

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：32305

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K11107

研究課題名(和文)咀嚼による全身的效果のメカニズム解明

研究課題名(英文)Elucidating mechanism underlying systemic effects of mastication

研究代表者

永井 俊匡(Nagai, Toshitada)

高崎健康福祉大学・健康福祉学部・准教授

研究者番号：50451844

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：咀嚼の効果は、行動・生理・生化学的な研究が進んでいる一方で、分子レベルでの研究は少ない。そこで(1)咀嚼が血圧を下げるメカニズムの解明、(2)咀嚼が小脳を介して運動機能与える効果の解明を、目指した。その結果、ラットに粉末飼料と比べて固形飼料を与えると、(1)視床下部の視床下部-下垂体-副腎軸に関連する遺伝子群の発現量や副腎皮質刺激ホルモンの分泌量が増加することを明らかにした。さらに、(2)ラット小脳の樹状突起形態形成・神経新生・長期増強に関連する遺伝子の変動を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

咀嚼の効果は、そのメカニズムに関する知見に乏しい。本研究は、網羅的な遺伝子発現解析を行うことで、現象と現象とをつなぎ合わせ、これまで見えてこなかったメカニズムの解明を図った。そして咀嚼が視床下部と小脳の神経細胞に変化を及ぼすことを、分子レベルで明らかにした。このような基礎的な研究を積み重ねることによって、将来的に咀嚼に関連した機能性食品の開発や、スポーツ医学・栄養学または高齢者医学・栄養学への展開、新たな疾患または未病マーカーの同定などの創造につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：While research on behavior, physiology, and biochemistry is progressing on the effects of mastication, there are few studies at the molecular level. Therefore, we aimed to (1) elucidate the mechanism by which mastication lowers blood pressure, and (2) elucidate the effect of mastication on motor function via the cerebellum.

As a result, when rats were fed a solid diet compared to a powder diet, (1) the expression level of genes related to the hypothalamus-pituitary-adrenal axis and the secretion level of adrenocorticotrophic hormone increased. Furthermore, (2) expression of the genes related to dendrite morphogenesis, neurogenesis, and long-term potentiation were altered in rat cerebellum.

研究分野：栄養学

キーワード：咀嚼 視床下部 小脳 DNAマイクロアレイ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年では、食品加工技術の進歩により、ファーストフードや加工食品が普及し、軟食化の傾向を示している。また欠食と孤食の増加、さらに高齢化などにより咀嚼が疎かになり、現代人の咀嚼回数は戦前の半分以上にまで低下している<sup>1)</sup>。

しかし咀嚼は、単に消化作用のみではなく、全身性の生体機能の発達に影響しており、生命の維持に極めて重要で広範な作用を持つ<sup>2)</sup>。例えば運動機能との関連については、高齢ラットの全身持久力や<sup>3)</sup>、高齢人の開眼片足立の持続時間に<sup>4)</sup>、咀嚼が影響する。高齢ラットではさらに骨塩量も増加することから、骨粗しょう症予防に効果があるとされる<sup>5)</sup>。

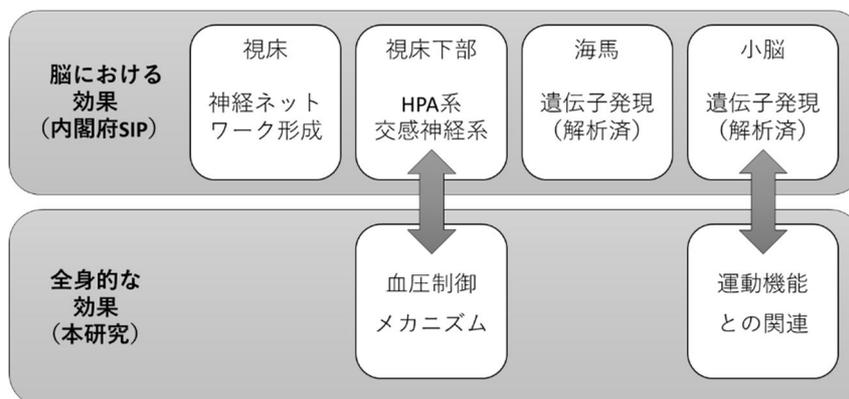
咀嚼のストレス緩和効果について、動物実験においてストレス関連ホルモンの血中濃度変化が認められる<sup>6, 7)</sup>。また咀嚼時には、視床下部のヒスタミン分泌が活性化し、摂食抑制や<sup>8, 9)</sup>、エネルギー代謝亢進を介して、抗肥満作用が発揮される<sup>10)</sup>。

脳においては、飼料硬度が幼若ラットの学習・記憶能力に影響する<sup>11, 12)</sup>。これは、咀嚼の減少による海馬神経細胞の減少が関係していると考えられる<sup>13)</sup>。ヒトのガム咀嚼も、短期記憶能力を向上させる<sup>14)</sup>。そのメカニズムの一端として、脳血流量の増加や<sup>15)</sup>、脳由来神経栄養因子 (BDNF) の発現誘導が示されている<sup>16)</sup>。各種疾患モデルラットの記憶能力も向上することから、記憶障害への予防効果も期待される<sup>17, 18)</sup>。

### 2. 研究の目的

これら咀嚼の効果は、行動・生理・生化学的な研究が進んでいる一方で、分子レベルでの研究は少ない。したがってこれまでは現象論的な議論にとどまっており、メカニズムの解明には至っていない。そこで報告者らは、咀嚼頻度の異なる粉末飼料あるいは固形飼料をラットに与え、DNA マイクロアレイによりラット脳内発現遺伝子を網羅的に解析した(内閣府・戦略的イノベーション創造プログラム(SIP))。

その結果、視床においては咀嚼による離乳直後の神経ネットワーク形成の制御、視床下部においては視床下部 - 下垂体 - 副腎 (HPA) 系や交感神経系による血圧制御が示唆された(下図)。



このように咀嚼の効果について、少なくとも脳機能についてはメカニズム解明の端緒を切り開くことができた。しかし、全身的な効果のメカニズムは、未だ不明である。そこで本研究では、咀嚼の脳にとどまらない全身的な効果のメカニズム解明を目的とした。具体的には、(1) 咀嚼が血圧を下げるメカニズムの解明、(2) 咀嚼が小脳を介して運動機能与える効果の解明を、目指した。

### 3. 研究の方法

(1) 報告者らが既に得てあった視床下部 DNA マイクロアレイデータについて、Rank products 法<sup>19)</sup>を用いて発現変動遺伝子を抽出した。それら遺伝子を解析ソフトウェア Ingenuity Pathway Analysis (IPA, QIAGEN)に供し、有意な Z スコア (2 以上) の Diseases or Functions Annotation を抽出した。

3 週齢の Wistar 系雄ラットを粉末飼料群または固形飼料群に分けて 15 週間飼育し、視床下部の RNA を抽出した。逆転写後、HPA 系に関連する遺伝子について TB Green Premix Ex Taq (TaKaRa) を用いたリアルタイム PCR を行った。また、同条件のラット血清中の adrenocorticotrophic hormone (ACTH) 濃度を、ACTH ELISA kit (MD Biosciences) にて測定した。

(2) 報告者らが既に得てあった小脳 DNA マイクロアレイデータについて、Rank products 法を用いて発現変動遺伝子を抽出した。抽出された遺伝子について、ウェブ解析ソフトウェア DAVID を用いて Gene Ontology (GO) 解析を行った。また、IPA を用いて、有意な Z スコア (2 以上) の

Upstream Regulator を予測した。

運動機能解析には、ロータロッド装置 (LE8505, Panlab) を用いた。この装置には、直径 6 cm の回転ロッド (ロータロッド) がプラットフォームから 21.5 cm の高さに設置されており、ラットをロータロッドに乗せると、ラットは落下しないようにロッドの上を歩く。3 週齢または 4 週齢の Wistar 系ラット (オス) をロッドに乗せ、徐々に回転速度が加速する際のロッドから落下するまでの時間、または一定回転数で一定時間内に落下する回数を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) 視床下部 DNA マイクロアレイデータを、これまでと別のソフトウェア (Ingenuity Pathway Analysis, IPA) を用いて多角的に解析した。IPA Diseases or Functions 解析で発現変動遺伝子の機能的な分類を行ったところ、23 個の Annotation が抽出された。そのうち 18 個には、関連遺伝子として BDNF が含まれていた。これら 18 個から、咀嚼は視床下部において BDNF の発現上昇を介して神経細胞の保護や成長の機能に影響をもたらすことが示唆された。さらに、咀嚼が BDNF を介して微小管ダイナミクスやアクチン重合を活性化し、神経伸長を亢進することも示唆された。ただし、興奮性シナプスと抑制性シナプスの両方にそれぞれかかわる遺伝子の発現が見られることから、シナプス可塑性の両方向の作用について更なる検討が必要であると考えられた。

DNA マイクロアレイの結果を検証するため、より定量性の高いリアルタイム PCR を用いて、HPA 系関連遺伝子の発現解析を行った。その結果、バソプレッシン (AVP) とニューロメディン U (NMU) で DNA マイクロアレイと同様の、固形飼料群での発現上昇が確認された。このことから、咀嚼が NMU と AVP を介して副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) の分泌を低下させ、血圧の低下を引き起こすという仮説をより確かめる結果となった。副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン (CRH) の減少傾向も、有意ではないものの、仮説を支持する結果となった。

次いで、ACTH の分泌上昇に注目した。しかし ACTH は、プロオピオメラノコルチン (POMC) から切り出されて分泌されるため、POMC の遺伝子発現変動では ACTH の増減を定量できない。そこで ACTH タンパク質の血清濃度を ELISA 法で測定した。その結果、血清 ACTH 濃度は、粉末飼料群に比べて、固形飼料群で有意に低値を示した。このことによって、HPA 系を介した血圧制御の説をより確かなものとした。

(2) 小脳について、まず DNA マイクロアレイデータの詳細な解析を行った。発現変動遺伝子を抽出し、Gene Ontology (GO) 解析によって機能的に分類したところ、神経に関連する最下層 GO Term が最も多く抽出された。これらの Term は、神経細胞機能、遺伝子発現の調節、細胞応答、その他の 4 つに分類された。また、Term に含まれる発現変動遺伝子は、属する Term によって 4 パターン (グループ - ) に分類された。

これらの遺伝子を詳細に考察したところ、グループ と では、咀嚼することで軸索や樹状突起の形態形成が促進されることが示唆された。グループ では、神経細胞を新生するうえで重要な役割を果たしていると考えられる。グループ では、咀嚼は小脳においても正常なスパインの形態形成に重要であると考えられた。

データ解析ソフト Ingenuity Pathway Analysis (Qiagen) を用いて、遺伝子発現の変化を説明できる上流因子を予測したところ、咀嚼は cAMP を介して長期増強や血管拡張を引き起こされることが示唆された。

小脳と関連して、ロータロッド装置を用いて、咀嚼の運動機能に対する効果の測定系構築を試みた。ロータロッド試験は、協調運動や学習効果の能力を定量化するために用いられており、小脳機能の解析に有用と考えられる。老齢動物での実施例は多く、報告者らの系でも適用可能と考えられた。しかし健康な幼若ラットでの例は少なく、この条件でのロータロッド試験を予備検討した。

その結果、十分に訓練した後に試験することで、幼若ラットの学習効果を高められることが示唆され、試験条件の設定の目安を得た。今後、さらに詳細な実験条件を決定し、サンプル数を増やして粉末飼料群と固形飼料群との学習効果の差を解析していく予定である。

#### < 引用文献 >

- 1) 齋藤滋. 咀嚼とメカノサイトロジー. 咀嚼システム入門 (1987) 風人社.
- 2) 小林義典. 咬合・咀嚼が創る健康長寿. 日補綴会誌 (2011) 3, 189-219.
- 3) 青木 聡, 武田秀勝, 平井敏博, 池田和博, 石島 勉, 矢嶋俊彦. 咀嚼機能が高週齢ラットの全身持久性に及ぼす影響. 老年歯学 (1995) 10, 128-135.
- 4) Nagai, Shibata, Haga, Ueno, Suyama, Yasumura, Matsuzaki, Sakihara, Taira. Chewing Ability in Relation to Physical Health Status. Jpn J Geriat (1990) 27, 63-68.
- 5) Hirai, Ikeda, Hashikawa, Aoki, Terasawa. Histomorphometric, Immunohistochemical and Exercise-Physiological Study on Age-, Tooth Loss-, Dietary- and Nutrition-related Changes in Rat Body. J Jpn Prosthodont Soc (1998) 42, 175-183.
- 6) Créton, Cune, de Putter, Ruijter, Kuijpers-Jagtman. Dentofacial characteristics of patients with hypodontia. Clin Oral Investig (2010) 14, 467-77.

- 7) Tsuchiya, Niijima-Yaoita, Yoneda, Chiba, Tsuchiya, Hagiwara, Sasaki, Sugawara, Endo, Tan-No, Watanabe. Long-term feeding on powdered food causes hyperglycemia and signs of systemic illness in mice. *Life Science* (2014) 103, 8-14
- 8) Fujise, Yoshimatsu, Kurokawa, Oohara, Kang, Nakata et al. Hypothalamic histamine modulates mastication and satiation in rats. *Proc Soc Exp Biol Med* (1998) 217, 228-234.
- 9) Yoshimatsu, Itateyama, Kondou, Tajima, Himeno, Hidaka, Kurokawa, Sakata. Hypothalamic neuronal histamine as a target of leptin in feeding behavior. *Diabetes* (1999) 48, 2286-2291.
- 10) Li, Zhang, Hu, Li, Li, Li, Wang. Improvement in chewing activity reduces energy intake in one meal and modulates plasma gut hormone concentrations in obese and lean young Chinese men. *Am J Clin Nutr* (2011) 94, 709-716.
- 11) Onozuka, Watanabe, Mirbod, Ozono, Nishiyama, Karasawa, Nagatsu. Reduced mastication stimulates impairment of spatial memory and degeneration of hippocampal neurons in aged SAMP8 mice. *Brain Res* (1999) 826, 148-153.
- 12) Akazawa, Kitamura, Fujihara, Yoshimura, Mitome, Hasegawa. Forced mastication increases survival of adult neural stem cells in the hippocampal dentate gyrus. *Int J Mol Med* (2013) 31, 307-314.
- 13) Terasawa, Hirai, Ninomiya, Ikeda, Ishijima, Yajima, Hamaue, Nagase, Kang, Minami. Influence of tooth-loss and concomitant masticatory alterations on cholinergic neurons in rats: immunohistochemical and biochemical studies. *Neurosci Res* (2002) 43, 373-379.
- 14) Hirano, Obata, Kashikura, Nonaka, Tachibana, Ikehira, Onozuka. Effects of chewing in working memory processing. *Neurosci Lett* (2008) 436, 189-192.
- 15) Onozuka, Fujita, Watanabe, Hirano, Niwa, Nishiyama, Saito. Mapping brain region activity during chewing: a functional magnetic resonance imaging study. *J Dent Res* (2002) 81, 743-746.
- 16) Nose-Ishibashi, Watahiki, Yamada, Maekawa, Watanabe, Yamamoto, Enomoto, Matsuba, Nampo, Taguchi, Ichikawa, Saido, Mishima, Yamaguchi, Yoshikawa, Maki. Soft-diet feeding after weaning affects behavior in mice: Potential increase in vulnerability to mental disorders. *Neuroscience* (2014) 263, 257-268.
- 17) Kushida, Kimoto, Hori, Toyoda, Karasawa, Yamamoto, Kojo, Onozuka. Soft-diet feeding decreases dopamine release and impairs aversion learning in Alzheimer model rats. *Neurosci Lett* (2008) 439, 208-211.
- 18) Kawanishi, Koshino, Toyoshita, Tanaka, Hirai. Effect of Mastication on Functional Recoveries after Permanent Middle Cerebral Artery Occlusion in Rats. *J Stroke Cerebrovasc Dis* (2010) 19, 398-403.
- 19) Del Carratore, Jankevics, Eisinga, Heskes, Hong. RankProd 2.0: a refactored bioconductor package for detecting differentially expressed features in molecular profiling datasets. *Rainer Breitling Bioinformatics* (2017) 33, 2774-2775.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 永井俊匡, 朝倉富子	4. 巻 52
2. 論文標題 咀嚼が脳の発育を促進する: そのメカニズムを探る	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 日本調理科学会誌	6. 最初と最後の頁 126-128
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogawa Mana, Nagai Toshitada, Saito Yoshikazu, Miyaguchi Hitonari, Kumakura Kei, Abe Keiko, Asakura Tomiko	4. 巻 498
2. 論文標題 Short-term mastication after weaning upregulates GABAergic signalling and reduces dendritic spine in thalamus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 621 ~ 626
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbrc.2018.03.032	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 永井俊匡、齋藤美佳、清水愛恵、齋藤芳和、安岡顕人、阿部啓子、朝倉富子
2. 発表標題 長期間の咀嚼は視床下部の遺伝子発現の変化と血圧の低下をもたらす
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 李善美、安岡顕人、永井俊匡、齋藤芳和、阿部啓子、朝倉富子
2. 発表標題 幼若期における咀嚼刺激が記憶に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 李善美、安岡顕人、永井俊匡、斎藤芳和、阿部啓子、朝倉富子
2. 発表標題 幼若期における咀嚼刺激が脳内発現遺伝子と行動に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 永井俊匡
2. 発表標題 ラットの幼若期における咀嚼刺激が海馬の遺伝子発現と記憶能力に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度関東支部例会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 宮口 一勢、永井 俊匡、斉藤 芳和、安岡 顕人、阿部 啓子、朝倉 富子
2. 発表標題 ラットの幼若期における咀嚼刺激が海馬の遺伝子発現と記憶能力に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 永井 俊匡、浅野 実久、齊藤 美佳、齋藤 芳和、阿部 啓子、朝倉 富子
2. 発表標題 長期間の咀嚼による小脳の遺伝子発現変動
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

高崎健康福祉大学 研究者情報データベース 永井俊匡  
<https://research.takasaki-u.ac.jp/Main.php?action=profile&type=detail&tchCd=0000001316>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	朝倉 富子  (Asakura Tomiko)  (20259013)	東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・特任教授   (12601)	
研究分担者	清水 愛恵  (Shimizu Manae)  (30816343)	高崎健康福祉大学・健康福祉学部・助手   (32305)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------