

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	宇津木 千鶴
-------	-----	-----	--------

学 位 論 文 題 目

Hard-diet feeding recovers neurogenesis in the subventricular zone and olfactory functions impaired by soft-diet feeding.

(粉末飼料飼育により低下した脳室下層での神経新生および嗅覚機能は固形飼料飼育によって回復する)

共 著 者 名

宮園 貞治、長田 和実、笹島 仁、野口 智弘、松田 光悦、柏柳 誠

PLOS One 投稿中

研 究 目 的

ヒトや実験動物で咀嚼不全が脳機能を低下させる可能性があるという報告されている。例えば、ヒトにおいて正常な認知能力を持つ高齢者の残存歯数は、認知障害を有する高齢者と比べて多い。また、アルツハイマー病のケースコントロールでは歯の欠損が重要な危険因子であるといわれている。

一方、中枢神経は一度ダメージを受けると再生はしないと考えられていたが、成体の脳の海馬および脳室下層において神経新生が盛んに行われていることがわかってきた。脳室下層で新生した細胞は嗅球へ移動し、介在神経として嗅覚機能の維持に参与している¹⁾。

本研究は咀嚼の脳機能に対する影響を明らかにするため、咀嚼不全のモデルマウスを用いて脳室下層における神経新生と嗅覚中枢の機能を調べた。

材 料 ・ 方 法

1) 実験動物

咀嚼が十分に行われない動物モデルとして、粉末飼料で飼育したC57BL/6マウス(雌、週齢24～28週)を用いた。

2) 方法

i) 神経興奮および神経新生の免疫組織学的解析

咀嚼感覚の入力の違いおよび匂い応答性について、神経興奮の指標となるFos陽性細胞の発現を免疫組織化学的に解析した。絶食後に固形飼料または粉末飼料を摂食させ、90分後に還流固定を行い、飼料の違いによる脳内神経細胞の興奮に相違がみられるか検討した。匂い応答性は、雄の尿の匂いで刺激して調べた。

脳室下層における神経新生を調べるため、指標となるBrdUを用いた。還流固定60分前にBrdUを腹腔内に投与した。嗅球および海馬におけるBrdU陽性細胞の発現の解析では還流固定1週間前よりBrdUを3日間連続で1日2回ずつ投与した。

マウスを4% paraformaldehydeで還流固定後、脳を取り出し、100 μ mの脳切片を作製した。その後、Fos蛋白質およびBrdUに対する免疫染色を行い、Fos陽性細胞およびBrdU陽性細胞の発現を計測し、統計学的解析を行った。

ii) 酪酸に対する忌避行動の解析

マウスが忌避を示すか否かを調べるために、Y字型迷路装置を使用して行動実験を行った。Y字の一端にマウスが忌避を示す酪酸、もう一端には水を設置し、マウスがそれぞれのアームに滞在した時間を計測した。

成 績

1) 固形飼料および粉末飼料の咀嚼感覚入力の違い

口腔の感覚情報は、三叉神経を介して三叉神経主知覚核へ投射する。マウスに固形飼料と粉末飼料を与えた際、神経興奮に違いが生じるか否かを検討した。粉末飼料を与えた時の三叉神経主知覚核におけるFos陽性細胞の発現は、無刺激の時と同じ程度であった。しかしながら、固形飼料を摂食させると無刺激の時と比べて、顕著なFos陽性細胞の発現を認めた。

2) 粉末飼料飼育による脳室下層、嗅球および海馬でのBrdU陽性細胞の減少

固形飼料および粉末飼料を咀嚼した時に三叉神経主知覚核における感覚入力が大きく異なったことから、固形飼料あるいは粉末飼料で1か月間飼育したマウスの脳室下層におけるBrdU陽性細胞の検討を行った。すると、粉末飼料で1か月間飼育したマウスの脳室下層では固形飼料で飼育したマウスと比べ、BrdU陽性細胞が有意に減少した。また、脳室下層由来の細胞が移動する嗅球においても粉末飼料による1か月間の飼育でBrdU陽性細胞の有意な減少を認めた。

海馬においては粉末飼料で1か月間飼育してもBrdU陽性細胞の発現に変化は認めなかったが、3か月間飼育をするとBrdU陽性細胞が減少した。このことから、脳室下層における神経新生は、海馬よりも早く咀嚼不全の影響を受けることが示唆された。

3) 粉末飼料で飼育したマウスの忌避能力および匂い応答性の低下

粉末飼料で1か月間飼育した、神経新生が低下した状態のマウスは、酪酸に対する忌避能力の低下を認めた。また、匂い刺激を行ったところ、粉末飼料で飼育したマウスでは、匂い情報を受容する嗅球および梨状皮質においてFos陽性細胞が有意に減少した。

4) 粉末飼料飼育で低下した忌避能力および匂い応答性の回復

次に、粉末飼料飼育による神経新生および嗅覚機能の低下が可逆的に回復するか否かを検討した。粉末飼料で1か月間飼育したマウスを、固形飼料へ変更し1か月間飼育を行っても回復は認めなかった。しかしながら、固形飼料で3か月間飼育をすると、酪酸に対する忌避能力の回復を認めた。また、匂い応答性を調べたところ、粉末飼料で飼育し続けたマウスと比べ、嗅球および梨状皮質においてFos陽性細胞の強い発現が認められた。

5) 粉末飼料飼育により低下した脳室下層での神経新生の回復

粉末飼料で1か月間飼育後、固形飼料へ変更して3か月間飼育を行ったマウスの神経新生について検討をした。すると、脳室下層ではBrdU陽性細胞の発現に回復が認められた。さらに、嗅球においてもBrdU陽性細胞の発現が回復した。

6) 固形飼料および粉末飼料摂食時に興奮した神経細胞の脳内局在

口腔の感覚入力の違いが、脳室下層の神経新生にどのように影響するのかは不明である。そこで、マウスに固形飼料または粉末飼料を与えた時に、脳内の各部位でFos陽性細胞の発現に違いが認められるかを検討した。すると、固形飼料を与えたマウスは粉末飼料を与えたマウスに比べ、三叉神経主知覚核に加えて脚橋被蓋核において多くのFos陽性細胞の発現が見られた。また、黒質においても固形飼料を与えたマウスでは、多くのFos陽性細胞が発現する傾向を認めた。

考 案

Onozukaらは、咀嚼不全のマウスにおいて海馬における神経新生および空間学習能力の低下を認めたと報告している²⁾。本実験で、粉末飼料での飼育による十分な咀嚼が行われ

ないマウスでは、脳室下層で新生する神経細胞の数が減少し、嗅覚機能の低下が引き起こされることがわかった。臨床的にはアルツハイマー病やパーキンソン病の前駆症状として、嗅覚障害が報告されている。粉末飼料の飼育によって脳室下層における神経新生の低下が、海馬よりも早期に生じた結果を考慮すると、これらの疾患と同様に、まず、脳室下層由来の細胞が移動する嗅球において嗅覚機能が低下し、その後、海馬での記憶障害などの他の障害が引き起こされる可能性が示唆された。

嗅覚機能が低下した状態のマウスを固形飼料へ変更して飼育を行うと脳室下層での神経新生の回復および忌避能力の回復を示した。この結果は、障害された神経新生は可逆的であることを示した。また、粉末飼料による飼育で嗅覚機能の低下は1か月と早期に生じるが、3か月間という長期の咀嚼環境の改善が回復に必要であると示唆された。

口腔感覚情報は三叉神経主知覚核へ入力し、視床を通り、大脳皮質体性感覚野、運動野を経由して脚橋被蓋核へと投射する。また、脚橋被蓋核のコリン作動性ニューロンおよびグルタミン作動性ニューロンは黒質に投射している。さらに、黒質緻密部から脳室下層へのドパミン作動性ニューロンの投射が投射している。ドパミンは、脳室下層での神経新生を増加させることが報告されている³⁾。固形飼料を咀嚼させた時の感覚入力、三叉神経主知覚核、脚橋被蓋核および黒質緻密部の神経を強く興奮させることから、咀嚼感覚が脳室下層における神経新生の維持に関与している可能性が示唆された。

結 論

粉末飼料で1ヶ月間飼育を行ったマウスでは、固形飼料で飼育したマウスに比べ脳室下層において新生される神経細胞が有意に減少した。また、酪酸に対する忌避能力および匂い応答性の低下も示した。さらに、粉末飼料で1ヶ月間飼育後、固形飼料へ変更して3か月間飼育をすると、脳室下層における神経新生が回復することにより、忌避能力および匂い応答性が回復することが明らかとなった。

引 用 文 献

- 1) Gheusi G, Cremer H, Maclean H, et al. Importance of newly generated neurons in the adult olfactory bulb for odor discrimination. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:1823-8
- 2) Onozuka M, Watanabe K, Mirbod SM, et al. Reduced mastication stimulates

impairment of spatial memory and degeneration of hippocampal neurons in aged SAMP8 mice. Brain Res 1999;826:148-53




3) O' Keefe GC, Barker RA, Caldwell MA. Dopaminergic modulation of neurogenesis in the subventricular zone of the adult brain. Cell Cycle 2009;8:2888-94

参 考 文 献

1) 柏柳誠、宇津木千鶴、松田光悦. 脳室下層における神経新生と嗅覚機能. 日味匂学誌2012;19:71-77.

2) 宇津木千鶴、長田和実、笹島仁、宮園貞治、野口智弘、松田光悦、柏柳誠. 粉末飼料による飼育で引き起こされた脳室下層の神経新生および嗅覚機能の低下. 日本味匂学誌2011;18:529-532.

学位論文の審査結果の要旨

報 告 番 号	第 号		
学位の種類	博士(医学)	氏 名	宇津木 千鶴
<div>審査委員長 高草木 薫 </div> <div>審査委員 船越 洋 </div> <div>審査委員 柏柳 誠 </div>			
<p style="text-align: center;">学 位 論 文 題 目</p> <p style="text-align: center;">Hard-diet feeding recovers neurogenesis in the subventricular zone and olfactory functions impaired by soft-diet feeding. (粉末飼料飼育により低下した脳室下層での神経新生および嗅覚機能は固形飼料飼育によって回復する)</p> <p style="text-align: center;">共 著 者 名</p> <p style="text-align: center;">宮園 貞治、長田 和実、笹島 仁、野口 智弘、松田 光悦、柏柳 誠</p> <p style="text-align: center;">PLOS One Vol.9 (5); e97309, 2014 Published May 9, 2014</p>			
<p>学位論文の審査結果の要旨</p> <p>「嗅ぐ・咀嚼する・嚥下する」という摂食機能は動物が生存する上で必須の生得的機能である。この生得的機能の破綻は高齢化による脳機能の低下と密接に関連する。特に、高齢化に伴う認知機能と残存歯数には正の相関があることから、健康歯を維持することが、適切な咀嚼機能と認知機能の維持につながる可能性がある。近年の研究では、海馬や脳室下層における神経細胞の新生（神経新生）が、嗅球に移動して嗅覚の維持に関与することが知られている。</p> <p>そこで本研究では、咀嚼運動が細胞新生を促し、脳機能を改善させるという作業仮説に立脚し、これを動物実験において検証した。具体的には、固形飼料と粉末飼料のそれぞれで飼育した健常咀嚼マウス群と咀嚼不全マウス群において、①脳室下層での細胞新生、②匂い応答に基づく忌避行動（脳機能）、③脳内神経細胞活動の組織学的検索、の3項目について検討した。その結果、健常咀嚼マウス群では咀嚼不全マウス群よりも、①細胞新生、②匂い応答に基づく忌避行動、そして、③匂い情報に関与する</p>			

嗅球と梨状皮質、咀嚼運動・感覚に関与する神経核群（三叉神経核・脳幹網様体・視床・運動・感覚皮質）、さらには報酬に関与する神経核群（脚橋被蓋核・黒質緻密部）の興奮性、は有意に上昇した。また咀嚼不全マウスを固形飼料で飼育すると、これらのパラメータは回復した。

これらの成績は、「咀嚼運動が細胞新生を促して脳機能を改善させるという」作業仮説を裏付けると共に、健康歯を維持して固形物を咀嚼する運動が脳機能の改善や維持に重要であることを示唆する。一方で、高齢化に伴う健康歯の喪失により、柔らかい食事しか摂取できない場合には、細胞新生や脳機能の改善・維持は困難であろうと予測される。即ち、高齢者において健康歯を維持することが認知症の予防や改善につながると考えられる。（758字）

学力確認の結果

学位論文申請者、宇津木千鶴氏（博士課程）は、柏柳誠教授（生理学・神経機能分野）の指導の下でマウスモデル動物の作成と一連の研究を遂行し、上記の成績を得ることに成功した。本研究の内容は、本年5月9日発刊のPLOS One誌（Open-journal）に掲載された。

本研究には、行動学的研究や組織化学・免疫組織化学的研究など多彩で繊細な解析技術が要求される。宇津木氏は忍耐強く一連の研究を実行し、咀嚼と脳機能に関する極めて重要な知見を得ることができた。本知見は、認知症予防における健康残存歯ならびに咀嚼運動の重要性を示した点において極めて重要であり、広くアウトリーチすべき知見である。

また、解析が多彩であることから解析手法に対する知識や結果を解釈するための知識は広範囲に及ぶ。これらの広い背景知識を駆使し、宇津木氏は、本学位論文の主査・副査の質問・査問に対して、極めて真摯で適切に対応してきた。さらに、宇津木氏は、臨床歯科医として、本研究の知見を臨床研究にまで応用・拡張することにより、高齢化に伴う認知症予防に広く貢献したいという強い意志を持っている。

本学位論文審査員は、①研究に対する姿勢と学位論文、②背景知識、そして、③前向きで真摯な人物像、を総合的に評価した結果、「同氏は本学の学位（医学）授与に相応しい」と判断した。