

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24593103

研究課題名(和文)脳・消化管ペプチドによる顎口腔異常機能活動の発現機序の解明

研究課題名(英文)The study of the mechanism of the stomatognathic function activated by the brain and the gastrointestinal peptide

研究代表者

八木 孝和 (Yagi, Takakazu)

鹿児島大学・医学部・歯学部附属病院・講師

研究者番号：10346166

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ストレスと顎口腔機能活動との関係に注目した。末梢性刺激として、食道下部へ酸刺激を行い、中枢性刺激として、ストレスと関係の深い、CRFの脳内投与を行った。検出項目は、咬筋活動を中心に心拍数と脳波を測定した。その結果、刺激前と比較して刺激後に咬筋活動量は増加傾向を示した。また、睡眠の質が低下し、自律神経系にも影響を与えていることが示唆された。一方、食道下部への刺激に対する遺伝子発現では、ASIC3ならびにTRPV1が発現量を増やした。以上より、ストレスと顎口腔機能の異常活動の間には、密接な関係があり、末梢性の刺激応答には、痛覚関連性の伝達経路が関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：This study focused on the relationship of stress and the stomatognathic function. As peripheral stimulation, we performed the acid stimulation to upper part gastrointestinal tract and, as central stimulation, we used corticotropin release factor where related stress. Recording procedure was mainly electromyogram (EMG: masseter muscle activity), electroencephalogram (EEG), and electrocardiogram (ECG). The result is that EMG increased after peripheral and central stimulation in comparison with before stimulation. In addition, quality of the sleep decreased, and it was suggested that the stimulation influenced the autonomic nervous system. On the other hand, in the gene expression of the stimulation on the upper gastrointestinal tract, ASIC3 and TRPV1 gained expression. It was suggested that peripheral stimulation was transmitted through the sense of pain related tract. Therefore, stress has close to the relations with the stomatognathic dysfunction.

研究分野：歯科矯正

キーワード：ストレス プラキシズム 電気生理学 遺伝子発現 顎口腔機能

1. 研究開始当初の背景

顎口腔系機能は、顎・舌・顔面の協調だけでなく、消化器官の入口として、胃・食道・腸等との協調的な運動を行っている。

睡眠時ブラキシズム(SB)と胃食道逆流(GER)の関係および顎顔面骨格系異常とSB、GER症状の間に相関性については口腔と消化器の因果関係として報告されてきた(Miyawaki S. et al., 2003, 2009, 2010)。また、大脳皮質咀嚼野の電気刺激(中枢性刺激)でブラキシズムに類似した活動が誘発されるが、咬合高径を高くする(末梢性刺激)と、筋紡錘から三叉神経中脳路核を介した、上位中枢への感覚入力が異常機能活動を誘発することも報告されている(Yagi T. et al., J Dent Res 2003 a & b)。しかし、SBとGERの関係を繋ぐ伝達経路について、自律神経系からどのような経路を介して、顎口腔機能をつかさどる三叉神経支配の異常機能活動(睡眠時ブラキシズムなど)を誘発するかは未解明である。

持続的に異常機能活動を誘発するには「中枢性興奮の誘発」が重要であるが、中枢性興奮を誘発する大脳辺縁系や視床下部から三叉神経路核への入力経路も不明である。また、どのような因子が「中枢性の興奮」を導くのかについては、未だ解明されていない。

中枢性の異常を引き起こす現象としてストレス性の反応が考えられるが、本研究では、ストレスに関わる因子として視床下部と消化管から放出される神経ペプチド(脳・消化管ペプチド)に着目した。大脳辺縁系・視床下部にストレス情報が伝わると、脳・消化管ペプチドである副腎皮質刺激ホルモン放出因子(CRF)を放出し、ノルアドレナリン分泌が促進され、自律神経系を介して胃酸などの腺分泌を調整する。また、グレリンやCRFに代表される脳・消化管ペプチドは、胃・腸管からも放出され、情動行動だけでなく摂食行動や消化管運動に影響を与えることが報告

されている(Inui A. et al., 2008, 2011)。

一方、末梢性刺激として、実験的に咬合干渉を咬合関係に付与するとSBの誘発と情動ストレスを惹起することや、抗不安薬のセロトニン選択的再取り込み阻害薬(中枢性刺激)がブラキシズムを誘発することが報告されており、ストレスと睡眠時ブラキシズムの関係は従来から注目されている。

中枢性と末梢性に認められる現象から、中枢もしくは末梢から分泌されるペプチドは、咬合異常や胃酸過多といったストレス刺激によるブラキシズムの発現に関与している可能性があるが、現在のところ生理学的なメカニズムをはじめ、解剖学的な連絡経路や遺伝子発現など不明な点が多く、いまだに、解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は、独自に開発してきた非侵襲性で食道下部に薬物を投与できる刺激モデル動物(海外誌に投稿中)と脳内薬物投与慢性モデル動物を用いて、脳波・筋電図・眼電図・心電図等の生体電位を自由運動下で同時に記録することで、電気生理学的な反応を解析することを目的とする。あわせて、本研究は、顎口腔の異常機能活動の発現機序の解明の一端として、脳・消化管ペプチドの影響に関する研究基盤を確立することである。

3. 研究の方法

【モデル動物の作製】

Hartley系モルモット(400-550g)を7匹用いて、ペントバルビタール(40 mg/kg)を腹腔内投与し、麻酔レベルを第一期第1相に保ち、ステンレスワイヤー(直径0.05mm、ウレタンコート)を左右の胸郭(心電図の記録用)、咬筋、顎二腹筋および顎筋(睡眠覚醒解析用)に刺入した。頭部にステンレス製スクリュー(直径1.4mm)を3.0mmの深さで脳波用に埋入し、眼球周囲骨に眼電図用電極

を埋め込み、歯科用レジンでマイクロコネクタ(6チャンネル)を固定した。次に、末梢刺激実験用では鼻腔からカテーテル(Polyethylene tube 直径 1.09 mm)を挿入し、食道下部括約部または食道上部へ留置する。反対側は鼻腔から皮下を通してカテーテルを頭部固定装置付近で埋め込み型コネクタに固定し、スリッピングを通過して行動観察 BOX 外へ出した。

中枢刺激として脳内へ薬物投与用モデルは、Hartley 系モルモット 7 匹の頭部に 6 チャンネルのマイクロコネクタを固定し、また、脳地図に従い、側脳室にカニューレを留置し、周囲をデンタルセメントで固定した。

遺伝子発現状態を調べるためには、Wister 系雄性ラット 12 匹を供して、ペントバルビタール(40 mg/kg)による麻酔下で、ステンレスワイヤー(直径 0.05mm、ウレタンコート)を咬筋に刺入し、鼻腔からカテーテル(Polyethylene tube 直径 1.09 mm)を挿入し、食道下部括約部または食道上部へ留置した。

すべてのモデル作製において、術後は、頭部及び頬部に炎症防止と鎮痛のため、術後 3 日間抗生物質(オキシテトラサイクリン 10mg/kg)と鎮痛薬(フルルビプロフェンアキセチル 0.8mg/kg)を投与した。

【行動観察】

動物は 1 匹ずつ 12 時間サイクル(7:00-19:00 までを明期)の照明環境で飼育し、術後の回復期および、少なくとも記録開始前の 3 時間から 5 時間はチャンバーとケーブルの接続を行い、装置装着状態に慣らせた。記録開始は術後 10 日後からとし、記録時間は明期の 12:00-15:00 とした。各記録用周波数帯は EEG, EOG 及び ECG: 030-100Hz, EMG: 100-1000Hz とした。

記録は、継続的にパーソナルコンピュータに商業用記録装置(キッセイコムテック社製、Vital recorder)を介して行い、解析には

Sleep sign(キッセイコムテック社製)を用いて行った。なお sampling rate は 512Hz とした。また、動物の行動観察のためにビデオによる撮影を同時に行った(図 1)。

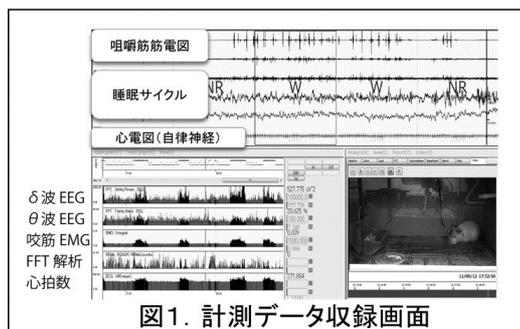


図 1. 計測データ収録画面

【胃・食道への酸性溶液による刺激実験】

16 時間絶食状態して空腹時に、自由行動下でカテーテルから胃・食道粘膜に pH=7(蒸留水)及び、pH=2.0 の gastric juice pepsin (p-6887, Sigma)+HCl 溶液(0.5mg/mL)を 1 ml/h の速度で 20 分間投与して、前後の行動観察を行った。なお、多くの電極を装着するモデルには、頭部の大きさがある程度必要で有り、頭部に繋がるケーブルとスリッピングに係るトルクの大きさが行動に負担にならない大きさに有り、睡眠レベルなどについて先行研究があるモルモットで行ったが、遺伝子の発現については、モルモットに対応する抗体の感度に影響があったことから、本研究では、ラットで同様の応答を確認した(咬筋筋電図)上で組織を採取した。

【中枢への薬物投与による刺激実験】

5 匹のモルモットにマイクロインジェクターを用いて、側脳室に繋がるカニューレから脳・消化管ペプチドである CRF と人工脳脊髄液をそれぞれ 10 µl 投与した。

【遺伝子解析】

採取した胃組織 100mg を溶解(Gibco BRL 社製)し、RNA を抽出(Qiagen 製:RNeasy Protect Mini Kit)し、cDNA を合成(Invitrogen 製: SuperScript III First-Strand Synthesis System)し、real-time PCR を Thermal Cycler

Dice Real Time System (タカラバイオ Code:TP900) を用いて、cDNA に PCR 用試薬 (Takara bio 製: Premix Taq II) を用いて合成を行い、測定された遺伝子発現量を CT 法で算出した。

Primer は下記遺伝子配列を使用した。

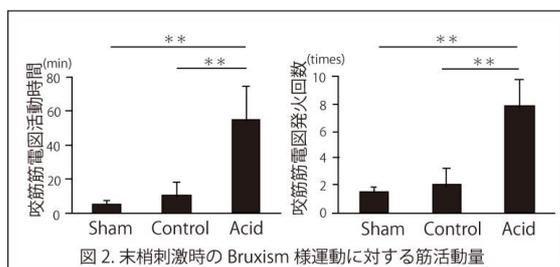
Oligo 名	Sequence(5' 3')
rTRPV1-F	AGCGAGTTCAAAGACCCAGA
rTRPV1-R	TTCTCCACCAAGAGGGTCAC
rPAR-2-F	GGAGCAGTACATATTGCCGTAGAAA
rPAR-2-R	CCGAACGAAGAAGAAGCACCCCT
rAsic 3-F	GCTATGCTGCGAAAGGACAC
rAsic 3-R	TACGGTGGGAGGCAGAGAGT
rTacr 1-F	TCCTCCTGCCCTACATCAAC
rTacr 1-R	TGACCTTGTACACGCTGCTC

なお、本動物実験は、動物実験倫理委員会において承認 (承認番号: H23MD100085) 得た上で行った。

4. 研究成果

【末梢性刺激 (上部消化管への酸溶液投与) に対する咬筋筋活動への効果】

酸性溶液による末梢刺激実験では、咬筋に有意な活動を認めた (図 2)。また、睡眠の質は低下し、覚醒状態が増加すると共に投与前後の時間は心拍数の上昇を認めた。上部消化管への薬物刺激により、交感神経系への興奮をもたらし、この入力が中枢側で、咬筋活動の発生に繋がった可能性が示唆された。



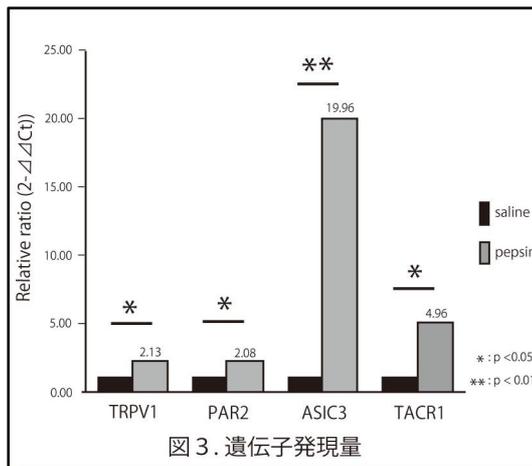
【末梢性刺激 (上部消化管への酸溶液投与) に対する胃・食道粘膜組織での遺伝子発現】

酸感受性の ASIC3 遺伝子が有意に発現し、さらに熱、酸などの侵害刺激に应答して開口

するチャネル分子である TRPV1 の発現が有意に上昇した。このことから、酸に限らず、上部消化管粘膜へ侵害性刺激の入力があると、口腔領域の運動へ影響する可能性が示唆された。これは、胃食道逆流症などの症状に認められる、口腔機能での不随意運動について、実験的に上部消化器官での pH 値が低下すると発生することを実証した研究を裏付ける結果であると考えられた。

また、カプサイシン感受性一次知覚神経にも存在し、痛覚の情報伝達に關与する PAR-2 の遺伝子発現の有意な増加を認めたことから、刺激伝導路の一端として、痛覚求心路に關係する刺激の伝導路の關与が示唆されていた。(図 3)

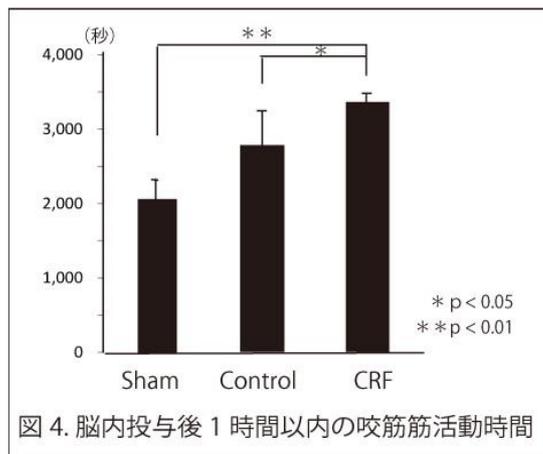
一方、その他の経路の可能性について検討する必要がある。また、Fos 蛋白などを利用して、1次ニューロンの投射野および2次ニューロンの伝達路の確認が必要である。特に、末梢入力との關与として、痛覚系の内臓感覚領域への投射について精査が必要であることが示唆された。



【中枢性刺激に対する咬筋筋活動への効果】

中枢性投与においては、人工脳脊髄液の側脳室への投与により、投与しなかった場合と比較して、咬筋の筋活動は増加していたが、有意な差は示さなかった。一方、情動ストレスに關係する CRF の投与によって、咬筋の活

動電位は上昇し、活動持続時間の有意な延長を認めた(図4)。また、睡眠の質の著しい低下および覚醒時間の延長を認めた。心拍数も増加し、R-R ピーク検出による測定結果共に、交感神経有意な状態を示唆していた。



これらの結果から、齧歯類においては、情動性のストレスに起因する刺激に対して、ストレス性ホルモン(CRF)が分泌されると、1つの表現系として、咬筋の筋活動が上昇する可能性が示唆された。また、末梢性の刺激に対しては、痛覚に関する伝達経路がブラキシズムなどの顎口腔機能異常の発生に関与す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7件)

Suzuki H, Asakawa A, Kawamura N, Yagi T, and Inui A. Hesperidin potential ghrelin signaling, Recent Patents on Food, Nutrition and Agriculture, 査読有, 6, 2014, 60-63.

Tomonari H, Kubota T, Yagi T, Kuninori T, Kitashima F, Uehara S, Miyawaki S. Posterior scissors-bite: Masticatory jaw movement and muscle activity, J. Oral Rehabil. 査読有, 41, 2014, 257-265, DOI: 10.1111/joor.12148.

Yagi T, Asakawa A, Ueda H, Ikeda S, Miyawaki S, and Inui A. The role of ghrelin in

patients with functional dyspepsia and its potential clinical relevance. Int. J. Mol. Med. 査読有, 22, 2013, 523-532, DOI: 10.3892/ijmm.2013.1418.

Ueda H, Yagi T, Amitani H, Asakawa A, Ikeda S, Miyawaki S, and Inui A. The roles of salivary secretion, brain-gut peptides, and oral hygiene in obesity. Obes Res Clin Pract., 査読有, 7, 2013, e321-329, DOI: 10.1016/j.orcp.2013.05.001.

Yagi T, Ueda H, Amitani H, Asakawa A, Miyawaki S, and Inui A. The Role of Ghrelin, Salivary Secretions, and Dental Care in Eating disorders. Nutrients, 査読有, 4, 2012, 967-989, DOI: 10.3390/nu4080967.

Yagi T, Asakawa A, Ueda H, Ikeda S, Miyawaki S, and Inui A. The role of zinc in the treatment of taste disorders., Recent patents on food, nutrition & agriculture, 査読有, 5, 2016, 44-51.

Ueda H, Yagi T, Amitani H, Asakawa A, Miyawaki S, and Inui A. Regulative roles of ghrelin in ingestive behavior, upper gastrointestinal motility, and secretion. Current Nutrition & Food Science, 査読有, 8, 2012, 188-195.

[学会発表](計4件)

植田紘貴, 菅 真有, 八木孝和, 宮脇正一. 胃酸分泌抑制と唾液分泌促進の二相性効果について - H₂ 受容体拮抗薬による自律神経活動の促進 - . 第73回日本矯正歯科学会大会 学術展示 2014年10月20-22日 千葉

上村裕希, 八木孝和, 北嶋文哲, 浅川明弘, 乾 明夫, 宮脇正一. ラット食道粘膜への酸刺

激における咬筋筋活動と侵害受容器の発現亢進について. 第9回九州矯正歯科学会大会 学術展示 2014年2月8-9日 沖縄

植田 紘貴, 八木 孝和, 菅 真有, 宮脇 正一. 内臓感覚と胃酸分泌抑制剤ニザチジンが唾液分泌に与える影響, 第72回日本矯正歯科学会大会, 2013, 長野

植田 紘貴, 八木 孝和, 菅 真有, 宮脇 正一. 内臓感覚は唾液分泌および顎舌骨筋のリズミカルな筋活動を誘発する, 第71回日本矯正歯科学会大会, 2012年, 岩手

[図書](計 1件)

Miyawaki S, Yagi T, Nagayama K, Ohmure H, Kanematsu K, Sakoguchi Y, Nova publishers, Sleep bruxism and gastroesophageal reflux as a peripheral risk factor.; Sleep Medicine; Clinical Practice, 2013, 15.

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

[その他]

ホームページ等

鹿児島大学研究者総覧

<http://kuris.cc.kagoshima-u.ac.jp/213106.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

八木 孝和(YAGI TAKAKAZU)

鹿児島大学・医学部歯学部附属病院・講師

研究者番号: 10346166

(2)研究分担者

宮脇 正一(MIYAWAKI SHOUICHI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 80295807

乾 明夫(INUI AKIO)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号: 80168418

上村 裕希(KAMIMURA HIROKI)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 50464467

(~25年度)

植田 紘貴(UEDA HIROTAKA)

鹿児島大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号: 10583445