

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592913

研究課題名(和文)咬合支持の喪失ならびにその回復と記憶学習との関連について - 酸化ストレスの影響 -

研究課題名(英文)Occlusal support and memory -Effect of oxidative stress-

研究代表者

原 哲也(Hara, Tetsuya)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：60238160

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では咬合支持の喪失ならびにその回復と記憶学習との関連について、脳内の酸化ストレスを指標として検討した。

ラットは上顎臼歯を抜歯した抜歯群、臼歯抜歯後実験用義歯を装着した義歯装着群ならびに対照群に分けて受動的回避実験を行った。血液と海馬から酸化ストレスの影響をELISA法で計測した。

記憶学習能は臼歯抜歯群では対照群に比べて早期から低下し、義歯装着群は経時的に低下した。臼歯抜歯群は対照群に比べて酸化ストレス状態であり、義歯装着群は脂質の酸化反応と抗酸化作用の点では対照群と差がなかった。したがって、咬合支持の喪失による記憶学習能の低下には酸化ストレスが関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to examine the relationship between memory learning and the loss and recovery of occlusal support, as an index of the oxidative stress in the brain.

Rats were divided to three groups and subjected to the passive avoidance experiment: 1) the extraction group which was extracted all maxillary molars, 2) the denture group wearing the experimental denture after molars extraction, and 3) control group.

Memory learning in the extraction group is reduced from an early stage as compared to the control group, and that in the denture group was decreased over time. Molar extraction group was under oxidative stress conditions as compared to the control group. Oxidation of lipids and antioxidant effects in the denture group was no difference between the control group. Therefore, it was suggested that oxidative stress would affect the defect of memory learning due to the loss of occlusal support.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：酸化ストレス 咬合 記憶 チオバルビツール酸反応物質 Superoxide dismutase

1. 研究開始当初の背景

歯の喪失に伴って記憶学習機能が低下することは、過去の研究からも明らかにされている。しかしそのメカニズムについては、海馬錐体細胞の減少、大脳皮質における神経伝達物質の減少、ホルモンの分泌減少、脳血流量の減少などが報告されているが、十分には解明されていない。我々は、抜歯したラットと健常ラットを対象として迷路課題を行わせ、海馬における遺伝子発現を DNA microarray 法によって網羅的に検索し、記憶関連遺伝子の発現量の検討を行った。その結果、抜歯によって、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) などの活性酸素を解毒する抗酸化物質の遺伝子発現が減少することに着目した。

活性酸素は、体内では呼吸で取り入れた酸素をミトコンドリアの電子伝達系で使用して水が出来る際や、感染時に白血球が炎症反応を起こす際などに産生される。脳における酸素消費量は全体の 20% と言われており、脳内では多量の活性酸素が発生しているが、SOD などの抗酸化物質によってバランスが取られている。しかし、活性酸素が過剰に生成されると、体内の酸化ストレスが増加して、動脈硬化、心筋梗塞、糖尿病、癌など、さまざまな病気が発症すると考えられおり、酸化ストレスは老化危険因子の中で大きな位置を占めていると考えられている。

一方、学習・記憶障害の特徴を有する老化促進モデルマウスの SAMP8 マウスでは、10 週齢で活性酸素を無害化する機能を有する SOD の減少が報告されている。さらに、抗酸化作用を持つ α -lipoic acid やアセチルカルニチンの持続投与によって、記憶学習障害が軽減されるという報告があり、SAMP8 マウスの記憶学習障害に酸化ストレスが関与している可能性が強く示唆されている。

2. 研究の目的

本研究では、上顎臼歯抜歯によって咬合支持を喪失したラットと実験用義歯によって咬合支持を回復させたラットを用いて、咬合支持の有無が記憶学習能と酸化ストレスに及ぼす影響について検討することを目的とした。

3. 研究の方法

7 週齢の Wistar 系雄性ラット 21 匹を用い、全身麻酔下において全ての臼歯を抜歯した臼歯抜歯群 7 匹、上顎臼歯抜歯後 10 週齢時に実験用義歯を装着した義歯装着群 7 匹、対照群 7 匹の 3 群に無作為に振り分けた。記憶学習能の評価には受動的回避実験装置を用いた。獲得試行は 18 週齢時から開始し、電気刺激 (0.8mA, 3 秒間) を 3 日間与え、その後の再生試行では電気刺激を与え無い以外は獲得試行と同様の施行を 5 日間行った。再生試行の最大待機時間は 600 秒とし、各試行は 1 日 1 回とした。最終日の試行終了後に

麻酔下で動物を屠殺し血液と海馬を採取した。

酸化ストレスの影響として 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)、カルボニル化タンパク質、チオバルビツール酸反応物質 (TBARS) を、抗酸化作用として SOD を ELISA 法によって計測した。また、実験期間を通じたラットの体重変動及び実験動物の慢性ストレス測定のため血漿コルチコステロン濃度を計測した。統計学的分析としては分散分析のち Tukey 法による多重比較を行った ($p < 0.05$)。また、酸化ストレスの影響と抗酸化作用の測定結果の相関関係を検討した。

4. 研究成果

実験期間を通じていずれの実験群も同様の体重変動を示し (図 1)、抜歯及び実験義歯を用いた咬合支持の回復には摂食行動ならびに栄養状態への影響はなかったと推察された。

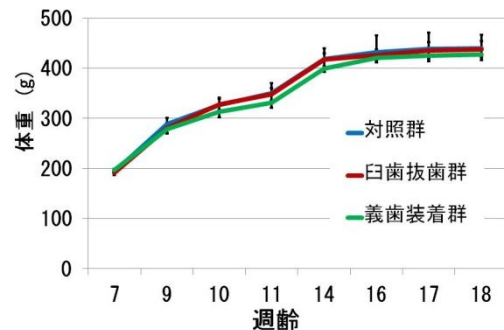


図1 体重変化

各群間の血漿コルチコステロン濃度には有意な差は認められず (図 2)、3 群間に慢性ストレスの差はなかったと考えられた。

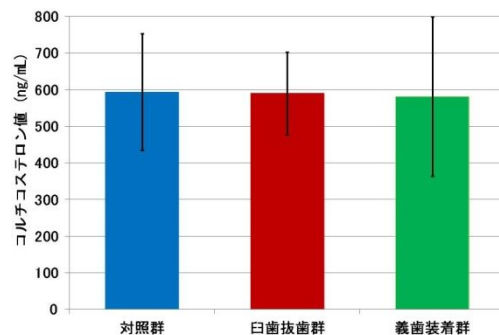


図2 コルチコステロン値の結果

受動的回避実験の獲得試行では、いずれの実験群も経時的に長時間明箱に留まるようになったが、2 日目の臼歯抜歯群では対照群と比較して有意に短時間で暗箱に入った (図 3)。4 日目には、いずれの実験群も 300 秒以上明箱に留まるようになった。再生試行では、対照群は記憶を保持したが、臼歯抜歯群では 7 日目以降、義歯装着群では 8 日目に対照群と比較して有意に短時間で暗箱に入った。

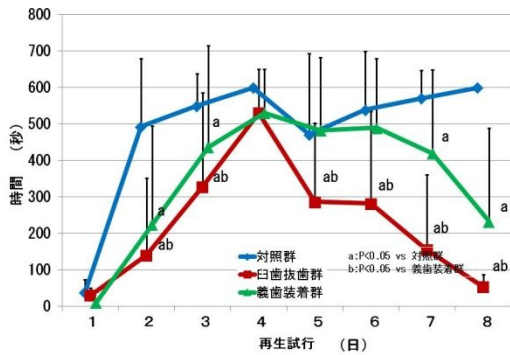


図3 受動的回避実験の結果

8-OHdG とカルボニル化タンパク質は、臼歯抜歯群と義歯装着群では対照群と比較して有意に高値を示したが、これらの2群間には有意差はなかった(図4)。TBARS は対照群と義歯装着群間に有意差はなかったが、臼歯抜歯群では他の2群に比べて有意に高値であった。SOD は対照群と義歯装着群間に有意差はなかったが、臼歯抜歯群では他の2群に比べて有意に低値であった。また、SOD とTBARS には強い負の相関を認めた(図5, $R=-0.743$)。

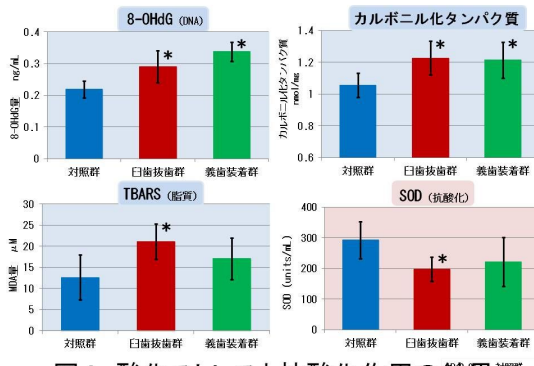


図4 酸化ストレスと抗酸化作用の結果

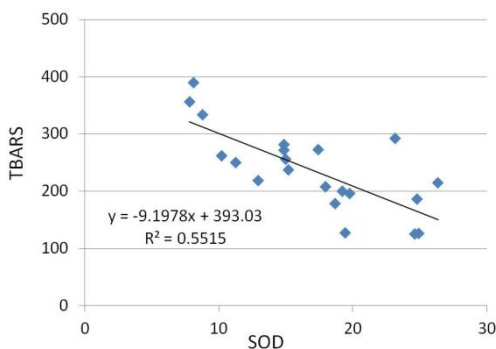


図5 SODとTBARSの相関

これらの結果より、DNA とタンパク質の酸化は、臼歯抜歯によって亢進したが咬合支持の回復の影響を受けず、受動的回避実験の結果に関与しないと考えられた。一方、脂質過酸化反応と抗酸化作用は、両者の変化に相関を認め、臼歯抜歯によって抗酸化作用が低下して脂質過酸化反応が亢進し、咬合支持の回復によって脂質過酸化反応と抗酸化作用が正常化したことから受動的回避実験の結

果に影響を与えたことが推察された。

【結論】

咬合支持を喪失したラットでは抗酸化作用が低下し脂質過酸化反応が亢進した酸化ストレス状態となり記憶学習能障害が発現し、咬合支持を回復させたラットでは脂質過酸化反応と抗酸化作用が正常化し、記憶学習能障害が抑制されたと推察される。したがって、咬合支持の有無による酸化ストレスの変動は、記憶学習能に影響を与える可能性が示唆された。

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2件)

Sakamoto S, Hara T, Kurozumi A, Oka M, Kuroda-Ishimine C, Araki D, Iida S, Minagi S. Effect of occlusal rehabilitation on spatial memory and hippocampal neurons after long-term loss of molars in rats. J Oral Rehabil. 2014 41(10):715-22. Jun 7. DOI: 10.1111/joor.12198. (査読有)

Iida S, Hara T, Araki D, Ishimine-Kuroda C, Kurozumi A, Sakamoto S, Miyazaki T, Minagi S. Memory-related gene expression profile of the male rat hippocampus induced by teeth extraction and occlusal support recovery. Arch Oral Biol. 2014 Feb;59(2):133-41. (査読有)

〔学会発表〕(計3件)

宮崎貴子, 原 哲也, 伊志嶺知沙, 荒木 大介, 飯田祥与, 清瀧優也, 皆木省吾. 咬合支持の喪失が記憶学習と酸化ストレスに及ぼす影響, 第26回日本老年歯科医学会, 電気ビルみらいホール(福岡県, 福岡市) 2014年6月13日

飯田祥与, 原 哲也, 荒木大介, 岡 森彦, 伊志嶺(黒田)知沙, 黒住明正, 坂本隼一, 宮崎貴子, 皆木省吾. 咬合支持の回復による海馬の記憶関連遺伝子に関する分子生物学的解析, 第122回日本補綴歯科学会学術大会, 福岡国際会議場(福岡県, 福岡市), 2013年5月19日

Hara T, Miyazaki T, Sakamoto S, Iida S, Araki D, Kurozumi A, Kuroda-Ishimine C, Oka M, Minagi S. Contralateral Hippocampal Pyramidal Cells is Reduced by Unilateral Tooth Extraction, 第91回国際歯科研究学会, シアトル(米国), 2013年3月22日

6. 研究組織

(1)研究代表者

原 哲也 (HARA TETSUYA)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 60238160

(2)研究分担者

皆木 省吾 (MINAGI SHOGO)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 80190693

黒住 明正 (KUROZUMI AKIMASA)

(H24~H25)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 20599790

岡 森彦 (OKA MORIHIKO)(H24)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 90335612

伊志嶺 知沙 (ISHIMINE CHISA)

(H26)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号 40581096