

咬合支持の喪失と回復が空間記憶や高次脳機能に及ぼす影響

飯田祥与

The effects by loss and recovery of occlusal support on spatial cognitive performance
and higher brain function

Sachiyo Iida, DDS, PhD

抄 録

口腔内衛生状態・咬合関係などの咀嚼機能が認知症の状態に関連することが臨床研究として報告されており、現在に至るまで咀嚼機能と高次脳機能との関連性について多岐にわたる研究が進められている。

咬合支持の喪失と回復が高次脳機能に与える影響について、現在までに発表されている研究に加えて、我々が行った迷路課題によって海馬に発現する遺伝子を DNA microarray を用いて網羅的に解析して記憶関連遺伝子を選択し、迷路課題実施によるこの遺伝子発現に対して歯の欠損や咬合支持の回復が及ぼす影響について、定量的に検討を行った研究を紹介する。

キーワード

咬合支持, 海馬, 遺伝子

I. はじめに

先進国において人口の急激な高齢化が問題となっており、高齢化率の上昇に伴い認知症患者の増加という社会問題が深刻化している。認知症の危険因子はいくつか示されているが、縦断研究では多数歯欠損の場合、認知症の罹患率と発病率両方のリスクが高まることが示されている¹⁾など歯の喪失が認知症の危険因子の一つであることが示唆されている²⁾。現在では、中枢神経系の神経可塑性が記憶形成の基礎をなすことが知られている。記憶の符号化、強化で最も重要な脳の構造体は海馬であり^{3,4)}、空間認知には海馬体が深く関わることが知られている^{5,6)}。我々のグループでは、臼歯を抜歯したラットでは海馬の錐体細胞数が減少して八方向放射状迷路での記憶が低下し、抜歯後に義歯を装着して咬合支持を回復させると八方向放射状迷路でのエラー数が減少することを報告してきた⁷⁾。このような現象を理解するためには、海馬における歯

の喪失や咬合支持の回復が分子生物学的に与える影響を検討する必要があると考えられるが、空間認知の際に海馬でどのような遺伝子が発現しているのかいまだ詳細な解明が行われていない。

今回は、咬合支持の有無と脳機能について現在までに発表されている研究と我々が行った迷路課題実施後に海馬での遺伝子発現を網羅的に解析して記憶関連遺伝子を選択し、迷路課題の実施によるこの遺伝子発現に対して歯の欠損や咬合支持の回復が及ぼす影響についての研究⁸⁾を紹介する。

II. 咬合支持の喪失と高次脳機能の関係

歯牙の喪失は、アルツハイマー型認知症の疫学的リスクファクターの一つとなる可能性があることが報告されている²⁾。特に、咀嚼能力が老人の栄養状態、健康ならびに日常生活の活動性 (ADL) に影響する⁹⁻¹³⁾ことや、老人の口腔内衛生状態・咬合関係などの咀嚼機能が認知症の状態に関連することが臨床研究¹⁴⁾と

して報告されている。

動物実験においても咀嚼機能や咬合支持の有無と中枢神経系との関連性を調べた研究が進められてきた。パウダー食を与えられた若齢ラットは、固形食を与えられた同週齢のラットと比較して空間記憶能が劣ることが報告され¹⁵⁾、臼歯抜歯されたラットでは、大脳皮質におけるアセチルコリン放出量の減少と、八方向放射状迷路における空間記憶の減退が認められている¹⁶⁾。また、一側の歯牙を抜歯することによって片側咀嚼にしたラットでは大脳の細胞分布密度に明らかな左右差が認められ¹⁷⁾、老齢 SAMP8 マウスの臼歯喪失は空間記憶の減退とアストロサイトの反応変化をもたらすと考えられている¹⁸⁾。猿やツバイにおいても抜歯 70 日後には、歯根膜神経が抜歯窩から完全に消失し、三叉神経節の神経細胞の変化分解及び断裂が観察され、さらに長期間の歯牙喪失に由来する咬合崩壊の結果、歯根の感覚受容器からの感覚性入力が増加することが報告されている¹⁹⁾。また、Matsuno らは受動的回避学習実験装置を用い、7 週齢の臼歯喪失ラットと無処置ラットの記憶の保持試行において臼歯抜歯群は Reaction latency の有意な短縮を認めたことを報告している²⁰⁾。この報告では、臼歯喪失ラットにおいては海馬におけるグルタミン酸放出量の有意な減少が示されている。グルタミン酸は中枢神経系における主たる興奮性神経伝達物質であり、記憶、学習、神経学的な分化や再生、そして細胞死等に関与すると考えられている。臼歯喪失ラットのグルタミン酸の放出量の減少は、臼歯抜歯が脳内の伝達物質の放出にも影響を与える可能性を示唆している。このように、咀嚼機能の減少や咬合支持の喪失が学習ならびに記憶能力の減退を引き起こし、中枢神経系に影響を与えている事実が次第に明らかになりつつある。

III. 咬合支持の回復と高次脳機能の関係

咬合支持を失った高齢患者に対する補綴治療が毎日の臨床において当たり前のように行われているが、欠損補綴が単に咀嚼機能を回復するだけでなく中枢神経系に与える影響を解明することは欠損補綴の有用性を示すうえで、非常に重要であると考えられる。

我々のグループでは、実験動物の咬合支持の回復が空間認知能に及ぼす影響について八方向放射状迷路を用いて検討してきた²¹⁾。その結果、情報の入力から保持においても記憶の保持から再生過程においても臼歯を抜歯したラットでは八方向放射状迷路でのエラー数が多く、実験用義歯によって咬合支持を回復させると

エラー数の増加を抑制できることを示した。また、海馬の CA1 領域の錐体細胞数の変化も行動学的実験結果と整合性のある結果を示した。臼歯を抜歯したマウスでは末梢からの神経刺激が減少して、その経路となる三叉神経節の変化変性を起こしたという報告があり²²⁾、口腔から中枢を結ぶ神経系の変性退化ならびに脳内の情報伝達が鈍化した可能性が推察される。一方、義歯によって咬合支持が回復されることで下顎歯根膜から中枢への求心性情報入力が増加に引き起こされたことで空間認知能の低下が抑制されたと考えられる。これはラットにおいて背側海馬と前頭葉眼窩皮質の間の機能的な結合が八方向放射状迷路でのワーキングメモリに関与している²³⁾と考えられているからである。これらの結果から、咬合支持の喪失による中枢への咀嚼関連刺激の減少は、海馬・大脳皮質などの脳組織の退行的変化に影響を与えている可能性があると考えられる。抜歯によって咀嚼機能が低下するのみでなく、咀嚼筋の筋紡錘にある伸張受容器、口腔粘膜に存在する圧受容器、そして下顎残存歯の歯根膜にある機械的圧受容器など様々な感覚受容器から中枢神経系へ咀嚼関連刺激が影響することが推察される。また、補綴処置によって咀嚼機能を回復することで末梢から中枢への咀嚼関連刺激が増加して神経伝達回路や脳組織における変化退行変性が抑制された可能性もあると考えられる。

IV. 咬合支持の回復による記憶関連遺伝子に関する分子生物学的解析

上記のような現象を理解するためには、海馬において記憶に関連する神経伝達物質、内分泌系ならびに免疫系などに対して歯の喪失や咬合支持の回復が与える影響を検討する必要があると考えられるが、空間認知の際に海馬でどのような遺伝子が発現しているのかはまだ詳細な解明が行われていない。

そこで我々は、迷路課題実施後に海馬での遺伝子発現を網羅的に解析して記憶関連遺伝子を選択し、迷路課題の実施によるこの遺伝子発現に対して歯の欠損や咬合支持の回復が及ぼす影響について定量的に検討することを目的として研究を行った⁸⁾。

方法は、まず記憶関連遺伝子の同定のために 7 週齢の Wistar 系雄性ラット 10 匹を用い、これらを 5 匹ずつの迷路課題群と無課題対照群との 2 群に分け、迷路課題群には八方向放射状迷路課題を 1 日 1 回 5 日間施行し、エラー数の計測を行った。その後両群の海馬を摘出し、mRNA を抽出した。両群の遺伝子発

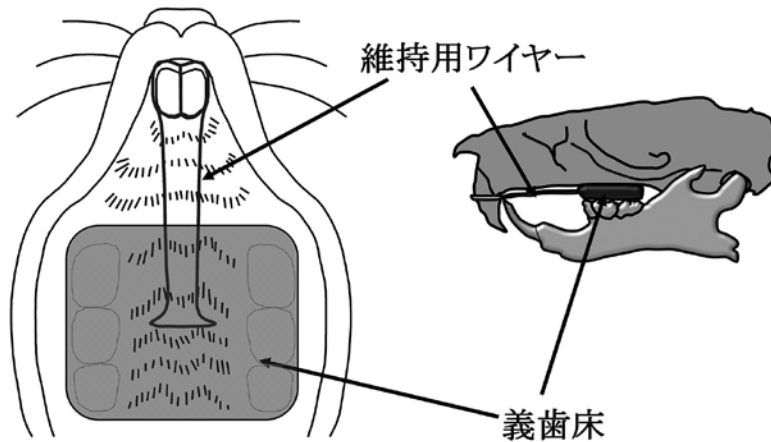


図1 維持用ワイヤーと加熱重合型レジン（アクリル（GC））を使用した実験用義歯

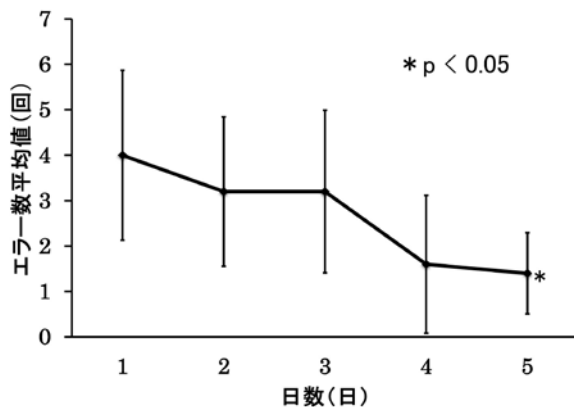


図2 八方向放射状迷路でのエラー数の平均値

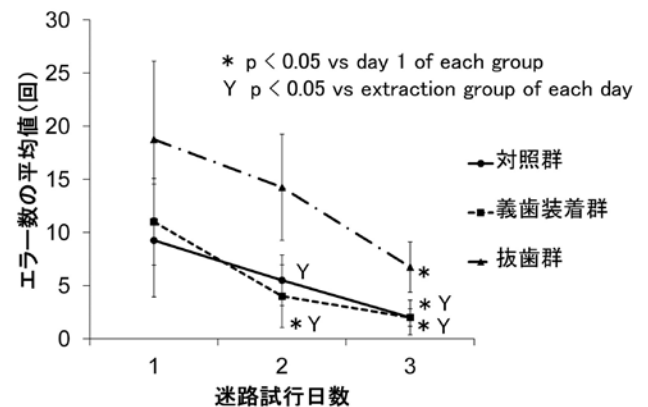


図3 八方向放射状迷路での对照群，義歯装着群，抜歯群のエラー数の平均値

現量の変化は DNA microarray 分析法を用いて確認した²⁴⁻²⁶⁾。記憶関連遺伝子の選択において，サンプルには Cy3 と Cy5 という結合染色によってラベル化を行った。蛍光色素の標識の際のサンプルへの取り込み効率や分解速度の差を補正するために，ダイスワップ法による繰り返し実験を行った。その後定量分析のため Real-time PCR 法を行い，遺伝子機能で整合性のあるものを記憶関連遺伝子として選択した。

その後，選択した記憶関連遺伝子の発現に対して歯の欠損や咬合支持の回復が及ぼす影響を検討するために，Wistar 系雄性ラット 42 匹を用い，これらを無処置对照群（以下，对照群），義歯装着群，抜歯群の 3 群に分けた。義歯装着群ならびに抜歯群は，7 週齢時に上顎臼歯全ての抜歯を行い，義歯装着群には咬合支持の回復のための実験用義歯を装着した（図 1）。3 群に対する八方向放射状迷路課題は 49 週齢時から開始し 1 日 1 回 3 日間行わせ，エラー数の計測を行った。

迷路課題 0，1 および 3 日後に各群 4～5 匹ずつ動物を屠殺し，海馬を取り出した。その後，選択した記憶関連遺伝子の発現量の経時的变化を Real-time PCR 法によって計測した。

当実験で記憶関連遺伝子の選択に若齢ラットを用いたのは，老齢ラットよりも空間認知能が高く，記憶関連遺伝子の発現量が老齢ラットよりも多い可能性が高く，記憶関連遺伝子の選択においては若齢ラットが好ましいと考えたためである²⁷⁾。実際，行動学的実験を行ったところ，若齢ラットは老齢ラットと比較してエラー数は少なかった。しかし，歯の喪失や記憶障害は高齢者に多く生じる。そのため，老齢になった場合，また咬合支持を喪失した場合の記憶関連遺伝子の変化を測定するため，記憶関連遺伝子の発現量の測定の際には老齢ラットを用いた。

この結果，迷路課題群のエラー数は経時的に減少し，学習が進行していることが示された（図 2）。DNA

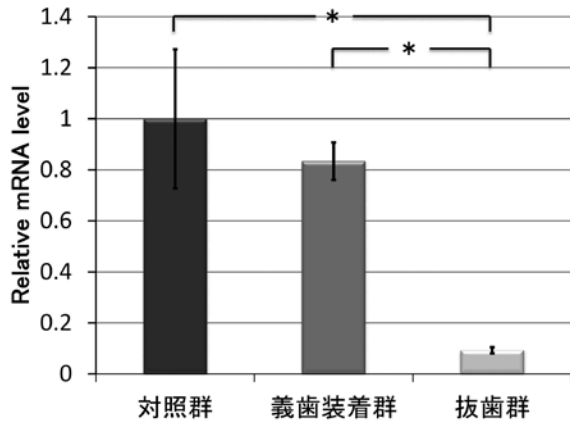


図4 S100a9 遺伝子の迷路課題前の抜歯と義歯装着による発現量の変化

microarray 分析の結果、学習記憶時にはカルシウム結合タンパク質の S100a9 遺伝子²⁸⁾ が減少することが明らかになった。

脳虚血、外傷性脳損傷、アルツハイマー病のような神経学的な病気において、S100a9 が属する S100 ファミリーの発現や機能の変化が関係しているということが報告されている²⁹⁻³²⁾。近年、S100a9 が老人斑や反応神経膠内で増加がみられたということや、アルツハイマー病の病因となる炎症に関与しているということが報告されている²⁹⁾。一方、S100a9 の発現を抑制することでアルツハイマー病治療の可能性があると報告もある²⁸⁾。

対照群、義歯装着群、抜歯群の八方向迷路課題の結果、いずれの群においてもエラー数は経時的に減少し、学習が進行していることが示された (図3)。群間比較をすると、対照群と義歯装着群のエラー数は迷路2日目と3日目には抜歯群のエラー数と比較して、有意に少なかった。

抜歯と義歯装着による遺伝子発現量の変化をみたところ、抜歯群の S100a9 発現量は、迷路課題前の時点で義歯装着群と対照群よりも有意に少なかった (図4)。このことから S100a9 の発現には咬合支持の有無が影響していることが示唆される。

迷路課題の実施によって S100a9 の発現量は、3群ともに迷路1もしくは3日目には迷路課題前に比べて約 1/2 ~ 1/5 に減少した (図5)。これらのことから S100a9 の発現は学習記憶時には発現が減少した DNA microarray の結果と一致しており、記憶に影響する遺伝子である可能性が示唆される。

迷路課題前の S100a9 発現量の減少については、生

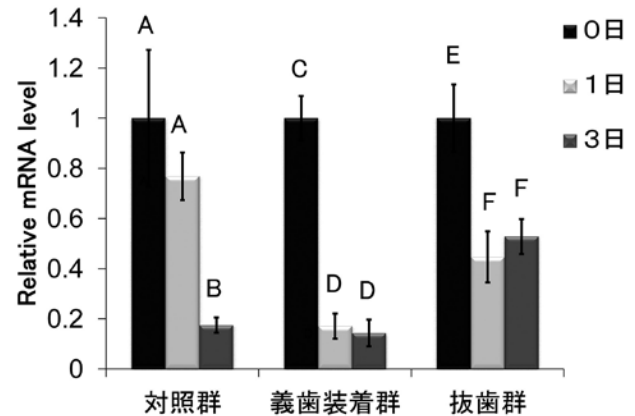


図5 八方向放射状迷路による S100a9 遺伝子経時的発現変化。それぞれの群の迷路課題前の発現量を基準としており、それぞれの群の迷路課題前と迷路課題後の発現量に有意差がある場合に異なるアルファベットを標識している。

活する上で必要な学習記憶をするために発現量が減少したとも考えられるが、今回の研究結果のみでは断言できない。S100a9 の発現量のみで学習記憶のメカニズムを理解することはできないが、S100a9 は咬合支持の有無により影響を受ける遺伝子であるとともに、記憶に影響する遺伝子である可能性が示唆され、S100a9 についての研究を推進することで海馬の学習の分子メカニズムに有用な見識を提供するかもしれない。

V. 今後の展望

今回、海馬での遺伝子発現の変化の測定を行ったが、海馬のどの領域内での変化かは測定できていない。本来であれば *in situ* ハイブリダイゼーションなどを行い、局在を明らかにするべきだと考えるが、まず包括的な実験を行うこととした。この研究は今後の検討の余地があると考えられる。

第124回補綴学会イブニングセッションにより、補綴処置による咬合支持の回復が国民の健康長寿に貢献するのではないかという一端を浮かび上がらせたのでないであろうか。しかし、この分野の全てを解明するにはまだまだ研究数が不足しており、本学会が中心となって咬合支持の回復・補綴歯科治療が健康長寿に果たすことを解明していくことが必要である。本学会でこの分野の研究が推進されていくことが強く望まれる。

文 献

- 1) Stein PS, Desrosiers M, Donegan SJ, Yepes JF, Kryscio

- RJ. Tooth loss, dementia and neuropathology in the Nun study. *J Am Dent Assoc* 2007; 138: 1314-1322.
- 2) Kondo K, Niino M, Shido K. A case-control study of Alzheimer's disease in Japan--significance of lifestyles. *Dementia* 1994; 5: 314-326.
- 3) Nadel L. A brain structure: the hippocampus. *Science* 1987; 235: 1682a
- 4) Scoville WB, Milner B. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci* 2000; 12: 103-113.
- 5) Burgess N. Spatial cognition and the brain. *Ann N Y Acad Sci* 2008; 1124: 77-97.
- 6) Rudy JW. Context representations, context functions, and the parahippocampal-hippocampal system. *Learn Mem* 2009; 16: 573-585.
- 7) Sakamoto S, Hara T, Kurozumi A, Oka M, Kuroda-Ishimine C, Araki D et al. Effect of occlusal rehabilitation on spatial memory and hippocampal neurons after long-term loss of molars in rats. *J Oral Rehabil* 2014; 41: 715-722.
- 8) Iida S, Hara T, Araki D, Ishimine-Kuroda C, Kurozumi A, Sakamoto S et al. Memory-related gene expression profile of the male rat hippocampus induced by teeth extraction and occlusal support recovery. *Arch Oral Biol* 2014; 59: 133-141.
- 9) Agerberg G, Carlsson GE. Chewing ability in relation to dental and general health. *Acta Odontol Scand* 1981; 39: 147-153.
- 10) Horwath CC. Chewing difficulty and dietary intake in the elderly. *J Nutr Elder* 1989; 9: 17-24.
- 11) Miura H, Araki Y, Umenai T. Chewing activity and activities of daily living in the elderly. *J Oral Rehabil* 1997; 24: 457-460.
- 12) Miura H, Arai Y, Sakano S, Hamada A, Umenai T, Isogai E. Subjective evaluation of chewing ability and self-rated general health status in elderly residents of Japan. *Asia Pac J Public Health* 1998; 10: 43-45.
- 13) 永井晴美, 柴田 博, 芳賀 博, 上野満雄, 須山靖男, 安村誠司ほか: 地域老人における咀嚼能力の健康状態への影響. *日本老年医誌* 1990 ; 27 : 63-68.
- 14) Miura H, Yamasaki K, Kariyasu M, Miura K, Sumi Y. Relationship between cognitive function and mastication in elderly females. *J Oral Rehabil* 2003; 30: 808-811.
- 15) 川村早苗. マウスとラットの条件回避学習に及ぼす飼料硬度の影響. *歯基礎誌* 1989 ; 31 : 72-82.
- 16) Kato T, Usami T, Noda Y, Hasegawa M, Ueda M, Nabeshima T. The effect of the loss of molar teeth on spatial memory and acetylcholine release from the parietal cortex in aged rats. *Behav Brain Res* 1997; 83: 239-242.
- 17) 藤原秀樹. ラットの咀嚼と脳発達に関する組織学的, 行動学的研究. *歯基礎誌* 1990 ; 32 : 495-508.
- 18) Onozuka M, Watanabe K, Nagasaki S, Jiang Y, Ozono S, Nishiyama K et al. Impairment of spatial memory and changes in astroglial responsiveness following loss of molar teeth in aged SAMP8 mice. *Behav Brain Res* 2000; 108: 145-155.
- 19) Kubota K, Nagae K, Shibana S, Hosoka K, Iseki H, Odagiri N et al. Degenerative changes of primary neurons following tooth extraction. *Anat Anz* 1988; 166: 133-139.
- 20) Matsuno A, Inoue H. Hippocampal glutamate release on learning and memory in teeth-loss rats. *Prosthodont Res Pract* 2008; 7: 71-77.
- 21) 黒住明正. 白歯抜歯後の咬合支持の回復が空間認知の再生及び海馬神経細胞密度に与える影響. *岡山歯誌* 2009 ; 28 : 1-9.
- 22) Tsutsui K, Kaku M, Motokawa M, Tohma Y, Kawata T, Fujita T et al. Influences of reduced masticatory sensory input from soft-diet feeding upon spatial memory/learning ability in mice. *Biomed Res* 2007; 28: 1-7.
- 23) Kesner RP, Lee I, Gilbert P. A behavioral assessment of hippocampal function based on a subregional analysis. *Rev. Neurosci* 2004; 15: 333-351.
- 24) Rosenzweig BA, Pine PS, Domon OE, Morris SM, Chen JJ, Sistare FD. Dye bias correction in dual-labeled cDNA microarray gene expression measurements. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 480-487.
- 25) Altman S. Masters of DNA. *J Biol Chem* 2005; 280: 14361-14365.
- 26) Martin-Magniette ML, Aubert J, Cabannes E, Daudin JJ. Evaluation of the gene-specific dye bias in cDNA microarray experiments. *Bioinformatics* 2005; 21: 1995-2000.
- 27) Muir JL, Fischer W, Björklund A. Decline in visual attention and spatial memory in aged rats. *Neurobiol Aging* 1999; 20: 605-615.
- 28) Ha TY, Chang KA, Kim Ja, Kim HS, Kim S, Chong YH et al. S100a9 knockdown decreases the memory impairment and the neuropathology in Tg2576 mice, AD animal model. *PLoS One* 2010; 5: e8840.
- 29) Shepherd CE, Goyette J, Utter V, Rahimi F, Yang Z, Geczy CL et al. Inflammatory S100A9 and S100A12 proteins in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2006; 27: 1554-1563.
- 30) Postler E, Lehr A, Schluesener H, Meyermann R. Expression of the S-100 proteins MRP-8 and -14 in ischemic brain lesions. *Glia* 1997; 19: 27-34.
- 31) Engel S, Schluesener H, Mittelbronn M, Seid K, Adjodah D, Wehner HD et al. Dynamics of microglial activation after human traumatic brain injury are revealed by delayed expression of macrophage-related proteins MRP8 and MRP14. *Acta Neuropathol* 2000; 100: 313-322.
- 32) Zimmer DB, Chaplin J, Baldwin A, Rast M. S100-mediated signal transduction in the nervous system and neurological diseases. *Cell Mol Biol* 2005; 51: 201-214.

著者連絡先: 飯田 祥与

〒700-8525 岡山市北鹿田町 2-5-1 岡山

大学病院咬合・義歯補綴科

Tel: 086-235-6687

Fax: 086-235-6689

E-mail: sachi@okayama-u.ac.jp