

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26293441

研究課題名(和文)咬合異常が脳に及ぼすストレスのリアルタイムモニタリング

研究課題名(英文) Real-time monitoring of the oxidative stress in brain induced by occlusal disharmony

研究代表者

森田 学 (Morita, Manabu)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・教授

研究者番号：40157904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 7,100,000円

研究成果の概要(和文)：酸化ストレス可視化マウスに咬合異常を付与したところ、脳の酸化ストレスレベルが上昇した。また、両側臼歯での咬合異常は、左側だけの咬合異常よりも、影響が強かった。次に、酸化ストレスを緩和する目的で水素水を摂取させた。水素水摂取により、酸化ストレス防御遺伝子の発現量は変化しなかった。発光量で測定した酸化ストレスレベルは、摂取群では1週後に減少する傾向が認められた。しかし、4週目には差が認められなかった。以上のことから、水素水による抗酸化作用は一過性である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We succeeded to visualize oxidative stress in brain after inducing occlusal disharmony in a Keap1-dependent oxidative stress detector-luciferase (OKD-LUC) mouse. The stress level was greater in mice with bilateral occlusal disharmony than those with unilateral. The intake of hydrogen-rich water (HW) did not reduce the heme oxygenase-1 (HO-1) gene expression, which is an oxidative stress inhibitor. The visualized oxidative stress level was lower in HW-intake, however the effect was transient.

研究分野：予防歯科学

キーワード：酸化ストレス 咬合異常 抗酸化物質

1. 研究開始当初の背景

歯の喪失が脳に悪影響を及ぼすこと、逆に咬合の回復が脳を活性化する可能性があることなどは、動物実験をはじめとして古くから指摘されてきた。最近では高齢者を対象とした大規模コホート研究において、咬合機能を良好に維持することが、認知症に代表される脳の老化を防ぐことが示されている。咬合の異常がアルツハイマー病関連蛋白の発現・沈着を惹起すること等がそのメカニズムの一つと考えられている。しかし、その詳細については不明な部分が多い。

申請者らは、歯周病が歯周局所および全身の酸化ストレスを増加させていることを疫学研究や動物実験によって報告した¹⁻²。酸化ストレス（生体内で生成する活性酸素群の酸化損傷力と生体内の抗酸化システムの抗酸化力のバランス）は老化の指標として近年注目されている。しかし、咬合の異常が口腔内で酸化ストレスを引き起こす可能性があるか否かについては不明である。また、口腔内で惹起された酸化ストレスが、その後のどのような経路で脳に影響を与えるのかについても全く不明である。

一方、申請者らは、咬頭を削除したラットの海馬では、認知症で重要な役割を持つアミロイド蛋白質の発現が増加すること、および咬合を回復したラットでは、同蛋白質が正常に戻ることを確認した³。

以上のことから、咬合異常が脳に及ぼす影響について酸化ストレスを切り口に検討することを着想した。

また、従来の動物実験では、口腔内で惹起された酸化ストレスがどのような経路・タイミングで全身に影響を与えるのかという詳細なエビデンスは得られていない。すなわち、今までは酸化ストレスによって引き起こされた結果（組織の酸化損傷）のみを把握する

に過ぎず、メカニズムの解明には至らないのが欠点であった。これに対して近年、酸化ストレス可視化マウス（Tg型OKD-Lucマウス）や固体状態で蛍光を有する色素であるアミノベンゾピラノキサントニン系色素（ABPX）が発明された。これにより、動物が生きたままの状態でも、酸化ストレスの動態を可視化できるようになった。そこで、この酸化ストレス可視化マウスで咬合異常惹起した後に、生体内での酸化ストレスの分布と経時的変化をリアルタイムで把握できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、どの程度の咬合異常が口腔内で酸化ストレス状態を惹起し、その後脳にどのような影響が起こるのか、抗酸化物質（栄養素、水素水等）の摂取により脳への影響が制御されるのか否か、この2点について動物実験においてリアルタイムで検討することを目的とした。

3. 研究の方法

1) 平成26年度

初年度は、酸化ストレス可視化マウス（Tg型OKD-Lucマウス）において咬合異常モデルを確立すること、咬合異常によって生じた酸化ストレスを可視化するための最適な条件を確立することを目標とした。

可視化の基本的な手技は、ルシフェリン（15mg/mL, 0.01mL/g）を腹腔内に注射後10分以内にルミノメーター（Lumazone、日本ローパー、東京）を用いて、発光状態を可視化・撮影することである。また、Luminescence imageを作成して、単位面積あたりの発光量を計算した。

8週齢の酸化ストレス可視化マウスを用いて、咬合異常群と対照群に分けた。さらに咬合異常群を両側の上顎臼歯の咬頭を削合す

る群、左側の上顎臼歯の咬頭を削合する群に分けた。削合直後及び、4 週後、8 週後にルシフェラーゼ活性を応用して、ルミノメーターでマウスの酸化ストレス部分を可視化、各種組織における経時的変化を検討した。また既存の方法における酸化ストレス評価と比較するため、実験期間終了後にマウスを屠殺し、各種サンプルを採取した。

2) 平成 27 年度

酸化ストレス可視化マウス(Tg 型 OKD-Luc マウス)において咬合異常モデルを作成し、咬合異常によって生じた酸化ストレスの詳細を知るため、条件の更なる最適化を目標とした。

3) 平成 28 年度

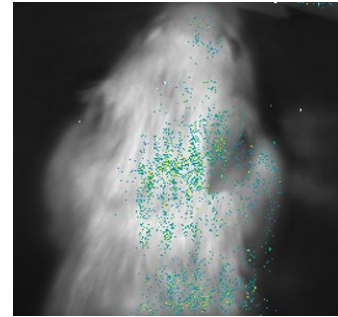
最終年度は、前年度で得られた測定条件下にて。抗酸化物質の一つである水素水の効果を検討した。8 週齢の酸化ストレス可視化マウスを用いて、咬合異常群と咬合異常 + 水素水群に分けた。咬合異常 + 水素水群には、ベースライン時に咬合異常を惹起するとともに、水素水 (3ppm、自由飲水、水素水サーバー : SEEMS Bionics Inc.) を同時に飲水させた。削合直後及び、1, 2, 4 週後のルシフェラーゼ活性をルミノメーターで測定した。4 週後、マウスを屠殺して脳組織を採取した。トリゾールを用いて、mRNA を抽出後、リアルタイム PCR で、HO-1 (Nrf2 の下流に位置する遺伝子、酸化ストレス防御遺伝子) の発現を比較検討した。

4. 研究成果

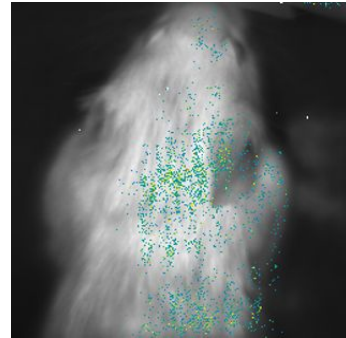
1) 平成 26,27 年度

ルシフェラーゼ活性による単位面積当たりの発光を比較したところ咬合異常群では4週目に高い値を示し、対照群と比較し、高い傾向が見られた(図1)。

対照群



左側削合群



両側削合群

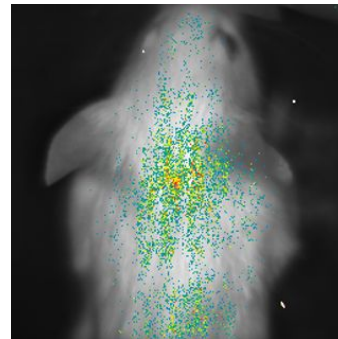


図1 可視化された酸化ストレス

採取された脳において、咬合異常群では対照群と比較し酸化ストレスの指標である Nrf2 の活性が高い値を示した。さらに両側臼歯を削合した群では、左側のみを削合した群と比較し、高い値を示した(図2)

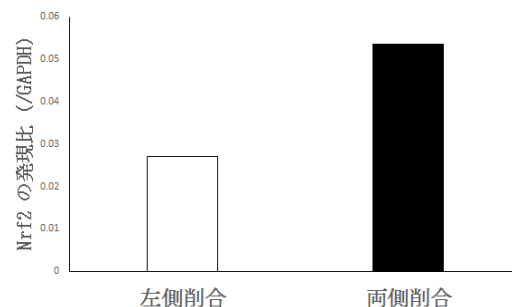


図2 脳中の HO-1 発現量

その後、よりよい測定条件を決定するため、同マウスを研究グループの勉強会に参加、可視化マウスの開発者等に意見を求め、撮影条件の検討を行った。発光の撮影条件を変更、以前より安定して発光を計測できるようになった。すなわち、発光の撮影時間を5分と定め、撮影距離を可能な限り近づけることとした。

2)平成 28 年度

採取された脳において、咬合異常群と咬合異常 + 水素水群では H0-1 の発現量に大きな違いが認められなかった (図 3)。

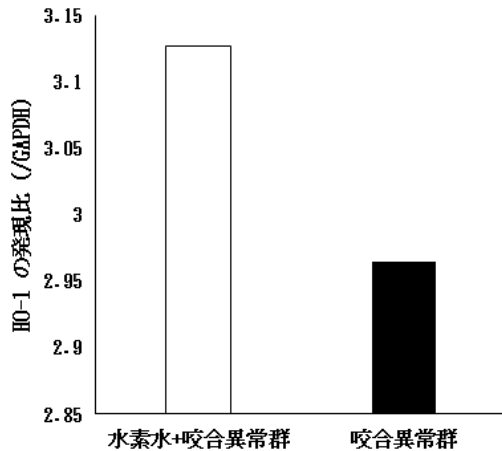
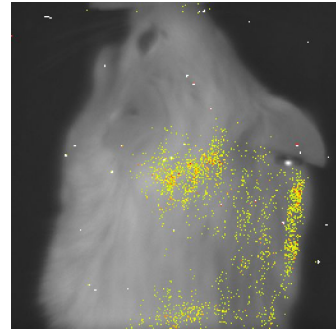


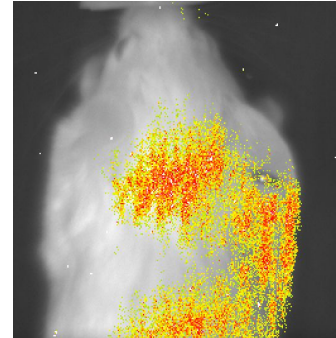
図 3 脳中の H0-1 発現量の比較 (4 週後)

ルシフェラーゼ活性による単位面積当たりの発光を比較したところ、咬合異常 + 水素水群では 1 週後に減少する傾向が認められた。しかし、4 週目には咬合異常群と咬合異常 + 水素水群では大きな違いが認められなかった (図 4)。水素水による抗酸化作用は一過性である可能性が示唆された。

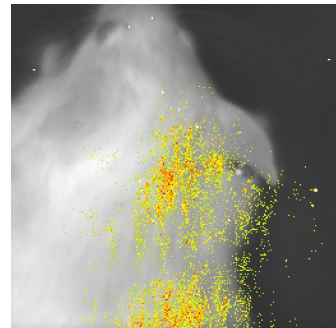
咬合異常+水素水
(1 週後)



咬合異常
(1 週後)



咬合異常+水素水
(4 週後)



咬合異常
(4 週後)

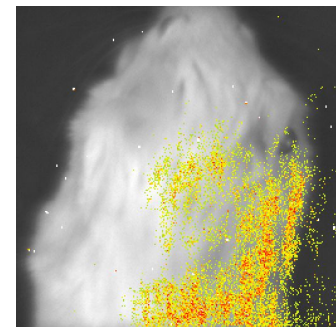


図 4 水素水摂取の効果

< 引用文献 >

- 1) Tamaki N, Tomofuji T, Ekuni D, Yamanaka R, Morita M. Periodontal treatment decreases plasma oxidized

LDL level and oxidative stress.
Clinical Oral Investigations. 15;
953-8, 2011.

- 2) Maruyama T, Tomofuji T, Endo Y, Irie K, Azuma T, Ekuni D, Tamaki N, Yamamoto T, Morita M. Supplementation of green tea catechins in dentifrices suppresses gingival oxidative stress and periodontal inflammation. Archives of Oral Biology 56: 48-53, 2011.
- 3) Ekuni D, Tomofuji T, Irie K, Azuma T, Endo Y, Kasuyama K, Morita M. Occlusal disharmony increases amyloid- in the rat hippocampus. Neuromolecular Medicine 13; 197-203, 2011.

5 . 主な発表論文等

[学会発表](計1件)

片岡広太、江國大輔、粕山健太、川端勇也、山根真由、遠藤康正、米田俊樹、友藤孝明、森田 学 .歯周病による全身の酸化ストレスへの影響:酸化ストレス可視化マウスを用いた検討 .. 第 63 回 日本口腔衛生学会・総会 . 熊本、平成 26 年 5 月 30~31 日

6 . 研究組織

(1)研究代表者

森田 学 (MORITA, Manabu)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号 : 40157904

(2)研究分担者

友藤 孝明 (TOMOFUJI, Takaaki)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号 : 80335629

江國 大輔 (EKUNI, Daisuke)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号 : 70346443

東 哲司 (AZUMA, Tetsuji)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号 : 80432649