

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 27 日現在

機関番号：32703

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659971

研究課題名(和文) 咬まない食事は何が問題なのか？ - 食形態が咀嚼運動調節機構に与える影響を解明する -

研究課題名(英文) What is a problem as for the meal which is not chewing?

研究代表者

赤坂 徹 (AKASAKA, Tetsu)

神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号：60316263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円、(間接経費) 810,000円

研究成果の概要(和文)：RT-PCR法を用いた解析において、生後間もないラットの三叉神経中脳路核ニューロンに発現しているGABA(A)受容体を構成するサブユニットは全て検出されたが、5週齢のラットでは一部のサブユニットが検出されなかった。これは成長・発育に伴い、一部のサブユニットに変異・splicing variantが生じていることが示唆された。また、12日齢のラットですでに一部のサブユニットが検出されなかったことから、出生後の早い時期からサブユニットの変異が生じている可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：In the analysis using RT-PCR method, although all the subunits that constitute the GABA (A) receptor revealed to the trigeminal mesencephalic nucleus neuron of the new born rat were detected, some subunits were not detected by the rat of 5week age. It was suggested that splicing variant have produced this in some subunits with growth.

Moreover, since it is some subunits were not already detected on the a rat of 12day age, a possibility th at the variation of the subunit had arisen from the early time after birth was able to be considered.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：三叉神経中脳路核 GABA(A)受容体 咀嚼運動調節機構 サブユニット splicing variant

1. 研究開始当初の背景

摂食障害や咀嚼運動障害を持つ患者の中には離乳の時期や食形態に問題があったと考えられるケースもあるが、実証はされていない。また、ブラキシズムや顎関節症といった咀嚼運動調節機構が関わっていると考えられる疾患についても根本的な解決法は定まっていないのが現状である。

このように咀嚼運動調節機構にはいまだ不明な点が多く、とりわけ、吸啜から咀嚼への運動様式の変化は生体にとっても大きな変化であり、咀嚼運動調節機構が形成され始める時期と考えられるが、この時期の咀嚼運動にかかわる感覚神経の変化について解析した報告は非常に少ない。

そこで、固形食で育てたラットと粉末食で育てたラットのVmesニューロンでのGABA(A)受容体の変化を組織学的、分子生物学的に解析することで咀嚼運動調節機構を解明し、咀嚼運動が関わっていると考えられる疾患の治療法が確立できるのではないかとという着想に至った。

2. 研究の目的

従来から咀嚼やその回数の寡多が咀嚼運動調節機構に影響を与えていることが示唆されている。特に離乳期は固形食を食べ始め、咀嚼運動の開始時期であり、咀嚼運動調節機構が形作られる上で、大きな変化が起きていることが考えられる。しかし、離乳期に咀嚼運動にかかわる感覚神経にどのような変化が起きているかについて組織学的、分子生物学的に解析した報告は非常に少ないため本研究ではこの点を明らかにすることに重点を置いていた。

3. 研究の方法

GABA(A)受容体の同在を確認するための免疫組織化学染色

GABA(A)受容体のサブユニットを認識する一次抗体と蛍光緑を呈するFITCを二次抗体としてそれぞれ用いた免疫組織化学染色を行い、組織像について解析を行う。

RT-PCR法による分子生物学的解析

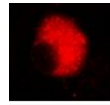
Vmesニューロン細胞体からGABA(A)受容体を構成するサブユニットのmRNAの抽出、1st strand cDNAの合成、PCR法によるcDNAの増幅を行い、mRNAの全シーケンスの解析を行った。

4. 研究成果

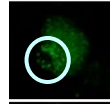
(1) GABA(A)受容体の同在を確認するための免疫組織化学染色

デキストラン・ローダミンBを逆行性に取り込ませた三叉神経中脳路核ニューロン細胞体にGABA(A)受容体のサブユニットを認識する一次抗体と蛍光緑を呈するFITCを二次抗体と

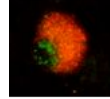
してそれぞれ用いた免疫組織化学染色を行い、組織像について解析を行った。その結果、粉末食で5週齢まで飼育した群は固形食で飼育した群に比べGABA(A)受容体が核周囲に集積する特異な組織像を認めた。



ローダミン染色像



GABA(A)受容体の免疫染色像
核周囲に受容体の集積を認める

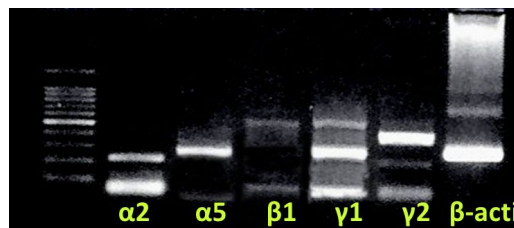


重ね合わせ画像

(2) RT-PCR法による分子生物学的解析

1. GABA(A)受容体を構成するサブユニットの発現の確認

三叉神経中脳路核ニューロンに発現しているGABA(A)受容体は2、5、1、1、2のサブユニットで構成されている頻度が高いことをIshiiらは報告しており、本研究も上記5種のサブユニットのmRNAの解析を中心に行った。ニューロン細胞体の切り出しはレーザーマイクロダイセクション装置を用いて行い、1個体から10個前後の細胞体を集め解析を行ったが、レーザーマイクロダイセクション装置を用いてmRNAを解析した報告は非常に少なく、また、10個前後の細胞を用いてmRNAを解析した報告も少なかった。このためこのような方法で目的とするmRNAが検出できるか否かを確認する必要があった。このため、まず、この5種のサブユニットが検出されるか否かを5週齢の固形食で育てたラットを用いてRT-PCR法にて確認した。

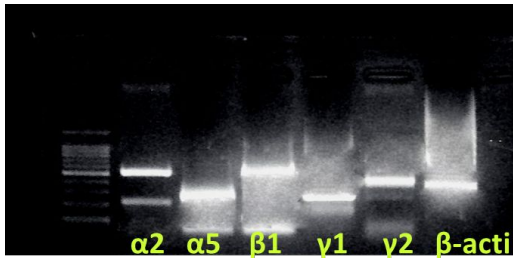


その結果、2サブユニットは検出されず、1サブユニットも明確には検出されなかった。アニーリングの温度やサイクルの条件を変え一つの試料について複数回試みたが、結果は同様であった。この原因として2、1のサブユニットに変化が生じている可能性が考えられた。

このため、成長や発達の影響を受けない生後4日齢のラットで同様に解析を行った。

2. 生後4日齢のラットのGABA(A)受容体を構成するサブユニットの解析

前述の理由で、生後4日のラットについて同様にサブユニットのmRNAを解析した。

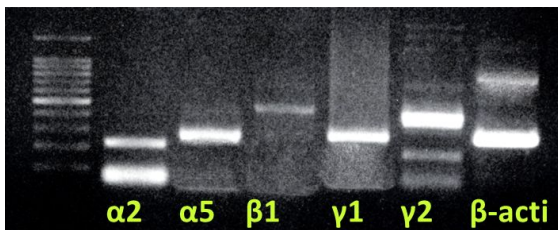


その結果、半数以上の個体(n=20)に全てのサブユニットの mRNA の発現が確認された。

これまで報告されてきたラットの GABA(A)受容体のサブユニットのシークエンスは胎児や出生後間もないラットから得られたものであり、Ishii らも胎児の三叉神経中脳路核ニューロン細胞体について解析しており、その結果 2、 5、 1、 1、 2 の5つのサブユニットが三叉神経中脳路核ニューロンでは他のサブユニット(数十種のサブユニットの存在が報告されている)よりも多く発現していることを報告している。これらの結果から、胎児や出生後間もないラットでは三叉神経中脳路核ニューロンに発現している GABA(A)受容体は 2、 5、 1、 1、 2 で構成されているが、成長に伴い、 2、 1 サブユニットに splicing variant が生じている可能性が考えられた。この点を明らかにするために生後 1 2 日齢のラットを用いて同様にサブユニットの mRNA について解析した。

3. 生後 1 2 日齢のラットの GABA(A)受容体を構成するサブユニットの解析

生後 1 2 日のラットについて同様にサブユニットの mRNA を解析した。



その結果、全ての個体(n=20)で 2 サブユニットの発現が認められなかった。また一部の個体では 1 サブユニットが検出されなかった。

これらの実験の結果から、ラット三叉神経中脳路核ニューロンでは出生前後ではこれまで報告されているようなサブユニットのシークエンスが存在しているが、成長・発育とともに一部のサブユニットのシークエンスに変化が生じる splicing variant が生じている可能性が示唆された。今回、RT-PCR に用いたプライマーは 2 では 5 0 0 塩基程度の増幅を行うが、この 5 0 0 塩基対の配列の中に splicing variant が生じている部位が含まれている可能性が考えられた。このため現在、2 0 0 0 塩基対程の 2 サブユニットの mRNA の全配列を抽出し、そのシークエ

ンスを解析を行っているところである。

また、今後はサンプルとなるラットの日齢、週齢についても詳細な検討を行い、splicing variant が生じているか否かを検討するとともに、生じているとすれば、生後どの時期から生じているのか、長期的にはどのような影響があるのかも検討していく予定である。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

赤坂 徹 成長過程での咀嚼運動調節機構における機能的変化を探る第 2 9 回日本障害者歯科学会総会および学術大会
2012 年 9 月 28 ~ 30 日 札幌

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤坂 徹 (AKASAKA Tetsu)

神奈川歯科大学・歯学研究科(研究院)・助教

研究者番号: 60316263

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号：