

指導教授氏名	指導役割
皆木 省吾 印	実験計画の立案, 実験および論文の指導
印	
印	

## 学 位 論 文 要 旨

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科

専攻分野 咬合・有床義歯 補綴学分野	身分 大学院生	氏名 村上 明日香
論文題名 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		
<p><b>【緒言】</b></p> <p>アミロイドβ（以下、Aβ）沈着によるアミロイド班の形成がアルツハイマー型認知症（以下、AD）の初期病変であると考えられている。動物実験では咬合支持の欠如と海馬神経細胞脱落の関連が報告され、咬合支持の欠如が認知症発症の疫学的危険因子であると考えられている。しかし、咬合支持の欠如と海馬におけるAβタンパク量の変化やAβ沈着との関連については統一した見解が得られていない。これは健常なげっ歯類ではAβが沈着しにくいことや、ADモデルマウスとして頻用されるアミロイド前駆体タンパク質（amyloid-beta precursor protein: APP）過剰発現マウスではAβ以外に過剰な断片が産生されてAβ沈着状態がAD患者と近似しないといった実験動物の選択に大きな問題があるためと考えられる。そこでその問題を解決するため理化学研究所によりAPP遺伝子領域に複数の家族性遺伝子をノックインしたAD患者病態との類似性を示すAPPノックインマウスが作製された。</p> <p>本研究は上顎臼歯を抜歯したAPPノックインマウスを用いて、咬合支持の欠如により認知機能が低下するかどうか、海馬の神経細胞数が減少するかどうか、および咬合支持の欠如によりAβ沈着が増加するかどうかについて検討を行った。</p> <p><b>【材料ならびに方法】</b></p> <p>実験動物にはC57BL/6-App&lt;tm3(NL-G-F)Tcs&gt;（APPノックインマウス）雄性5週齢を16匹購入して実験に用いた。マウスはすべての上顎臼歯を抜歯した臼歯抜歯群（抜歯群）8匹、抜歯を行っていない対照群（対照群）8匹の2群に無作為に振り分けた。マウスを4か月飼育した後、認知機能を評価するためモリス水迷路を行った。直径75cmのプールを使用して訓練試行およびプローブ試験を行った。訓練試行では水面下1.5cmに直径7cmの逃避台を配置し、逃避台を見つけるまでの時間（探索時間）を計測した。1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) とし、4象限それぞれでの滞在時間を測定した。モリス水迷路終了後、血液を採取し、慢性ストレスマーカーである血漿コルチコステロン濃度を測定した。</p>		

脳組織のうち右半球から海馬組織を採取し、ホモジナイズしたのち遠心分離した。不溶性画分の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にて可溶化し、遠心分離して得られた上清を 12 倍に希釈してグアニジン HCl 濃度を 0.5 M に調整し、ELISA 法によって A $\beta$ 40 および A $\beta$ 42 のタンパク量を測定した。

左半球はパラフィン包埋を行い、Nissl 染色を施して CA1 と CA3 では錐体細胞、DG では顆粒細胞を対象として単位面積あたりの細胞数を計測した。免疫組織化学染色では A $\beta$  プラークを染色し、ImageJ にて A $\beta$  沈着面積を測定したのち、海馬面積に対する A $\beta$  沈着面積割合を算出した。

ELISA 法による A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 のタンパク量と免疫組織化学染色による A $\beta$  沈着面積との関連について Spearman の順位相関を用いて相関係数  $\rho$  を求めて相関関係を評価した。

統計学的解析として群間比較は Shapiro-Wilk 検定により正規性を検討した後、Mann-Whitney の U 検定を用いて評価した。群内比較は Friedman 検定および Steel の検定を用いて評価した。本実験は岡山大学動物実験委員会の承認を得て行った (OKU-2018629)。

### 【結果と考察】

迷路試験における探索時間では、3 日目と 4 日目において対照群よりも抜歯群の方が有意に長く、プローブ試験では、TQ 滞在時間は、対照群と比較して抜歯群の方が有意に短かったことから、対照群と比較して抜歯群では認知機能が低下していることが示された。また慢性ストレスマーカーである血漿コルチコステロン濃度の上昇によって A $\beta$  タンパク量が増加するという研究があるが、本研究では血漿コルチコステロン濃度に有意差がなかったことから、本研究の結果には血漿コルチコステロン濃度は影響していないと考えられる。海馬神経細胞数は対照群と比較して抜歯群で有意に減少しており、従来の研究と同様に咬合支持の欠如によって認知機能の低下と共に海馬における神経細胞数の減少が認められた。しかし、海馬の A $\beta$  沈着面積と A $\beta$ 40 および A $\beta$ 42 のタンパク量は 2 群間で有意差が認められなかった。A $\beta$ 40 と A $\beta$ 42 のタンパク量と沈着面積との間に正の相関が認められたことから、本研究結果は脳内 A $\beta$  動態を適切にとらえており、A $\beta$  沈着に対する咬合支持の欠如による影響は少ないと考えられた。これらのことから、咬合支持の欠如による認知機能の低下には A $\beta$  が関与しない可能性が示唆された。

### 【結論】

本研究結果から、AD モデルの APP ノックインマウスにおいて、咬合支持の欠如によって、認知機能の低下、海馬の神経細胞数の減少、および海馬の A $\beta$  沈着の不変が認められた。その結果、咬合支持の欠如によって AD の原因といわれている A $\beta$  沈着を伴うことなく認知機能が低下することが示唆された。