

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 八木澤由佳(栃木県)
博士の専攻分野 博士(歯学)
学位記番号 甲第509号
学位授与年月日 令和2年3月31日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科
(博士課程) 歯学専攻
学位論文題目 実験的咬合異常がマウスの心機能に及ぼす影響について
循環制御 第41巻 第1号 38頁~45頁掲載 2020年5月20日発行
論文審査委員 主査 教授 河原 博
副査 教授 奥村 敏 副査 教授 友成 博

内容の要旨

【緒言】

咬合異常に苦しむ患者は、首や肩のこわばりなどの身体的異常に加えて心理的にも慢性的なストレスに苦しんでいる。咬合異常に関するこれまでの報告から、咬合異常が交感神経活動の活性化と副交感神経活動の低下を伴う慢性ストレスを引き起こす可能性があることを示唆している。うつ病や不安などの心理的ストレスを含んだ慢性ストレスは、心血管疾患の発生率増加に関連していることが疫学研究から示唆されているが、咬合異常と心血管疾患の分子レベルでのメカニズムに関する研究は不十分である。

本研究では、我々が独自に開発した咬合異常マウスモデルを用いて、咬合異常がマウスの心筋に及ぼす影響を分子レベルで明らかにすることである。

【材料と方法】

12週齢雄性のマウス(C57BL/6)をControl群、マウスの下顎切歯にレジンを装着し、実験的に咬合障害を生じさせた咬合異常群(Bite-opening; BO群)に分けた。2週間の実験期間を通して、マウスの体重を計測した。

BO処置が心機能に与える影響を調べるため心エコーを用いて心機能測定を行った。

生理学実験終了後心臓を摘出後、重量を測定し、心筋凍結切片を作成した。BO処置が心筋の組織学的構造に与える影響を調べるためヘマトキシリン-エオジン染色を行った。また心臓線維化に与える影響を調べるため、マッソン-トリクロム染色を行い、線維化領域を定量評価した。

BO処置がシグナル伝達系に与える影響を調べるため心筋組織を用いてウェスタンブロットティングを行った。一次抗体は calmodulin kinase II (CaMKII), phospho-CaMKII, Bax, Bcl-2, GAPDH, phospho-phospholamban (PLN) (Ser-16; Thr-17), PLN, phospho-extracellular Signal-regulated Kinase (ERK), ERK を用いた。ホースラディッシュペルオキシド結合抗ウサギまたは抗マウス IgG を二次抗体として使用した。

BO処置が心筋細胞の酸化ストレスに与える影響を 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) の免疫染色によって評価した。

【結果および考察】

BO処置が体重に及ぼす影響についてコントロール群とBO群で、BO処置前、BO処置1週間後、BO処置2週間後の各群のマウスの体重を測定した。その結果BO処置前に比べてBO群は、体重の減少を示したが、その後徐々に体重は増加した。

BO処置2週間後に心エコーを用いて、心筋収縮能(左室駆出分画(ejection fraction; EF); 左室内径短縮率(%fractional shortening; FS)を測定した。その結果BO群では、コントロール群に比較してEFならびにFSとも有意に低値を示した。

なおイソフルレン (1.0-1.5% v/v) 吸入麻酔下での心拍数はコントロール群と BO 群で有意差はなかった。

以上の結果より BO 処置 2 週間後では、コントロール群に比較して BO 群では心機能が低値を示すことが確認された。

心機能測定後、心臓を摘出して心重量を測定した。その結果心重量ならびに心重量 / 脛骨比のいずれもコントロール群と BO 群で有意差はなかった。

以上の結果より BO 処置は心重量には影響を与えないことが確認された。

BO 処置が心筋の組織学的構造に及ぼす影響を検討するため、ヘマトキシリン-エオジン染色を行った。その結果 BO 群では細胞の間に、心臓線維芽細胞の浸潤が増加していることを示す所見が観察された。

そこでマッソン-トリクローム染色を行い、心筋組織断面積あたりの線維化領域の割合を定量評価した。その結果、BO 群ではコントロール群に比較して、線維化領域が有意に高値を示した。

以上の結果より BO 処置は心筋線維化を誘導することが確認された。

アポトーシス促進タンパクである Bax とアポトーシス抑制タンパクである Bcl-2 の発現比を測定した。その結果 BO 群ではコントロール群に比較して Bax / Bcl-2 比が有意に高値を示した。

ERK のリン酸化 (活性化) は心筋線維化を誘導することが報告されている。そこでコントロール群と BO 群の ERK のリン酸化を比較検討した。その結果、BO 群ではコントロール群に比較して ERK のリン酸化が有意に高値を示した。

CaMKII の持続的な活性化 (リン酸化) は心不全を促進することが報告されているが、BO マウスの心筋で phospho-CaMKII の量が顕著に増加していた。

phospho-PLN (Thr-17) および phospho-PLN (Ser-16) は、BO マウスの心筋で有意に増加していた。

8-OHdG 陽性細胞の比率は BO 群で有意に増加した。これらの結果は、BO 処置が酸化ストレス誘発性の心筋障害を増加させ、それが BO マウスの心機能不全の一因になる可能性があることを示している。

【考 察】

本研究では、咬合異常が心機能に及ぼす影響について、咬合異常マウスモデルを用いて生理学的、組織学的、分子生物学・生化学的な手法を用いて検討した。

咬合異常マウスではコントロール群に比較して心機能の低下を示すとともに、線維化領域と心筋細胞への酸化ストレスの増加が観察された。以上のメカニズムを解明するため、心筋組織内のシグナル伝達系を調べた。その結果、咬合異常マウスでは β アドレナリン受容体シグナルの下流に存在する protein kinase A (PKA) や CaMKII のシグナル伝達系の活性化観察された。

PKA や CaMKII のシグナル伝達系の活性化は、リアノジン受容体の過度のリン酸化によるカルシウム (Ca^{2+}) の漏洩も引き起こす。その結果 PLN のリン酸化増加に伴い活性化した Sarcoendoplasmic reticulum calcium transport ATPase 2a (SERCA2a) による筋小胞体への Ca^{2+} 取込では不十分になり、咬合異常マウスの心筋細胞内では Ca^{2+} の過負荷が生じると考えられる。心筋細胞内の Ca^{2+} 過負荷はミトコンドリアにも影響し、酸化ストレスの亢進やアポトーシスを誘導する。その結果、心筋細胞の脱落箇所への線維芽細胞の浸潤が心筋組織で起こったと示唆される。

【結 論】

咬合異常は、 β アドレナリン受容体の下流に存在する PKA や CaMKII の活性化と心筋細胞内に存在する筋小胞体の Ca^{2+} 制御機構の異常を引き起こす。その結果、心筋細胞の脱落と置換性の線維化、心筋収縮能の低下が誘導されることが示唆された。

審査の結果の要旨

咬合異常が交感神経活動の活性化を伴う慢性ストレスを引き起こし、また、疫学的研究から慢性ストレスが心血管疾患の発生率増加に関連していることが報告されている。本研究は、咬合異常動物モデルを作成し、咬合異常が心機能にどのように影響を及ぼすのかを調べることを目的とした。

12 週齢雄性マウスを用い、咬合異常 (以下 BO) モデルを作成し、BO を 2 週間負荷した後、心エコーによる左室駆出率と左室内径短縮率を測定した。次に、心臓を摘出して、心筋のヘマトキシリン-エオジン染色とマッソン-トリクローム染色を行い、さらに、 β アドレナリン受容体シグナル伝達系への BO の影響を調べるため、アポトーシス促進タンパク Bax と抑制タンパク Bcl-2 の心筋発現比、phospho-extracellular signal-regulated kinase (以下 ERK)、calmodulin kinase II (以下 CaMKII)、心筋収縮を調節するタンパクである phospholamban の protein kinase A によってリン酸化される部位である Ser-16 と、CaMKII によってリン酸化される部位である Thr-17 のリン酸化測定を行った。さらに、心筋細胞の酸化ストレ

スを 8-OHdG 染色により検討した。

その結果、左室駆出率と左室内径短縮率が BO により低下し心機能が低下していること、BO により細胞間隙への心臓線維芽細胞浸潤が増加し、心筋の繊維化が誘導されていることを見出した。さらに、 β アドレナリン受容体シグナル伝達系に関しては、BO により Bax/Bcl-2 心筋発現比が高くなること、同じく BO により ERK, CaMKII, Ser-16, Thr-17 のリン酸化が高くなることを見出した。また、BO により心筋細胞の酸化ストレスが誘導されることも見出した。

以上から、咬合異常は、交感神経活動の活性化に伴う β アドレナリン受容体シグナル伝達系の活性化により心臓リモデリングを誘導して心機能を低下させることが示唆された。

本研究は、咬合異常の心機能への影響を分子レベルで明らかとし、咬合異常が心疾患を発生させる可能性を見出した。よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。