

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21668

研究課題名(和文) 歯の特性を活かした幼若期ストレスの遡及的定量解析

研究課題名(英文) Retrospective quantitative analysis of juvenile stress using dentin matrix

研究代表者

山田 聡 (YAMADA, SATORU)

東北大学・歯学研究科・教授

研究者番号：40359849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：ELISA法を用いた解析により、コルチコステロン連続投与マウスの象牙質からコルチコステロンが検出され、対照群のPBS投与群ではコルチコステロンは検出されなかったことから、コルチコステロンは象牙質に沈着することが示唆された。幼若期ストレス負荷を受けたマウスでは、ストレス負荷直後の血液中コルチコステロンは非負荷群と比較して有意( $p = 0.0019$ )に増加していた。負荷3か月後における象牙質中のコルチコステロン量をLC-MS/MSで測定すると、負荷群では0.5343 pg/mgである一方で、非負荷群では0.3587 pg/mgであり、ELS負荷群で高い傾向を示した ( $p = 0.2046$ )。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、幼若期循環ストレスホルモン量が増加するマウスモデルにおいて、成体から回収される象牙質を分析し、幼若期循環ストレスホルモンが歯に沈着している可能性を示した。将来的には、さらに高度な微量検出法の使用により、歯に沈着しているストレスホルモンを測定することで、幼若期のストレス負荷や生育環境による心理的負荷を時系列に沿って遡及的かつ定量的に解析できる可能性がある。歯は咀嚼と審美性という機能を持つが、非侵襲的な幼若期全身循環状態の記録媒体としての新たな価値創出の端緒となる知見が得られた。

研究成果の概要(英文)：Mice were intravenously administrated corticosterone at early childhood or juvenile stage and the amount of corticosterone in mineralized hard tissue of their teeth was quantified by ELISA method. The results revealed that corticosterone was detected in mineralized hard tissue of the teeth of corticosterone-injected group but not PBS-injected control group. This result suggested that systemically administrated corticosterone could be deposited into hard tissue of teeth. Corticosterone level in circulation of the mice received early life stress was significantly higher than that of control mice ( $p=0.0019$ ). Corticosterone level in hard tissue of the teeth of adult mice that have experienced early life stress was 0.5343 pg/mg and that of control adult mice was 0.3547 mg/kg ( $p = 0.2046$ ). These results indicated that corticosterone induced by early life stress at early childhood stage possibly accumulated in hard tissue of the teeth and corticosterone level was retained during the lifespan.

研究分野：歯科保存学

キーワード：幼若期ストレス 象牙質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

象牙質は 800 種を超えるタンパク質を含有する非代謝性硬組織であり (Widbiller *et al.*, *Sci Rep.* 2019)、臨床においてテトラサイクリン変色歯が見られることから、象牙質は石灰化時に有機物や有機化合物を取り込む。石灰化基質に取り込まれるホルモンの種や量は、過去その時々々の全身循環状態を記録し、エナメル質側を最古として時系列的に保存された状態であるといえる。

虐待やネグレクト(子供に対する育児放棄・育児怠慢・監護放棄)などの心理的ストレスは青年期以降の精神疾患や社会性行動障害発症の重大なリスク因子であることが明らかにされている (Nemeroff *et al.*, *Neuron* 2016)。幼若期における心理的ストレスは、副腎皮質からの過度なグルココルチコイド (Glucocorticoid) 分泌を誘導する。グルココルチコイドは、心理的または身体的ストレスを受けた際に、負担を軽減するためのストレス調整ホルモンとして副腎皮質から分泌される。しかしながら、ネグレクト(子供に対する育児放棄・育児怠慢・監護放棄)などの幼若期ストレスにより、幼児体内での糖質グルココルチコイドの分泌と機能が過度に亢進されると、脳内の神経細胞に糖質グルココルチコイドが過剰作用することで、BDNF 発現低下を引き起こす。この一定期間の神経細胞の機能低下が、脳の構造的な変化による後天的な機能低下を惹起するとされる。このような背景から、幼児期にどの程度・どの期間ネグレクトの被害を受けたのかを客観的に知ることは、幼児期の体験に伴う精神的不安定な患者の理解や診断にとって、医科精神科において重要な課題であるとされる。しかしながら、ネグレクトから解放された後は、糖質グルココルチコイドや脳由来神経栄養因子(brain derived neurotrophic factor; BDNF)の発現量は多くの症例においておおむね回復し、精神的な問題を抱えたままであるにもかかわらず、正常者との劇的な差異は血液検査等の画一的な検査法では検知できないとされ、幼若期ストレスの有無やその負荷程度・期間の根拠となるのは、虐待から解放された後の青年期や成人後に行われる本人や関係者の記憶に依存する問診が主であり主観的要素が強く、幼若期心理ストレスの遡及的定量法の開発が望まれている。

## 2. 研究の目的

本研究計画では、象牙芽細胞が神経細胞に近い神経細胞様表現型を有すること並びに象牙質が象牙芽細胞から分泌されたタンパク質を時系列に従って蓄積している組織であることに着目する。幼若期における全身循環ストレスホルモンの量的変化を象牙芽細胞が感知できるか、さらには、ストレスホルモンが象牙質に蓄積するかを、成体マウス臼歯の象牙質を用いて解析することを目的とする。脱落乳歯など不要となった歯を用いて幼若期ストレス負荷を遡及的かつ定量的に評価できるようになれば、過去の様々な全身状態変化を表す記録媒体として、歯の新たな価値創出につながり、幼若期ストレスと精神疾患発症の関連の更なる解明のみならず虐待の発見や予防につながり歯科学の社会貢献度が飛躍的に向上する。

## 3. 研究の方法

### (1) 象牙芽細胞におけるストレスホルモン受容体発現の解析

マウス切歯を回収後に正中で二分割することで歯髓組織を露出させる。分割した切歯をコラゲナーゼ処理し歯髓組織のみを除去する。続いて、象牙質に接着残存した細胞集団 (odontoblast enriched fraction) からtotal RNAを回収し、コルチコイド受容体である

Nr3c1 (Glucocorticoid receptor:GR) および Nr3c2 (Mineralocorticoid receptor: MR) をコードする *Nr3c1* と *Nr3c2* の発現レベルをリアルタイム PCR 法にて解析した。比較対象サンプルとして、非コラゲナーゼ処理歯髄組織全体から得られる total RNA を基準として odontoblast enriched fraction における発現レベルを解析した。

(2) コルチコステロン (マウスストレスホルモン) 連続投与マウス象牙質におけるコルチコステロン検出: 生後7日目から21日目までコルチコステロンを静脈注射 (20 mg/kg/day) した。その後通常飼育を行った後に安楽死させ、マウス歯 (切歯および臼歯) を回収した。得られた歯サンプルを破碎後にPBS溶液に浸漬し一晩振盪することで歯髄組織に付着しているコルチコステロンを取り除いた。続いて、歯サンプルを再度PBSで洗浄した後に、EDTA溶液中で完全脱灰し溶液を回収した。溶液中に溶出してきたストレスホルモン量をELISA kitを用いて定量した。

(3) 幼若期ストレス負荷モデルマウスの構築とコルチコステロン検出: 一般的な幼若期ストレス負荷モデルであるearly life stress (ELS) (Malter *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 2013, Goodwill *et al.*, Cell Rep. 2018) 法を用いた。ELSは生後2日目から21日目の離乳時までの期間において、ケージ底を一般的な紙や木くずで覆う代わりに金属メッシュにし、さらに寝床作製の綿を最低限にした環境で飼育するストレス負荷法である。ELS負荷時並びに生後3ヵ月後に血清並びに象牙質中のコルチコステロン量をLC-MS/MSで定量した。

#### 4. 研究成果

(1) odontoblast enriched fraction における *Nr3c1* および *Nr3c2* 発現は、それぞれ歯髄組織の 8.33 倍および 11.1 倍であった。これら結果より、象牙芽細胞は二つの異なるコルチコイド受容体を高発現しており、コルチコイド感受性を持つ可能性が示された。

(2) コルチコステロン連続投与マウス象牙質中から得られる溶出液中のコルチコステロン量は 3.326ng/ml であった。その一方で、対照群の PBS 投与群ではコルチコステロンは検出されなかった。この結果より、全身に投与したコルチコステロンは象牙質に沈着することが示唆された。一方で、EDTA 溶液浸漬前の PBS 溶液中には、EDTA 溶液と比較して約 10 倍程度のコルチコステロンが検出されたことから、歯髄組織中のコルチコステロン量と比較して象牙質に蓄積するコルチコステロン量は相対的に少量であることが示唆された。本研究期間中に、ELISA 法により歯からストレスホルモンが検出できることが初めて報告された (Am J Phys Anthropol. 2021 Mar;174(3):532-541. doi: 10.1002/ajpa.24157. )。その報告では ELISA 法の測定では、検出限界付近のサンプルが多く、より高感度の計測が必要であることが示されており、本研究結果と一致する内容であった。

(3) ELS 負荷直後の血液中のコルチコステロンは 32.58 ng/ml であった。一方で、非負荷群では 6.569 ng/ml であり、ELS 負荷により血中コルチコステロンが有意 ( $p = 0.0019$ ) に増加していることが明らかとなった (ELISA 法測定)。続いて、ELS 負荷 3 か月後にマウス歯を回収し、LC-MS/MS で歯硬組織サンプル中のコルチコステロン量を測定すると、ELS 負荷群では 0.5343 pg/mg である一方で、非負荷群では 0.3587 pg/mg であったことから、ELS 負荷群で高い傾向を示した ( $p = 0.2046$ )。この結果より、ELISA 法では検出不可能であった非負荷群歯サンプルにおいても、LC-MS/MS で定量が可能であることが示されたことから、今後は LC-MS/MS が象牙質コルチコステロン量測定のスラン

ードとしていくことが望まれる。

本研究により、ELS 負荷により象牙質にコルチコステロンがより有意に沈着することから、歯あるいは象牙質から検出されるストレスホルモンは象牙質石灰化時期の全身循環状況を反映し、象牙質は「ホルモンバランス変化の記録媒体」としての価値を持つ可能性が示された。象牙質は新生硬組織が歯髄側に添加していく年輪様の多層構造の非代謝性組織であり、層別分離をしたうえでコルチコステロン量を測定する技術革新を通じて、より幼若期内の時期特異的なストレス負荷の遡及的定量解析が可能となっていくと期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	鈴木 茂樹  (SUZUKI SHIGEKI)  (30549762)	東北大学・大学病院・講師   (11301)	
研究分担者	齋藤 正寛  (SAITO MASAHIRO)  (40215562)	東北大学・歯学研究科・教授   (11301)	
研究分担者	根本 英二  (NEMOTO EIJI)  (40292221)	東北大学・歯学研究科・准教授   (11301)	
研究分担者	齋藤 幹  (SAITO KAN)  (40380852)	東北大学・大学病院・講師   (11301)	
研究分担者	土屋 志津  (TSUTIYA SHIZU)  (60610053)	広島大学・医系科学研究科(歯)・助教   (15401)	

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