

学位申請論文

APP ノックインマウスを用いた咬合支持の欠如による
アミロイドβ沈着の変化

村上 明日香

Changes in amyloid β deposition due to lack of occlusal support
in APP knock-in mice

Asuka MURAKAMI

(令和2年12月9日受付)

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 咬合・有床義歯補綴学分野

主任教授

皆木 省吾

緒言

近年、我が国は高齢者の増加により超高齢社会を迎えた。厚生労働省の発表によると、2012年には462万人であった認知症高齢者は2025年には700万人、65歳以上の高齢者の約5人に1人に達すると見込まれている¹⁾。アルツハイマー型認知症(以下、Alzheimer's Disease : AD)は最も多いタイプの重要な認知症であり、脳内のアミロイドβ(以下、Aβ)の凝集、蓄積により生じることが知られている。

歯科との関連では、咬合支持の欠如がADのリスクファクターの一つであることが疫学研究で報告されている²⁾。さらに残存歯数が多いほど認知機能の低下が少ないこと³⁾や、歯の喪失と高齢者の日常生活動作の間には関連性があること⁴⁾が報告されている。また、動物実験によっても、咀嚼回数の減少や咬合支持の喪失が認知学習機能の低下を引き起こすことが報告されてきた^{5,6,7)}。このように、咬合支持の欠如により認知機能が低下することは報告されているが、Aβが脳に沈着するかどうかは定かではない。

Ekuniらは、Wistar系ラットの歯冠を切除して咬合支持を欠如させると、認知機能が低下すると共に海馬のAβタンパク量が増加すると報告した⁶⁾。しかし、

健常なげっ歯類では A β の沈着が生じにくい⁸⁾ため、脳組織における A β の沈着は検討されていない。また、アミロイド前駆体タンパク質 (Amyloid precursor protein: APP) 過剰発現マウスを用いて咬合支持を欠如すると海馬における神経細胞数が減少するが、A β タンパク量の増加は認められなかったと報告されている⁹⁾。しかし、A β は APP から 2 種類のプロテアーゼが作用して形成されるため、APP 過剰発現マウスでは A β 以外にも余分な機能断片が過剰発現する。そのため記憶障害の他にも遺伝子発現抑制作用などが生じるだけでなく、A β 沈着状態は AD 患者との類似性が乏しいと言われている¹⁰⁾。これらのことから、咬合支持の欠如と A β の凝集・蓄積との関連性はいまだ明らかにされていない。

APP 過剰発現マウスでは AD 本来の病態を解明することはできないという問題を解消するために、総 A β 産生量を増加させる変異、凝集性の高い A β 42 の産生比率を増加させる変異、および A β の配列をヒト化させ凝集性を亢進させる変異を組み込み、AD の初期病変が誘導される APP ノックインマウスが理化学研究所で開発された。この APP ノックインマウスでは老人斑の沈着状況が AD 患者と類似しており¹⁰⁾、APP 過剰発現マウスでしばしば発生する突然死が生じないことから極めて有用な AD モデルマウスと考えられている。

本研究は、上顎臼歯を抜歯した APP ノックインマウスを対象として、迷路課題によって学習認知機能の変化、海馬における神経細胞数の変化および AB タンパク量、AB 沈着の変化について評価することを目的とした。

材料ならびに方法

1. 実験動物

C57BL/6-App^{tm3(NL-G-F)Tcs}>(以下, APP ノックインマウス)(理化学研究所バイオリソース研究センター, 茨木, 日本)雄性 5 週齢を 16 匹購入し, 実験に用いた。マウスはすべての上顎臼歯を抜歯した臼歯抜歯群(以下, 抜歯群)8 匹, 抜歯を行っていない対照群(以下, 対照群)8 匹の 2 群に無作為に振り分けた。マウスは 12 時間毎の明暗サイクルの飼育室内において, 硬性試料および水分を自由摂取できる環境で飼育した。

抜歯群は, 5 週齢時に 3 種混合麻酔薬 (ドルベネ 0.3mg/kg : 共立製薬株式会社, 東京, 日本, ミタゾラム 4mg/kg : サンド株式会社, 東京, 日本, ベトルファール 5mg/kg : Meiji Seika ファルマ株式会社, 東京, 日本) を用いた腹腔

内麻酔下において全ての上顎臼歯を抜歯し、対照群には麻酔のみの偽手術を行った。その後、覚醒薬(アチパメゾール 3mg/kg：共立製薬株式会社，東京，日本)を投与した。

なお，この実験は岡山大学動物実験管理委員会の指針に従い，同委員会の承諾を得て行った(OKU-2018629)。

2. モリス水迷路を用いた記憶学習能の評価

学習認知機能を評価するために行動学的テストとしてモリス水迷路を用いた。これは，高次機能の一つである空間認知機能の評価方法として一般的に用いられる方法である。抜歯後，マウスを4か月飼育した後，直径75 cmのプールを使用して7日間の訓練試行，および訓練試行が終了した2日後にプローブ試験を行った。訓練試行では直径7 cmの逃避台の位置を決め，水面から1.5 cmの水中に配置し(図1a)，マウスがプールに入れられてから逃避台を見つけるまでの時間(探索時間)を計測した¹¹⁾。一回の計測時間は最大60秒とし，1日4回，7日間の計測を行った。プローブ試験ではプールを4つの象限に分け，逃避台のあった象限をTarget-Quadrant (TQ)，他3象限をそれぞれAdjacent-Right (AR)，Adjacent-Left (AL)，Opposite-Platform (OP)とした(図

1b)。TQ より逃避台を取り外したのち、マウスをプールに入れ 60 秒間自由探索させ、4 象限それぞれに滞在した時間をビデオトラックにて測定した。

3. 血漿コルチコステロン濃度の測定

モリス水迷路のプロープ試験終了後、マウスに対して 3 種混合麻酔薬（抜歯時と同用量）の腹腔内投与による麻酔後、心臓より血液を採取した。採取した血液は EDTA 含有チューブに採取し、遠心分離 (1200×g, 20 分間) を行い、血漿を採取し、−80℃にて保存した。血漿コルチコステロン濃度の測定には YK240 Corticosterone EIA キット (矢内原研究所, 静岡, 日本), およびマイクロプレート用吸光度計 (グレーティングマイクロプレートリーダー SH-1000 (Lab) : コロナ電気株式会社, 茨木, 日本) を用いた。

4. ELISA による Aβ タンパク量の測定

血液を採取後、マウスを麻酔薬過剰投与により安楽死させ、脳組織を摘出した。矢状断方向に左半球と右半球に切断し、右半球は氷上にて海馬組織を採取し液体窒素にて急冷し、−80℃にて保存した。その後、海馬組織を 150mM NaCl とプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む 50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.6) を

加え、ホモジナイザー(バイオマッシャーII：株式会社ニッピ，東京，日本)を用いてホモジナイズした後， $200000\times g$ ， 4°C ，20分間遠心分離を行った。不溶性画分が含まれた沈殿物をプロテアーゼ阻害剤カクテル含有6 M グアニジン-HCl バッファーで超音波処理を行い，可溶化した後， $200000\times g$ ， 4°C ，20分間で遠心分離を行ったのち上清を採取した。採取した上清を12倍に希釈してグアニジン-HCl の濃度を0.5Mに調整した後，ELISAを用いてA β 40およびA β 42のタンパク量を測定した¹²⁾。A β 40はELISAキット(ヒト/ラット β アミロイド(40)ELISAキットワコー：富士フィルム和光純薬株式会社，大阪，日本)を用いて測定した。またA β 42はELISAキット(ヒト/ラット β アミロイド(42)ELISAキットワコー 高感度品：富士フィルム和光純薬株式会社)を用いて測定した。

5. 組織学的評価

左半球は組織固定のため，4%パラホルムアルデヒドに半日浸漬させ，通法に従ってパラフィン包埋し， $6\mu\text{m}$ の前頭断切片とした。

海馬における神経細胞数の計測を行うため，Nissl染色を行った。Nissl染色では0.1% Cresyl violet 液にて10分間染色し，光学顕微鏡を用いてCA1，

CA3, 齒状回(DG) 領域を観察した。観察範囲は縦 150 μm , 横 250 μm の範囲とし, 単位面積あたりに存在する神経細胞数を観察者により 3 回計測したのち平均値を算出し, 計測値とした。なお, 計測した神経細胞は, 細胞形態が円形で核小体が明瞭なものとし, CA1, CA3 領域では錐体細胞数, DG 領域では顆粒細胞数を計測した。

AB の免疫組織化学染色では, 抗原の賦活化のためギ酸処理(98%ギ酸 室温 5 分)を行った。内在性ペルオキシダーゼ不活性化のため 3%過酸化水素を用いた。ブロッキングには Protein Block Serum-Free(ダコ・ジャパン株式会社, カーピンテリア, アメリカ)を用いた。一次抗体反応には A β 40, A β 42 特異的な抗体 beta Amyloid Antibody (MOAB-2) (Novus Biologicals Canada, トロント, カナダ), 二次抗体反応には Dako Envision System-HRP (DAB) (ダコ・ジャパン株式会社)を用いて染色し, 海馬組織における A β 沈着面積を ImageJ により測定し, 海馬面積に対する沈着面積割合を算出した。

6. A β タンパク量と A β 沈着面積割合との相関関係の評価

ELISAによるAβ40とAβ42のタンパク量と免疫組織化学染色によるAβ沈着面積割合の関連についてSpearmanの順位相関を用いて、相関係数 ρ を求め相関関係を評価した。

7. 統計学的分析

モリス水迷路の群間比較、血漿コルチコステロン濃度、神経細胞数、Aβタンパク量、海馬におけるAβ沈着面積割合にはShapiro-Wilk検定にて正規性を検討しMann-WhitneyのU検定、プローブ試験の群内比較はFriedman検定およびSteelの検定を用いて評価した。統計学的有意差の検定にはExcel統計(株式会社 社内情報サービス, 東京, 日本)を用い、有意水準は5%とした。

結果

1. モリス水迷路を用いた記憶学習能の評価

訓練試行期間中、抜歯群ならびに対照群ともに経時的に探索時間は減少し、学習効果が認められた。訓練試行の3日目および4日目において、対照群と比

較して抜歯群では探索時間が有意に増加していた(図 2a)。プローブ試験において、対照群では AL, OP の滞在時間と比較して逃避台のあった TQ 滞在時間が有意に長時間であった。しかし、抜歯群では TQ と他の 3 象限との滞在時間の間に有意差がなかった。また、抜歯群の TQ 滞在時間が対照群と比較して有意に短かった ($p < 0.05$) (図 2b)。

2. 血漿コルチコステロン濃度の測定

対照群の値 (中央値[25%, 75%])は 209.4 [126.8, 221.1], 抜歯群 161.5 [144.3, 179.9]ng/ml であり, 両群間の血漿コルチコステロン濃度に有意な差は認めなかった(図 3)。

3. 海馬各領域における神経細胞密度の測定

CA1, CA3, DG 領域における対照群および抜歯群それぞれの神経細胞数は, CA1 では 52.5 [49.2, 56.0], 38.5 [31.0, 40.2], CA3 では 33.0 [27.7, 38.0], 15.5 [11.7, 21.5], および DG では 79.0 [72.7, 97.0], 50.0 [46.5, 54.7]であった。すべての領域において抜歯群の方が有意に低い値を示した ($p < 0.05$) (図 4a-d)。

4. ELISA による A β タンパク量の測定

A β 40 の値は対照群 2.0 [1.6, 2.5], 抜歯群 2.1 [2.0, 2.5], A β 42 は対照群 61.4 [33.7, 75.7], 抜歯群 46.6 [39.2, 56.3] pmol/g tissue であった。

A β 40, A β 42 とともに両群間に有意な差は認めなかった(図 5a, b)。

5. 免疫組織化学染色による A β 沈着面積割合の測定

海馬組織における A β 沈着面積割合は対照群 3.6[3.2, 4.0], 抜歯群 3.4[2.7, 3.7]%であり, 両群間において有意な差は認められなかった(図 6a, b)。

6. A β タンパク量と A β 沈着面積割合との相関関係の評価

横軸に A β タンパク量, 縦軸に A β 沈着面積割合としてすべての実験動物における両者の相関を示した(図 7)。A β 40+A β 42 タンパク量の増加に伴い A β 沈着面積割合は増加する傾向を示し, Spearman の相関係数を求めると $\rho=0.6746$ となり, 有意な相関関係を示した($p=0.003$)。

考察

残存歯数と認知機能との関連について、前向きコホート研究では4年以内に認知機能が低下する確率は、多数歯残存群(10本以上の残存)では11.5%であるのに対して少数歯残存群(9本以下の残存)は26.7%であり、多数歯残存群に対して少数歯残存群のオッズ比が3.31であった¹³⁾。また、義歯を使用していない少数歯残存群は20歯以上の残存群に対して1.85倍認知症の発症リスクが高いと報告されている¹⁴⁾。一方、動物実験では咬合支持の喪失に伴い記憶・学習能力が低下することが多数の研究で示されている^{3,6,15,16)}。このように、臨床研究と動物実験では認知機能の低下の程度には差があるが、咬合支持の喪失に伴い認知機能が低下する傾向があることはほぼ統一した見解である。

認知症のうちADの割合は60-70%¹⁷⁾を占めており、海馬へのAβの沈着および蓄積がAD発症の原因の一つと考えられている。認知機能低下患者におけるAβ沈着状態を電子放射断層撮影(Positron Emission Tomography : PET)を用いて検討した研究^{18,19)}では、Aβ沈着を認める患者では記憶力および認知機能が低下していることが示された²⁰⁾が、残存歯数あるいは咬合支持との関連を

含めて検討していなかった。このように、臨床において咬合支持の欠如と A β 沈着との関連性については解明されているとはいえない。ヒトを対象とした場合には、日常生活における様々な要因が認知機能の活性化に関与している可能性があり、実験条件を単純化するためには実験室で飼育されている動物実験で検討することが望ましい。げっ歯類では A β のアミノ酸配列がヒトとは異なり A β の凝集性を示さず、老齢期の 24 か月齢になっても A β が沈着しないことが知られている^{8,21)}。上顎臼歯の歯冠切除によって咬合支持を喪失させた野生型ラットの海馬では A β タンパク量が増加しているが、A β 沈着については観察されていない⁶⁾。また、APP 過剰発現マウスの上顎臼歯を抜歯した場合、海馬への A β の沈着、および A β タンパク量に変化がなかったと報告されている⁹⁾。このように、咬合支持の喪失と A β タンパク量の変化や A β 沈着との関連性については解明されているとはいえない。

今回使用した APP ノックインマウスは、AD 本来の病態を解明するための遺伝子をノックインした新しい実験モデルマウスである。4 か月齢から A β 斑が形成され、Y 字迷路を用いた学習認知機能の観察では 6 か月齢から学習認知機能が低下したため¹⁰⁾、本研究では 5 週齢で抜歯を行い、飼育期間を 4 か月として行動学的試験を行った。

血漿コルチコステロンは全脳組織における Aβ タンパク量を増加することが示されている²²⁾。歯冠切除後 2 か月飼育したラットでは、血漿コルチコステロン濃度が上昇し、学習認知機能の低下および脳内に Aβ タンパク量が増加した⁶⁾。これに対して、抜歯後 4 か月のマウスでは血漿コルチコステロン濃度は非抜歯と比べて有意差がなく、Aβ タンパク量も増加しなかったと報告されている⁹⁾。また、ラットでも抜歯後の飼育期間が長期間の場合には血漿コルチコステロン量は非抜歯と変わらないこと^{7,23)}が示されている。このように抜歯後比較的短期間(2 か月)では抜歯による咬合支持の欠如の影響を受けて血漿コルチコステロン濃度が増加するが、抜歯後長期間飼育された動物では咬合支持の欠如に対する生体が順応性を示して血漿コルチコステロン濃度が正常値まで低下しているものと推察される。本研究において血漿コルチコステロン濃度を計測したが、抜歯後 4 か月の飼育によって血漿コルチコステロン濃度の増加は認められなかった。抜歯による侵襲で生じる慢性ストレスは、4 か月という長期飼育により、測定時には抜歯窩の上皮化も終了していることで軽減され、この時期の血漿コルチコステロン濃度に与える影響は少ないと考えられる。この結果は、以前のマウスで示された結果⁹⁾と同様である。

抜歯による咬合支持の欠如^{7,9)}や、軟性飼料を与え咀嚼回数が減少すること⁵⁾で、神経細胞脱落により学習認知機能が低下する。また、DG領域での神経新生はCA1およびCA3領域にニューロンを供給する⁵⁾。さらに、咀嚼求心性刺激の減少によりDG領域の神経細胞が減少し学習認知機能が低下すること⁵⁾が過去の研究で示されている。本研究においても、海馬のCA1, CA3ならびにDG領域における神経細胞数が減少し学習認知機能が低下していることから、咀嚼求心性刺激の減少により海馬神経細胞数の減少および学習認知機能低下が引き起こされたという可能性が考えられる。

本研究では、抜歯群における海馬内のAβ40とAβ42のタンパク量は対照群と比較して有意な差は認められなかった。正常な野生型マウスではAβ42よりもAβ40の方が多¹⁰⁾が、本研究ではAβ40に比べてAβ42の方が多^いのは凝集性の高いAβ42の産生比率を増加させる遺伝子が導入されているためと考えられる。脳内のAβタンパク量はAβ沈着に影響^{24, 25)}し、特にAβ42はAβ40に比べてAβ沈着を増強してAD発症に影響を与える²⁶⁾と考えられているが、本研究ではAβ沈着に抜歯の影響は認められなかった。本研究で認められたAβ40+Aβ42タンパク量と沈着面積割合との間の正の相関は、脳内Aβの動態を適切に

とらえているものと考えられる。このような脳内 Aβ の動態からも、Aβ 沈着に対する抜歯の影響は少ないと考えられる。

AD の病態として、Aβ 沈着による神経細胞脱落から認知機能低下が生じるというアミロイド仮説が有力である²⁷⁾。一方で、タウ変性を中心とするタウ仮説等、他の経路が関与する可能性について報告²⁸⁾されている。本研究では、咬合支持の欠如によって神経細胞の脱落は生じたが、Aβ 沈着には変化が見られなかった。このことから、咬合支持の欠如に起因する認知機能の低下は、Aβ 沈着ではなく咬合支持の欠如による咀嚼求心性刺激の減少や、タウ仮説等の他経路が働き生じた可能性が考えられるが、このメカニズムの詳細については今後検討していく必要がある。

結論

本研究では、AD 患者病態を適切に反映することが可能な APP ノックインマウスを用いて、上顎臼歯を抜歯することで咬合支持を欠如させ、モリス水迷路試験により学習認知機能を評価し、海馬における神経細胞数、Aβ タンパク量

および Aβ 沈着を観察した。その結果，咬合支持の欠如によって海馬神経細胞数の減少および学習認知機能の低下を生じるが，海馬内の Aβ タンパク量，Aβ 沈着が変化しないことが示され，咬合支持の欠如によって Aβ の沈着を伴うことなく学習認知機能が低下する可能性が示唆された。

謝辞

本論文を作成するにあたり，温かい御指導と激励を賜りました岡山大学大学院医歯薬総合研究科咬合・有床義歯補綴学分野の皆木省吾教授に深く御礼申し上げます。また，本研究を遂行するにあたり，終始懇切なる御指導を頂きました岡山大学大学院医歯薬総合研究科咬合・有床義歯補綴学分野の原哲也准教授に心より感謝申し上げます。最後に，本研究を行うにあたり御助言，御協力いただきました岡山大学大学院医歯薬総合研究科咬合・有床義歯補綴学分野ならびに岡山大学病院咬合・義歯補綴科の諸先生方に謹んで感謝の意を表します。

参考文献

- 1) 厚生労働省． 認知症施策推進総合戦略（新オレンジプラン）
https://www.mhlw.go.jp/file/06-Seisakujouhou-12300000-Roukenkyoku/nop1-2_3.pdf (accessed 2020.12.1)
- 2) Kondo K, Niino M, Shido K. A case-control study of Alzheimer's disease in Japan--significance of life-styles. *Dementia* **5**: 314-326, 1994.
- 3) Takata Y, Ansai T, Soh I, Sonoki K, Awano S, Hamasaki T, Yoshida A, Ohsumi T, Toyoshima K, Nishihara T, Takehara T. Cognitive function and number of teeth in a community-dwelling elderly population without dementia. *J Oral Rehabil* **36**: 808-813, 2009.
- 4) Okamoto N, Morikawa M, Okamoto K, Habu N, Hazaki K, Harano A, Iwamoto J, Tomioka K, Saeki K, Kurumatani N. Tooth loss is associated with mild memory impairment in the elderly: The Fujiwara-kyo Study. *Brain Res* **1349**: 68-75, 2010.
- 5) Fukushima-Nakayama Y, Ono T, Hayashi M, Inoue M, Wake H, Ono T, Nakashima T. Reduced mastication impairs memory function. *J Dent Res* **96**: 1058-1066, 2017.

- 6) Ekuni D, Tomofuji T, Irie K, Azuma T, Endo Y, Kasuyama K, Morita M.
Occlusal disharmony increases amyloid- β in the rat hippocampus.
NeuroMolecular Med **13**: 197-203, 2011.
- 7) Sakamoto S, Hara T, Kurozumi A, Oka M, Kuroda-Ishimine C, Araki D,
Iida S, Minagi S. Effect of occlusal rehabilitation on spatial memory and
hippocampal neurons after long-term loss of molars in rats. *J Oral Rehabil*
41: 715-722, 2014.
- 8) Götz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and
frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* **9**: 532-544, 2008.
- 9) Oue H, Miyamoto Y, Okada S, Koretake K, Jung Cha-Gyun, Michikawa M,
Akagawa Y. Tooth loss induces memory impairment and neuronal cell loss
in APP transgenic mice. *Behav Brain Res* **252**: 318-325, 2013.
- 10) Saito T, Matsuba Y, Mihira N, Takano J, Nilsson P, Itohara S, Iwata N,
Saido TC, Shigeyoshi Itohara. Single app knock-in mouse models of
Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* **17**: 661-663, 2014.
- 11) Zhang Y, Chao FL, Zhang L, Jiang L, Zhou CN, Chen LM, Lu W, Jiang R,
Tang Y. Quantitative study of the capillaries within the white matter of

- the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *Brain Behav* **9**: e01268, 2019. doi:10.1002/brb3.1268.
- 12) Iwata N, Mizukami H, Shirotani K, Takaki Y, Muramatsu S, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Ozawa K, Saido TC. Presynaptic localization of neprilysin contributes to efficient clearance of amyloid-beta peptide in mouse brain. *J Neurosci* **24**: 991-998, 2004.
- 13) Saito S, Ohi T, Murakami T, Komiyama T, Miyoshi Y, Endo K, Satoh M, Asayama K, Inoue R, Kikuya M, Metoki H, Imai Y, Ohkubo T, Hattori Y. Association between tooth loss and cognitive impairment in community-dwelling older Japanese adults: A 4-year prospective cohort study from the Ohasama study. *BMC Oral Health* **18**: 142, 2018.
- 14) Yamamoto T, Kondo K, Hirai H, Nakade M, Aida J, Hirata Y. Association between self-reported dental health status and onset of dementia: a 4-year prospective cohort study of older Japanese adults from the Aichi Gerontological Evaluation Study (AGES) Project. *Psychosom Med* **74**: 241-248, 2012.

- 15) Onozuka M, Watanabe K, Mirbod SM, Ozono S, Nishiyama K, Karasawa N, Nagatsu I. Reduced mastication stimulates impairment of spatial memory and degeneration of hippocampal neurons in aged SAMP8 mice. *Brain Res* **826**: 148-153, 1999.
- 16) Onozuka M, Watanabe K, Fujita M, Tomida M, Ozono S. Changes in the septohippocampal cholinergic system following removal of molar teeth in the aged SAMP8 mouse. *Behav Brain Res* **133**: 197-204, 2002.
- 17) World Health Organization. Dementia. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dementia> (accessed 2021.1.29)
- 18) Jansen WJ, Ossenkuppele R, Tijms BM, Fagan AM, Hansson O, Klunk WE, Flier WM, Villemagne VL, Frisoni GB, Fleisher AS, Lleó A, Mintun MA, Wallin A, Engelborghs S, Na DL, Chételat G, Molinuevo JL, Landau SM, Mattsson N, Kornhuber J, Sabri O, Rowe CC, Parnetti L, Popp J, Fladby T, Jagust WJ, Aalten P, Lee DY, Vandenberghe R, Oliveira CR, Kapaki E, Froelich L, Ivanoiu A, Gabryelewicz T, Verbeek MM, Sanchez-Juan P, Hildebrandt H, Camus V, Zboch M, Brooks DJ, Drzezga A, Rinne JO, Newberg A, Mendonça A, Sarazin M, Rabinovici GD, Madsen K,

Kramberger MG, Nordberg A, Mok V, Mroczko B, Wolk DA, Meyer PT, Tsolaki M, Scheltens P, Verhey FRJ, Visser PJ, Aarsland D, Alcolea D, Alexander M, Almdahl IS, Arnold SE, Baldeiras I, Barthel H, Berckel BNM, Blennow K, Buchem MA, Cavedo E, Chen K, Chipi E, Cohen AD, Förster S, Fortea J, Frederiksen KS, Freund-Levi Y, Gkatzima O, Gordon MF, Grimmer T, Hampel H, Hausner L, Hellwig S, Herukka SK, Johannsen P, Klimkiewicz-Mrowiec A, Köhler S, Koglin N, Laere K, Leon M, Lisetti V, Maier W, Marcusson J, Meulenbroek O, Møllergård HM, Morris JC, Nordlund A, Novak GP, Paraskevas GP, Perera G, Peters O, Ramakers IHGB, Rami L, Rodríguez-Rodríguez E, Roe CM, Rot U, Rütger E, Santana I, Schröder J, Seo SW, Soininen H, Spuru L, Stomrud E, Struyfs H, Teunissen CE, Vos SJB, Doorn LJCW, Waldemar G, Wallin AK, Wiltfang J, Zetterberg H. Association of cerebral amyloid- β aggregation with cognitive functioning in persons without dementia. *JAMA Psychiatry* **75**: 84-95, 2018.

- 19) Sperling RA, Mormino EC, Schultz AP, Betensky RA, Papp KV, Amariglio RE, Hanseeuw BJ, Buckley R, Chhatwal J, Hedden T, Marshall GA,

- Quiroz YT, Donovan NJ, Jackson J, Gatchel JR, Rabin JS, Jacobs H, Yang HS, Properzi M, Kirn DR, Rentz DM, Johnson KA. The impact of A β and tau on prospective cognitive decline in older individuals. *Ann Neurol* **85**: 181-193, 2019.
- 20) Liu K, Solano I, Mann D, Lemere C, Mercken M, Trojanowski JQ, Lee VMY. Characterization of abeta11-40/42 peptide deposition in Alzheimer's disease and young Down's syndrome brains: implication of N-terminally truncated Abeta species in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* **112**: 163-174, 2006.
- 21) Maeda J, Ji Bin, Irie T, Tomiyama T, Maruyama M, Okauchi T, Staufenbiel M, Iwata N, Ono M, Saido TC, Suzuki K, Mori H, Higuchi M, Suhara T. Longitudinal, quantitative assessment of amyloid, neuroinflammation, and anti-amyloid treatment in a living mouse model of Alzheimer's disease enabled by positron emission tomography. *J Neurosci* **27**: 10957-10968, 2007.

- 22) Green KN, Billings LM, Roozendaal B, McGaugh JL, LaFerla FM. Glucocorticoids increase amyloid-beta and tau pathology in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* **26**: 9047-9056, 2006.
- 23) Iida S, Hara T, Araki D, Ishimine-Kuroda C, Kurozumi A, Sakamoto S, Miyazaki T, Minagi S. Memory-related gene expression profile of the male rat hippocampus induced by teeth extraction and occlusal support recovery. *Arch Oral Biol* **59**: 133-41, 2014.
- 24) Masters CL, Selkoe DJ. Biochemistry of amyloid β -protein and amyloid deposits in Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: a006262, 2012.
- 25) Gowing E, Roher AE, Woods AS, Cotter RJ, Chaney M, Little SP, Ball MJ. Chemical characterization of A beta 17-42 peptide, a component of diffuse amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Biol Chem* **269**: 10987-10990, 1994.
- 26) Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation:

implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* **32**: 4693-4697, 1993.

27) Kametani F, Hasegawa M. Reconsideration of amyloid hypothesis and tau hypothesis in Alzheimer's disease. *Front Neurosci* **12**: 25, 2018.

28) Mohandas E, Rajmohan V, Raghunath B. Neurobiology of Alzheimer's disease. *Indian J Psychiatry* **51**: 55-61, 2009.

表題脚注

岡山大学大学院医歯薬総合研究科 機能再生・再建科学専攻 口腔・顎・顔面
機能再生制御学講座 咬合・有床義歯補綴学分野(主任：皆木省吾教授)

本論文の一部は、第129回日本補綴歯科学会学術大会(2020年6月、福岡)において発表した。

図表の説明

図1 モリス水迷路

(a) 訓練試行

直径 7 cm の逃避台の位置を決め、水面から 1.5 cm の水中に配置した。

マウスがプールに入れられてから逃避台を見つけるまでの時間(探索時間)を計測した。

(b) プローブ試験

プールを 4 つの象限に分け、逃避台のあった象限を Target-Quadrant (TQ), Adjacent-Right (AR), Adjacent-Left (AL), Opposite-Platform (OP) とした。TQ より逃避台を取り外したのち、マウスをプールに入れ 60 秒間自由探索させ、各象限滞在時間を測定した。

図2 モリス水迷路による行動解析

(a) 訓練試行における探索時間 (秒) を示す。以後、箱ひげ図における見方を右上に示す。(n=8, Mann-Whitney の U 検定, *: $p < 0.05$)

(b) プローブ試験における各象限での滞在時間 (%) を示す。(n=8, Steel の検定, *: $p < 0.05$)

図 3 血漿コルチコステロン濃度の測定

手術 4 か月後の対照群、抜歯群の血漿コルチコステロン濃度を示す。 (n=8, Mann-Whitney の U 検定, $p > 0.1$)

図 4 Nissl 染色による海馬神経細胞数の計測

(a) 海馬各領域の神経細胞の Nissl 染色による染色像の一例を示す。

(b-d) 海馬各領域における神経細胞数を示す。 (n=8, Mann-Whitney の U 検定, *: $p < 0.05$)

図 5 海馬における A β タンパク量の測定

(a) 海馬 A β 40 タンパク量を示す。 (n=8, Mann-Whitney の U 検定, $p > 0.05$)

(b) 海馬 A β 42 タンパク量を示す。 (n=8, Mann-Whitney の U 検定, $p > 0.1$)

図 6 免疫組織化学染色による A β 沈着の解析

(a) マウス海馬 (5 か月齢) での免疫組織化学染色による A β 沈着の染色像の一例を示す。抜歯群, 対照群ともに A β 沈着 (矢印) が認められた。

(b) 海馬における A β 沈着面積割合 (%) を示す。抜歯群, 対照群ともに有意差は認められなかった。 (n=8, Mann-Whitney の U 検定, $p > 0.1$)

図 7 A β タンパク量と A β 沈着面積割合における Spearman の相関関係分析

横軸は AB タンパク量を示し，縦軸は AB 沈着面積割合を示す。AB 沈着面積割合は，AB タンパク量の増加に伴い増加する傾向を認め，相関関係係数 $\rho=0.6746$ であり有意な相関を示した。(p=0.003)