

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K17282

研究課題名（和文）歯科的認知症予防を目指した歯根膜由来Wnt familyの中樞神経保護作用の解明

研究課題名（英文）CNS Protective Effects of Periodontal Ligament-derived Wnt Family for the Prevention of Dental Dementia

研究代表者

高橋 かわり（Takahashi, Kaori）

東北大学・歯学研究科・助教

研究者番号：50888089

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：口腔機能の低下と認知機能の低下との関連性を示す報告は多く存在するが、その分子生理学的機序は未解明である。本研究は、歯根膜細胞に生理的な咀嚼運動を模倣した機械刺激を負荷し産生されるWnt5aの産生経路の同定と神経に対する生理機能の検討を行った。その結果（1）機械刺激を受けた歯根膜内でMEK1/2やPI3Kのシグナル経路が働きWnt5aが産生分泌されること、（2）三叉神経節細胞の軸索突起の長さ、分岐数、突起数が増加すること、（3）三叉神経節中脳路核細胞の生存・維持に機能することが分かった。本研究により、口腔組織由来因子が神経細胞の生存・維持、および分化を直接的に調節する機序の一端が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔機能の低下と認知機能の低下との関連性を示す研究は多く存在するが、口腔組織が直接神経細胞を調節する機序は不明であった。本研究により、生理的な咀嚼運動を模倣した機械刺激を負荷された歯根膜細胞から産生される液性因子が神経細胞の分化・生存・維持を調節する機能がある事が明らかになった。本研究で得られた成果は、歯科的認知症予防法の開発基盤に繋がる事が期待される。

研究成果の概要（英文）：Although many reports suggest a link between poor oral function and cognitive decline, the molecular physiological mechanism of this link is still unclear. In this study, we identified the pathway of Wnt5a production by mechanical mechanical stimulated periodontal ligament cells mimicking physiological mastication and investigated the physiological function of Wnt5a on nerves. The results showed that (1) Wnt5a is produced and secreted by the MEK1/2 and PI3K signaling pathways in the periodontal ligament upon mechanical stimulation, (2) the length, number of branches, and number of projections of axonal processes of trigeminal ganglion cells increase, and (3) Wnt5a functions in the survival and maintenance of the trigeminal ganglion midbrain tract nucleus cells. This study reveals one aspect of the mechanism by which oral tissue-derived factors directly modulate neuronal survival, maintenance, and differentiation.

研究分野：歯科薬理学分野

キーワード：歯根膜 三叉神経 三叉神経中脳路核 Wnt family

1. 研究開始当初の背景

2019年国民生活基礎調査によると認知症が要介護の第一位となった。認知症に関する効果的な治療(予防)法を開発する事は健康寿命の延長(SDGsの目標)に繋がる。認知症の60%を占めるアルツハイマー(AD)病の根本的治療法はまだない。AD病患者の約半数は軽度認知症(MCI)患者由来であり、MCIに対する予防介入は効果的にAD病への進行を予防するので重症化予防の点で極めて重要である。多くのコホート研究では、「口腔機能の低下は認知症の発症および認知機能の低下と関連する」と報告されている(Fereshtehnejad SM, et al. *Alzheimers Dement.* 2018; 14: 10-19., Delwel S, et al. *Clin Oral Investig.* 2018; 22: 93-108.)が、口腔機能低下と認知症の関連を直接的に示す分子生理学的メカニズムの報告はまだない。アルツハイマー型認知症の初期において青斑核(LC)領域では神経細胞死が盛んに起きることが近年報告された(Tanaka H, et al. *Nat Commun.* 2020; 11: 507.)。更にマウス抜歯モデルによって三叉神経中脳路核(Me5)細胞やLC細胞が減少する報告(Kimoto A. *Kokubyo Gakkai Zasshi.* 1993; 60: 199-212, Goto T, et al. *J Alzheimers Dis.* 2020; 76: 1443-1459.)もある。LCの隣にはMe5が存在することから、両者は互いにクロストークしている可能性が高い(Phillips MI, et al. *Regul Pept.* 1993; 44: 95-107., Takahashi T, et al. *Neurosci Res.* 2010; 68: 103-106.)。研究代表者らの予備検討で、機械刺激を受けた歯根膜細胞でWnt5aが産生増強される結果を得ていたことから、研究代表者は機械刺激を负荷された歯根膜から産生されるWnt5aを中心とした液性因子が供給されることでMe5の機能が維持され、LCの生存が調節されている、という仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究では生理的な機械刺激を受けた歯根膜由来液性因子による中枢神経の保護作用を検討する。具体的には、「生理的な機械刺激を负荷された歯根膜から産生されるWnt5aを中心とした液性因子が供給されることでMe5細胞の機能が維持され、隣接するLC細胞の生存が調節されている」という仮説を立て、(1)伸展刺激を负荷した歯根膜細胞から産生・分泌される液性因子の同定とその産生経路について、(2)機械刺激负荷歯根膜由来液性因子群が神経細胞の分化・生存・維持に関与するか、(3)伸展刺激後の歯根膜細胞上清培地に含まれるどの液性因子が神経細胞に機能したか、(4)生体内でもMe5に同定した液性因子は供給されているか、を検証する。

3. 研究の方法

(1) 機械刺激负荷歯根膜細胞が産生する神経栄養因子・軸索ガイダンスタンパク質の定量的解析
ラット歯根膜(Wistar rat, 5-6週齢、雄)より歯根膜初代培養細胞(rPDL)を樹立し、シリコンチャンパーに播種し、rPDLに15%、0.5 Hzで伸展刺激を负荷し、qPCR法、ELISAにより候補神経栄養因子・軸索ガイダンスプロテインのmRNA、タンパク質を定量化する。

(2) 機械刺激负荷歯根膜上清培地による神経細胞の生存・維持作用評価
歯根膜由来液性因子群が神経細胞の生存・維持に関与するかを明らかにする目的で、機械刺激负荷歯根膜細胞の上清培地で三叉神経節(TG)細胞とMe5細胞(C57BL/6Jマウスから単離)の培養を行い、コントロール(機械刺激をかけない歯根膜細胞上清培地)と比較し細胞の数、軸索突起の長さ、分岐数の増減を評価する。

(3) 機械刺激负荷歯根膜細胞が分泌する神経保護作用物質の同定
候補タンパク質の中和抗体を機械刺激负荷歯根膜上清培地に添加し、三叉神経節(TG)細胞とMe5細胞(C57BL/6Jマウスから単離)の培養を行い、コントロール(機械刺激をかけない歯根膜細胞上清培地)と比較し細胞の数、軸索突起の長さ、分岐数の増減を評価する。

(4) LC領域の候補タンパク質の定量的解析
口腔機能低下モデルマウスとして、C57BL/6Jマウスの片側の大白歯を抜歯し咬合不全の状態を作成し、1か月後のLC領域の該当タンパク質量をELISAにて定量化する。

4. 研究成果

機械刺激を受けた歯根膜由来液性因子による中枢神経の保護作用を検討することを目的として、機械刺激の有無が歯根膜細胞の産生する神経栄養因子や軸索ガイダンスプロテインにどう影響するか、特に産生量の変化や神経細胞への作用に着目してin vitro、in vivoの両面から定性的・定量的解析を行った。(1) rPDL細胞に15%、0.5 Hzで伸展刺激を负荷した結果、NGF、BDNFなどの神経栄養因子群はmRNAの発現量に変化はみられなかったが、Wnt5aは機械刺激により時間依存的に有意にmRNAが増加することを見出した(図1)。

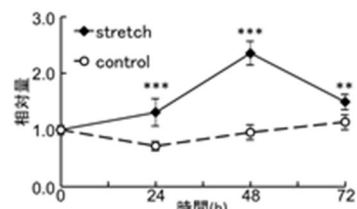


図1: 機械刺激负荷によるWnt5a産生量の経時的増加

LY294002 (PI3K inhibitor) または U0126 (MEK 1/2 inhibitor) を適用して rPDL に 15%、0.5 Hz で 48 時間伸展刺激を負荷した結果、Wnt5a の mRNA の発現量は有意に抑制された(図 2)。しかしながら JNK (c-Jun N-terminal kinase) の阻害薬である SP600125 では抑制されなかった。以上の事から、**歯根膜が機械刺激を受けると、歯根膜内で MEK1/2 や PI3K のシグナルカスケードが働くことで Wnt5a の産生量が増加することが明らかになった。**(2) 伸展刺激後の rPDL 上清培地を mTG に添加したところ、伸展していない上清培地を添加した mTG に比べ神経突起の有意な伸長が見られた。この伸長作用が Wnt5a によるものなのか、を明らかにするために Wnt5a 中和抗体を培養液中に添加して mTG を培養したところ、神経突起の伸長が有意に抑制された(図 3)。(3) Me5 細胞においても(2) と同様の結果を得たことから**機械刺激負荷歯根膜から産生分泌された Wnt5a は TG 細胞、Me5 細胞に対する分化促進作用・保護作用をもつことが明らかになった。**(4) C57BL/6J マウスの片側の大白歯を抜歯し咬合不全の状態を作成した口腔機能低下モデルマウスにおいて、抜歯後 1 か月時点での LC 領域の Wnt5a 量を ELISA にて定量解析した。抜歯側 LC 領域は非抜歯側 LC 領域と比較して、Wnt5a 量の減少が認められた。LC 領域にある Wnt5a の由来の特定のためには今後更なる検討が必要であるものの、これらの結果より**歯根膜細胞が生理的な機械刺激を負荷されると、Wnt5a の産生が増強され、産生・分泌された Wnt5a には神経細胞に対し分化作用や保護作用を有することが示唆された。**更に口腔機能低下モデルマウスにおいて、有意な LC 領域での Wnt5a 量の減少が生じたことから、**LC 領域における正常な Wnt5a 量を保つためには少なくとも生理的な咬合圧を感知できる歯根膜を有する歯がある事が必要である事が明らかになった。**本研究により、生理的な機械刺激を受けた歯根膜由来液性因子による中枢神経の保護作用の一端が明らかになった。本研究で得られる成果は、認知機能障害・認知症の歯科的な予防法につながる事が期待される。

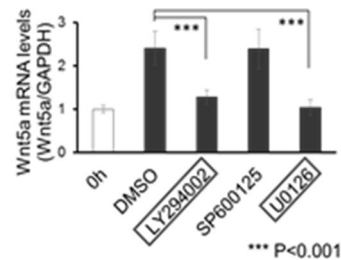


図 2: Wnt5a 産生シグナル経路同定実験

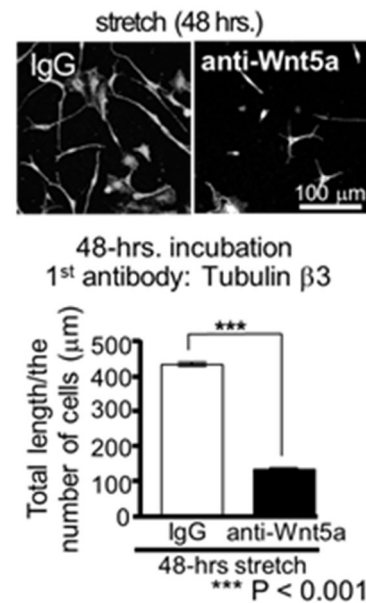


図 3: mTG 神経突起の伸長比較
(左図)伸展刺激あり rPDL 培地に IgG 添加。
(右図)伸展刺激あり rPDL 培地に Wnt5a 抗体添加。
(下図)軸索突起の長さの比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takahashi Kaori, Yoshida Takashi, Wakamori Minoru	4. 巻 323
2. 論文標題 Periodontal ligaments enhance neurite outgrowth in trigeminal ganglion neurons through Wnt5a production induced by mechanical stimulation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 C1704 ~ C1719
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1152/ajpcell.00302.2022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Kaori Takahashi, Takashi Yoshida, Takashi Nakamura, Minoru Wakamori
2. 発表標題 Wnt5a, produced by mechanically stimulated periodontal ligament cells, modulates differentiation of trigeminal ganglion cells
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高橋 かわり、吉田 卓史、中村 卓史、若森 実
2. 発表標題 機械刺激を受けた歯根膜細胞から産生されるWnt5aによる三叉神経節細胞の分化作用の解明
3. 学会等名 第73回日本薬理学会北部会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kaori Takahashi, Takashi Yoshida, Takashi Nakamura, Minoru Wakamori
2. 発表標題 Elucidation of the regulatory mechanisms of neurite outgrowth of the trigeminal mesencephalic nucleus neurons by Wnt5a, released from mechanically stimulated rat periodontal ligament cells
3. 学会等名 neuroscience 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋 かおり
2. 発表標題 歯根膜への正常な機械刺激による神経突起伸長作用から考える異常な機械刺激によるストレスが与える神経への影響
3. 学会等名 認知症と口腔機能研究会 第4回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高橋 かおり、吉田 卓史、中村 卓史、若森 実
2. 発表標題 三叉神経中脳路核細胞における機械刺激負荷歯根膜細胞由来Wnt5aの役割
3. 学会等名 第65回歯科基礎医学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kaori Takahashi, Takashi Yoshida, Takashi Nakamura and Minoru Wakamori
2. 発表標題 Wnt5a, produced by physiological mechanical stimulation on the periodontal ligament, regulates neuronal differentiation in the trigeminal mesencephalic nucleus
3. 学会等名 第97回日本薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kaori Takahashi
2. 発表標題 Role of Wnt5a, released from the mechanically stimulated periodontal ligament cells, in trigeminal mesencephalic nucleus (Me5)
3. 学会等名 Joint Symposium with UQ (招待講演)
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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