

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：33703

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2011～2012

課題番号：23890225

研究課題名（和文）咬合不全による海馬での神経細胞新生プログラム抑制機構の神経科学的解明

研究課題名（英文）Apoptosis and decreased neurogenesis in the hippocampal dentate gyrus of SAMP8 mice with occlusal disharmony.

研究代表者

森 大輔 (Mori Daisuke)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号：30610232

研究成果の概要（和文）：老化促進モデルマウス（SAMP8）を用い、咬合挙上による慢性ストレスが海馬歯状回に及ぼす影響を解明した。咬合挙上が老齢マウスにおいて海馬歯状回での脳由来栄養因子（BDNF）の mRNA を減少させ、BDNF の供給を傷害することを *in situ* hybridization 法と ELISA 法を用いてそれぞれ定量的に検出し、有意な減少を認めた。また咬合挙上の影響により海馬におけるアポトーシスの増加を TdT-mediated dUTP nick-end labeling 染色によって定量的に測定した。これらの結果は高齢マウスにおいて咬合挙上によって引き起こされる海馬での器質的な障害とその要因について明らかにするものである。

研究成果の概要（英文）： We recently demonstrated that raising the bite (bite-raised) significantly decreased cell proliferation, survival, and differentiation of newborn cells into neurons in aged senescence-accelerated mice (SAMP8). Chronic stress, even chronic mild stress, decrease Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and increases in circulating glucocorticoid levels lead to apoptosis in the hippocampus. Here we examined the effect of the bite-raised condition on BDNF, deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling-positive apoptotic cells in the hippocampal dentate gyrus (DG) of SAMP8 mice.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：歯学

科研費の分科・細目：補綴系歯学

キーワード：咬合 海馬 ストレス

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

ストレス環境下では、ストレス疾患や精神疾患に加え、記憶形成の座である海馬の神経細胞死が誘発され、海馬の萎縮が引き起こされることが多くの研究者によって報告されている。海馬は学習記憶過程において中心的な役割を演じているにもかかわらず、老化やストレス等の影響を受けやすく、その障害は認知機能障害を発症させ大きな社会問題となっている。近年、海馬歯状回では成体になってからも、細胞新生が持続しておこり、誕生した新生細胞は海馬の神経ネットワークに組み込まれ、学習記憶機能の維持に重要な役割を果たしていることが明らかにされた (Yagita et al., Stroke, 2001)。また、最新の研究により、ストレスが海馬における細胞新生を抑制し、それには血中のグルココルチコイド濃度や海馬での脳由来神経栄養因子の発現が深く関与していることが分ってきた (Alboni S et.al., 2011, Neuropharmacology, Weihong Y et.al., 2010, Neuroscience Letters.)。

我々のグループはこれまでに、老齢期の老化促進モデルマウスに咬合不全処置を施すと、血中コルチコステロン濃度上昇、記憶の座である大脳辺縁系の海馬にリンクした記憶機能の減退、海馬への情報入力量の減少、海馬神経細胞の変性、グリア細胞の増加などが引き起こされることを見出してきた (Kubo K et.al., 2007, Neuroscience Letters, Ichihashi Y et.al., 2007, Neuroscience Letters)。これらの結果は、咬合不全が HPA 軸のネガティブフィードバック機構を抑制し、海馬の神経細胞死や記憶障害を誘発し、海馬の老化を促進させることを示唆するものである。

またこれまでの研究活動において、「咬合不全が海馬の細胞新生に及ぼす影響」を中心に研究を行ってきた。海馬の細胞新生には増殖、生存、分化という3つのステージが存在すると言われていたため (Gould E et.al., 1999, Neuroscience, Lee KJ et.al., 2006, Experimental and Molecular medicine)、咬合不全が細胞新生の増殖・生存・分化のそれぞれのステージに及ぼす影響を検討した。その結果、咬合不全による慢性ストレスが、海馬歯状回における細胞の増殖数の減少や新生細胞の生存期間を顕著に短縮させるものの、新生細胞から神経細胞やグリア細胞への分化率には影響を与えないことが明らかになった。この結果は、咬合不全が細胞新生の全てのステージではなく、増殖・生存を特異的に障害して学習記憶機能を減退させることを示唆するものである。

2. 研究の目的

海馬歯状回における新生細胞の生存期間や細胞分化に影響を与えている脳由来神経栄養因子にスポットをあて、その発現状態から咬合不全による海馬での細胞新生機構の障害機序を解明し、高年齢期の咬合、咀嚼の維持が海馬機能維持に与える影響を明らかにするため、咬合不全が海馬での脳由来神経栄養因子の発現に与える影響を *in situ* hybridization 法や、ELISA 法を用いて組織化学的に解析し、咬合不全による細胞新生の障害機序を明らかにするとともに、TUNEL 染色を用い海馬での神経細胞死=アポトーシスの動態を確認する。

3. 研究の方法

本研究には、生後6ヶ月頃から加齢に伴い空間認知能が衰退し、平均寿命が13か月で老衰死する老化促進モデルマウス (SAMP8) を用いる。本申請課題の目的を達成させるため、海馬における脳由来神経成長因子の発現状態を定性および定量的に解析するとともに、血中のカテコールアミン濃度を測定して、咬合不全により引き起こされる海馬での細胞新生抑制機構を解明して、咬合不全による海馬機能障害の特定を試みた。

(1) 老化促進モデルマウス (SAMP8) の飼育

朝日大学口腔科学共同研究所・動物飼育施設 SPF 室で老化促進モデルマウスの飼育・繁殖を行った。

(2) 咬合不全 (咬合挙上) 処置

Ichihashi ら (Ichihashi Y et.al., 2008, Biogenic Amines. in press) の方法に従い、雄、9ヶ月齢 SAMP8 マウスをペントバルビタールで麻酔し、上顎両側臼歯を乾燥し、歯科用ボンディング材を用いて前処置を行った後、歯科用光重合レジンを追加することで咬合挙上し、咬合不全状態をつくった。

挙上処置定期的の上顎臼歯のレジン付着状態を確認。レジンが脱落している場合は、その個体を研究から除外した。

(3) 組織学的検索

(i) *in situ* hybridization 法

組織内における、物質の局在を証明するための方法として *in situ* hybridization 法が遺伝学、組織学分野で幅広く利用されている (組織細胞化学, 2006)。今回の課題では、Sterlemann V ら (Sterlemann V., et al., 2010, Hippocampus) の方法に従い mRNA プローブ用いた *in situ* hybridization 法を用い、海馬での脳由来神経栄養因子 mRNA の発現状況を検出した。咬合挙上2週間後のマウスおよび同齢のコントロールマウスをペントバ

ルビタールで麻酔を行い、灌流固定後速やかに脳を取り出した後、DNA切断処置後、BDNFプローブによるmRNAのhybridizationを行い、その後抗DIG抗体による陽性シグナルの検出を行った。

(ii) ELISA 法

ELISA 法は微量タンパクの測定にも応用できるタンパク分析方法である。今回の申請課題では、Weihong Yら(Weihong Y. et. al., 2010, Neurosci. Lett.)の方法に従いELISA法を用い脳由来神経栄養因子のタンパク量を定量的に分析した。咬合不全2週間後のマウスおよび同齢のコントロールマウスを屠殺し、速やかに海馬を取り出した後、液体窒素を用いて瞬間冷凍した。その後ホモジネイト、遠心分離した後にELISA法を用いて脳由来神経栄養因子のタンパク量の定量的分析を行った。

(iii) TUNEL 染色

TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) によってアポトーシスの過程で生じる断片化されたDNA鎖の末端を染色することにより組織局所でのアポトーシスを検出する方法である。咬合挙上2週間後のマウスおよび同齢のコントロールマウスをペントバルビタールで麻酔を行い、灌流固定後速やかに脳を取り出した後、パラフィン包埋し薄切切片を作製した。その後Apoptosis *in situ* Detection Kit (Wako)を用いTUNEL染色をおこない、海馬でのアポトーシス陽性細胞を検出した。

(2) 血液検査

生体にストレスが負荷されるとストレス反応として交感神経系が作動し、血中のカテコールアミン濃度が上昇すると言われている。血中カテコールアミン濃度の上昇が脳由来神経栄養因子の動態に影響を与えるといわれていることから、Kuboら(Kobo K et. al., 2007, Neurosci. Lett.)の方法を参考に血液採取を行い、測定までの間冷凍庫で保存した。検体を検査会社に外注し、カテコールアミン三分画の解析を行う。血液検査の結果から、カテコールアミン濃度と脳由来神経栄養因子の発現量との相関を調べた。

4. 研究成果

in situ hybridization 法によるBDNFのmRNAの染色により、9ヶ月齢、雄、SAMP8では咬合挙上により海馬歯状回局所におけるBDNF mRNAが有意に現象することが解った。

ELISA法による海馬歯状回のタンパク質の定量的解析により、9ヶ月齢、雄、SAMP8では咬合挙上により海馬歯状回局所におけるBDNFタンパクの組織含有量が有意に低下していることが解った。

TUNEL染色を行い、9ヶ月齢、雄、SAMP8での咬合挙上とアポトーシス陽性細胞の増

減について定量的解析を行った。咬合挙上7日後にはTUNEL陽性細胞は増殖し、その後咬合挙上14日後において最高値を示した。その後TUNEL陽性細胞は減少傾向をみせ、咬合挙上21日後においてコントロール群と差がない数値となった。

血液検査を行い血中のカテコールアミン濃度の測定を行い、9ヶ月齢、雄、SAMP8では咬合挙上により血中カテコールアミン濃度の上昇が見られることが解った。

しかし、データにばらつきが大きく統計を行うまでは至っていないため、今後さらに検体数を増やし、検査を行っていきたい。

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)

[雑誌論文] (計3件)

- ① Daisuke Mori, Tasuku Katayama, Hidekazu Miyake, Shuu Fujiwara, Kin-ya Kubo. Occlusal disharmony leads to learning deficits associated with decreased cellular proliferation in the hippocampal dentate gyrus of SAMP8 mice. *Neuroscience letters*, 2013 (534) 228-32.
- ② Tasuku Katayama, Daisuke Mori, Hidekazu Miyake, Shuu Fujiwara, Yumie Ono, Toru Takahashi, Minoru Onozuka, Kin-ya Kubo. *Effect of bite-raised condition on the hippocampal cholinergic system of aged SAMP8 mice. Neuroscience letters*, 2012 (520) 77-81
- ③ Chika Kurata, Yukiko Ichihashi, Mika Onishi, Mitsuo Inuma, Yasuo Tamura, Daisuke Mori, Kin-ya Kubo. Early toothless condition suppresses cell proliferation in the hippocampal dentate gyrus of SAMP8 mice. *Pediatric Dental Journal*, 2012(22-2)110-116.

[学会発表] (計5件)

- ① Daisuke Mori, Hidekazu Miyake, Manabu Furuzawa, Shuu Fujiwara, Nobuyuki Karasawa, Minoru Onozuka, Kin-Ya Kubo. Reduced neurogenesis and enhanced apoptosis in the hippocampal dentate gyrus of SAMP8 mice with occlusal disharmony. 第35回日本神経科学大会. 2012年9月. 名古屋国際会議場
- ② Miyake Hidekazu, Daisuke Mori, Shuu Fujiwara, Minoru Onozuka, Kin-ya Kubo. Effects of the bite-raised condition on activity in the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of SAMP8 mice. 第35回日本神経科学大会. 2012年9月. 名古屋国際会議場
- ③ Daisuke Mori, Hidekazu Miyake, Manabu

Furuzawa, Ryoko Azakami, Osamu Yamamura, Shuu Fujiwara, Kin-ya Kubo. Occlusal disharmony increase apoptosis in the hippocampal DG. ADR General Session & Exhibition – 2013年3月. Seattle, USA

④ Hidekazu Miyake, Daisuke Mori, Manabu Furuzawa, Shuu Fujiwara, Kin-ya Kubo. Effects of the occlusal disharmony on activity in the HPA-axis. IADR General Session & Exhibition – 2013年3月. Seattle, USA.

⑤ Manabu Furuzawa, Tasuku Katayama, Daisuke Mori, Hidekazu Miyake, Shu Fujiwara, Huayue Chen, Kin-ya Kubo. Chewing during chronic stress ameliorates stress-induced bone loss. IADR General Session & Exhibition – 2013年3月. Seattle, USA.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森大輔 (Mori Daisuke)

朝日大学・歯学部・助教

研究者番号: 30610232

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者 ()

研究者番号: