

平成21年5月19日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19592227
 研究課題名（和文） マイクロアレイ解析に基づく歯の喪失と脳機能に関する研究
 研究課題名（英文） A Study on Loss of Molar Teeth and Brain Function
 Based on Microarray Analysis
 研究代表者
 高津 匡樹（TAKATSU MASAKI）
 日本大学・歯学部・准教授
 研究者番号：50343033

研究成果の概要：マウスやラットでは歯の喪失により記憶学習能が低下すると報告されているが、そのメカニズムや他の脳機能に及ぼす影響については不明である。そこで本研究では、マウスの臼歯を抜歯し、記憶中枢である海馬の遺伝子発現変動を網羅的に解析した。その結果、歯の喪失は記憶学習能以外にも種々の脳機能や疾患に影響する可能性が示された。また、歯の喪失に伴う記憶学習能低下のメカニズムとして、海馬シナプスにおける長期抑制の阻害が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19年度	1,700,000	510,000	2,210,000
20年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：歯の喪失、脳機能、マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) 人口の高齢化が進行し続ける現在、健康寿命の延長や QOL の維持向上において、生活習慣病などの疾患に伴う全身機能低下の予防や改善、進行抑止が医療の急務となっている。このような状況の中、高齢者を対象とした口腔状態と認知機能に関する疫学研究が行われ、歯の喪失と認知機能低下との関連が多数報告されている。これら疫学研究の結果は、歯の喪失を防止することが認知症予防の手段として寄与する可能性を示すものである。

一方、こうした疫学調査の結果は、ラットやマウスなどのモデル実験によっても支持されており、臼歯の削合や抜歯が空間認知能力の低下を招くことが行動学的に示されている。さらに、歯の喪失に伴う脳の組織学的、生化学的あるいは生理学的変化が、特に海馬において多く報告されている。海馬は古くから記憶や学習を担う重要な部位といわれており、海馬への入力線維が高頻度に刺激されてシナプスの伝導効率が長期増強されたり、あるいは長期抑制されたりすることで、記憶を形成、保持すると考えられている。このよ

うに記憶や学習との関連が強い海馬においては、歯の喪失によりアセチルコリンの分泌量が減少すると同時に、錐体細胞数の減少、アストロサイト数の増加が明らかにされている。さらに、海馬に入力線維を投射する前脳基底部の対角帯核や内側中隔核においても、コリン作動性ニューロンの減少が報告されており、歯の喪失による記憶学習能低下は、三叉神経系の感覚入力減少により前脳基底部、さらにその投射先である海馬錐体細胞におけるコリン作動性ニューロン機能の障害によるものと考えられている。しかしながら、これらの研究ではアセチルコリンという単一の神経伝達物質から組織学的、生化学的な解明を試みているに過ぎない。また、歯の喪失が記憶学習能以外の脳機能に及ぼす影響については不明である。

そこで本研究を行うにあたり、申請者は以下の2つの仮説を立てた。

①歯の喪失に伴う記憶学習能の低下には、アセチルコリン以外にも記憶に関する多くの物質が関与する。

②歯の喪失は記憶学習能以外の脳神経系の機能や疾患にも影響を及ぼす。

(2) 実験動物を用いた歯の喪失と学習記憶能に関する研究は、短期間で老化を示す変異型動物を用いた研究と、正常老化を示す野生型動物を用いた研究に分けられる。

変異型動物を用いた研究では、老化促進マウスの1系統であるSAMP8が多く用いられている。SAMP8系マウスの平均寿命は12ヶ月とされ、6ヶ月を経過したあたりから急速に不可逆的な老化兆候を示すとともに、顕著な記憶学習障害を示すことが報告されている。そのため、SAMP8系マウスは、生理的老化モデルというよりはむしろ老年期脳障害モデルとされているため、このマウスを使用することは適当ではない。

一方、野生型動物を用いた研究では、若齢期のマウスやラットで臼歯の抜歯や歯冠削合を行っている。しかしながら、本邦の大臼歯部咬合支持喪失の平均年齢は60歳であることから、動物実験をヒトにおける歯の喪失のモデル実験と位置付けるのであれば、動物における臼歯の喪失もヒトの初老期に相当する時期に行うべきである。

(3) 歯の喪失と記憶学習能との関連については、これまでに組織学的、生化学的および生理学的な解明が行われているが、分子生物学的に解明を試みた研究は国内外においてみられない。近年、分子生物学の分野では、DNAマイクロアレイ法が確立され、大きな成果が得られている。このマイクロアレイを用いることにより、歯を喪失した際の脳における遺伝子発現の変化を網羅的に解析する

ことが可能となる。

2. 研究の目的

そこで本研究では、正常老化を示す野生型動物を用いて、老齢期の臼歯抜歯に伴うマウス海馬の錐体細胞数の変化を確認した。さらに、上記の2つの仮説を検証するため、マイクロアレイを用いて抜歯に伴う海馬の遺伝子発現変化を網羅的に解析し、臼歯咬合喪失が脳や神経に特異的な機能や疾患に及ぼす影響について検討した。

3. 研究の方法

(1) 被験動物

被験動物には、C57BL/6系雄性リタヤマウス(日本クレア)を用いた。これを18ヶ月齢まで飼育した後、ペントバルビタール(40 mg/kg, ip)による全身麻酔下で上顎両側臼歯すべてを抜歯したものを抜歯群とした。一方、麻酔処置のみを行った同月齢のマウスを対照群とした。いずれも処置後4ヶ月の22ヶ月齢まで、一定条件で管理された自然環境下にて、水および固形食を自由摂取させて飼育した。なお、本研究は日本大学歯学部動物実験委員会の承認を得て行った。

(2) 海馬錐体細胞数の測定

抜歯群と対照群ともに1サンプルの22ヶ月齢マウスを、ジエチルエーテル麻酔下で頸椎を脱臼し、断頭してから速やかに脳を摘出した。これを4%パラホルムアルデヒドに4℃で3日間浸漬して固定した。さらに、エタノール系列による脱水およびキシレン浸漬を経てパラフィンに包埋し、マイクロトームで厚さ5μmの海馬前頭断連続切片を作成した。染色にはCrysil Violet溶液を用い、通報に従ってNissl染色を行なった。切片を光学顕微鏡下にて200倍または400倍でCA1、CA3、歯状回領域を観察し、各領域につき3箇所をデジタルカメラで撮影後、単位面積あたりの錐体細胞数を測定して比較した。なお、CA1およびCA3領域では150×150μm²、歯状回領域では50×50μm²のエリアで測定を行った。

(3) 海馬 RNA 抽出

抜歯群および対照群それぞれ5サンプルの22ヶ月齢マウスをジエチルエーテル麻酔下で頸椎脱臼させ、脳を全摘出した後、両側海馬を分離した。摘出した海馬は直ちにRNA安定化溶液(RNAlater®, Ambion)に浸漬し、24時間後に取り出してRNA抽出まで-80℃で保存した。total RNAの抽出にはRNeasy® Mini Kit (QIAGEN)を用い、専用のプロトコールに従って行った。抽出したRNAは分光光度計(Biophotometer, Eppendorf)で吸光度を測定して定量し、発現解析に使用する

まで-80°Cで保存した。

(4) マイクロアレイハイブリダイゼーション

各群ともに5サンプルの total RNA を等量ずつ混ぜ、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) にて濃度および純度を確認した後、これをマイクロアレイのプロンプとして用いた。アレイには約 22,600 のプロンプセットでマウス完全長遺伝子約 14,000 の遺伝子発現を網羅的に解析できる、GenChip® Mouse Genome 430A 2.0 Array (Affymetrix) を用いた。プロンプのラベリングおよびハイブリダイゼーションは、GeneChip® Expression Analysis Technical Manual (Affymetrix) に従って、以下の手順で行った。まず各群とも μg の total RNA を逆転写して cDNA を合成し、さらに in vitro 転写によりビオチン標識 cRNA を合成した。これを断片化して hybridization control を添加し、アレイに 45°C にて 16 時間ハイブリダイズした。アレイを洗浄した後、ストレプトアビジン-フィコエリスリンで蛍光標識し、レーザースキャナー (GeneChip® Scanner 3000, Affymetrix) でシグナルを検出した。

(5) マイクロアレイデータ解析

検出したシグナルの強度は専用ソフト GeneChip® Operating Software ver 1.4 を用いて数値化し、アレイ毎に転写発現の解析を行い、さらにアレイ間の比較解析を行った。各アレイの解析では、シグナル強度値を算出するとともに、Wilcoxon singled-rank test によるその信頼度から、転写産物の検出の有無を決定した。アレイ間の比較解析では、両アレイのシグナル強度値から発現変動率を算出し、Wilcoxon singled-rank test を用いて転写産物の発現変動の有意性を評価した。これにより、発現変動が有意に 1.5 倍以上の遺伝子を変動遺伝子とした。これら発現変動遺伝子については、Gene Ontology 解析および KEGG pathway 解析を行い、歯の喪失が脳神経系の機能や疾患に及ぼす影響について検討した。

4. 研究成果

(1) 海馬錐体細胞数

図 1 に抜歯群および対照群の海馬 Nissl 染色像を、CA1、CA3、歯状回の領域ごとに示す。抜歯したマウスの海馬錐体細胞数は対照マウスと比較して、CA1 領域で 80%、CA3 領域で 81%、歯状回領域で 74% に、それぞれ減少していた (表 1)。臼歯咬合の喪失により海馬錐体細胞数が減少することは、これまでいくつかの動物種や系統で報告されている。本研究で用いた C57BL/6 系マウスにおいても、臼歯咬合喪失に伴い海馬錐体細胞

が減少することが確認された。

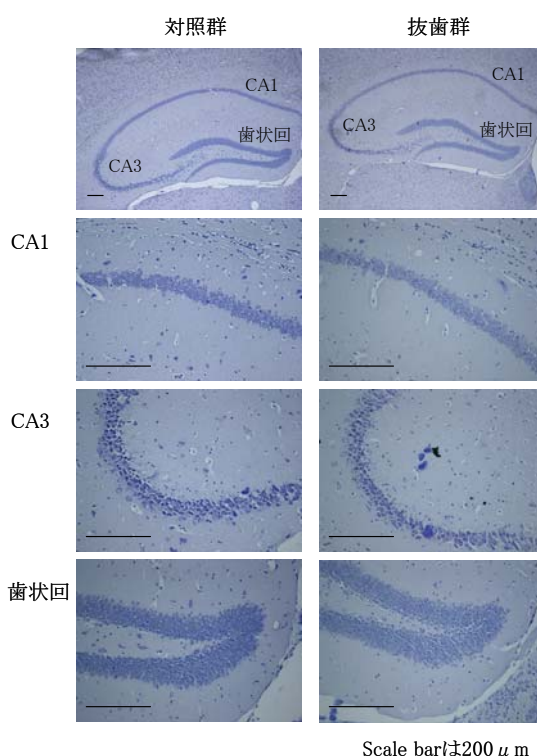


図 1. 海馬の Nissl 染色

表 1. 海馬の錐体細胞数

	CA1	CA3	歯状回
対照群	2730 ± 39	2281 ± 53	11733 ± 267
抜歯群	1896 ± 39	1852 ± 141	8667 ± 353

1mm²あたりの錐体細胞数を平均 ± 標準誤差で示す

(2) マイクロアレイ解析

マイクロアレイにより解析した約 22,600 プロンプのうち、抜歯群および対照群の両アレイで転写産物が検出されたのは、約半数の 10,993 プロンプであった。そのうち、抜歯に伴い 90 遺伝子 (96 プロンプ) で 1.5 倍以上の発現変動が認められた。発現が上昇していたのは 21 遺伝子、発現が低下していたのは 69 遺伝子となっており、発現が低下した遺伝子が多くなっていた。

Gene Ontology 解析により、これら 90 の発現変動遺伝子について Biological process をみると、発現上昇遺伝子では糖やタンパクなどの分解・代謝に関連する遺伝子が多かった。また、発現低下遺伝子には合成系の遺伝子が多く含まれていた (表 2)。これらの遺伝子発現変動の特徴から、抜歯に伴い海馬の細胞では退行性変化が生じていると考

えられた。

表2. Biological processによる遺伝発現遺伝子の分類

Biological Process	Up	Down
Biosynthesis	1	2
Catabolism/Metabolism	8	4
Development	0	4
Signal Transduction	1	3
Transcription/RNA processing	3	13
Transport	7	9
Other	0	8
Unknown	1	26

さらに、これら遺伝子機能の詳細について検索したところ、発現変動遺伝子には神経伝達物質の輸送・放出制御や受容体などの神経機能や、統合失調症などの脳疾患に関連する遺伝子が、少なくとも9つ存在していた(表3)。脳に特異的な機能や疾患に関連する遺伝子で発現変動が認められたことは、臼歯咬合の喪失が記憶学習能だけではなく、脳における種々の現象に影響を及ぼす可能性を示すものと考えられた。なかでも、統合失調症のリスク因子とされている *Zdhhc8* 遺伝子において発現低下がみられたことは、歯の喪失と統合失調症との関連を示唆するものであった。ヒトではアルツハイマー病以外にも、脳血管障害や統合失調症などの脳疾患において認知機能障害を伴うことが知られている。そのため、高齢者における歯の喪失は、統合失調症に随伴する認知機能障害に影響する可能性が考えられた。

表3. 神経系の機能や疾患に関連する遺伝子

	Gene Symbol	Gene Function
↑	<i>Scamp5</i>	シナプス小胞に豊富に存在
	<i>Kif5c</i>	神経伝達物質の輸送
↓	<i>Cntfr</i>	脳の虚血時に発現
	<i>Plxn3</i>	神経回路形成の制御
	<i>Bzw2</i>	神経系の発生
	<i>Stx3</i>	神経伝達物質の放出制御
	<i>Ryr1</i>	神経系の長期抑制
	<i>Zdhhc8</i>	統合失調症のリスク因子
	<i>Gria2</i> (AMPA)	神経系の長期抑制

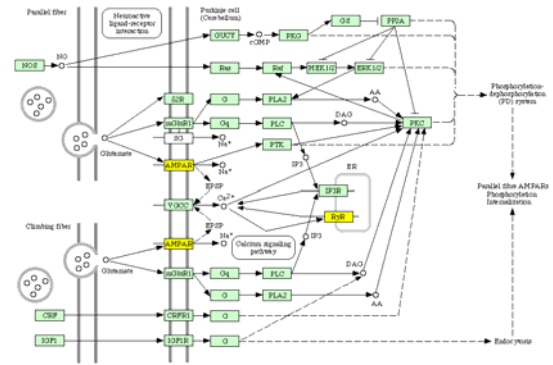


図2. KEGG pathway解析 (Long-Term Depression)

また、KEGG pathway 解析において、*Ryr1* および *Gria2* 遺伝子が長期抑制 (LTD : Long-Term Depression) のシグナル伝達経路に含まれることが示された(図2)。海馬では刺激に依存して長期増強、長期抑圧を起こすことが知られており、これらは記憶や学習に関与した細胞レベルの基礎現象であると考えられている。長期抑制では、AMPA型グルタミン酸受容体サブユニットである *Gria2* (*GluR2*) や、リアノジン受容体の1種である *ryr1* が重要な役割を担っている。これらの遺伝子で発現低下が認められたことから、臼歯咬合喪失に伴う記憶学習能低下における長期抑制の関与を遺伝子発現レベルで示唆し、メカニズム解明の一助となりうるものと考えられた。

(3) 研究成果のまとめ

老齢期の C57BL/6 系雄性マウスの上顎臼歯を抜歯し、マイクロアレイを用いて海馬遺伝子発現変化を解析した結果、以下の知見が得られた。

- ①本研究で用いたマウスにおいても、他の系統と同様に、抜歯に伴う海馬錐体細胞の減少が確認された。
- ②臼歯咬合の喪失が記憶学習能だけではなく、脳における種々の現象に影響する可能性が示された。
- ③歯の喪失は、統合失調症に随伴する認知機能障害に影響する可能性が考えられた。
- ④これまでに多数報告されている臼歯咬合喪失に伴う記憶学習能低下に、海馬シナプスにおける長期抑制の阻害が関与する可能性が示唆され、メカニズム解明の一助となりうると考えられた。
- ⑤本研究結果は、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析の結果であるため、今後は発現変動が認められた遺伝子について、RT-PCRによる遺伝子発現解析、さらには免疫染色によるタンパクレベルでの発現解析を行うことが課題となる。

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)

[学会発表] (計2件)

- ① 高津匡樹、小牧健一郎、土谷昌広、飯沼利光、伊藤智加、池田貴之、岩崎洋子、渡辺誠、祇園自信仁、臼齒抜歯に伴うマウス海馬の遺伝子発現変動、第19回日本老年歯科医学会学術大会、平成20年6月20日、岡山
- ② Takatsu M, Komaki K, Tsuchiya M, Ohi T, Gionhaku N, Gene Expression Profile in Mouse Hippocampus Following Loss of Molar Teeth, 19th IAGG, 8 July 2009, Paris

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高津 匡樹 (TAKATSU MASAKI)

日本大学・歯学部・准教授

研究者番号：50343033

(2) 連携研究者

小牧 健一郎 (KOMAKI KENICHIRO)

東北大学・歯学研究科 (研究所)・助教

研究者番号：40361109

土谷 昌広 (TSUCHIYA MASAHIRO)

東北大学・歯学研究科 (研究所)・助教

研究者番号：60372322