

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 21 日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24593113

研究課題名(和文) 母獣咬合障害が子獣海馬機能を抑制し、生後の良好養育環境により改善されるか

研究課題名(英文) Maternal occlusal disharmony produces the learning deficits by the altered hippocampal neurogenesis, enriched environment of pups ameliorates the learning deficits

研究代表者

飯沼 光生 (Iinuma, Mitsuo)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：70184364

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：母獣マウスの臼歯部を拳上し、咬合障害を加えることでコルチコステロン濃度が高くなりストレスが確認された。そのマウスから生まれた仔獣は海馬の神経細胞数が減少し、空間認知能が低下した。次に咬合障害マウスから生まれた仔獣を、狭く養育環境が悪いゲージ、広く養育環境が良い(Environment Enrichment EE)ゲージで飼育した。その結果、EEゲージで飼育したマウスは、空間認知能が改善され海馬の神経細胞数も増加した。これらのことより妊娠中の咬合障害のストレスにより仔獣に神経機能への障害が生じるが、生後の飼育環境を良好にすることでかなり抑制できることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To determine which aspect of neurogenesis regulation is influenced in the hippocampus of pups obtained from dams in the bite-raised condition during pregnancy, we examined the proliferation of newborn cells in the pup hippocampus and spatial learning ability. Plasma corticosterone levels of bite-raised group in dam were greater than those of the control group. The dams of maternal bite-raised condition decreased the proliferation of newborn cells in the pup hippocampus and spatial learning ability. Exposure to an enriched environment enhances, hippocampal cell proliferation and spatial learning ability were improved.

研究分野：小児歯科学

キーワード：妊娠中の咬合障害 仔マウス 飼育環境良好 海馬機能 空間認知能

1. 研究開始当初の背景

妊娠中のストレスと出生後の統合失調症など神経認知機能障害との関連が強く指摘されている。また咬合障害がストレスになることを我々は明らかにしたが、母獣の咬合障害が出生後のマウスに及ぼす影響は不明である。また幼少時の養育環境により神経認知機能に影響が及ぶという報告がある。

2. 研究の目的

そこで母獣の咬合障害が仔獣の記憶・情動、脳機能に及ぼす影響と、その影響が養育環境を良くする(Environment Enrichment EE)ことで改善されるのか、老化が抑制されるのかを明らかにし、妊娠中の口腔管理の重要性および出生後の養育環境の重要性を社会にアピールすることを目的として本研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 咬合障害

老化促進モデルマウスを用い、生後3~4か月のマウスを交配させ、メンスが停止した直後に上顎臼歯部をコンポジットレジンで挙上し、咬合障害状態にしストレスを加えた。

まず、妊娠マウスのストレスを定量するため、ストレス関連物質の血中コルチコステロン濃度をラジオイムノアッセイ法で計測した。

次にこれらの妊娠マウスから出生したマウスを生後1か月で離乳させ同一腹の雄マウスを1ゲージ3匹で、生後2か月(若齢期)、5か月(成熟期)、10か月(高齢期)まで飼育し、Morris水迷路テスト(海馬依存性の空間認知記憶能力の検定)、情動を調べる探索行動テスト(ホールボードテスト)を行った。次に海馬歯状回での細胞新生への影響を調べるためBrdU(5-bromo-2-deoxyuridine)を水迷路テスト直後に3時間ごとに5回腹腔内に投与し、BrdU陽性細胞数を調べた。

(2) 養育環境

妊娠マウスの咬合障害が仔獣の神経認知

機能の生後発達への悪影響を養育環境を良好にすること(EE)によりリカバーできないか、老齢期まで影響が継続するかを検討した。方法としては咬合障害は前述と同様の条件で妊娠マウスを作製し、そこから生まれた雄マウスを生後1か月で母獣より分離し、23×17×12cm(狭い、養育環境が悪い)、38×25×17cm(標準)、45×35×25cm(広い、養育環境が良い(EE)の大きさの異なる3種類のゲージで同腹の3匹ずつ飼育した。なお広いゲージではより環境を良くするためにプラスチック製の回転式遊具を入れた。これらのマウスを通常の飼料、水で生後8か月(高齢期)まで飼育した。標準的な飼育を行った群(SE群)、飼育環境を強化した群(EE群)と、非咬合障害群、咬合障害群を組み合わせ、4群に分類した。

空間認知能を調べるためのMorris水迷路テストと海馬新生細胞数を調べるためのBrdU抗体を用いてABC法による免疫染色を行った。次に細胞は新生後、神経細胞に分化していくわけであるが、すべてが神経細胞に分化するわけではなく、神経細胞に分化する細胞、アストロサイトに分化する細胞、その他の細胞に分化する細胞、消失する細胞などに分かれる。そこで、飼育環境が良ければ正常な母獣から生まれた仔獣と比較してストレスが加えられた母獣から生まれた仔獣の海馬の新生細胞の神経細胞への分化率に差がないかを調べるため、新生細胞を同定する抗BrdU抗体と神経細胞を同定する抗NeuN抗体、抗BrdU抗体とアストロサイトを同定する抗GFAP抗体による2重染色を行った。さらに神経細胞の発生や成長、維持、修復に不可欠なタンパクであるBDNFの発現量を測定した。

4. 研究成果

(1) 咬合障害

血中コルチコステロン濃度はコントロール群の妊娠マウスと比較して挙上妊娠マウ

スの方が血中濃度が有意に高く、ストレスが確認された。

Morris 水迷路テストでは、生後2か月(若齢期)では差が認められなかったが、5か月(成熟期)10か月(高齢期)では咬合障害マウスから生まれた仔獣の方が、コントロールマウスから生まれた仔獣より、プラットホームへの到達時間の短縮の割合が小さかった。また、ホールボードテストでは、穴をのぞく回数はコントロールマウスに比べ成熟期、老齢期群ではストレスマウスでは有意に少なく、情動反応が低下し、海馬錐体神経細胞数の測定で神経細胞数も少なかったことから海馬機能も低下していることが明らかになった。BrdU陽性細胞数は、コントロールマウスから生まれたマウスに比べ、咬合障害マウスから生まれたマウスの方が、生後5か月(成熟期)10か月(高齢期)では陽性細胞数が少なかった。

これらのことから妊娠中に咬合挙上のストレスが加わることによって、生まれてくる仔獣は成熟期以降に海馬錐体神経細胞数が減少し、特に海馬歯状回では細胞新生が抑制され、空間認知能、情動が低下することが明らかになった。

(2) 養育環境

水迷路テストでは、咬合障害群ではEE群がSE群と比較してプラットホームへの到達時間が有意に短縮した。また、海馬歯状回でのBrdU陽性細胞数は、SE群で咬合障害群と比較して有意に減少し、咬合障害群ではEE群がSE群と比較して増加していた。2重染色の結果、飼育環境が良ければ新生細胞から神経細胞への分化率が高かったが、アストロサイトへの分化率には差はなかった。BDNFの発現量も飼育環境の改善によりBDNFの発現量が増加した。

これらのことより妊娠中の咬合障害のストレスにより仔獣には細胞新生障害や空間認知能障害などの神経機能への障害が生じ

るが、飼育環境を良好にすることでかなり抑制できることが示唆された。

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6件)

Kondo H, Kurahashi M, Mori D, Linuma M 他6名: Hippocampus-dependent spatial memory impairment due to molar tooth loss is ameliorated by an enriched environment : Archives of Oral Biology 61:1-7:2015.

Huayue Chen, Mitsuo Linuma, Minoru Onozuka and Kin-ya Kubo : Chewing maintains hippocampus-dependent cognitive function : International Journal of Medical Science 12(6) 502-509:2015.

Minori kurahashi, Hiroko Kondo, Mitsuo Linuma, Yasuo Tamura, Huayue Chen and Kin-ya Kubo : Tooth loss early in life accelerates aged-related bone deterioration in mice : Tohoku J. Exp. Med 235(1) 29-37:2015.

Mika Onishi, Mitsuo Linuma, Yasuo Tamura and Kin-ya Kubo : Learning deficits and suppression of the cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus of offspring are attenuated by maternal chewing during prenatal stress : Neuroscience letters 560 77-80:2013.

Kurata C, Ichihashi Y, Onishi M, Linuma M, Tamura Y, Mori D and Kubo K : Early toothless condition suppresses cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus of SAMP8 mice Pediatric Dental Journal 22(2) 110-116 2012

Linuma M, Kondo H, Kurahashi M, Onishi M, Tamura Y, Chen H, Kubo K : Relationship between the Early toothless condition and Hippocampal Functional Morphology. Anat Physiol. 4(3)1-6 2014.

〔学会発表〕(計 11 件)

近藤裕子、倉橋実里、鈴木あゆみ、小刀見佳、村林知香、森大輔、飯沼光生、田村康夫、久保金弥：歯の喪失により惹起される海馬機能障害は豊かな飼育環境により改善される：第 53 回日本小児歯科学会 2015-05-21, 22 広島

倉橋実里、近藤裕子、鈴木あゆみ、小刀見佳、村林知香、森大輔、飯沼光生、田村康夫、陳華岳、久保金弥：幼若期の歯の喪失が骨の脆弱化に及ぼす影響：第 53 回日本小児歯科学会 2015-05-21, 22 広島

Mitsuo linuma, Sakae Mori, Hiroko Kondo, Chika Murabayashi, Yasuo Tamura and Kin-ya Kubo : Maternal occlusal disharmony suppresses cell proliferation in the hippocampus of pups : 25th Congress of International Association of Pediatric Dentistry 2015-07-04 Glasgow, UK

近藤裕子、倉橋実里、鈴木あゆみ、村林知香、森大輔、飯沼光生、田村康夫、陳華岳、久保金弥：歯の喪失により惹起される海馬機能障害は豊かな飼育環境により改善される：第 30 回老化促進モデルマウス研究協議会 2015-07-04 東京

近藤裕子、村林知香、塚本計昌、飯沼光生、田村康夫：歯の喪失が老化促進モデルマウスの骨量変化に及ぼす影響：第 15 回日本外傷歯学会 2015-7-11 福岡

A Suzuki, M Kotachi, M linuma 他 6 名 : Maternal chewing during prenatal stress ameliorates stress-induced deficits in myelin formation in the hippocampus in adult pups : 第 37 回日本神経科学会 2015.9.10 神戸

倉橋実里、林寿男、近藤裕子、大西見佳、鈴木あゆみ、飯沼光生、田村康夫、陳華岳、久保金弥：歯の早期喪失が大腿骨、腰椎の加齢的な骨量減少に及ぼす影響：第 32 回日本小児歯科学会中部地方会 2013.11. 4 岐阜

近藤裕子、堀口浩、倉橋美里、大西見佳、倉田知香、市橋幸子、飯沼光生、田村康夫、森大輔、久保金弥：環境強化は歯の喪失によって惹起される認知障害を改善させる：第 51 回日本小児歯科学会 2013.5.25 岐阜

大西見佳、倉橋実里、近藤裕子、倉田知香、市橋幸子、森大輔、飯沼光生、田村康夫、久保金弥：妊娠中の咀嚼が新生仔の海馬機能障害に及ぼす影響：第 51 回日本小児歯科学会 2013.5.25 岐阜

Kubo K, Onishi M, Murabayashi M, linuma M, Mori D, Huayue C and Onozuka M : Chewing during prenatal stress ameliorates stress-induced suppression of brain-derived neurotrophic factor expression in the hippocampus : 第 36 回日本神経科学大会 2013.6.20 京都

linuma M, Kondou H, Kurahashi M, Onishi M, Tamura M and Kubo K : Effects of maternal occlusal stress on hippocampal neurogenesis in SAM mouse-pups : 24th Congress of the International Association of Pediatric Dentistry 2013.5.25 Seoul, Korea

〔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

飯沼光生(IINUMA Mitsuo)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：70184364

(2)研究分担者

久保金弥(KUBO Kin-ya)

星城大学・リハビリテーション学部・教授

研究者番号：00329492

田村康夫(TAMURA Yasuo)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：40113047

(3)連携研究者

()

研究者番号：