

令和 6 年 4 月 26 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K10000

研究課題名（和文）歯根膜刺激が減少すると海馬錐体細胞が減少するメカニズムの解明 青斑を介した伝導路

研究課題名（英文）Mechanism of hippocampal pyramidal cell degeneration by reduced periodontal ligament stimulation: Neural pathway via the locus coeruleus

研究代表者

原 哲也（Hara, Tetsuya）

岡山大学・医歯薬学域・准教授

研究者番号：60238160

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：抜歯して咬合支持が喪失すると、認知機能が低下するメカニズムについて検討した。三叉神経中脳路核の細胞数ならびに認知機能に影響するノルアドレナリン含有ニューロンが集合している青斑核細胞が減少し、脳内アドレナリン量も減少していた。これらの結果から、咬合支持の喪失に伴う認知障害は、脳内ノルアドレナリン量の減少が影響することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって、抜歯によって咬合支持が喪失すると認知機能が低下するメカニズムの一因は、青斑核細胞の減少に伴う脳内ノルアドレナリン量の減少であることが示唆された。これらの結果は、歯を残したり、義歯の使用によって咬合支持を維持することは認知症予防に有効であることを示す科学的根拠の一つとなり、社会的に重要な意義である。

研究成果の概要（英文）：We investigated the mechanism by which cognitive function declines with loss of occlusal support. The number of cells in the mesencephalic trigeminal nucleus and the locus coeruleus cells, where noradrenaline-containing neurons that affect cognitive function are gathered, decreased, and the amount of adrenaline in the brain also decreased. These results suggested that the cognitive impairment associated with loss of occlusal support is affected by a decrease in the noradrenaline amount in the brain.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：ノルアドレナリン 青斑核 咬合支持 認知機能 ラット

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我が国においては高齢者の増加に伴い 2012 年に 462 万人であった認知症高齢者は 2025 年には 700 万人、65 歳以上の高齢者の 5 人に 1 人に達すると見込まれている。アルツハイマー型認知症は認知症の最も多いタイプの重要な原因疾患であり、歯の喪失がアルツハイマー型認知症の疫学的リスクファクターの 1 つであることが報告されている。さらに、残存歯数が多いほど認知機能が高いことや、歯を喪失すると高齢者の日常生活動作が低下することが報告されている。また、我々研究グループにおいても、これまでに上顎臼歯を抜歯したラットでは海馬の錐体細胞数が減少して空間認知能が低下し、咬合支持を回復させると空間認知能の低下を抑制するということを報告した。

このような結果は抜歯によって歯根膜などの感覚が減少して脳への刺激が減少するとした考察が行われているが、三叉神経から記憶に関わる海馬への直接的な神経伝達経路は明確にされておらず、咬合咀嚼能を担う三叉神経系と認知記憶能を担う神経メカニズムとの関連が不明なままである。

青斑核は中枢神経系の中で最も多数のノルアドレナリン (NA) 含有ニューロンが集合しているとともに三叉神経中脳路核に近接している。青斑核ニューロンは、大脳、視床、海馬、小脳、脊髄などほとんどの脳領域に NA 線維を投射する。このような脳全域にわたる広範な支配様式から推測されるように、青斑核は脳全体の機能の調節に関係していると考えられる。また、中枢神経系 NA は覚醒-睡眠やストレスに関する働きをして、記憶や学習などにも影響すると考えられている。

2. 研究の目的

本研究では抜歯によって認知機能が低下するメカニズムを解明することを目的として、抜歯した実験動物における三叉神経中脳路核とそれに近接する青斑核の変化、脳内の NA 量と認知機能の低下との関連性について評価した。

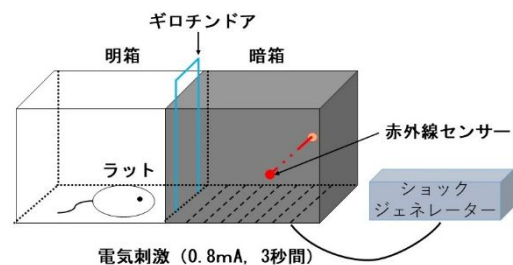
3. 研究の方法

1) 実験動物

実験動物には Wistar 系雄性ラット 14 匹を用い、上顎臼歯を抜歯した臼歯抜歯群 7 匹と対照群の 7 匹に無作為に振り分けた。ラットは 12 時間毎の明暗サイクルの飼育室において硬性飼料および水分を自由摂取できる環境で飼育した。臼歯抜歯群は、7 週齢時に 3 種混合麻酔による腹腔内麻酔を行い、全ての上顎臼歯部を抜歯し、対照群には麻酔のみの偽手術を行った。なお、本研究は岡山大学動物実験委員会の指針に従い同委員会の承認を得て行った (OKU-2019630)。

2) 記憶学習能の評価

受動的回避実験装置は、明箱と暗箱に区切られ、ギロチンドアによって開閉できる構造である (図 1)。暗闇を好むラットが暗箱へ移動したことが赤外線センサーによって感知されると、ショックジェネレーターから床面のグリッドを通して電気刺激 (0.8mA, 3 秒間) が伝わる設定となっている。受動的回避実験は、18 週齢



時から実行し獲得試行と再生試行で構成した。獲得試行においては施行前の 2 分間、ラット

を明箱内周囲の環境に順応させた後、ギロチンドアを開けラットが暗箱に侵入するまでの反応時間を計測した。ラットが暗室に入ったと同時にギロチンドアを閉めて床面のグリッドから電気刺激を与え、電気刺激終了後にギロチンドアを開けてラットを明箱に移動させた。この獲得試行をすべてのラットが明箱に 300 秒待機できるようになるまで試行した。再生試行では電気刺激を与えない点以外は獲得試行と同じ試行を 9 日間行った。再生試行の最大待機時間は 600 秒とした。獲得試行,再生試行は 1 日 1 回とし,実験中は周囲の環境を一定とし,日内変動の影響を最小とするため同時刻に試行した。

3)組織採取

受動的回避実験の最終試行の後,ラットに対してペントバルビタールナトリウム(100 mg/kg)投与による麻酔後に脳組織を摘出して海馬組織と脳幹を採取した。脳幹は青斑核と三叉神経中脳路核の細胞数を計測するため厚さ 40 μm の凍結切片とした。大脳は左右に矢状断し,左側の海馬と大脳皮質を採取して NA 量を測定し,右側は細胞を観察するため厚さ 10 μm の凍結切片とした。

4)ELISA 法による NA 量の測定

海馬組織と大脳皮質は PBS を加えてホモジナイザー(バイオマッシャー :ニッピ)を用いてホモジナイズした後,遠心分離して上清を採取した。採取した上清を 10 倍に希釈して ELISA 法(Rat Noradrenaline ELISA Kit : MyBioSource)を用いて NA 量を測定した。

5)組織学的評価

青斑核の細胞数は NA に特異的な抗体 Anti-Tyrosine Hydroxylase (Sigma-Aldrich), 二次抗体反応には Alexa FluorTM 555 goat anti-rabbit IgG (H+L)(invitrogen)を用いて免疫染色を行い計測した。三叉神経中脳路核と右側背側海馬領域の切片には Nissl 染色を施した。脳幹の凍結切片は 1 枚ごと免疫染色と Nissl 染色とを施し,青斑核の部位を確認しつつ青斑核と三叉神経中脳路核の細胞数を計測した。海馬計測部位は Paxinos and Watson らのラットの脳解剖図譜に示される右側背側海馬 CA1, CA3, 歯状回(DG)領域の縦 150 μm , 横 250 μm の範囲と対象として,この中に存在する神経細胞数を観測した。

6)統計学的分析

統計処理には Mann-Whitney U-test を用いて評価した ($p < 0.05$)。

4. 研究成果

1) 受動的回避実験

受動的回避実験では,2 日目にはすべての動物が明箱に 300 秒待機した。抜歯群の再生試行の 5 日目と 6 日目において明室での待機時間は対照群に比べて有意に短かった(図 2)。このことから対照群と比べて抜歯群では認知機能が低下していた。

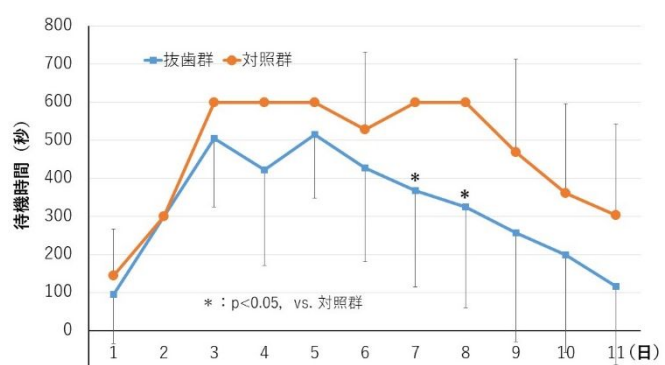


図 2 受動的回避実験の結果

2) 海馬各領域における細胞密度

対照群及び抜歯群の CA1, CA3, DG 領域における組織学所見を図 3 に示す。対照群及び抜歯群におけるそれぞれの神経細胞数(中央値[25%, 75%], 個)は CA1 では 142.0 [131.0, 163.5], 85.5 [78.8, 101.8], CA3 では 122.5 [99.5, 127.0], 89.5 [79.8, 91.0], および DG では 198.5 [167.5, 234.3], 122.0 [101.5, 133.0] で,すべての領域において抜歯群の

方が対照群に比べて有意に低値であった（図4）。

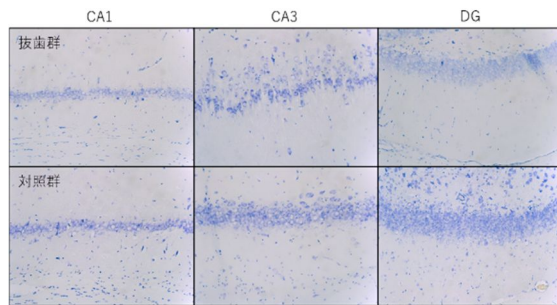


図3 海馬の神経細胞

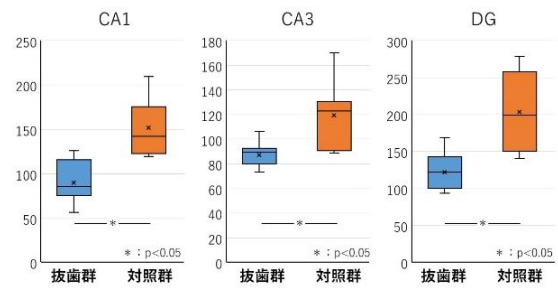


図4 海馬の神経細胞数

3. 青斑核と三叉神経中脳路核における神経細胞密度

青斑核と三叉神経中脳路核の組織所見を図5に示す。青斑核領域における対照群及び抜歯群それぞれの神経細胞数は74.0 [71.0, 93.0], 46.0 [35.5, 58.7], 三叉神経中脳路核領域では29.3 [27.3, 32.5], 21.7 [18.0, 23.3]であり, 双方の領域において抜歯群のほうが対照群よりも有意に低値であった（図6）。

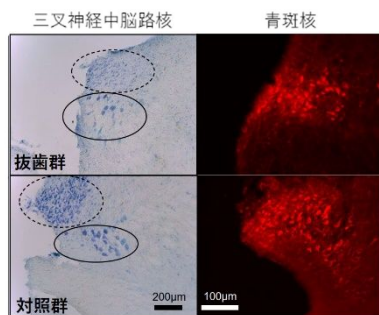


図5 青斑核と三叉神経中脳路核の組織像
実線:三叉神経中脳路核, 点線: 青斑核

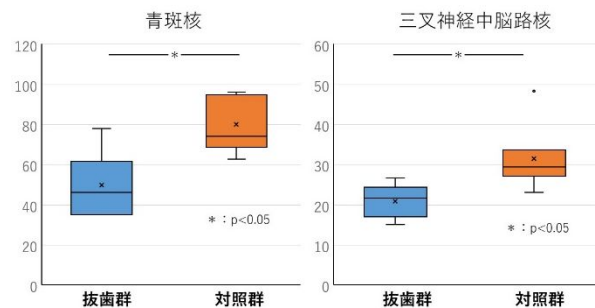


図6 青斑核と三叉神経中脳路核の細胞数

4. 海馬と大脳皮質におけるNA量

対照群及び抜歯群におけるそれぞれのNA量 (pmol / g 組織) は, 海馬では 14.0×10^{-2} [11.9×10^{-2} , 14.5×10^{-2}], 9.1×10^{-2} [7.4×10^{-2} , 10.8×10^{-2}], 大脳皮質では 9.4×10^{-2} [9.1×10^{-2} , 10.3×10^{-2}], 6.9×10^{-2} [6.2×10^{-2} , 7.3×10^{-2}]であった。海馬と大脳皮質のNA量は両群間に有意な差を認めた（図7）。

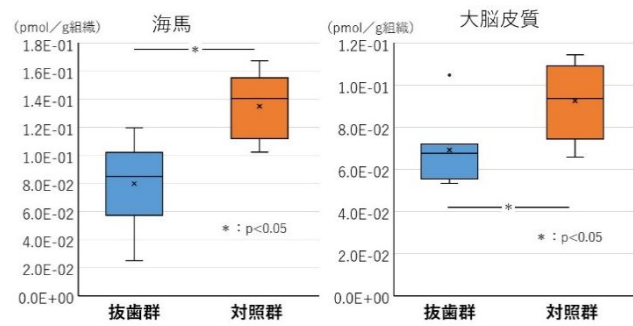


図7 海馬と大脳皮質のNA量

本研究では,ラットを用いて上顎臼歯を抜歯して咬合支持を欠如させると,学習認知機能が低下し,海馬の神経細胞数が減少した。また,三叉神経中脳路核と青斑核の細胞も減少し,海馬および大脳皮質のNA量が減少した。これらの結果から,抜歯に伴う咬合支持の欠如によって歯根膜からの刺激が減少して三叉神経中脳路核の細胞数が減少し,近接する青斑核の細胞数も減少することで,大脳皮質や海馬へ投射するNA量の供給が低下して認知機能が低下する可能性が示唆された。

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 加藤（市川）知香，原 哲也，窪田（山田）知枝，角谷（桑原）実穂，皆木省吾
2. 発表標題 咬合支持の喪失による三叉神経中脳路核と青斑核の変化と認知機能低下のメカニズム
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第132回学術大会
4. 発表年 2023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	桑原 実穂 (Kawahara-Kadoya Miho) (30868287)	岡山大学・医歯薬学域・助教 (15301)	
研究分担者	村上 明日香 (Murakami Asuka) (80885426)	岡山大学・歯学部・博士研究員 (15301)	

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