

平成 22 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19592266  
 研究課題名（和文）非咬合モデル動物を用いた、咬合状態が舌、咀嚼筋の特性に及ぼす影響の検討  
 研究課題名（英文）A study of the influence of occlusal activity on the characteristics of tongue and masticatory muscles using non-occlusal model animal  
 研究代表者  
 石川 千恵子（ISHIKAWA CHIEKO）  
 鶴見大学・歯学部・助教  
 研究者番号：70176163

研究成果の概要（和文）：すべての歯が放出しない小眼球症マウスをモデル動物として用いて、咬筋の神経筋接合部のニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR)除去の正常な進行のためには咬合運動が重要な役割を果たしていること、咬筋の nAChR 転換の正常な進行に咬合運動が与える影響は殆どないこと、および咬合に関与する筋の間でもシナプス形成に咬合運動が与える影響は異なっていることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：The present study attempted to elucidate the contribution of occlusal activity to synaptogenesis in masticatory muscles. In the masseter of the mi/mi, the nAChR elimination initiated, but did not progress normally after 3 weeks of age, when the occlusal activity emerged in the +/+ mouse, whereas the nAChR switch progressed normally during the entire period of synaptogenesis. The mRNA expression patterns of nAChR subunits in the temporalis and digastric of the mi/mi differed from those in its masseter. These findings suggest that, in the masseter, occlusal activity is essential for the completion of nAChR elimination, but not for the nAChR switch, and that the contribution of occlusal activity to synaptogenesis varies among the masticatory muscles.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴理工系歯学

キーワード：小眼球症マウス、咬合、シナプス形成、AChR 転換、AChR 除去、mitf

## 1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え、誤嚥による事故が大きな社会問題になっている。誤嚥の原因の一つとして、舌筋や咀嚼筋の筋力低下が考えられる。

この高齢者における筋力の低下の大きな原因の一つとして、齶蝕や歯周病による歯の喪失により非咬合状態になることが挙げられる。非咬合状態におかれた咀嚼筋と性質の変

化を調べるために、我々は、マウスに与える飼料を固形から液状に転換する実験を行い、収縮蛋白質の一種であるミオシンの発現変化 (Saito et al., *Archs Oral Biol Archs oral Biol.* 47:109-115, 2002)、インスリン様増殖因子 I (Insulin-like growth factor) の発現変化 (Urushiyama et al., *Cell Tissue Res* 315:97-105, 2004) が起こることをすでに報告している。しかし、飼料を転換する実験は、咬合を完全に除くことができず、再現性に乏しいという欠点がある。

そこで本研究において、我々は歯が萌出しない小眼球症マウスをモデル動物として用いて、非咬合状態が咀嚼筋の性質に与える影響の検討を行う。小眼球症マウスは MITF (microphthalmia-associated transcription factor) 遺伝子に異常もつ自然発症突然変異マウスである。MITF はベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 構造をもつ転写調節因子で、色素細胞、肥満細胞、破骨細胞などの発生に非常に重要な役割を果たしていることが知られている。我々の使用する小眼球症マウスは MITF 遺伝子 bHLH 構造中のアルギニンが欠失しているため DNA 結合能を持たない MITF が発現している突然変異である。このマウスは小眼球症以外に難聴、色素異常によるアルビノ、大理石骨症などの異常が報告されている。破骨細胞が正常に発生しないため、上、下顎のすべての歯が萌出していない。よってこのマウスをモデル系として用いることにより、非咬合状態が咀嚼筋の性質に及ぼす影響を明らかにすることが可能である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、小眼球症マウスをモデル動物として用いて非咬合状態が咀嚼筋の性質に及ぼす影響を明らかにする。さらにこのマウスに義歯を装着し、義歯の装着が咀嚼筋の性質をどの程度回復させるかを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

(1) MITF 遺伝子突然変異自体の骨格筋への影響を調べるため、腓腹筋、ヒラメ筋の性質を調べ小眼球症マウスと野生型マウスを比較する実験をおこなった。

① 1、2、3、4、8 週齢の小眼球症マウス (mi/mi) および野生型マウス (+/+) を殺し腓腹筋、ヒラメ筋などを摘出し RNA、蛋白質を分離する。また組織学用に 4%パラホルムアルデヒド、ブアンで固定した。

② Real-time PCR 法を用いて、これらの筋におけるニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) のサブユニットの mRNA 発現量を測定した。

③ 免疫組織化学的方法を用いて、筋組織内で

の nAChR のサブユニットの分布を明らかにした。

④ ディファレンシャル二次元電気泳動法を用いて、これらの筋におけるプロテオーム解析を行い可能な限り多数の蛋白質の発現を調べた。

(2) 咬筋、顎二腹筋、側頭筋など咀嚼筋と舌筋の性質を調べ小眼球症マウスと野生型マウスを比較する実験を行った。

(1)、(2) の実験で得られた結果を小眼球症マウスと野生型マウスの間で比較した。

## 4. 研究成果

本研究において、mi/mi の咬筋では、生後 nAChR の除去は開始されたが 2~3 週齢で正常に進行しなくなり、8 週齢でも筋線維全体に多くの胎仔型の nAChR の発現が認められた。この 2~3 週齢という時期は+/+において咬合運動が開始される時期と一致している。mitf 遺伝子は骨格筋、心臓や肥満細胞を含む様々な組織で発現することも知られている。しかし mi/mi や mitf 遺伝子欠失マウスで骨格筋の発育、成長に異常をきたすという報告はなされていない。本研究では、mitf 遺伝子突然変異自体が nAChR サブユニットの発現に影響を与えていないか確認のために、腓腹筋と前脛骨筋を対照として用いたが、nAChR の mRNA 発現量や分布に有意な差は認められなかった。さらに、筋線維数、二次元電気泳動による筋組織のプロテオーム解析においても顕著な差は認められなかった。(データは示さず。) これらの結果から、咬筋の生後の正常な nAChR の除去の進行のためには咬合運動が必要であり、mi/mi においては、咬合運動が行われないことにより nAChR の除去が正常に進行しないことが示唆された。

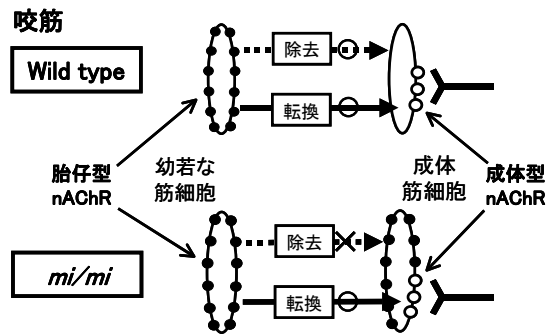
$\epsilon$  の mRNA 発現量や分布において+/+と mi/mi 間で有意な差が認められなかった。この結果から、咬合運動が行われない mi/mi の咬筋でも nAChR の転換は正常に進行し、神経筋接合部で神経から筋へのシグナル伝達がなされていることが示唆された。

側頭筋において nAChR  $\epsilon$  の mRNA 発現量や分布において+/+と mi/mi 間で有意な差が認められなかった。一方で、顎二腹筋では mi/mi の  $\delta$ 、 $\epsilon$  mRNA 発現量は+/+より有意に高い値を示した。これらの結果は咬筋での結果と異なっていることから、咬合に關与する口腔周囲筋の間でも、シナプス形成に咬合運動が与える影響が異なることが示唆された。

(1) 咬筋の nAChR 除去の正常な進行のためには咬合運動が重要な役割を果たしている。

(2) 咬筋の nAChR 転換の正常な進行に咬合運動が与える影響は殆どない。

(3) 咬合に關与する筋の間でもシナプス形成に咬合運動が与える影響は異なっている。



以上の結果が得られたことにより、mi/mi は咬合状態が咬筋の発育、発達に及ぼす影響を調べるための良いモデルであることの確立に有用であると考えられる。

また、咬合運動が咬筋の正常な発達に重要であることを示唆するに十分な結果であると思われる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

掲載した論文はすべて査読あり

- ① NARIYAMA, M., KOTA, Y., TASHIMA, I., TOMOHIRO, T., YAMANE, A. and ASADA, Y. Effect of third molar absence on development of masticatory muscles in EL mice. Pediatric Dent. J. In press
- ② FUKUI, T., SUGA, T., IIDA, R., MORITO, M., LUAN, X., DIEKWISCH, T.G.H., NAKAMURA, Y. and YAMANE, A. BMP-2 Regulates the Formation of Oral Sulcus in Mouse Tongue by Altering the Balance between TIMP-1 and MMP-13. Anat. Rec. In press
- ③ YAMANE, A., FUKUI, T., SUGA, T., IIDA, R. and MORITO, M. TGFβ3 is expressed in differentiating muscle of the embryonic mouse tongue. Int. J. Dev. Biol. 54(1):221-226, 2010
- ④ KATAYAMA, R., YAMANE, A. and FUKUI, T. Changes in the expression of myosins during postnatal development of masseter muscle in the microphthalmic mouse. Open Dent. J. 4:1-7, 2010
- ⑤ KOTA, Y., YAMANE, A., TOMOHIRO, T. and ASADA, Y. Contribution of occlusal activity to synaptogenesis in masticatory muscles. J. Dent. Res. 88(8):768-772, 2009
- ⑥ ISHIKAWA, C., OGAWA, T., IKAWA, T. and

YAMANE, A. Effects of clenbuterol, a  $\beta_2$ -adrenergic agonist, on sizes of masseter, temporalis, digastric, and tongue muscles. Open Dent. J. 3:191-196, 2009

- ⑦ YOSHINO, Y., YAMANE, A., SUZUKI, M. and NAKAGAWA, Y. Availability of saliva for the assessment of alterations in the autonomic nervous system caused by physical exercise training. Arch. Oral Biol. 54(11):977-985, 2009
- ⑧ LUAN, X., ITO, Y., HOLLIDAY, S., WALKER, C., DANIELL, J., GALANG, T. M., FUKUI, T., YAMANE, A., BEGOLE, E., EVANS, C., and DIEKWISCH, T. G. H. Extracellular matrix-mediated tissue remodeling following axial movement of teeth. J. Histochem. Cytochem. 55(2): 127-140, 2007
- ⑨ SUGA, T., FUKUI, T., SHINOHARA, A., LUAN, X., DIEKWISCH, T.G.H., MORITO, M. and YAMANE, A. BMP2, BMP4, and their receptors are expressed in the differentiating muscle tissues of mouse embryonic tongue. Cell Tissue Res. 329(1):103-117, 2007
- ⑩ TOMOHIRO, T., YAMANE, A. and ASADA, Y. Characterization of excess hard tissue occurring in the mesio-labial surface of the mandibular first molar in microphthalmic mouse. Archs. Oral Biol. 52(9):828-835, 2007
- ⑪ SUGA, T., FUKUI, T., MORITO, M. and YAMANE, A. Expressions of BMP2, BMP4, and their receptors during the development of mouse tongue muscle. Jpn. J. Gerodontology. 22(3):280-287, 2007

[学会発表] (計 27 件)

主要なもののみ掲載

- ① 山根 明、福井只美. マウス胎仔舌発生におけるBMP2 の機能. 第 83 回日本薬理学会学会年会、大阪国際会議場、2010 年 3 月 16 日
- ② 山根 明. 歯が欠損している小眼球症マウスの咀嚼筋におけるミオシン重鎖の発現. 筋生理の集い、東京慈恵会医科大、2009 年 12 月 19 日
- ③ 片山理奈、福井只美、山根 明. 小眼球症マウスの生後発達過程における咬筋ミオシン重鎖 mRNA 発現の経時的変化. 第 51 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、朱鷺メッセ、新潟コンベンションセンター、2009 年 9 月 10 日
- ④ 山根 明、金子周平、飯田良平、菅 武雄、福井只美、篠原暁子、森戸光彦. 高

- 脂肪食を摂取させたラット咬筋におけるアセチルコリン受容体サブユニットの発現. 第20回日本老年歯科医学会総会・学術大会、横浜パシフィコ、横浜、2009年6月19日
- ⑤ 金子周平、飯田良平、菅 武雄、福井只美、篠原暁子、山根 明、森戸光彦. 高脂肪食を摂取させたラット骨格筋におけるトリグリセロールの蓄積について. 第20回日本老年歯科医学会総会・学術大会、横浜パシフィコ、横浜、2009年6月19日
- ⑥ KOTA, Y., YAMANE, A. and ASADA, Y. Contribution of occlusal activity on expression of MyHC in masseter muscle. 50th Korean academy of pediatric dentistry, SETEC, Seoul, Korea, April 24-26, 2009
- ⑦ SAITO, T., YAMANE, A., KANEKO, S. and OGAWA, T. Study on adipogenic change of lingual muscles in the obese rat. 87th General session & exhibition of the IADR. Miami Beach Convention Center, USA, April 2, 2009
- ⑧ 山根 明、福井只美. 器官培養系を用いたマウス舌形態形成の研究. 生体運動合同班会議、東京大学駒場キャンパス、2009年1月11日
- ⑨ 山根 明、飯田良平、菅 武雄、金子周平、森戸光彦. Klothoマウス骨格筋萎縮における蛋白質分解系について. 第31回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド、2008年12月12日
- ⑩ 山根 明、福井只美. 分化過程のマウス舌筋細胞におけるTGF $\beta$ およびその受容体、シグナル伝達因子の発現. 第50回歯科基礎医学会学術大会・総会、有明コンベンションセンター、2008年9月25日
- ⑪ 福井只美、山根 明. BMP2はTIMPとMMPの発現を調節することによりマウス舌側溝形成を制御している. 第67回日本矯正歯科学会大会、幕張メッセ、2008年9月16~18日
- ⑫ KOUTA, Y., TOMOHIRO, T., YAMANE, A. and ASADA, Y. Synaptogenesis of craniofacial muscles is affected by occlusal activity. 87th General Session & Exhibition of the IADR, Metro Toronto Convention Center, July 3, 2008
- ⑬ 飯田良平、菅 武雄、金子夏樹、山根 明、森戸光彦. 老化促進 (Klotho)マウス咬筋、舌筋、腓腹筋における蛋白質分解系について. 第19回日本老年歯科医学会総会・学術大会、岡山コンベンションセンター、2008年6月12日
- ⑭ 古宇田ゆき、山根 明、友廣忠文、田島格、小西博和、有田浩一朗、朝田芳信. 歯の萌出不全モデルマウスを用いた咀嚼筋のプロテオーム解析. 第46回日本小児歯科学会大会、大宮ソニックシティ、2008年6月12日
- ⑮ YAMANE, A., KOUTA, Y., SUGA, T., KANEKO, N., MORITO, N. and ASADA, Y. Function of occlusal activity in the synaptogenesis and myogenesis of masseter muscle. Gordon Research Conference "Craniofacial morphogenesis and tissue regeneration", Il Ciocco, Italy, February 12, 2008
- ⑯ KOUTA, Y., YAMANE, A., TASHIMA, I., TOMOHIRO, T., ARITA, K. and ASADA, Y. Effects of occlusal activity on masseter myogenesis and synaptogenesis. 55th Annual meeting of JADR, 鶴見大学、2007年11月18日
- ⑰ 古宇田ゆき、山根 明、朝田芳信. 飼料性状の違いがマウス咬筋のシナプス形成に及ぼす影響. 第49回歯科基礎医学会学術大会、北海道大学、2007年8月31日
- ⑱ 古宇田ゆき、山根 明、友廣忠文、有田浩一朗、田島格、朝田芳信. 咬合様式の違いが咀嚼筋の筋タンパク発現に及ぼす影響. 第45回日本小児歯科学会大会、タワーホール船堀、2007年7月20日

〔図書〕(計1件)

- ① 山根 明. スタディ歯科薬理学. 永末書店. 2009. p260

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者:

石川 千恵子 (ISHIKAWA CHIEKO)  
鶴見大学・歯学部・助教  
研究者番号: 70176163

##### (2) 研究分担者:

山根 明 (YAMANE AKIRA)  
鶴見大学・歯学部・教授  
研究者番号: 20166763

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号: