

氏名	飯田 祥与
学位	博士
専門分野の名称	歯学
学位授与番号	博甲第4934号
学位授与の日付	平成26年3月25日
学位授与の要件	医歯薬学総合研究科機能再生・再建科学専攻 (学位規則(文部省令)第4条第1項該当)
学位論文題目	Memory-related gene expression profile of the male rat hippocampus induced by teeth extraction and occlusal support recovery (咬合支持の回復による海馬の記憶関連遺伝子発現に関する分子生物学的解析)
学位論文審査委員	松尾 龍二 教授      杉本 朋貞 教授 皆木 省吾 教授

## 学位論文内容の要旨

### 【緒言】

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構造体である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、空間認知には海馬体が深く関わるということが知られている。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たラットでは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。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。

本研究では、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れら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た。

### 【材料ならびに方法】

#### 実験1. 記憶関連遺伝子の選択

7週齢のWistar系雄性ラット10匹を用い、これらを5匹ずつ対照群と迷路実験群の2群に分けた。迷路実験群には八方向放射状迷路を1日1回5日間施行し、エラー数の計測を行った。迷路課題終了後に海馬を摘出し、mRNAを抽出した。遺伝子発現量の変化はDNA microarray分析法を用いて確認した。その後、定量分析のためReal-time PCR法を行い、整合性のあるものを記憶関連遺伝子として選択した。

#### 実験2. 抜歯ならびに咬合支持の回復に伴う記憶関連遺伝子の発現

Wistar系雄性ラット42匹を用い、これらを対照群、抜歯群、義歯装着群の3群に分けた。義歯装着群には、11週齢時に咬合支持の回復のため実験用義歯を装着した。八方向放射状迷路は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4~5匹ずつ動物を屠殺し、海馬を取り出した。その後、実験1で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。また、実験動物に対しての精神的ストレスをみるため、酵素免疫測定法によりコルチコステロン値の測定を行い、3群間で比較を行った。統計学的分析には、二元配置分散分析あるいは一元配置分散分析とTukeyによる多重比較検定を用いて行った。有意水準は5%とした。なお、本実験は岡山大学動物実験委員会の指針に従い、同委員会の承認を得て行っている。(OKU-2010142)

## 【結果】

実験1では、迷路実験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。DNA microarray分析の結果、迷路課題によって96の遺伝子に2倍以上の発現増加が認められ、208の遺伝子に半分以下の発現減少を認めた。これらのうち、個体差が大きいものや恐怖に関連するものを除外した結果、海馬において甲状腺刺激ホルモンを放出するニューロペプチドであるTrh遺伝子と、細胞外マトリックス構成要素のTnxa遺伝子が増加し、ニューロン細分化に関連するNnat遺伝子とカルシウム結合タンパク質のS100a9遺伝子が減少することが明らかになった。

実験2では、迷路実験によるエラー数は、対照群と抜歯群は迷路1日目と比較すると、迷路3日目には有意に減少した。義歯装着群は迷路1日目と比較すると、2日目には有意に減少した。迷路2日目、3日目の抜歯群のエラー数は同日の対照群と義歯装着群のエラー数と比較すると有意に多かった。迷路課題前の義歯装着群のTrh遺伝子の発現量は、対照群と抜歯群よりも有意に多く発現していた。迷路課題後のTrh遺伝子の発現量は、対照群では経時的に有意に減少したが、義歯装着群と抜歯群では経時的变化がみられなかった。迷路課題前のTnxa遺伝子の発現量は3群間で有意差を認めなかった。迷路課題後のTnxa遺伝子の発現量は対照群と義歯装着群では経時的に有意に増加したが、抜歯群では変化はみられなかった。迷路課題前のNnat遺伝子の発現量は、3群間で有意差を認めなかった。迷路課題後のNnat遺伝子の発現量は3群全てにおいて経時的に有意に減少した。迷路課題前の抜歯群のS100a9遺伝子の発現量は、対照群と義歯装着群よりも有意に少なく発現していた。迷路課題後のS100a9遺伝子の発現量は3群全てにおいて経時的に有意に減少した。3群間でコルチコステロン値の有意差はみられなかった。

## 【考察】

Trh 遺伝子は海馬における記憶に影響しない遺伝子であるか、もしくは若齢ラットにおいてのみ学習によって発現量が増加する遺伝子である可能性が示唆された。Tnxa, Nnat ならびに S100a9 遺伝子は DNA microarray の結果と整合性を示し、経時的な発現が行動学的結果と一致していたことから、記憶に影響する遺伝子である可能性が示唆された。また、迷路課題前の抜歯群における S100a9 遺伝子の発現量が有意に少なかった点については空間認知能の減退の補償によるものと考えられ、咬合支持の有無による記憶の変化には S100a9 遺伝子が影響することが示唆された。

## 学位論文審査結果の要旨

海馬は記憶の符号化、強化で重要な役割を担っており、空間認知には海馬体が深く関わるということが知られている。咬合支持を回復することにより空間認知能の低下を抑制する可能性がある」と提唱されているが、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についてはいまだ検討されていない。本研究は、迷路課題実験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れら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を検討したものである。その結果、

- 1) DNA microarrayの結果から、迷路課題後の海馬においてTrhとTnxaが増加し、NnatとS100a9が減少することが示された。
- 2) Tnxa、NnatならびにS100a9遺伝子の迷路課題後の経時的発現動態はDNA microarrayの結果と整合性を示し、記憶に影響する遺伝子である可能性が示された。
- 3) Trh遺伝子は迷路課題後の経時的発現動態がDNA microarrayの結果と一致せず、若齢ラットの記憶に関連する可能性が示された。
- 4) 咬合支持の有無による学習能力の変化にはS100a9遺伝子が影響する可能性が示された。

これらの研究結果は、記憶と学習における海馬の機能を研究する上で重要な知識を提供すると考えられる。

上記の審査結果より、審査委員会は本論文に博士（歯学）の学位論文としての価値を認める。