

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 25 年 6 月 30 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22592334

研究課題名（和文）咀嚼刺激による脳由来神経栄養因子を介した生活習慣病抑制効果に関する研究

研究課題名（英文）Study on control effect of the lifestyle-related disease through the BDNF factor by the chewing stimulation

研究代表者

河原 和子 (KAWAHARA KAZUKO)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・助教

研究者番号：20034209

研究成果の概要（和文）：

習慣的咀嚼負荷の差異が耳下腺の糖代謝ならびに脂質代謝関連遺伝子の転写レベルに影響する可能性を、マウスにおいてマイクロアレイ解析によって示唆した。肥満糖尿病マウス並びに正常マウスのそれぞれを2群に分けて、同一組成の固形飼料あるいは粉末飼料で飼育し、耳下腺サンプルを採取した。肥満糖尿病マウスでは搭載遺伝子の約35%、また同系統の正常マウスの耳下腺では約60%の遺伝子の転写レベルにおいて、飼育飼料間で統計学的な差が認められた。有意差が認められた遺伝子の転写レベルは、いずれも固形飼育>粉末飼育であった。

研究成果の概要（英文）：

DNA microarray analyses were performed to examine a possibility whether difference in the habitual-chewing-load would affect expression of genes that linked to the glucose and lipid metabolism using mice.

In a comparison between groups of pellet feeding and powdery feeding, of which components were the same, parotid gland from the obese diabetes mice showed significant difference in the mRNA level in 35% of 194 genes installed to the chip, and ones from the normal mice about 60%. Each genes which showed a significantly different transcription level between the feeding groups, signals of pellet feeding group were higher than ones of powder feeding group.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：口腔衛生学、予防歯科学、口腔・消化管免疫学

科研費の分科・細目：歯学 社会系歯学

キーワード：咀嚼 肥満 糖尿病 BDNF 唾液腺 DNAチップ

1. 研究開始当初の背景

日本の国民医療費は増大傾向を続け、平成20年度は、歯科診療、薬局調剤、入院食事・生活、訪問看護に要した医療費を除いた一般

医療費は26兆円であり、そのうち8.4兆円が生活習慣病に対する医療費であった。この年の予算は83兆円なので、生活習慣病の診療費は国家予算の10%に相当する額に昇る。

いっぽう平成 21 年度の国民の就労状況は、就学生を除く 15-64 歳の労働人口のうち 32% は非正規雇用であり、生活困窮者が増加している。生活習慣病の抑制は、国民にとっても国にとっても大きな課題である。

よく噛むことは健康によい」という言葉は広く世間に浸透している。咀嚼と生活習慣病との関わりについては専ら、「食事の咀嚼刺激が満腹中枢に働きかけて食欲を抑制する」という卓越したヒスタミン機構の研究から語られ、これ以外の明確な機序や具体的な病態への関わりについての報告はほとんど見あたらない。

近年、過食症患者では脳由来神経栄養因子 (BDNF) の血中レベルが低いことや、BDNF 投与によって体重が減少することが明らかにされる一方で、咀嚼刺激が脳海馬の BDNF 発現を促すことや、ストレス下のマウスに棒かじりさせると顎下腺 BDNF 発現が増強するとの報告が相次いで発表されことから、咀嚼による肥満制御に関わる新たな糸口になるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

研究の背景で述べた社会環境の持続が予測され、高額医療の開発が進むなかで、費用がかからずベッド上で暮らすひとでも行える咀嚼を生活習慣病等の対策に活かすことの意義は小さくない。本研究の目的は、咀嚼について、食物の剪断とこれから派生する食物の消化促進以外の新たな健康効果の機序と生活習慣病の病態への効果事象を見いだすことであった。

3. 研究の方法

(1)咀嚼に関連する組織での BDNF 受容体の発現や、食事的な咀嚼による BDNF の体液中への分泌状況を調べた。

①BDNF 特異受容体の歯周靭帯における発現
ラット臼歯より得た歯周組織を 4%PFA で固定して、10%EDTA にて脱灰標本作製し、BDNF 特異受容体 *trkB* に対する免疫染色を実施した (ウサギポリクロナル抗体、サンタクルツ、USA カリフォルニア)。対照染色には、特異抗体に換えて同じタンパクレベルに調製したウサギ IgG を用いた。

②咀嚼による血液、唾液中への BDNF 分泌の可能性について

19-30 才の健康な男女 25 名をボランティアとして、咀嚼刺激群 20 名においては安静時、20 分の無味ガム咀嚼時咀嚼間の開始時と終了時の 3 時点で 3 分間唾液を採取した。このうちの 11 名では留置針を用いて、開始前、

咀嚼終了直後と終了後 30 分の 3 時点で血漿用採血管に採血した。対照群 5 名は咀嚼はしないが、咀嚼群の要領で唾液と血液をサンプリングした。BDNF 濃度測定には市販 ELISA キット (プロメガ社) 並びに検出抗体結合ビーズを用いるマルチプレックス分析機 (ミリポア社) による測定を実施した。なお本試験は食後 2h 以上を空けて午前中に安静座位で実施した (本学倫理委員会承認 288)。

(2)異なる咀嚼負荷飼育マウスの唾液腺に対する DNA マイクロアレイ解析
(目的:咀嚼が影響する生活習慣病の病態事象の探索)

①マウス

肥満・糖尿病マウス (以下肥満マウス)、同系統の非肥満マウス (正常マウス) のみ。

②飼育飼料

MF 固形飼料ならびに同一組成の粉末飼料 (オリエンタル酵母)

③飼育法

頒布が開始される 8 週齢の肥満マウス並びに正常マウスのそれぞれを 2 群に分けて、固形飼料あるいは粉末飼料で 3 ヶ月間飼育し、定期的に随時血糖検査と尿糖検査を実施した。

④サンプリング

前夜から 16 時間絶食させたマウスに間隔をおいてブドウ糖液を体重 1kg 当り 1g を腹注投与し、所定の時間に体重 1g 当たり 80 μ g の麻酔薬ソムノペンチルを投与した。痛覚反応の消失を確認できた時点で開腹し、PBS によって還流失血死させて対象組織を採取し、直ちに液体窒素にて凍結した。

動物実験は広島大学倫理委員会の審査を受けている (承認番号 A10-103)。

⑤RNA 抽出

RNA Later Ice (アンピオン) で前処理し、RNA Easy Mini (キアゲン) にて抽出した。

⑥DNA マイクロアレイ分析

マウスメタボリックチップ (ジェノパール、三菱レイヨン) を用い、チップ反応一基礎データ取得は同社研究所にて実施された。

⑦解析

ジェノパール専用解析ソフト (ダイナコム) による。なおマイクロアレイ分析には、各群 3-4 匹由来のサンプルを用いた。

4. 研究成果

(1)

①BDNF 特異受容体の歯周靭帯における発現

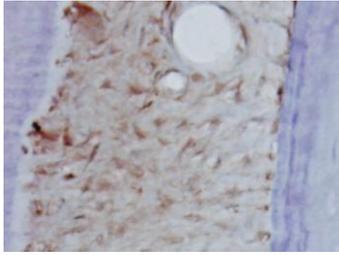


図1 ラット臼歯歯周靭帯の trkB 染色

セメント質(左)表面の2個の神経小体様、管腔周囲血管細胞、歯槽骨(右)表面に並ぶ骨芽細胞が陽性を呈しているほか、セメント質と歯槽骨間の線維芽細胞様細胞にも多数の陽性細胞が認められた。咀嚼は刺激局所においても、BDNF ならびに神経栄養因子との関係が深いことが示唆された。なおネガティブコントロール染色では同様のシグナルは示されなかった。

②咀嚼による血液、唾液中への BDNF 分泌の可能性について

ELISA キットでは感度が低く、唾液では検出限界未満であった。感度が高いといわれるマルチプレックス分析機による測定を実施したところ、唾液サンプルでは 2.5 -10.0 pg/ml の濃度が示された。

血漿サンプルの BDNF レベルは個人差が大きく、また3時点の血漿 BDNF レベルに有意差は認められなかった ($p < 0.05$, 多重比較 Dunnett 法)。また5名の非咀嚼被験者の血漿濃度も3時点に変動がみられたことから、普通の生活環境下でも潜在的な BDNF 分泌要因が存在する可能性があると考えられた。

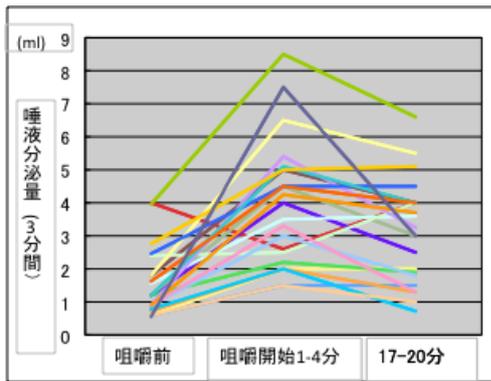


図2 無味ガム咀嚼 20名の唾液分泌量

(2) 習慣的咀嚼負荷を異にするマウスの耳下腺、顎下腺における糖・脂質代謝関連遺伝子の転写について

肥満や糖尿病患者では唾液腺、特に耳下腺に脂肪蓄積が見られやすいことが報告され

ている。咀嚼刺激に応答することが明白な唾液腺(例:図2)では、咀嚼負荷の違いがエネルギー代謝に影響する可能性も考えられる。そこで習慣的咀嚼負荷の差異による耳下腺と顎下腺の糖・脂質代謝への影響について、DNA マイクロアレイ解析によって検討した。

使用した DNA チップは、検査や診断への使用を目的として、特定の機能に関連する遺伝子群から数百個程度のプローブを選択してセットとしたもので、マウスメタボリックチップでは、シグナルのキャリブレーション用遺伝子を含めて 194 種を搭載している。

①固形飼料飼育マウスと粉末飼料飼育マウスから採取したサンプルの遺伝子転写レベルの比較

顎下腺では固型飼料飼育マウスと粉末飼料飼育マウス間の比較では転写レベルに有意差 ($p < 0.05$) のある遺伝子は認められなかった。しかし耳下腺では、固形飼料と粉末飼料の飼育群間において多数の遺伝子が転写レベルに有意差を示した。正常マウスで 110 種余、肥満マウスで 70 種余の遺伝子の発現レベルに有意差が認められ(図3)、有意差のあった遺伝子では、シグナルの平均値はいずれも固型飼料飼育 > 粉末飼料飼育であった。

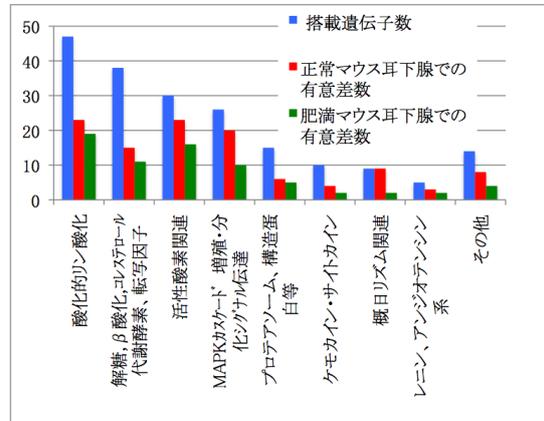


図3 ジェノパール・マウスメタボリックチップの搭載遺伝子の構成、及び飼育飼料の異なるマウスの耳下腺間で転写レベルに有意差を示した遺伝子数(グラフの縦軸は遺伝子数)

本研究によって、習慣的咀嚼負荷の差異が耳下腺の糖代謝ならびに脂質代謝に関連する様々な機能の遺伝子転写に影響する可能性が示唆された。昨今、唾液腺に対して、糖代謝あるいは脂質代謝という広い網かけをした研究は少ない。しかし生活習慣病患者の多くは高血糖および高脂血症を抱えている。唾液腺の脂肪化に対する咀嚼を考えるに当

たって、市販メタボリックチップでスタートすることはユニークかつ妥当であったと考える。なお Pub Med 検索では、まだ唾液腺に対してマイクロアレイ解析を実施した報告は見あたらなかった。

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)

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Takeda K, Sakai N, Shiba H, 他 11 名中 9 th, Kawahara, K. Characteristics of High Molecular Weight Hyaluronic Acid as a BDNF Scaffold in Periodontal Tissue Regeneration. 査読あり、Tissue Eng Part A. 2011;17(7-8):955-67

[学会発表] (計 2 件)

1. 河原和子、異なる咀嚼負荷飼育マウスの唾液腺に対する DNA チップ解析、第 55 回歯科基礎医学会学術大会 2013/9/21, 22, 岡山 (発表確定)
2. 河原和子、広島大学歯学科 4 年生における基礎的食材知識について、第 31 回日本歯科医学教育学会総会・学術大会、2012/7/20, 21, 岡山

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

河原 和子 (KAWAHARA KAZUKO)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
助教
研究者番号：20034209

(2) 研究分担者

二川 浩樹 (NIKAWA HIROKI)
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・
教授
研究者番号：10228140

牧平 清超 (MAKIHIRA SEICHO)
広島大学・大学院医歯薬学総合研究科・
准教授
研究者番号：80304450
(H22 年度のみ)

(3) 連携研究者

()

研究者番号：