

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17244

研究課題名（和文）海馬Wnt signal pathwayの変調と鼻呼吸障害改善の生物学的意義

研究課題名（英文）Biological significance of hippocampal Wnt signaling pathway modulation and improvement of nasal breathing disorders

研究代表者

沖原 秀政 (Okihara, Hidemasa)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・特任助教

研究者番号：80754960

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：実験群マウスは電気焼灼器を用いて左側外鼻孔を焼灼し片側鼻閉塞モデルとした。15週齢での行動実験において、実験群の記憶・学習機能低下が認められた。記憶・学習機能物質の評価に関して、Western blottingより、実験群においてBDNFの有意な増加、Wnt3a、 β -CateninおよびTrkBの有意な減少を認められた。RT-PCRより、実験群においてTrkB mRNAおよびBDNF mRNAの有意な減少を認めた。この結果より、成長期における鼻呼吸障害は、記憶・学習機能低下をもたらす可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、呼吸機能障害が、記憶・学習機能を司る海馬に変性をもたらす可能性が示唆されている。呼吸機能障害と海馬の機能変性に関するメカニズムについて解明することは、早期の呼吸機能障害改善の意義を高次脳機能学的観点から明確にすることが可能となり、先制医療への応用を鑑みると、社会的意義は極めて大きい。したがって本研究を含む研究の全体構想である「呼吸機能障害と記憶・学習機能を司る海馬における機能的・組織生化学的変性の関連を解明する」ことは学術的・社会的意義は非常に大きい。

研究成果の概要（英文）：In the experimental group mice, the left external nostril was cauterized using an electric cautery device to obtain a unilateral nasal obstruction model. In a behavioral experiment at 15 weeks of age, deterioration of memory and learning function was observed in the experimental group. Regarding the evaluation of memory / learning functional substances, Western blotting showed a significant increase in BDNF and a significant decrease in Wnt3a, β -Catenin and TrkB in the experimental group. RT-PCR showed a significant decrease in TrkB mRNA and BDNF mRNA in the experimental group. This result suggests that nasal breathing disorder during the growth period may lead to deterioration of memory and learning function.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：記憶・学習機能

1. 研究開始当初の背景

鼻呼吸障害は、頭痛、睡眠障害、日中傾眠などを引き起こすとされており、全身の健康に多大な影響を与え、成長期鼻閉に伴う口呼吸は、開咬、上顎前突、交叉咬合といった不正咬合との関連が指摘されている。さらに鼻閉に伴う口呼吸は、顎顔面領域の成長に影響を与えるだけでなく、高次脳機能にも影響を与えることが示唆されている。記憶学習機能は海馬が担っており、その成長発育には脳由来神経栄養因子である Brain derived neurotrophic factor (BDNF) とその受容体である Tyrosine kinase receptor B (TrkB) の結合が必要不可欠である。成長期片側鼻閉マウスを用いた先行研究において、実験群の BDNF 発現量は対照群に比べ有意に増加し、受容体である TrkB、および BDNF/TrkB signaling の指標とされる Phospho-p44/42MAPK 発現量は有意に減少した。それに伴い、海馬神経細胞数は有意に減少し、実験群マウスの記憶学習機能低下を認めた。しかし、実験群における BDNF および TrkB のタンパク質発現の変化のメカニズムは明らかにされておらず、BDNF/TrkB signaling の変化に寄与する因子についてもほとんど知られていない。本研究の目的は、成長期鼻呼吸障害に起因する BDNF および TrkB 発現の変化を高次脳機能学的観点から明確にすることにより、矯正歯科治療の予防的介入の提唱や方法の考案に繋げることである。

2. 研究の目的

記憶学習機能発達に重要な役割を持つ BDNF 産生の上流機構は Wnt/ β -Catenin 経路が担っているという報告がある。Wnt/ β -Catenin 経路は遺伝子発現調節に関与し、細胞の新生と維持の役割を担っている。この Wnt タンパク質の一種である Wnt3a が Frizzled 受容体に結合することで、 β -Catenin が核内へ移行し、転写因子と結合する。 β -Catenin と結合した転写因子が DNA 標的領域に結合し、BDNF mRNA の転写が起これ、BDNF が産生される。また、Wnt3a のアンタゴニスト DKK-1 が Frizzled 受容体と結合することで、 β -Catenin の核内移行が妨げられるため、DNA 転写が行われなくなる。これまで、成長期片側鼻閉が BDNF 産生に関する報告は認められているものの、その上流に位置する Wnt/ β -Catenin 経路に与える影響に関しては、明らかとなっていない。そこで本研究は、成長期片側鼻閉が SpO₂ レベルと Wnt/ β -Catenin 経路に与える影響を、行動学的・生化学的・組織学的手法を用いて明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 6日齢 BALB/c 雄性マウス 12匹を実験群と対照群 (各 n=6) に分けた。両群とも 8日齢で低温麻酔を施し、実験群マウスは電気焼灼器を用いて左側外鼻孔を焼灼し片側鼻閉塞を行い、対照群マウスは左側外鼻孔の 1-2mm 上方を焼灼する偽手術を行った。飼育は 15週齢までとした。

(2) 行動学的評価

15週齢時に Y 字迷路試験と受動回避試験を行った。Y 字迷路試験では、Y 字型の装置の中にマウスを入れ、8分間自由行動させた。各アームへの侵入回数および総侵入回数を計測し、自発的交替行動率を求めた。受動回避試験では、1日目に順化を行い、2日目に明箱に放たれたマウスが暗箱に入り電気刺激を受けるまでの時間を測定した。3日目に同様に明箱に放たれたマウスが暗箱に入るまでの時間を測定し、2日目と比較することで記憶学習機能を評価した。

(3) 動脈血酸素飽和度 (SpO₂) の測定

15週齢時に、MouseOx[®]を用いイソフルラン吸気麻酔下で計測し、連続した 40-50秒間の平均値とした。

(4) 生化学的評価

海馬における BDNF、TrkB、Wnt3a、Dkk-1 および β -Catenin の各タンパク質を Western blotting を用いて分析した。検出したバンドは ImageJ を用いて定量化した。また、BDNF および TrkB mRNA の発現を RT-PCR を用いて計測した。

(5) 組織学的評価

摘出した脳は 4%パラホルムアルデヒドで固定後、30%スクロース溶液へ移しその後、ドライアイスとイソペンタンを用いて凍結した。先行研究を参考にして、Bregma より -1.80mm から -5.20mm の部位を使用し、40 μ m の厚さで薄切し、切片を作成した。海馬歯状回の神経細胞増殖能を測定するため Ki67 を免疫標識として染色を行った。

4. 研究成果

SpO₂ レベルは、15週齢時において実験群で有意に低下した。Y 字迷路試験は、実験群において自発交替行動率の有意な低下を認めた。また受動回避試験において、明箱から暗箱へ侵入までの時間 (3日目) は実験群が対照群と比較して有意に短かった。Western blotting より、実験群において BDNF の有意な増加、Wnt3a、 β -Catenin および TrkB の有意な減少を認めた。Dkk-1 に関しては有意差を認めなかった (図 1)。RT-PCR より、実験群において TrkB mRNA および BDNF mRNA の有意な減少を認めた。免疫組織学染色より、実験群の海馬歯状回 Ki67 陽性細胞数は有意な減少を認めた (図 2)。実験群において SpO₂ レベルと TrkB タンパク発現量、ならびに SpO₂ レベルと

TrkB mRNA との間に有意な正の相関を認めた。

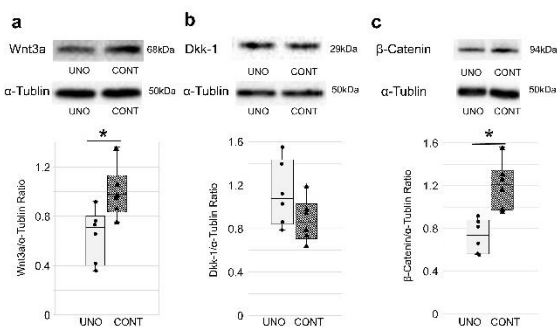


図1 Western blotting 結果

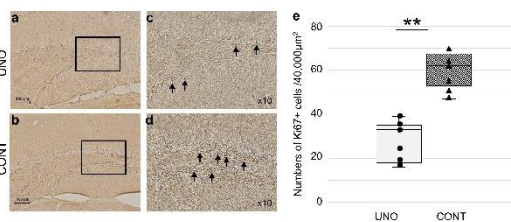


図2 Ki67 染色結果

本研究では、成長期片側鼻閉がマウス記憶学習機能に与える影響を SpO₂ と海馬 Wnt/β-Catenin 経路に注目して調べた。その結果、成長期片側鼻閉は BDNF 産生の上流である Wnt/β-Catenin 経路に変調を与えることが示唆された。また、SpO₂ レベルと TrkB mRNA の発現には有意な正の相関が見られた。

先行研究において、成長期片側鼻閉に伴ってマウス記憶学習機能が低下することが示されており、実験群の海馬において BDNF/TrkB signaling の発現低下、TrkB のタンパク質発現低下ならびに BDNF タンパク質発現の増加を認めたが、BDNF/TrkB シグナルの低下要因、ならびに BDNF および TrkB のタンパク質発現変化機序に関しては、依然として不明な点が多い。本研究において、実験群では、SpO₂ レベルの低下、ならびに TrkB mRNA および TrkB タンパク質の減少が観察された。これは、低酸素状態が海馬の TrkB ダウンレギュレーションをもたらしたという過去の報告と一致する。この結果から、成長期片側鼻閉に伴う慢性的な SpO₂ 低下が、TrkB タンパク質および mRNA のダウンレギュレーションを引き起こした可能性が示唆された。さらに、マウス海馬における BDNF タンパク質の発現量は、対照群に比べて実験群で増加していた。

実験群における BDNF タンパク質発現増加の機序に関しては二つの可能性が考えられる。一つは BDNF タンパク質産生が先行して亢進し、シナプス間隙に過剰に放出された BDNF の処理に受容体である TrkB が応答できず、TrkB のダウンレギュレーションが生じたとするものである。その結果、BDNF/TrkB シグナル発現が低下を示した可能性である。もう一つは、受容体である TrkB の発現減少が先行したとするものである。すなわち、最初に TrkB の減少が生じ、結合できなくなった BDNF がシナプス間隙にあふれた結果、BDNF タンパク質が増加した可能性である。マウス海馬 BDNF タンパク質量の増加が BDNF 過剰産生に起因するものか、あるいは BDNF がシナプス間隙に余剰に存在しているのかどちらかを明らかにするため、本研究では Wnt/β-Catenin 経路に焦点を当てた。Wnt/β-Catenin 経路は神経保護、ニューロン分化、シナプス形成など、胚および成体組織に対して広汎かつ重要な役割を果たしている。最近の研究では、Wnt シグナル伝達が海馬記憶学習機能に寄与しているという報告や、神経細胞において BDNF の増減に応じて Wnt シグナルが増減するという報告がある。Wnt ファミリータンパク質の一つである Wnt3a は神経細胞において BDNF の発現を誘導し、慢性的な低酸素状態はマウスの海馬における β-Catenin の発現を低下する。本研究では、実験群マウス海馬において Wnt3a および β-Catenin のタンパク質発現が対照群に比べ有意に減少した。

実験群では Wnt/β-Catenin 経路の変調が認められ、経路の下流に位置する BDNF mRNA の産生が減少しただけでなく、TrkB mRNA の産生も減少していた。また実験群では SpO₂ レベルと TrkB mRNA の発現との間に有意な正の相関を認めた。先行研究において、IH モデルでは海馬 TrkB の発現が低下を認めるとの報告があることから、TrkB 発現低下は SpO₂ レベルの低下に起因すると考えられる。成長期片側鼻閉により TrkB がダウンレギュレーションし、結合できなくなった BDNF がシナプス間隙にあふれ BDNF の総タンパク質が増加したと考えられる。また、Wnt/β-Catenin 経路の下流にある β-Catenin の減少は、増加した BDNF の調節に寄与していることが示唆される(図3)。

実験群において、TrkB と BDNF の産生低下を認めた。先行研究において、成長期鼻呼吸障害が海馬神経細胞数の減少を引き起こしたという報告がなされている。本研究では実験群マウス海馬歯状回における Ki67 陽性神経細胞数の有意な減少を認めた。海馬 Ki67 陽性細胞数減少が、記憶学習機能低下をもたらすという報告がなされているが、本研究においても、成長期片側鼻呼吸障害に起因する Ki67 陽性細胞数の有意な減少が記憶学習機能障害を誘発した可能性が示唆された。

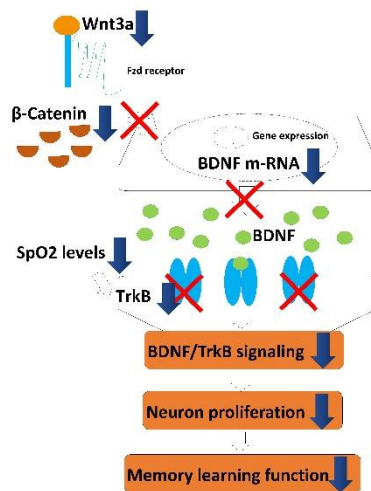


図3 分子メカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Ishidori Hideyuki, Okihara Hidemasa, Ogawa Takuya, Abe Yasunori, Kato Chiho, Aung Phyo Thura, Fujita Akiyo, Kokai Satoshi, Ono Takashi	4. 巻 55
2. 論文標題 Nasal obstruction during the growth period modulates the Wnt/ catenin pathway and brain derived neurotrophic factor production in association with tyrosine kinase receptor B mRNA reduction in mouse hippocampus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Neuroscience	6. 最初と最後の頁 5~17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/ejn.15547	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石通秀行、沖原秀政、小川卓也、小海暎、阿部泰典、加藤千帆、Phyo Thu RhaAung、藤田秋世、小野卓史
2. 発表標題 マウス成長期鼻呼吸障害は海馬におけるWnt signaling pathwayに変調をもたらす
3. 学会等名 第78回日本矯正歯科学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------