

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26463124

研究課題名(和文) チューイングによる扁桃体を中心としたストレス減弱効果の脳内機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of intracerebral mechanism of stress reduction effect in amygdala by Chewing

研究代表者

笹栗 健一 (Sasaguri, Kenichi)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：10235286

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)： ストレス下におけるChewingが扁桃体に情報入力され、それが自律神経系の中核であり、生体ストレス応答の中心でもある視床下部室傍核に投射され脳内ストレス応答を減弱させるとの仮説を立脚し検討した。

扁桃体に対し、Anti-GABA-transporter-1-saporin (anti-GAT1-sap) の投与によりGABA産生Neuronの特異的細胞死を片側性もしくは両側性に誘導させ、その影響を視床下部室傍核のp-ERK1/2の免疫陽性細胞の発現を指標として検討した結果、同側視床下部室傍核のp-ERK1/2のChewingによる免疫陽性細胞の減少効果が有意に抑制されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： The aim of this study was to investigate whether or not a stressed amygdala receives chewing information and projects to the hypothalamic paraventricular nucleus to diminish the cerebral stress response.

Unilaterally ablated GABAergic neurons were induced in male rats by administering anti-GABA-transporter-1-saporin (GAT1-SAP) to the amygdala, and the effects were measured by p-ERK1/2 immunopositive cell profiles in the hypothalamic paraventricular nucleus. Results indicated that in unilaterally ablated rats, chewing's ameliorating effects were significantly diminished in the stress-induced increase of p-ERK1/2 immunopositive cells in the ipsilateral hypothalamic paraventricular nucleus.

研究分野： 歯科矯正学分野

キーワード： Chewing ストレス 扁桃体 視床下部室傍核 p-ERK カイニン酸

## 1. 研究開始当初の背景

現代は、回避不能なストレスに暴露される社会であり、社会生活を営む上でストレス自体を排除することは困難であるため、近年様々なストレスに対する全身応答や脳内機構に関する研究が精力的に行われ、そのマネジメントもしくは解消法に関する多くのアプローチが認められるようになってきている。実験動物を用いた解析によれば、精神的ストレスの暴露により大脳皮質や辺縁系が興奮し、扁桃体中心核や分界条床核からの投射により、視床下部が興奮し Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis (HPA axis) を賦活させることでストレスの全身応答が開始されると考えられている。また、身体的ストレスは、副腎髄質からのノルアドレナリン・アドレナリン (NA・Ad) の放出や迷走神経を介して孤束核近傍の NA・Ad を含むニューロンからの上行性の投射により上位脳でのプロセッシングを経ることなく視床下部を興奮させると考えられている。なかでも視床下部室傍核 (PVN) は、生体ストレス応答の上位に位置し、自律神経系・内分泌系の制御中枢で、生体恒常性の維持に不可欠な神経核であり、さらに近年では、PVN で産生されるペプチドが情動応答や認知機能といった高次脳機能に影響をおよぼすことが明らかとなり注目されている。一方、1980年に Guile と McCutcheon らは、ストレス下にラットの口腔器官を活性化することで Gastric mucosal lesion がストレス単独群に比べ減少することを報告した。そこでこれまでに我々は、チューイングによる脳内ストレス応答が初期のレベルで抑制される脳領域を明らかにするために、p-ERK1/2 抗体を用いて視床下部室傍核に対して免疫染色を行ったところ、ストレスにより 15 分で上昇する

p-ERK1/2 免疫陽性細胞がチューイングにより速やかに、また有意に減少することを明らかにした。さらに、チューイングによる全身性ストレス応答を抑制する現象として、これまでに報告されている血清中の ACTH・Corticosterone と共に IL-1・IL-6・Leptin 濃度が減少することも明らかにした。すなわち、ストレス下での三叉神経からの求心性入力が増大は、何らかの脳内ストレス抑制機構を惹起し、全身性ストレス応答を抑制しているものと考えられたが、その詳細な脳内メカニズムは不明であった。

そこで本研究は、扁桃体をまずカイニン酸を用いて破壊した実験動物を作製し、扁桃体からの投射を受けストレスの身体応答に対して大きな役割を果たしている視床下部室傍核に及ぼす影響を p-ERK1/2 の発現と血清中のストレスホルモンの挙動を明らかにし、これらの結果を考察することにより、ストレス下での Chewing による脳内ストレス抑制機構の一端を明らかにするとともに、マイクロダイアリシス法を用いて関連する神経伝達物質を同定することとした。

## 2. 研究の目的

本研究では、扁桃体 (情動反応の中枢でストレス情報の振り分けをしている) を中心に、扁桃体と関連の深い海馬 (記憶や空間学習能力に係わる) および視床下部室傍核 (生体のホメオスターシスに大きな役割を果たす) との脳内連携に着目し、脳内のストレス抑制機構の活性化に対する咀嚼器官の役割を検討し、一般社会に対し咀嚼器官の新しい機能の可能性を提示すると共に、咬合医学研究の新規分野を開拓することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究は、カイニン酸を用いて片側もしくは両側扁桃体破壊ラットを作製し、ストレス下における咀嚼器官の活性化による脳内機構を、扁桃体を中心に明らかにすることを目的とする。扁桃体の破壊によるチューイングの影響の脳内機構の指標は、視床下部室傍核の p-ERK1/2 の免疫染色の発現を用いる。また、生体応答の指標として血清中のストレスホルモンである血中コルチコステロン濃度を用いる。その後、マイクロダイアリシス法を用い S 群と SC 群の扁桃体から直接神経伝達物質を採取し、ストレス下のチューイングにより増強されるトランスミッターを同定する。さらに、その阻害薬を用いて扁桃体での選択的トランスミッターの不活化を行い、ストレス下での三叉神経の求心性入力が増強により誘導される脳内物質の全容を明らかにする。

1) カイニン酸を用いた片側もしくは両側性扁桃体破壊ラットの作製

マイクロダイアリシス法を改変し、カイニン酸を用いて片側もしくは両側扁桃体の破壊ラットを作成し、Control 群 (C 群)・S 群および SC 群の視床下部室傍核の pERK1/2 の免疫染色を行い、扁桃体を介した視床下部室傍核の働きを検証する。

2) 血中コルチコステロンの計測

同様に両側扁桃体破壊ラットを用い、各群それぞれの血中コルチコステロン濃度を計測することで、ストレス下におけるチューイングが扁桃体を介して視床下部室傍核の機能を制御し、ストレス性全身応答に影響を及ぼしているかを検討する。

3) 扁桃体からの神経伝達物質の採取とその同定

C 群・S 群ならびに SC 群の扁桃体からマイクロダイアリシス法を用いて神経伝達物質を採取し、ストレス下におけるチューイングにより産生が誘導されるトランスミッターを同定する。

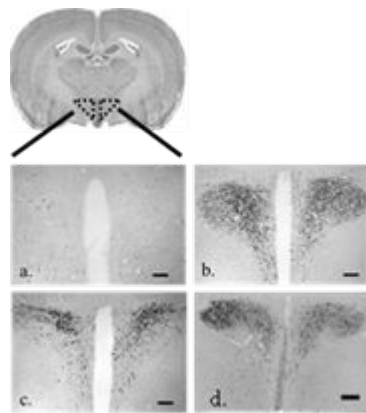
4) ストレス下でのチューイングにより扁桃体で惹起される神経伝達物質の阻害剤による選択的神経細胞破壊

ストレス下でのチューイングにより扁桃体で産生が増強されるトランスミッターの阻害薬を扁桃体に作用させ、選択的扁桃体細胞を破壊した実験動物を作製し、カイニン酸による破壊実験と同様の作用があるかどうかを検討する。

### 4. 研究成果

1) カイニン酸による扁桃体破壊実験動物の作製

生体のホメオスターシスに大きな役割を果たすストレス応答の上位中枢であり司令塔である視床下部室傍核のストレスにより誘導される p-ERK1/2 の発現を指標に、情動反応の中枢でストレス情報の振り分けをしている扁桃体をカイニン酸により細胞死を誘導し破壊する系を確立し、チューイングによるストレス応答変化を検討した。



(Fig.)

カイニン酸を用いて両側性に扁桃体細胞を破壊したところ、その投射領域である

視床下部室傍核での p-ERK1/2 の免疫陽性細胞の変動を検討したところ、ストレスにより増強された視床下部室傍核での p-ERK1/2 の発現細胞が、チューイングにより減少する現象が抑制されることが明らかとなった (Fig.; a : Control, b : Stress 単独, c : Stress + Chewing, d : Stress + Chewing + 両側扁桃体のカイニン酸による破壊)。この結果は、ストレス下での咀嚼器官の活性化がもたらす脳内ストレス減弱効果は、扁桃体を活性化し、その活性化が視床下部室傍核のストレス応答減弱効果を誘導する機構の一部であることを初めて明らかにした。

## 2) 扁桃体でのストレス下におけるチューイングに応じる神経伝達物質の同定

扁桃体からマイクロダイアリシス法を用いて神経伝達物質を採取し、ストレス下におけるチューイングにより産生が誘導されるニューロトランスミッターを同定したところ、チューイングに連動した興味ある抑制系の神経伝達物質が観察された。

以上の結果から、ストレス下のチューイングによる三叉神経からの求心性入力が増加が、三叉神経中脳路核と神経連絡があることが示唆されており、情動機構の最初中枢である扁桃体を介して、直接的もしくは間接的に視床下部室傍核での脳内ストレス応答を減弱させる可能性を示したと考えられた。さらに、その現象に扁桃体の抑制性神経伝達物質が関与している可能性が示唆された。現在、論文投稿中である。

## 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)

Chewing suppresses the stress-induced increase in the

number of pERK-immunoreactive cells in the periaqueductal grey.

Yamada K, Narimatsu Y, Ono Y, Sasaguri K, Onozuka M, Kawata T, Yamamoto T.

Neurosci Lett. 2015 Jul 10;599:43-8. doi: 10.1016/j.neulet.2015.05.023. Epub 2015 May 14.

Effects of mandibular retrusive deviation on prefrontal cortex activation: a functional near-infrared spectroscopy study.

Otsuka T, Yamasaki R, Shimazaki T, Yoshino F, Sasaguri K, Kawata T.

Biomed Res Int. 2015;2015:373769. doi: 10.1155/2015/373769. Epub 2015 May 17.

Stress-induced galectin-1 influences immune tolerance in the spleen and thymus by modulating CD45 immunoreactive lymphocytes.

Sasaguri K, Yamada K, Narimatsu Y, Oonuki M, Oishi A, Koda K, Kubo KY, Yamamoto T, Kadoya T.

J Physiol Sci. 2017 Jul;67(4):489-496. doi: 10.1007/s12576-016-0478-8. Epub 2016 Aug 29.

[雑誌論文] (計 3 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

笹栗 健一 (Sasaguri Kenichi)  
自治医科大学・歯科口腔外科学講  
座・講  
師  
研究者番号:10235286

### (2)研究分担者

久保金弥 (Kubo Kin-ya)  
名古屋女子大学・家政学部・教授  
研究者番号:00329492

### (3)連携研究者

山本利春 (Yamamoto Toshiharu)  
神奈川歯科大学・歯学部・准教授  
研究者番号:50111901