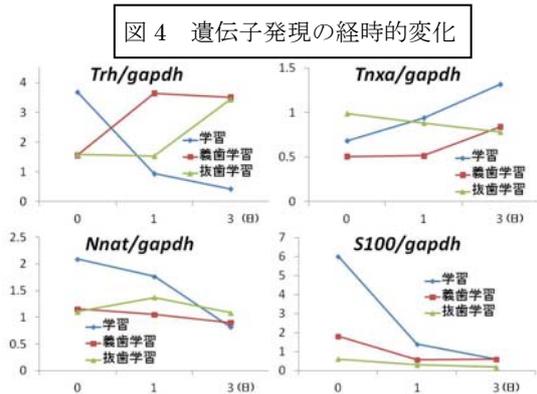
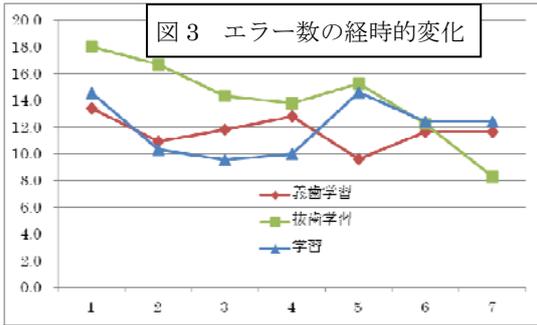


その結果、学習することでラットの海馬においてTrh遺伝子とTnxa遺伝子が増加し、S100a9遺伝子とNnat遺伝子が減少することが明らかとなった。そのため、Trh遺伝子、Tnxa遺伝子、S100a9遺伝子、Nnat遺伝子が記憶形成に関連する可能性が示唆された。

(2) 実験2

行動学的実験結果では実験開始から抜歯学習群は他の2群よりもエラー数が多いことが示された。3日後までは各群ともエラー数が減少傾向を示したが、4日後以降は動物数の減少によりエラー数が増減した(図3)。そこで、real time PCR法による遺伝子発現は0, 1, 3

日後までを対象として計測した。



Trhの発現は学習群では経時的に減少し、抜歯学習群では経時的に増加した。したがって、Trhは記憶学習についての関連は低いことが示された。一方、Tnxaの遺伝子発現はでは学習群と義歯学習群では経時的に増加し、抜歯学習群では減少傾向を示した。Nnatは学習群では経時的に減少し、義歯学習群ならびに抜歯学習群ではあまり変化が見られなかった。S100a9では学習群では減少したが、義歯学習群ならびに抜歯学習群での遺伝子発現の減少程度が学習群に比べて少なく行動学的結果と一致していた (図4)。

これらの遺伝子は記憶形成において重要な役割を果たしていると考えられ、Tn(テネイン)ファミリーのTnrの発現は記憶に関連する報告が見られるが、Tnxaの作用は明確ではない。Nnat遺伝子は過剰発現することで、フェニルケトン尿症患者での認知障害に関連することを示唆されている報告がある。S100a9遺伝子では発現を抑制することでアルツハイマー病治療が可能である可能性があるとの報告

もある。

したがって、本研究の結果からTnxa, NnatならびにS100a9遺伝子は行動学的検討結果と整合性を示し、学習に影響する遺伝子の可能性が示唆された

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)

(1) [学会発表] (計4件)

①Iida S, Araki D, Hara T, Kuroda C, Oka M, Kurozumi A, Kawata K, Sakamoto S, Miyazaki T, Minagi S, Memory-related gene expression in the rat hippocampus by the learning, American Association for Dental Research, 2012.3.22, Tampa, USA

②原 哲也, 黒住明正, 坂本隼一, 飯田祥与, 荒木大介, 黒田知沙, 岡 森彦, 白井 肇, 森 慎吾, 衣田圭宏, 皆木省吾, 咬合支持回復時の空間認知能に対する分散学習の影響, 日本老年歯科医学会, 2011.6.15, 東京

③ Hara T, Kurozumi A, Sakamoto S, Kuroda C, Oka M, Iida S, Araki D, Minagi S, Spaced Training Facilitates Long-term Memory Retention in Molarless Rats, International Association for Dental Research, 2011.3.20, San Diego, USA

④Hara T, Kawata K, Kurozumi A, Oka M, Kuroda C, Shimazu-Kodama C, Sakamoto S, Minagi S, Influence of Molar Loss on Gene Expression in Hippocampus, International Association for Dental Research, 2010.7.17, Barcelona, Spain

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 哲也 (HARA TETSUYA)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授
研究者番号 60238160

(2)研究分担者

中西 徹 (NAKANISHI TOHRU)
就実大学・薬学部・教授
研究者番号 : 30243463
(2009～10)

兒玉千恵 (KODAMA CHIE)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教
研究者番号 50444667
(2010)

(3)連携研究者

河田 かずみ (KAWATA KAZUMI)
岡山大学・歯学部・非常勤研究員
研究者番号 10457228

皆木 省吾 (MINAGI SHOGO)
岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 80190693