

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K11707

研究課題名（和文）咀嚼のストレス緩和・血圧抑制効果の制御分子を究明する

研究課題名（英文）Research on the regulatory molecules of the stress-relieving and blood pressure-suppressing effects of mastication.

研究代表者

永井 俊匡（Nagai, Toshitada）

高崎健康福祉大学・農学部・准教授

研究者番号：50451844

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）：報告者らは既に、咀嚼の血圧上昇抑制効果を発見していた。そこで咀嚼による血圧制御メカニズムの解明を目的に、3週齢 Wistar 系雄ラット固形または粉末飼料を与えて、2週間（短期モデル）または15週間（長期モデル）飼育し、生理学・トランスクリプトミクス・生化学的な解析を行った。短期モデルでは自律神経系の変化を生理学およびトランスクリプトミクスの両面から発見した。また海馬についても、トランスクリプトームの変化を見出した。長期モデルでは視床下部-下垂体-副腎軸の関与を、生化学的に明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

咀嚼は非常に広範な生理作用を持つことが知られているが、その議論は現象論にとどまっており、メカニズムは十分に解明されていない。本研究は、トランスクリプトーム解析を中心にメカニズムの全体像を明らかにしようと試みた。血圧上昇抑制効果に着目して解析した結果、自律神経系と内分泌系の両面に咀嚼が影響を与えていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We had already discovered the preventive effect of mastication on blood pressure elevation. To elucidate the mechanism of blood pressure control by mastication, 3-week-old male Wistar rats were fed solid or powdered diets for 2 weeks (short-term model) or 15 weeks (long-term model). In the short-term model, changes in the autonomic nervous system were found in both physiology and transcriptomics. We also found transcriptomic changes in the hippocampus. In the long-term model, the involvement of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis was found biochemically.

研究分野：栄養学

キーワード：咀嚼 血圧 内分泌系 自律神経系 トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

(1) 咀嚼は、食物を噛み砕き、反射的に唾液や消化液の分泌を促進することで、嚥下や消化を助ける役割を果たしている。しかし近年では、食品加工技術の進歩によって食品の軟食化が進み、食生活の変化とともに朝食の欠食と孤食が増加し、更に高齢化も相まって、咀嚼が疎かになっている。現代人の咀嚼回数は、戦前の半分以下しかないというデータもある【文献】。

咀嚼は、非常に広範な生理作用を持つことが知られている。例えば速食いの人はBMIが高い傾向にあり【文献】、また咀嚼回数の増加に伴い、摂食促進ペプチドであるグレリン濃度が減少する【文献】。これらのことから、咀嚼数の増加によって肥満を抑制する効果が示唆されている。その他にも咀嚼は、脳の活性化や老化抑制【文献】、糖尿病治療効果の向上【文献】などが示唆されている。

(2) 上記のような咀嚼の効果は、行動・生理・生化学的な研究が進んでいる一方で、分子レベルでの研究は少ない。したがってこれまでは現象論的な議論にとどまっており、メカニズムの解明には至っていない。

本研究と関連するストレスの緩和作用については、以下のような知見が報告されている。ストレス状態下のラットに物を噛ませると、ストレス誘発性胃潰瘍の抑制や【文献】、ストレスマーカーである血漿コルチコステロンの減少が見られる【文献】。また、マウスに固形飼料を与えると、血中コルチコステロン濃度が低下する【文献】。ヒトに対する試験でも、ガム咀嚼が血中カテコールアミン濃度を低下させる【文献】。

このようにストレスマーカーによる表現型の解析例は多くあるが、その上流で何が起きているか、メカニズムの解明に至った研究はない。

(3)そこで報告者らは、粉末飼料あるいは固形飼料をラットに与えて咀嚼頻度に差をつけ、DNAマイクロアレイによりラット脳内発現遺伝子を網羅的に解析した。その結果、まず15週飼育後のラットで固形飼料による血圧の有意な低下を観察した(図1)。さらに、視床下部において自律神経系や視床下部-下垂体-副腎(HPA)軸による血圧制御が示唆された。

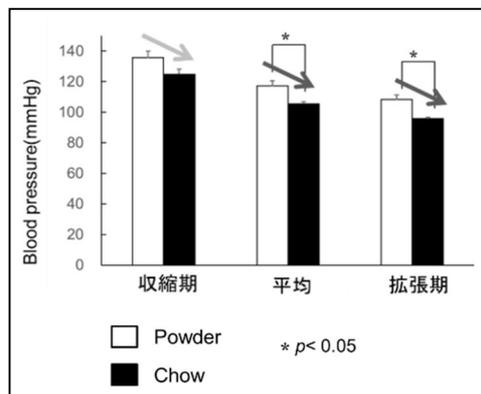


図1 咀嚼の血圧上昇抑制効果

2. 研究の目的

(1) 本研究では、上記(3)の咀嚼による血圧制御メカニズムの解明を目的とした。咀嚼の効果は、上述のように、そのメカニズムに関する知見に乏しい。本研究は、分子論に立脚し、網羅的な遺伝子発現解析を起点に現象と現象とをつなぎ合わせ、これまで見えてこなかったメカニズムの解明を進めた。

3. 研究の方法

(1) 3週齢 Wistar 系雄ラット(日本クレア)に固形または粉末飼料(日本クレア)を与えて15週間飼育し、視床下部の組織と血清・血漿を採取した。視床下部から TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いてトータル RNA を抽出し、さらに RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて精製した。PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio) を用いて cDNA に逆転写し、TB Green Premix Ex Taq II (Takara Bio) を用いて標的遺伝子のリアルタイム PCR を行って、発現量を定量した。

血清および血漿に含まれる各種ホルモンについて、それぞれ対応する ELISA キットを用いて定量した。

(2) 3週齢 Wistar 系雄ラット(日本クレア)にテレメトリー式心電図測定器(TA10ETA-F20、Data Science)を埋め込んでから、固形または粉末飼料(日本クレア)を与えて12日間飼育した。心電図は、給餌等の飼育操作時間帯を除いて、1日当たり24時間リアルタイムに測定した。心拍変動を解析ソフトウェア Labchart Pro (ADInstruments) の Heart Rate Variability モジュールを用いて解析し、高周波数帯パワー値、低周波数帯パワー値、SDRR (Standard Deviation of R-R intervals)、RMSSD (Root Mean Square Successive Difference of R-R intervals) を算出した。

トランスクリプトーム解析のために、3週齢 Wistar 系雄ラット(日本クレア)に固形または粉末飼料(日本クレア)を与えて8日間飼育し、視床下部を採取した。視床下部から TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) を用いてトータル RNA を抽出し、さらに RNeasy Mini Kit (Qiagen) を用いて精製した。GeneChip 3' IVT Plus Reagent Kit (Affymetrix) を用いてビ

オチン化 cRNA を調製し、GeneChip Rat Genome 230 2.0 Array (Affymetrix) に供して DNA マイクロアレイ解析を行った。解析ソフトウェア R (バージョン 2.7.2) による qFARMS 法 (factor analysis method for robust microarray summarization, quantile) を用いてデータを正規化し、Rank Products 解析を用いて発現変動遺伝子 (differentially expressed genes) を抽出した (False Discovery Rate < 0.05)。

(3) 3 週齢 Wistar 系雄ラット (日本クレア) に固形または粉末飼料 (日本クレア) を与えて 12 日間飼育し、10 日目に新奇物体認識試験を、12 日目に Y 字迷路試験を実施した。新規物体認識試験では、まず 2 つの同一の物体 (Familiar Objects) を Open Field に置き、ラットに 5 分間探索させた。30 分後に再びラットを Open Field に戻し、1 つの Familiar Object と 1 つの新規物体 (Novel Object) を 5 分間探索させた。探索行動はビデオ撮影し、2 回の探索期間における Familiar Object と Novel Object それぞれの探索時間を、解析ソフトウェア SMART 3.0 (Bio Research Center Corporation) を用いて算出した。

Y 字迷路試験では、ラットに迷路内を 8 分間探索させ、うち最初の 5 分間をビデオ撮影した。Y 字の各アームへの進入回数を計数し、交替行動率を算出した。

ニューロンの形態解析のために、3 週齢 Wistar 系雄ラット (日本クレア) に固形または粉末飼料 (日本クレア) を与えて 8 日間飼育した。ラットにイソフルラン (富士フィルム和光純薬株式会社) 麻酔下で 0.9% 生理食塩水を灌流し、脳を切除して海馬を含むブロックを摘出した。SuperGolgi Kit (Bioenno Lifesciences) と Vibratome VT1000S system (Leica Biosystems) を用いて、ブロックを薄切およびゴルジコックス染色し、プレグマから -3.80 ~ -4.52 mm の位置の海馬 CA1 領域を、LSM 700 ZEN microscope (Carl Zeiss) で観察した。画像を NeuroLucida 11.0 (MBF Bioscience) を用いて解析し、樹状突起とスパインをトレースした。

トランスクリプトーム解析は、(2) の視床下部と同様に行った。

(4) 3 週齢 Wistar 系雄ラット (日本クレア) に固形または粉末飼料 (日本クレア) を与えて 5 週間または 10 週間飼育し、最終週に非観血式自動血圧測定装置 (BP-98A-L、株式会社ソフトロン) を用いて、血圧を tail-cuff 法で測定した。その後、血清を採取し、ACTH EKISA Kit (MD Biosciences) を用いて副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) 濃度を定量した。

4. 研究成果

(1) 15 週飼育したラットの視床下部遺伝子のうち、自律神経系や HPA 軸に関連するものをリアルタイム PCR で発現解析した。その結果、Neuromedin U (Nmu) および Arginine vasopressin (Avp) の発現が、固形飼料群で低下することが明らかになった。Nmu は、ストレスにตอบสนองして Avp の発現を誘導する [文献]。このことから、咀嚼が Nmu の発現低下を介して Avp の発現を低下させることが示唆された。

さらに Avp は、ACTH の血中への放出を誘導する [文献]。そこで ACTH の血中濃度を測定したところ、固形飼料群で有意な低下が観察された。以上の結果から、固形飼料によって咀嚼頻度が高くなると、視床下部の遺伝子発現変動を介して HPA 軸が抑制され、血圧が低下することが示唆された。

血圧の制御には、HPA 軸以外にも自律神経系の直接的な関与、血中カテコールアミンによる心拍変動・血管収縮作用、血中バソプレシンによる抗利尿作用などが寄与している。そこでバソプレシンやカテコールアミンの血中濃度を解析したが、これらのホルモンレベルに群間差はなかった。すなわち、これらの血圧制御系は咀嚼による影響を受けていないことが考えられ、HPA 軸による制御の寄与が大きいことが、より強く示唆された。

(2) 自律神経系への咀嚼の効果について、15 週飼育ラットでは、視床下部遺伝子の発現変動を観察はしていたものの、実際の自律神経活動を解析してはいない。そこでまず 2 週間飼育ラットの心拍変動を解析した。その結果、固形飼料群のラットは、飼育 11 日目の心拍数が有意に低くなることを発見した (図 2)。

心拍変動を時系列解析および周波数解析し、自律神経活動を表すいくつかのパラメータを確認したところ、副交感神経マーカーである高周波数帯パワー値と RRSMD が、固形飼料群で高かった。すなわち、少なくとも 2 週間飼育ラットでは、咀嚼が副交感神経系の活動を促進することが示唆された。

視床下部の遺伝子発現についても、交感神経系の活性化に關する Avp, cocaine-amphetamine regulated transcript prepropeptide (Cartpt), corticotropin-releasing hormone (Crh), thyrotropin-releasing hormone (Trh) が、固形飼料群で発現低下することを、

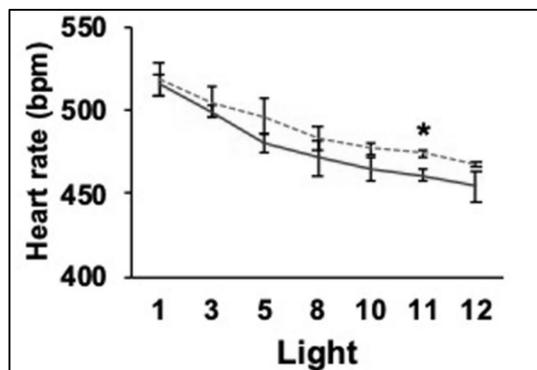


図 2 咀嚼の心拍数への効果 (明期) 破線: 粉末飼料群、実線: 固形飼料群 横軸は飼育日数 (day) *: $p < 0.05$

DNA マイクロアレイ解析で見出した。

(3) 海馬は、自律神経系や HPA 軸の中枢ではないが、HPA 軸の下流因子である糖質コルチコイド (ラットではコルチコステロン) によるフィードバックを受ける。2 週間飼育ラットの記憶能力に関連する行動試験を行ったところ、新奇物体認識試験では、固形飼料群では見慣れた物体よりも新奇な物体に対して有意に大きな弁別指数を示したが、粉末飼料群では弁別指数に有意な変動はなかった (図 3)。さらに Y 迷路試験では、固形飼料群は記憶能力の指標である交替行動率が有意に高くなった (図 4)。

海馬 CA1 領域のニューロンの形態を解析すると、固形飼料群のラットは apical 側の樹状突起の枝数が多く、basal 側の樹状突起のスパン密度が大きかった。このことから、咀嚼が海馬ニューロンの形態形成に影響を与えることが示唆された。DNA マイクロアレイ解析でトランスクリプトーム解析を行ったところ、予想通り樹状突起の成長に関連する遺伝子の多くが、固形飼料群の成長促進を支持する方向に発現変動していた。

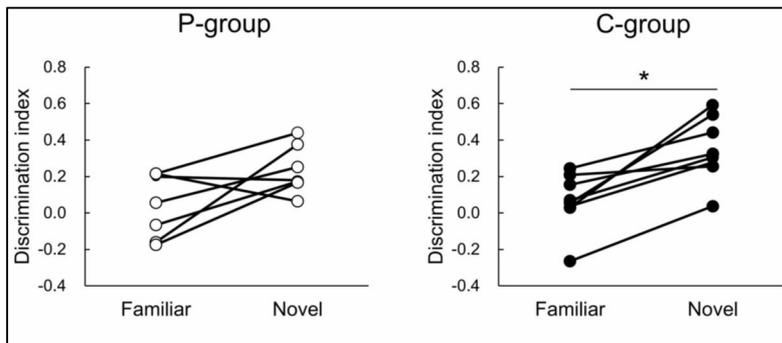


図 3 咀嚼の記憶能力に対する効果 (新規物体認識試験)
P: 粉末飼料, C: 固形飼料
*: $p < 0.05$

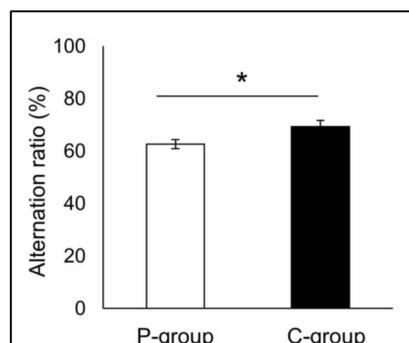


図 4 記憶能力 (Y 字迷路)
P: 粉末飼料, C: 固形飼料
*: $p < 0.05$

(4) これまでは1-2週間飼育の幼若ラットモデル、および15週飼育による成獣モデルを解析し、自律神経系および内分泌系の変化に共通点と相違点があることを見出してきた。そこで幼若ラットと成獣ラットにおける咀嚼の効果には連続性があるのかを明らかにするため、その間の期間に当たる成長期モデルの解析に着手した。本研究期間では、まず予備的な検討として、5 週飼育 ($n=5$) および 10 週飼育 ($n=5$) を行い、それぞれの粉末飼料群と固形飼料群とを比較した。しかし血圧と血清 ACTH 濃度について、両群の間に有意な差はなかった。ただしラットは、成長に伴って血圧が上昇することが知られている [文献]。したがって、成長による血圧の個体差が大きく、今回の試験では統計解析に十分な個体数が得られなかったと考えられた。

< 引用文献 >

- 齋藤滋. 咀嚼とメカノサイトロジー. 咀嚼システム入門 (1987) 風人社, 115-129.
- Otsuka R, Tamakoshi K, Yatsuya H, *et al.* Eating fast leads to obesity: findings based on self-administered questionnaires among middle-aged Japanese men and women. *J Epidemiol* (2006) 16, 117-124.
- Li J, Zhang N, Hu L, *et al.* Improvement in chewing activity reduces energy intake in one meal and modulates plasma gut hormone concentrations in obese and lean young Chinese men. *Am J Clin Nutr* (2011) 94, 709-716.
- Onozuka M, Fujita M, Watanabe K, *et al.* Age-related changes in brain regional activity during chewing: a functional magnetic resonance imaging study. *J Dent Res* (2003) 82, 657-660.
- Hashimoto K, Matsuda H, Takada K, *et al.* Study of the Relation between Mastication and Insulin Secretion. *J Jpn Soc Masticatory Sci Health Promotion* (2004) 14, 23-28.
- Vincent GP, Paré WP, Prenatt JED, *et al.* Aggression, body temperature, and stress ulcer. *Physiol Behav* (1984) 32, 265-268.
- Miyake S, Yoshikawa G, Yamada K, *et al.* Chewing ameliorates stress-induced suppression of spatial memory by increasing glucocorticoid receptor expression in the hippocampus. *Brain Res* (2012) 1446, 34-39.
- Tsuchiya M, Niiijima-Yaoita F, Yoneda H, *et al.* Long-term feeding on powdered food causes hyperglycemia and signs of systemic illness in mice. *Life Sci* (2014) 103, 8-14.
- Suzuki M, Shibata M, Sato Y. Energy Metabolism and Endocrine Responses to Gum-Chewing. *J Jpn Soc Masticatory Sci Health Promotion* (1992) 2, 55-62.

Wren AM, Small CJ, Abbott CR, *et al.* Hypothalamic actions of neuromedin U. *Endocrinol* (2002) 143, 4227-4234.

Gillies GE, Linton EA, Lowry PJ. Corticotropin releasing activity of the new CRF is potentiated several times by vasopressin. *Nature* (1982) 299, 355-357.

Okamoto K, Aoki K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* (1963) 27, 282-293.

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 2件）

1. 著者名 Yasuoka Akihito, Nagai Toshitada, Lee Seonmi, Miyaguchi Hitonari, Saito Yoshikazu, Abe Keiko, Asakura Tomiko	4. 巻 16
2. 論文標題 Mastication stimuli enhance the learning ability of weaning-stage rats, altering the hippocampal neuron transcriptome and micromorphology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Behavioral Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1006359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnbeh.2022.1006359	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Lee Seonmi, Tochinai Ryota, Yasuoka Akihito, Nagai Toshitada, Saito Yoshikazu, Kuwahara Masayoshi, Abe Keiko, Asakura Tomiko	4. 巻 17
2. 論文標題 Mastication stimuli regulate the heartbeat rate through rhythmic regulation by the hypothalamic-autonomic system; molecular and telemetric studies in weaning-stage rats	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Frontiers in Neuroscience	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnins.2023.1260655	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 李善美、栃内亮太、安岡顕人、永井俊匡、斎藤芳和、桑原正貴、阿部啓子、朝倉富子
2. 発表標題 離乳期ラットにおいて咀嚼刺激が視床下部-下垂体系を介して心拍動の制御に及ぼす影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Nagai T, Ogawa M, Saito Y, Miyaguchi H, Yasuoka A, Abe K, Asakura T
2. 発表標題 Mastication stimuli during weaning period upregulate GABAergic signalling and reduce dendritic spine in thalamus
3. 学会等名 Food Oral Processing 2021. Valencia & Online. 2021/07/12（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 永井俊匡
2. 発表標題 長期間の咀嚼は視床下部の遺伝子発現の変化と血圧の低下をもたらす
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度関東支部例会「日本農芸化学会2021年度大会トピックス賞受賞講演」、オンライン、2021/11/27（招待講演）
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>永井 俊匡 高崎健康福祉大学 研究者情報データベース https://research.takasaki-u.ac.jp/Main.php?action=profile&type=detail&tchCd=0000001316</p>
--

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	朝倉 富子 (Asakura Tomiko) (20259013)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・特任研究員 (12601)	
研究分担者	清水 愛恵 (Shimizu Manae) (30816343)	高崎健康福祉大学・健康福祉学部・助手 (32305)	
研究分担者	豊田 集 (Toyoda Tsudoi) (70808998)	高崎健康福祉大学・農学部・助手 (32305)	

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