

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462916

研究課題名(和文) チューイングによるストレス性骨粗鬆症胎児期発症の抑制機構の賦活化

研究課題名(英文) Maternal chewing during prenatal stress ameliorates stress-induced lower bone mass in adult offspring

研究代表者

東 華岳 (Kagaku, Azuma)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：20273146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では妊娠中のストレス負荷により引き起こされる新生仔の骨粗鬆症に対する咀嚼刺激の効果を解析した。妊娠ストレス負荷をかけた母マウスの血中コルチコステロン濃度は有意に上昇した。妊娠ストレス中に咀嚼刺激を与えると、母マウスの血中コルチコステロン濃度は有意に低下した。妊娠ストレス負荷をかけた母マウスから生まれた仔マウスでは、骨形成の抑制と骨吸収の促進による骨量が有意に低下した。妊娠ストレス条件下咀嚼刺激を与えた母マウスから生まれた仔マウスの骨量がある程度回復した。これらの結果より、妊娠ストレス条件下での咀嚼刺激はストレス反応を緩和し、妊娠期ストレス性骨粗鬆症の発症を抑制しているものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We examined the effects of maternal chewing during prenatal stress on bone microstructure of the adult offspring. Pregnant mice were randomly divided into control, stress, and stress/chewing groups. Mice in the stress and stress/chewing groups were placed in a ventilated restraint tube, and initiated on day 12 of gestation and continued until delivery. Mice in the stress/chewing group were allowed to chew a wooden stick. The bone response of 5-month-old male offspring was evaluated. Prenatal stress resulted in significant decrease of bone mass in the offspring. Maternal chewing during prenatal stress improved the lower bone volume and bone microstructural deterioration induced by prenatal stress in the offspring. These findings indicate that maternal chewing during prenatal stress can ameliorate prenatal stress-induced lower bone mass in adult offspring. Chewing during prenatal stress in dams could be an effective coping strategy to prevent lower bone mass in their offspring.

研究分野：医歯薬学

キーワード：妊娠ストレス 咀嚼刺激 骨粗鬆症 ストレスホルモン 骨代謝

1. 研究開始当初の背景

(1) 超高齢社会の到来を受け、わが国の骨粗鬆症患者数は1,300万人にも達している。高齢者における骨粗鬆症は運動機能の低下に留まらず転倒などから寝たきり状態になることが多く、医療費、介護の両面で大きな社会問題になっている。これまで、加齢、女性ホルモンの低下、喫煙、アルコールなどが骨粗鬆症の発症に関与するといわれてきたが、最近これらの要因以外にストレスが骨粗鬆症の発症・進行に関与することが報告された。骨の健康は骨を形成する骨芽細胞と骨を吸収する破骨細胞のバランスを保つことによって維持されている。ストレスは視床下部 - 下垂体 - 副腎 (HPA) 系を活性化させ、コルチコステロン濃度を上昇させ、ノルアドレナリンの分泌を促進する。これらのストレス物質により、骨芽細胞による骨形成が抑制され、破骨細胞による骨吸収が促進させるため、骨量が低下すると考えられている。

(2) 近年、胎児の環境変化が生後の精神障害や神経認知障害、生活習慣病の発症に関与していることが明らかになり注目を集めている。特に、妊娠中の母体がストレスに曝されるとコルチコステロンが過剰に分泌され、胎盤を通して胎児の血液循環に入り、出生子の認知、行動、身体発育に負の影響を与えることが明らかにされた。最近、妊娠中にストレスを受けると、生まれてくる子の骨化異常と長骨の短縮がみられることが報告された。我々は妊娠中にストレスを負荷したマウスから生まれた仔マウスの骨量が減少することを確認した。これらの結果は妊娠中の母体のストレスが出生子の骨代謝を障害し、骨の成長障害や骨量の減少を引き起こすことを示唆するものである。

(3) 我々はこれまでの研究において fMRI (磁気共鳴画像機能法) を用いたヒトの研究でストレス下のガムチューイングが扁桃体 (海馬の隣に位置しストレス情動発動のトリガー

部位) の神経活動を正常化し、ストレス反応を抑制することを明らかにし、多くの関心を集めてきた。また、ストレスを負荷したマウスに木製の棒を噛ませること (チューイング) により大脳辺縁系の神経回路網を通してストレスが緩和され、骨形成と骨吸収の動的バランスが改善され、ストレス性骨粗鬆症の発症が抑制されることを明らかにした。本研究課題では、骨粗鬆症の発症・進行抑制のヘルスプロモーションを目指し、ストレス下の妊娠マウスから生まれた仔マウスの骨形成、骨吸収機能や骨量と骨質の生後の変化に及ぼすチューイングの効果を系統的に解析する。

2. 研究の目的

(1) 我々は妊娠中に拘束ストレス条件下でチューイングさせたマウスとチューイングさせなかった母マウスの血中ストレスホルモンを測定し、妊娠期拘束ストレス条件下でのチューイング刺激はストレス反応が緩和されることを明らかにする。

(2) 妊娠期拘束ストレス負荷でチューイングさせたマウスとチューイングさせなかったマウスから生まれた仔マウスの骨構造解析と骨代謝マーカーの測定を行い、妊娠中のストレスにより引き起こされる新生子の骨粗鬆症に及ぼすチューイングの有効性を世界に先駆けて系統的に解明する。

3. 研究の方法

本研究目的を達成するために、妊娠期の母マウスにストレス条件下でチューイングさせたマウスとチューイングさせなかったマウスから生まれた仔マウスを用い、骨の三次元微細構造を解析する。母マウスのストレスホルモンと仔マウスの骨代謝マーカーの測定を系統的に行う。これによって、妊娠期の母体ストレスによる新生子の骨粗鬆症の発症メカニズムを検討する。母体のチューイングによるストレス緩和作用、および新生仔

の骨粗鬆症の発症と進行抑制に果たすチューイングの有用性を神経科学的に解明する。

(1) 実験動物モデルの作成：3カ月齢の ddY マウスを使用した。これまでに妊娠した経験のない雌2匹と雄1匹をケージに入れ交配させた。交配翌日膈のプラグを確認し、プラグの認められたマウスを妊娠0日として個別のケージで飼育を行った。妊娠12日目から出産までの間に、1日3回、1回45分間、長さ10.3cm、内径4.5cmのプラスチック製のチューブに妊娠マウスを閉じ込め、拘束ストレスをかけた。チューイング刺激は上述のストレス負荷中に木製の爪楊枝をマウスの前歯に近づける。マウスは自ら積極的に噛みつきチューイングを始める。

(2) 出生した仔マウスは母マウスとともに通常飼育し、生後21日目に離乳させた。本研究では5カ月齢の雄性マウスを使用する。マウス骨格のX線マイクロCTの観察と画像解析：マウスの第4腰椎と大腿骨をX線マイクロCTにより観察し、512×512ピクセル、スライス厚15ミクロンの条件で連続撮影した。第4腰椎の椎体と大腿骨遠位部における海綿骨の骨形態計測パラメータを三次元画像解析法により定量的に分析した。

(3) ストレスホルモンの測定：ストレスが負荷されると血中にストレスホルモンが分泌される。イムノアッセイ法を用いて、母マウスの血中グルココルチコイド濃度を計測することにより、妊娠期高速ストレス負荷に及ぼすチューイングの影響が抽出できた。

(4) 骨代謝マーカーの測定：骨形成マーカーとしての血中オステオカルシン、骨吸収マーカーとしてのI型コラーゲン架橋N-プロペプチドを測定した。

(5) 骨形成と骨吸収の形態学的解析：カルセインの二重標識により骨形成速度の測定を行った。酒石酸耐性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色キットを用いて、TRAP陽性破骨細胞の定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) 妊娠期ストレスをかけた母マウスの血中グルココルチコイド濃度は無処置の対照群に比べ有意に上昇した。妊娠ストレス期間中にチューイング刺激を与えると、母マウスの血中グルココルチコイド濃度はストレス群に比べ有意に低下した。

(2) 妊娠期間中にストレスをかけた母マウスから生まれた仔マウスでは、

大腿骨と腰椎における海綿骨の骨量、骨梁幅と骨梁数が有意に低下した。骨梁間隙が有意に増加した。

骨形成マーカーとしての血中オステオカルシン濃度および骨形成速度が有意に低下した。

TRAP陽性破骨細胞数、破骨細胞面および骨吸収マーカーとしてのI型コラーゲン架橋N-プロペプチド濃度が有意に上昇した。

(3) 妊娠ストレス条件下でチューイング刺激を与えた母マウスから生まれた仔マウスでは、

大腿骨と腰椎における海綿骨の骨量、骨梁幅と骨梁数が有意に上昇した。骨梁間隙が有意に低下した。

骨形成マーカーとしての血中オステオカルシン濃度および骨形成速度が有意に上昇した。

TRAP陽性破骨細胞数、破骨細胞面および骨吸収マーカーとしてのI型コラーゲン架橋N-プロペプチド濃度が有意に低下した。

これらの結果より、妊娠期間中のストレス負荷は視床下部 下垂体 副腎系が過剰に活動し、新生仔の骨リモデリングに悪影響を与え、骨芽細胞による骨形成の抑制と破骨細胞による骨吸収の促進により骨量が低下し骨粗鬆症に陥る。一方、妊娠ストレス条件下でのチューイング刺激はストレス反応を緩和し、新生仔の骨形成と骨吸収の動的バランスを改善し、妊娠期ストレス性骨粗鬆症の発症

と進行を抑制しているものと考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 15 件)

Azuma K, Ogura M, Kondo H, Suzuki A, Hayashi S, Iinuma M, Onozuka M, Kubo KY. Maternal active mastication during prenatal stress ameliorates prenatal stress-induced lower bone mass in adult mouse offspring. *Int J Med Sci* 査読有 14:348-355, 2017.

Kubo KY, Murabayashi C, Kotachi M, Suzuki A, Mori D, Sato Y, Onozuka M, Azuma K, Iinuma M. Tooth loss early in life suppresses neurogenesis and synaptophysin expression in the hippocampus and impairs learning in mice. *Arch Oral Biol* 査読有 74: 21-27, 2017.

Suzuki A, Iinuma M, Hayashi S, Sato Y, Azuma K, Kubo KY. Maternal chewing during prenatal stress ameliorates stress-induced hypomyelination, synaptic alterations, and learning impairment in mouse offspring. *Brain Res* 査読有 1651:36-43, 2016.

Kondo H, Kurahashi M, Mori D, Iinuma M, Tamura Y, Mizutani K, Shimpo K, Sonoda S, Azuma K, Kubo KY.

Hippocampus-dependent spatial memory impairment due to molar tooth loss is ameliorated by an enriched environment. *Arch Oral Biol* 査読有 61:1-7, 2016.

Ueda M, Li S, Itoh M, Wang MX, Hayakawa M, Islam S, Tana, Nakagawa K, Chen H, Nakagawa T. Expanded polyglutamine embedded in the endoplasmic reticulum causes membrane distortion and coincides with Bax insertion. *Biochem*

Biophys Res Commun 査読有 474:259-63, 2016.

Miyake H, Mori D, Katayama T, Fujiwara S, Sato Y, Azuma K, Kubo KY. Novel stress increases hypothalamic-pituitary-adrenal activity in mice with a raised bite. *Arch Oral Biol* 査読有 68:55-60, 2016.

Azuma K, Adachi Y, Hayashi H, Kubo KY. Chronic Psychological Stress as a Risk Factor of Osteoporosis. *J UOEH* 査読有 37:245-253, 2015.

Azuma K, Furuzawa M, Fujiwara S, Yamada K, Kubo KY. Effects of active mastication on chronic stress-induced bone loss in mice. *Int J Med Sci* 査読有 12:952-957, 2015.

Endo S, Nishiyama A, Suyama M, Takemura M, Soda M, Chen H, Tajima K, El-Kabbani O, Bunai Y, Hara A, Matsunaga T, Ikari A. Protective roles of aldo-keto reductase 1B10 and autophagy against toxicity induced by p-quinone metabolites of tert-butylhydroquinone in lung cancer A549 cells. *Chem Biol Interact* 査読有 234:282-289, 2015.

Chen H, Senda T, Kubo KY. The osteocyte plays multiple roles in bone remodeling and mineral homeostasis. *Med Mol Morphol* 査読有 48:61-68, 2015.

Chen H, Iinuma M, Onozuka M, Kubo KY. Chewing maintains hippocampus-dependent cognitive function. *Int J Med Sci* 査読有 12:502-509, 2015.

Kubo KY, Iinuma M, Chen H. Mastication as a stress-coping behavior. *Biomed Res Int* 査読有 2015:876409, 2015.

Kurahashi M, Kondo H, Iinuma M, Tamura Y, Chen H, Kubo KY. Tooth loss early in life accelerates age-related bone

deterioration in mice. *Tohoku J Exp Med* 査読有 235:29-37, 2015.

Chen H, Kubo KY. Bone three-dimensional microstructural features of the common osteoporotic fracture sites. *World J Orthopedics* 査読有 5:486-95, 2014.

Iinuma M, Kondo H, Kurahashi M, Ohnishi M, Tamura Y, Chen H, Kubo KY. Relationship between the early toothless condition and hippocampal functional morphology. *Anat Physiol* 査読有 4:3, 2014.

[学会発表](計 13 件)

東 華岳, 久保金弥. 老化促進モデルマウス SAMP8 に対する抑肝散の効果：空間学習記憶と海馬微細構造の解析、第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017 年 3 月 30 日、長崎大学坂本キャンパス（長崎県・長崎市）

Marong Fang, Yang Yang, Zhiying Hu, Kagaku Azuma. CUMS depression model rat hippocampus induced autophagic and apoptosis are reversed by miR16 and Fluoxetine. 第 122 回日本解剖学会総会・全国学術集会、2017 年 3 月 30 日、長崎大学坂本キャンパス（長崎県・長崎市）

久米正矩、神谷直希、周 向荣、加藤博基、東 華岳、村松千左子、原武史、三好利治、松尾政之、藤田広志。体幹部 CT 画像における脊柱起立筋の自動認識と COPD の予後予測因子としての可能性の検討、第 9 回呼吸機能イメージング研究会学術集会、2017 年 1 月 27 日、京都大学百周年時計台記念館（京都府・京都市）

Tatsuya Katafuchi, Naoki Kamiya, Xiangrong Zhou, Hiroki Kato, Kagaku Azuma, Chisako Muramatsu, Takeshi Hara,

Toshiharu Miyoshi, Masayuki Matsuo, Hiroshi Fujita. Improvement of Supraspinatus Muscle Recognition Methods based on the Anatomical Features on the Scapula in Torso CT Images. *International Forum on Medical Imaging in Asia 2017*. 2017 年 1 月 20 日、那覇市ぶんかテンプス館（沖縄県・那覇市）

小島拓也、周 向荣、東 華岳、横山龍二郎、原 武史、姜 慧研、松尾政之、藤田広志。CT 画像における椎体骨折の半定量的評価の診断支援 ～ 機械学習を用いた椎体の自動検出と分類 ～。2017 年度医用画像研究会。2017 年 1 月 18 日、那覇市ぶんかテンプス館（沖縄県・那覇市）

Suzuki A, Hayashi S, Kondo H, Murabayashi C, Iinuma M, Azuma K, Kubo KY. Maternal chewing during prenatal stress ameliorates stress-induced vulnerability of the brain to novel stress in the adult pups in mice. 第 39 回日本神経科学大会 2016 年 7 月 20-22 日、パシフィコ横浜（神奈川県・横浜市）鈴木あゆみ、林櫻子、近藤裕子、村林知香、飯沼光生、東 華岳、久保金弥。

歯の早期喪失が海馬の髄鞘形成に及ぼす影響：SAMP8を用いた検討。第31回老化促進モデルマウス（SAM）研究協議会研究発表会 2016年7月 9-10日、京都大学医学部芝欄会館（京都府・京都市）

東 華岳、久保金弥。マイクロCTによる骨の三次元微細構造解析。日本顕微鏡学会第72回学術講演会 2016年6月14-16 日、仙台国際会議場（宮城県・仙台市）Suzuki A, Hayashi S, Kondo H, Ogura M, Murabayashi C, Kotachi M, Iinuma M, Azuma K, Kubo KY. Maternal chewing during prenatal stress ameliorates

stress-induced synaptic and myelin alterations in the hippocampus in adult pups. 10th Biennial conference of the pediatric dentistry association of asia. 1016年5月26-28日、Tokyo Dome Hotel (東京都・文京区)

近藤裕子、倉橋実里、鈴木あゆみ、村林知香、森 大輔、飯沼光雄、田村康夫、東 華岳、久保金弥。歯の喪失により惹起される海馬機能障害は豊かな飼育環境により改善される。第30回老化促進モデルマウス(SAM)研究協議会研究発表会 2015年7月4-5日、岐阜大学サテライトキャンパス(岐阜県・岐阜市)

Chen H, Senda T, Kubo KY. Masticatory activity affects bone remodeling in mice. 13th congress of the international society of bone morphometry 2015年4月27-29日、Tokyo Garden Palace Hotel (東京都・文京区)

Suzuki A, Kotachi M, Murabayashi C, Kondo H, Kurahashi M, Iinuma M, Azuma K, Kubo KY. Maternal chewing during prenatal stress ameliorates stress-induced deficits in myelin formation in the hippocampus in adult pups. 第38回日本神経科学大会 2015年3月21-23日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

東 華岳。骨組織の形態学解析とその応用。第71回日本解剖学会九州支部学術集会 2015年10月31日、熊本大学本荘キャンパス(熊本県・熊本市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.uoeh-u.ac.jp/University/dept/medicine/1kaibou.html>

<http://www.imbs-mastication.org/>

(1)研究代表者

東 華岳 (AZUMA Kagaku)
産業医科大学・医学部・教授
研究者番号：20273146

(2)研究分担者

久保 金弥 (KUBO Kin-ya)
星城大学・リハビリテーション学部・教授
研究者番号：00329492

小野塚 実 (ONOZUKA Minoru)
神奈川歯科大学・歯学部・名誉教授
研究者番号：90084780

6. 研究組織