

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23592921

研究課題名(和文)顎口腔刺激と摂食促進ペプチド活性が睡眠・認知障害に及ぼす影響

研究課題名(英文) Effects of oral sensation and orexigenic peptide stimulus on sleep and spatial memory

研究代表者

田中 晋 (Tanaka, Susumu)

大阪大学・歯学研究科(研究院)・招へい教員

研究者番号：00367541

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：桂花による持続的な嗅覚刺激は、視床下部におけるOrexinの発現抑制、Orexinニューロン数の減少と体重増加の抑制を伴って、水迷路実験における空間記憶能力を亢進させることが明らかとなった。一方、亜鉛欠乏食給餌は味覚減退に関与していると考えられているが、摂食行動特性の変化だけでなく、海馬におけるGFAP陽性細胞数の増加を伴い空間記憶能力の低下を認めた。さらに、抜歯による咀嚼機能低下条件を付加すると、その効果は増強することが明らかとなった。以上の結果より、嗅覚や咀嚼、味覚等顎口腔感覚入力の変化は空間記憶能力を制御する因子となり得る可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The consecutive odor stimulation of *Osmanthus fragrans* promoted the spatial memory accompanied with decrease of the expression of Orexin and number of orexin-immunoreactive neurons in the hypothalamus, in addition to the loss of body weight. Zinc deficiency, might be related to taste disorder, demonstrated the characteristic changes of feeding behavior as well as decreasing of spatial memory. Immunohistological study showed an increase of GFAP-positive neurons in hippocampus as well. Further investigation revealed more decline effect in the combined condition of Zinc deficiency and deterioration of masticatory function by tooth extraction. These results suggest that orofacial sensory inputs such as smell, taste and chewing might have a potent role for the regulation of spatial memory.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・外科系歯学

キーワード：顎口腔刺激 摂食促進ペプチド 認知障害

1. 研究開始当初の背景

社会の高齢化と疾病の多様化、医学の目覚ましい進歩の中で、アルツハイマー型認知症(AD)の罹患率は増加の一途を辿っている。ADでは大脳皮質の著しい萎縮、老人班(β アミロイドの沈着)、神経原線維変化(タウ蛋白の沈着)、神経細胞の脱落がみられ、アセチルコリン・ドーパミン・ノルアドレナリン・セロトニン等の神経伝達物質の減少も明らかとされている。現在もADの治療法を模索するために、 β アミロイドに対するワクチン開発などの研究が行われているが(Okura et al., Proc Natl Acad Sci USA 103, 2006)、認知症により失われた機能を元に戻すような治療は確立されておらず、進行を遅らせるのにとどまっているのが実情であり、未だ不明な点が多い。

しかしながら、近年ADの発症と睡眠の関連性について Jae-Eun Kang らは、1)睡眠パターンが乱されると、 β アミロイドの形成が増加すること、2)アルツハイマー病モデルマウスの脳液中の β アミロイド値が睡眠時より覚醒時で高いこと、3) β アミロイド値は睡眠不足時に増加し、脳室内投与に応じて覚醒時間が延長することで増加することを報告した(J.E.Kang et al., Science 326, 2009)。また、快適な運動と住環境が脳の β -アミロイドの形成を抑制する、すなわちライフスタイルが脳病変そのものの進行を抑制する可能性が示唆されている(O. Lazarov et al., Cell 120, 2005)。さらに、咀嚼には大脳皮質の覚醒効果があり、咀嚼が脳の老化を遅延させる効果が明らかとされている。申請者は、ADマウスの行動解析実験において、咀嚼機能の低下が β アミロイドの蓄積を促進し、空間認知能力の低下を引き起こす結果を得ている。空間認知能力とOxの関連性に関しては、大村らがOrexin-Aは海馬に働き、CA1ニューロンを抑制し、空間認知を抑制すると報告している(第31回日本肥満学会2010年)。一方、睡眠は『脳の休息』といった単なる活動停止の時間ではなく、『大脳の保守・修復、身体機能の回復、情報処理や記憶の固定』といった高度の生理機能に支えられた積極的な適応行動である。睡眠障害の一つであるナルコレプシーは、本邦では600人に1人と高い罹患率と想定されており、日中の耐え難い眠気、入眠時幻覚、脱力発作(カタレプシー)を主徴としている。近年、イヌ・ナルコレプシーにオレキシン受容体2型の遺伝子変異があることが判明し、Orexinの欠損によって引き起こされることが明らかとされた。Orexinは脳内の摂食促進神経ペプチドとして発見されたが(T. Sakurai et al., Cell 92, 1998)、強い覚醒作用を有し、睡眠・覚醒相の安定化に重要な働きをもつことが明らかとなり、Orexin系に作用する拮抗薬や刺激薬が不眠症などの各種病態の治療に役立つことが期待されている(R. M. Chemelli et al., Cell 98, 1999, C. Peyron et al., Nat Med 6, 2000, J. Hara et al., Neuron 30, 2001, M. Mieda et al., Proc Natl Acad Sci U S A 101, 2004)。これらの知見は、Orexinレベルを制御することにより、覚醒・睡眠のリズムを調整、さらには脳内の β アミロイドの沈

着を抑制し得るものとして非常に興味深い知見である。

申請者は、1)ラットを対象とした研究より、桂花(中国産のキンモクセイ)匂い刺激がOrexinの前駆体であるprepro-orexinの発現を抑制することを明らかとし、2)桂花の匂い刺激により、一定時間当たりの摂食量減少、同量の飼料を与えた際の摂食行動開始までの時間および摂食時間の延長と摂食を抑制する方向に視覚的行動特性が変化すること、3)桂花の匂い刺激により、一定時間当たりの睡眠導入潜時までの短縮・睡眠時間が延長することをそれぞれ明らかとした。さらに4)ヒトを対象とした研究では、非侵襲性のストレスマーカーとして着目されている唾液中の血清アミラーゼが桂花匂い刺激中には低値を示したことから、桂花の匂い刺激が鎮静効果を有することが明らかとなった(未発表データ)。

以上の結果を踏まえて、咀嚼や味覚などの顎口腔刺激が、摂食行動(摂食量・体重)、空間認知能力(学習記憶)へ及ぼす影響について、さらにはこれらの影響が桂花の嗅覚刺激の有無により如何なる変動をもたらすのかを追及し、さらには桂花の匂い刺激により脳内Orexinレベルを上手にコントロールすることで、余儀なくされている生活習慣を変えることなく、アルツハイマー型認知症の進行抑制の治療に役立つのではないかと考えるに至り、本研究を申請した。

2. 研究の目的

認知症の有効な治療法は確立されておらず不明な点が多いものの、アルツハイマー型認知症の発症に睡眠さらには覚醒促進作用のあるOrexinが密接に関連していることが最近報告されている。我々は、Orexinが摂食行動・咀嚼パターン・摂食後の血中糖代謝動態へ及ぼす影響について検討するとともに、桂花の匂い刺激が脳内のOrexin発現を抑制することを明らかとしてきた。本研究では、顎口腔刺激と桂花の嗅覚刺激の2つの感覚情報が、摂食行動・学習記憶に如何なる影響を及ぼすかを明らかとし、非侵襲的で簡易的な匂い刺激を用いることで、認知症の進行抑制を可能とする方策を考案していく。

3. 研究の方法

咀嚼及び味覚情報といった顎口腔感覚刺激が、摂食行動、学習記憶へ及ぼす影響について、さらにはこれらの影響が桂花の嗅覚刺激の有無により如何なる変動をもたらすのか解明するために、行動生理学的・免疫組織学的に解析・検討を行った。まず、マウスによる行動生理実験について、1.咀嚼及び桂花の嗅覚刺激が摂食行動へ及ぼす影響について比較検討するとともに、成獣ラットを用いて、2.桂花の嗅覚刺激が摂食促進ペプチドOrexinニューロンへ及ぼす影響、免疫組織学的手法を用いて解析し検討する。次に、咀嚼能力の低下が空間認知能力の低下をもたらす傾向が得られているため、3.咀嚼機能低下および桂花の嗅覚刺激が空間記憶力へ与える影響を評価する。最後に、亜

鉛欠乏給餌動物を用いて、味覚障害モデルマウスを作成し、4. 咀嚼機能低下および亜鉛欠乏飼料給餌マウスにおける空間記憶力の行動生理学的検討、5. 空間記憶力の免疫組織学的検討を解析し、得られた結果より、認知症の進行抑制に有益な方策を考案していく。

実験 : 咀嚼及び桂花の嗅覚刺激が摂食行動へ及ぼす影響について

我々は、桂花の嗅覚刺激にて、成獣ラットの一定時間当たりの摂食量減少、同量の飼料を与えた際の摂食行動開始までの時間および摂食時間の延長と摂食を抑制する方向に視覚的行動特性が変化する傾向が得られているため、本研究では咀嚼機能の違い、つまり顎口腔刺激の変化が摂食行動に影響を及ぼすのか明らかにした上で、脳内のOrexin発現抑制効果をもつ桂花の嗅覚刺激にて両者がいかに変化するかを検討した。

実験 : 桂花の嗅覚刺激が摂食促進ペプチドOrexinニューロンへ及ぼす影響

行動生理学実験にて、桂花(OSM)の嗅覚刺激が摂食行動を抑制し、体重増加の抑制効果を示唆されたため、OSMの嗅覚刺激が摂食促進ペプチドであるOrexinニューロンへ直接影響を与えるのか否かを免疫組織学的に検討した。雄性成獣ラットを用いて、無臭・桂花(OSM)・ミルク(MILK)の各々の匂いに暴露した空間で、15分間待機させ、匂い刺激解除45分後に、心灌流固定し、全脳を摘出した。凍結脳切片を作製し、通法に従いオレキシンの免疫組織化学的染色を行い、視床下部外側野でのOrexinニューロン数を計測した。

実験 : 咀嚼機能低下および桂花の嗅覚刺激が空間記憶力へ与える影響

Orexin-A脳室内投与は海馬に投射し、CA1ニューロンを抑制することで空間認知能を抑制すると報告されているため、本研究では、脳内のOrexin発現抑制効果をもつ桂花の嗅覚刺激にて学習記憶がいかに変化するかを検討した。ICR系雄性マウス7週齢を、コントロール(CT)群、抜歯(Ext)群、桂花匂い刺激(OSM)群、抜歯+桂花匂い刺激(EOSM)群の四群に分類した。1週間経過した段階で連続する6日間で水迷路実験(Water maze test: WMT)を実施し、水面下のplatformに到達するまでの時間(escape latency)および制限時間内にゴールに到達しなかった回数を測定した。7日目にplatformを取り除き、ゴールエリアの滞在時間を測定し(probe test)、8日目はplatformを水面上に設定し、escape latencyを測定した(visible probe test)。

実験 : 咀嚼機能低下および亜鉛欠乏飼料給餌マウスにおける空間記憶力の行動生理学的検討

ICR系雄性マウス3週齢を、コントロール(CT)群、抜歯(Ext)群、亜鉛欠乏食給餌(ZD)群、抜歯+亜鉛欠乏食給餌(EZD)群の四群に分類した。CT群、Ext群は標準飼料を、ZD群、EZD群は3~12週齢時に亜鉛欠乏飼料を給餌し、12週齢以降は標準飼料を与えた。Ext群、EZD群

は3週齢時に左側上下臼歯抜歯及び左側咬筋切断を行った。1週間ごとに体重を測定し、8、13、22週齢時に各々、連続する6日間で水迷路実験(Water maze test: WMT)を実施し、水面下のplatformに到達するまでの時間(escape latency)および制限時間内にゴールに到達しなかった回数を測定した。7日目にplatformを取り除き、ゴールエリアの滞在時間を測定し(probe test)、8日目はplatformを水面上に設定し、escape latencyを測定した(visible probe test)。

実験 : 咀嚼機能低下および亜鉛欠乏飼料給餌マウスにおける空間記憶力の免疫組織学的検討

ICR系雄性マウス3週齢を実験と同様にCT群、Ext群、ZD群、EZD群の四群に分け飼育し、8週齢時に実験と同じスケジュールで8日間の水迷路実験を施行し、その後9日目に再度水面下にplatformを設置し、escape latencyを測定し、90分後に深麻酔下にて、心灌流固定後に全脳を摘出した。40µmの連続した凍結脳切片(前頭断)を作製し、一次抗体として抗GFAP抗体を用い、DABにて発色させ、免疫組織化学染色を行った。空間記憶に関与するとされる海馬の3領域(CA1, CA3, DG)における単位面積当たりのGFAP陽性細胞数を測定した。

4. 研究成果

実験 : 咀嚼及び桂花の嗅覚刺激が摂食行動へ及ぼす影響について

実験開始後、1,2週目までは体重増加量はcont > OSM > Ext > OSM+Extであったが、3週目でcont > Ext > OSM > OSM+Ext、4週目でcont > Ext > OSM + Ext > OSMという結果を得た。当初は抜歯による咀嚼機能低下の影響で体重増加の抑制効果を示し、4週経過すると抜歯後からの咀嚼機能の回復、非抜歯群(control群、OSM群)の成長曲線がプラトーとなることが要因となり、抜歯群の体重が非抜歯群の体重に近づいたと推測された。また、OSMによる慢性的な嗅覚刺激が累積摂食量の減少に伴い、体重増加の抑制効果を示唆された。

実験 : 桂花の嗅覚刺激が摂食促進ペプチドOrexinニューロンへ及ぼす影響

OSMの嗅覚刺激によって、視床下部外側野に存在するOrexinニューロン数は全域に渡って減少し、MILK匂い刺激では明らかな変化を認めなかった。OSMによる急性的な嗅覚刺激が視床下部のオレキシンの発現量を減少させるだけでなく、ニューロン数自体を減少させ、その結果、摂食量の減少を惹起する可能性を示唆された。

実験 : 咀嚼機能低下および桂花の嗅覚刺激が空間記憶力へ与える影響

実験開始後1週間経過した時点で6日間連続しゴール(platform)に到達するまでの時間(escape latency)を測定し、7日目にplatformを取り除き、制限時間のうちゴールエリア一帯を遊泳する時間を計測するProbe testを行い、学習記憶への与える影響を検討した。1日目のescape latencyはOSM群が他の3群に比して明らかに

到達時間が早い結果を得た。しかしながら、Ext 群と OSM+Ext 群との間に有意な差はなく、Ext 条件下での OSM の効果は顕著でなかった。

また、OSM、Ext+OSM 群が Control、Ext 群より早期に escape latency が減少するが、最終日 (day6) では Control 群が追いついてくる傾向が得られた。Probe test では Ext 群が他群に比してやや減少する傾向が得られた。OSM による嗅覚刺激を提示することで、脳内の Orexin 発現抑制に伴い学習記憶を亢進させる可能性が示唆された。

実験：咀嚼機能低下および亜鉛欠乏飼料給餌マウスにおける空間記憶力の行動生理学的検討

CT 群、Ext 群間に体重増加量の差は認めず、ZD 群・EZD 群では、亜鉛欠乏飼料給餌期間中 CT 群に比して、有意な体重増加量の減少を認め、標準飼料に変更後、二群ともに急激な体重増加を認めた。8 週齢時の WMT において、CT 群、Ext 群は 6 日間で Day1 に比べ、連日 escape latency の短縮を認めたが、ZD 群、EZD 群は escape latency の短縮傾向を認めなかった。ゴール非到達回数も同様に、CT 群、Ext 群は Day1 に比べ連日、回数の減少を認めたが、ZD 群、EZD 群は減少傾向を認めなかった。probe test では EZD 群のゴールエリア滞在時間が短い傾向を認めたが、ZD 群は CT 群と有意な差を認めなかった。visible probe test では ZD 群、EZD 群の escape latency が長い傾向を示した。13,22 週齢時では、ZD 群、EZD 群の escape latency およびゴール非到達回数の減少を認め、その際 ZD 群の方が先に減少傾向がみられた。22 週齢時の probe test では、EZD 群のゴールエリア滞在時間の増加を認めた。

8 週齢時の ZD 群、EZD 群は、visible probe test でゴールが視認できるにも関わらず、visible probe test にて escape latency の延長を認めた。このことがマウスの体重によるものかどうかを検討するため、ZD 群、EZD 群と同程度の体重の標準動物(ICR マウス 4 週齢:CT4w 群)を用いて同様のスケジュールで WMT を行ったところ、CT4w 群の escape latency とゴール非到達回数は、6 日間で連日、有意に短縮傾向を認めたが、6 日目の escape latency は ZD 群、EZD 群と有意差は認めなかった。CT4w 群の probe test でのゴールエリア滞在時間は CT 群と差がなく、visible probe test では CT 群より escape latency が有意に延長し、ZD 群、EZD 群とは差は認めなかった。

実験：咀嚼機能低下および亜鉛欠乏飼料給餌マウスにおける空間記憶力の免疫組織学的検討

CT 群に比較し、ZD 群および EZD 群の海馬 CA1 領域における GFAP 陽性細胞密度が高い傾向を示したが、CA3・DG 領域では有意な差は認めなかった。ZD 群と EZD 群の各領域における GFAP 陽性細胞密度の間に有意な差は認めなかった。

【考察・結論】

桂花による嗅覚刺激を提示することで、脳内

の Orexin 発現抑制に伴い学習記憶を亢進させる可能性が示唆された。亜鉛欠乏食給餌は、摂食行動特性の変化だけでなく、海馬における GFAP 陽性細胞数の変化を伴い空間記憶能力低下を生じた。さらに、咀嚼機能低下条件を伴うと、その効果が増強し、標準飼料給餌変更により空間記憶能力低下は回復することが示唆された。以上より、咀嚼機能や味覚という顎口腔刺激の低下は学習記憶の低下を惹起する要因となり、嗅覚刺激の付与は学習記憶の亢進を誘発する因子となり得る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)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1). Yamamoto T(1/3), Inui T, Tsuji T(3/3), The odor of Osmanthus fragrans attenuates food intake, Sci Rep. 22;3:1518, 2013, 査読有
- (2). Tsuji T(1/8), Tanaka S(5/8), Kogo M (7/8), Yamamoto T(8/8), 桂花の匂いが摂食関連ペプチドの発現および咀嚼筋活動へ与える影響, 日本味と匂学会誌, vol.3, 20, 2013, 査読有
- (3). Tsuji T(1/7), Yamamoto T(2/7), Tanaka S(6/7), Kogo M(7/7), The odor of Osmanthus fragrans attenuates food intake : The 43th Society for Neuroscience abstract, 452.19, QQ15, 2013, 査読無
- (4). Tsuji T(1/3), Inui T, Yamamoto T(3/3), The odor of Osmanthus fragrans modulates feeding behavior, The Journal of Physiological Sciences, vol. 64, suppl.1, S241, 2014, 査読無

〔学会発表〕(計 5 件)

- (1). 辻 忠孝, 乾 賢, 木田久美子, Bakhshishayan Sanam, 田中 晋, 佐藤耕一, 古郷幹彦, 山本 隆: 桂花の匂い刺激が摂食関連ペプチドの発現および咀嚼筋活動を含めた摂食行動特性へ与える影響: 第 47 回日本味と匂学会大会: 2013 年 9 月 5-7 日: 仙台市
- (2). 木田久美子, 辻 忠孝, Bakhshishayan Sanam, 田中 晋, 山本 隆, 古郷幹彦: Spatial memory and feeding behavior in zinc-deficient rodents: 第 47 回日本味と匂学会大会: 2013 年 9 月 5-7 日: 仙台市
- (3). 木田久美子, 辻 忠孝, 田中 晋, 古郷幹彦: Feeding behavior and spatial cognitive function in zinc-deficient rodents: 第 58 回日本口腔外科学会総会: 2013 年 10 月 11-13 日: 福岡
- (4). 辻 忠孝, 山本 隆, 乾 賢, バハシヤンサナン, 木田久美子, 田中 晋, 古郷 幹彦: The odor of Osmanthus fragrans attenuates food intake: NEUROSCIENCE 2013: 2013 年 11 月 9-13 日: サンディエゴ・米国
- (5). 辻 忠孝, 乾 賢, 山本 隆: 桂花の香りが摂食行動へ与える影響, 第 91 回日本生理学会大会: 2014 年 3 月 18 日: 鹿児島

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 晋 (TANAKA SUSUMU)
大阪大学・歯学研究科・招へい教員
研究者番号：00367541

(2) 研究分担者

古郷 幹彦 (KOGO MIKIHICO)
大阪大学・歯学研究科・教授
研究者番号：20205371

(3) 研究分担者

辻 忠孝 (TSUJI TADATAKA)
大阪大学・歯学部附属病院・医員
研究者番号：50527231

(4) 連携研究者

山本 隆 (YAMAMOTO TAKASHI)
畿央大学・健康科学部・教授
研究者番号：60028793