

令和 元年 6 月 12 日現在

機関番号：30110

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11608

研究課題名(和文)咀嚼による記憶機能維持のメカニズム解明についての研究

研究課題名(英文) Mechanism of maintenance of learning and memory by mastication

研究代表者

豊下 祥史 (Toyoshita, Yoshifumi)

北海道医療大学・歯学部・准教授

研究者番号：20399900

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)：咀嚼が学習記憶機能の維持や促進に有効であることが報告されている。咀嚼の動作を行う際、中枢と口腔内は主として三叉神経を介し、双方向に情報の伝達を行っている。さらに、これらの情報が中枢の様々な部分に影響していると考えられるが、その詳細は不明である。本研究では記憶に関与していることが報告されている遺伝子の発現が咀嚼の動作によって大脳皮質内で活性化されていることをモデル動物を使って明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

認知症は加齢とともに発症率が増加する疾患で、超高齢社会を迎えた日本において、患者数の増加が問題となっている。根本的な治療方法はなく、発症の予防、進行の抑制が主たる対応方法となる。認知症によって脳機能が障害され、さまざまな症状を呈するが、記憶機能低下もその一つである。本研究の結果から、咀嚼は学習記憶機能に関与する遺伝子の発現に寄与していることから、口腔機能の改善および維持が認知症の抑制に有効である可能性が考えられる。

研究成果の概要(英文)：It is reported that mastication promotes and maintains learning and memory. When mastication is conducted, central nerve and oral area transmit information each other mainly through trigeminal nerve. Although it is expected that the information spread to various area in cerebral cortex, the mechanism is not clear. In this research, it is suggested that expression of gene that is involved with memory is promoted in cerebral cortex after mastication.

研究分野：補綴歯科学

キーワード：咀嚼 学習記憶機能 BDNF CREB

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで、咀嚼が学習記憶機能を向上または維持させる現象は、動物、ヒトを問わず多数報告されており¹⁾、fMRI や PET を用いた研究により、咀嚼が、一次感覚運動野等の血流や細胞代謝を増加させることが知られている²⁾。

申請者はこれまで咀嚼と学習記憶の関係についてのメカニズムの解明に向け、これまで多数の論文を発表してきた。高齢モデル動物研究において、固形飼料飼育に比較した軟性飼料飼育は、腹側被蓋野のドーパミン作動性や大脳皮質のドーパミンやアセチルコリン濃度の低下を招き、記憶や記憶保持能力を低下させることを報告した³⁾。さらに、液体飼料飼育は固形飼料飼育に比較して、大脳皮質中の脳由来神経栄養因子およびそのレセプターの発現が有意に低下し、さらにはシナプス形成に重要な役割を果たすコレステロールの含有量が低下していることを報告した⁴⁾。

しかしながら、これまでの研究は咀嚼と記憶機能のメカニズムの一部に過ぎず、特に大脳皮質に蓄積されるとされる記憶に関しては、咀嚼がどのような経路で脳のどこを活性化し、そこで何が起きているのか未だ不明である。

本研究では、これまでの研究結果を元に、咀嚼による三叉神経の求心性シグナルが神経細胞の発火を促し、シナプス形成促進物質を産生することによって、シナプス形成の促進が起こり、その結果として記憶機能の維持、向上が起こっているとの仮説をたてた。さらにこれらの刺激は細胞内シグナル伝達により記憶に関係する遺伝子の発現を促進すると予想した。これらのメカニズムが明らかに示されれば、咀嚼の意義、重要性をより明確にできることはもとより、脳機能と関係の深い認知症の予防に歯科領域が積極的に関わっていくことができると考えられる。

2. 研究の目的

上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、申請者は、咀嚼が記憶機能の維持にどのように関わっているのかを明らかにするため、下記の事象を明らかにすることを目的とした。

- ・咀嚼行為後、脳のどの部分の神経細胞が活性化させられるのか。
- ・咀嚼行為後、神経細胞の活性が認められた領域で、シナプス形成を促進するようなタンパクが発現しているのかどうか。
- ・長期的な咀嚼行動の差が、上記で認められた領域にシナプス形成に関して恒常的な変化をもたらしているか。

3. 研究の方法

1) 三叉神経刺激によって神経細胞の活動が起こった領域の特定

Wistar 系雄性ラットを 24 時間絶食させた後、固形飼料を与え咀嚼をさせる群と液体飼料を与え咀嚼を行わせない群を設定した。栄養価の相違による実験結果への影響を避けるため、市販の経腸経口栄養剤とそれと同等の栄養成分を含む固形飼料を製作した (Table 1)。これまでの予備の実験から 5 分で約 2kcal/kg を摂取することが分かっている。これに達しなかったものは分析から除外した。その後、ラットを安楽死させ、脳を頭蓋より一塊として取り出し、速やかにフォルマリン固定を行った。大脳を 5 mm 間隔の冠状断で薄切切片を製作し、細胞内のカルシウムイオンと結合すると発色する Ca²⁺-2 で処理を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて、画像の取り込みを行った。神経細胞の発火すると細胞内 Ca²⁺濃度が上昇するため赤色に発光が認められ、神経細胞の活動が盛んな領域を特定することが可能である。左脳と右脳の発色の相違を画像処理ソフトを用いて解析した。

Table 1 Nutritional profile

Calories	250kcal
Total Carbohydrates	34.3g
Protein	8.8g
Total Fat	8.8g
Cholesterol	20mg<
Sodium	0.2g
Potassium	0.37g
per 250ml or 62.5g	

2) 三叉神経刺激によって神経細胞の活動が起こった領域におけるシナプス形成促進物質の解析

大脳皮質において、シナプス形成を促進するタンパクの検証を行った。本研究では、これまでターゲットとしてきた BDNF (brain derived neurotrophic factor; 脳由来神経栄養因子) および CREB (cAMP response element binding protein) について細胞内の mRNA 量を比較検討した。BDNF は神経細胞の発生, 成長, 維持, 修復に働き、シナプスの可塑性にも関与しており、学習・記憶と関係が深いとされている。CREB は様々な外的刺激によって活性化される転写因子で、学習・記憶に関わるタンパクをコードすることが知られており、BDNF との相乗作用でその効果が増強されることが報告されている。さらに、アルツハイマーの発症と関連する ApoE についても検証を行った。ApoE は血液脳関門を境に中枢と末梢で異なる作用をもっていることから、脳および肝臓における発現を計測した。各々の mRNA 発現量を real time RT-PCR で検討した。

3) ラットを液体または固形飼料で長期間飼育した場合、上記の領域のシナプス形成および形成に関わるタンパクの発現に相違がみとめられるかどうか検討を行った。飼育期間は12週とした。大脳皮質におけるBDNF、CREB、ApoEの発現量をRT-PCR法にて定量した。

4. 研究成果

1) 三叉神経刺激によって神経細胞の活動が起こった領域の特定

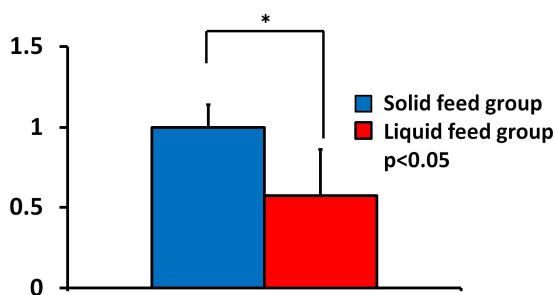
一定時間、絶食をさせた後、5分間の給餌をさせ、咀嚼を行ったことを確認したモデル動物を、可及的にす早く頸椎脱臼により安楽死させ、脳を頭蓋より一塊として取り出した。ホルマリン固定後、切り出した断面とCa²⁺プローブであるCaTM-2と反応をさせ、共焦点レーザー顕微鏡にて、画像の取り込みを行った。その結果、Ca²⁺プローブの発色は非常に微弱であり検出は困難であった。次にホルマリンによる固定方法から、固定を行わずに組織を凍結、凍結切片を作製し、細胞透過性のあるCa²⁺プローブと反応させた。その結果、神経細胞の発色を認めたものの、神経の活性化部位に一定の再現性は認められず、Ca²⁺の流入が起こる場所に一定の規則はないことが明らかとなった。咀嚼の刺激は脳の一定の部位を活性化するような単純な対応ではないことが明らかとなった。

2) 三叉神経刺激によって神経細胞の活動が起こった領域におけるシナプス形成促進物質の解析

1)と同様に絶食後咀嚼を行う群と咀嚼を行わない群に対し、記憶に関わる遺伝子の分析を行った。咀嚼による中枢への刺激は特定部位が活性化されるわけではない結果が得られたため、大脳皮質を一塊として、総mRNAを抽出した後、CREB、BDNF、ApoEの発現量を測定した。さらに、ApoEについては肝細胞での発現も同様に測定した。

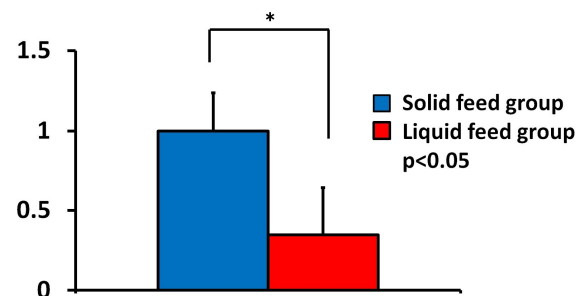
BDNFの大脳皮質における発現は、咀嚼を行わなかった群と比較して、咀嚼を行った群は約2倍の発現を示していた(図1)。CREBの発現についても、咀嚼を行った群は咀嚼を行わなかった群と比較して有意に高い発現を示していた(図2)。咀嚼による刺激がCREBの発現を上昇させ、これが転写因子として機能し、結果としてBDNFの発現を上昇させていることが明らかとなった。

一方、大脳皮質におけるApoEの発現については両群間に有意な差を認めなかった(図3)。咀嚼と記憶機能の関わりにApoEは関与しておらず、脂質の輸送やコレステロール代謝の部分に咀嚼は関与していない可能性が示唆された。肝細胞におけるApoEの発現では、咀嚼を行った群で有意に高い発現を示した(図4)。咀嚼による情報伝達が中枢を介し、自律神経を経由し、肝細胞でのApoEの発現上昇が起こったことが考えられる。給餌により脂質が取り込まれ、これを代謝する必要があることを考えると、肝細胞におけるApoEの上昇は理にかなっていると考えられる。



BDNF expression in cerebral cortex

図1 大脳皮質におけるBDNFの発現



CREB expression in cerebral cortex

図2 大脳皮質におけるCREBの発現

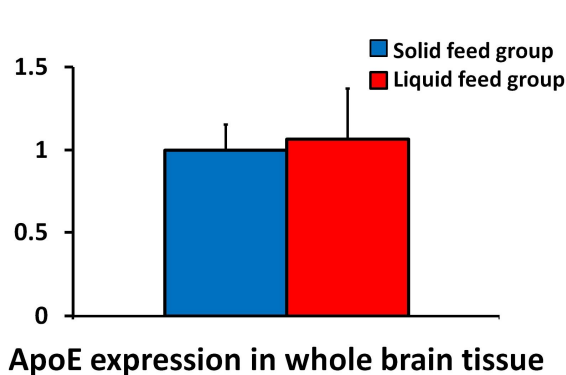


図3 大脳皮質における ApoE の発現

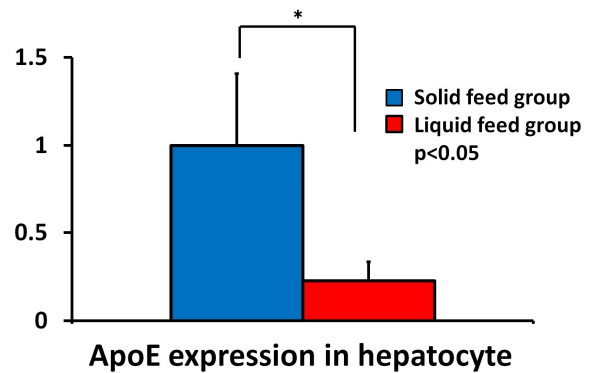


図4 肝細胞における ApoE の発現

3) 長期の咀嚼行為による記憶に関わる遺伝子の発現

固形飼料によって長期間の咀嚼を行かせた群は、液体飼料によって咀嚼を行っていなかった群と比較して、CREB、BDNF とともに高い発現傾向は示したが、有意な差は認めなかった。咀嚼によるこれらの遺伝子の発現は永続的に持続するわけではなく、咀嚼行為による発現の促進と経時間的な発現の減少を繰り返していると考えられた。また、ApoE の発現については両群間に差はみとめられなかった。

<引用文献>

船越正也, 川村早苗, 中島宏通ほか 咀嚼機能と知能指数の相関について, 岐阜歯科誌, 14: 17-29, 1987.

Shinagawa H, Ono T, Honda E, et al. Chewing-side preference is involved in differential cortical activation patterns during tongue movements after bilateral gum-chewing: a functional magnetic resonance imaging study. *J Dent Res.* 2004;83:762–766.

Makiura T, Ikeda Y, Hirai T, et al. Influence of diet and occlusal support on learning memory in rats behavioral and biochemical studies. *Research Communications in Molecular Pathology and Pharmacology.* 2000;107(3-4):269–277.

渡部真也, 豊下祥史, 川西克弥, 會田英紀, 越野 寿: 咀嚼による脳由来神経栄養因子を介したコレステロール合成の促進. 日本補綴歯科学会誌, 6: 167-175, 2014.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

菅悠希, 豊下祥史, 佐々木みづほ, 川西克弥, 會田英紀, 越野 寿, マウスにおける咀嚼動態の相違が GLP-1 分泌に与える影響, 日本咀嚼学会雑誌, 27 巻, 2017 年, 72-79

<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/download?GoodsID=dr3mast i /2017/002702/003&name=0072-0079j&User ID=210.137.144.232>

〔学会発表〕(計4件)

Yoshifumi Toyoshita, Yuki Kan, Yosuke Takeda, Mizuho Sasaki, Katsuya Kawanishi, Hisashi Koshino, Effects of Mastication by Each Organs on Expression of Apo E, 42nd Annual Conference of the European Prosthodontic Association and EPA-SEPES Joint Meeting, 2018 年

Yoshifumi Toyoshita, Yuki Kan, Yosuke Takeda, Mizuho Sasaki, Katsuya Kawanishi, Hisashi Koshino, Mastication Promotes Expression of Some Memory-Related Genes in the Cerebral Cortex, The 11th Biennial Congress of Asian Academy of Prosthodontics, 2018 年

菅悠希, 豊下祥史, 佐々木みづほ, 川西克弥, 會田英紀, 安斎 隆, 寺沢秀朗, 玉城均, 越野 寿, 飼料性状の違いによる咀嚼動態の相違が脳細胞に与える影響, 第126回日本補綴歯科学会学術大会 2017 年

菅悠希, 豊下祥史, 佐々木みづほ, 川西克弥, 會田英紀, 山中隆裕, 芦田眞治, 小西洋次, 高崎英仁, 伊東由紀夫, 越野 寿, 健常マウスにおける飼料性状の違いによる GLP-1 の変化, 第125回日本補綴歯科学会学術大会, 2016 年

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：會田 英紀

ローマ字氏名：(AITA, hideki)

所属研究機関名：北海道医療大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 10301011

研究分担者氏名：川西 克弥

ローマ字氏名：(KAWANISHI, katsuya)

所属研究機関名：北海道医療大学

部局名：歯学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 10438377

研究分担者氏名：佐々木 みづほ

ローマ字氏名：(SASAKI, mizuho)

所属研究機関名：北海道医療大学

部局名：歯学部

職名：助教

研究者番号(8桁): 70638410

研究分担者氏名：越野 寿

ローマ字氏名：(KOSHINO, hisashi)

所属研究機関名：北海道医療大学

部局名：歯学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 90186669

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。