

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：15301
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2020
課題番号：19K19126
研究課題名(和文)咀嚼筋由来マイオカインの概念確立 次世代シーケンシングによる生体内網羅的解析
研究課題名(英文)Establishing the concept of masticatory muscle-derived myokines
研究代表者
沼本 賢 (Numoto, Ken)
岡山大学・大学病院・医員
研究者番号：70837111
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、咀嚼して食事を取ることが全身健康の向上に影響を与えていることの生物学的機序の解明にあたり、咀嚼筋で特異的に発現するマイオカインの探索を試みた。その結果、抗炎症作用、抗菌作用を有するWAP four-disulfide core domain 12 遺伝子が、四肢の筋ではほとんど発現していなかったが、咬筋組織内では発現することが明らかとなった。しかしながら、咬筋と同様に咀嚼時に活動が活発となる唾液腺である顎下腺における発現量と比較すると低かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義
咀嚼して口から栄養を摂取することが、同じ栄養量の経管摂取などと比較して全身健康を高める可能性が報告されてきた。本研究では、咀嚼の際に用いる咀嚼筋組織で特異的に産生される因子に着目し、四肢の筋組織内で産生されるものと比較した。その結果、抗炎症作用、抗菌作用を持つWAP four-disulfide core domain 12と呼ばれる因子は、腕や脚の筋ではほとんど産生されないが、咀嚼の際に活動する咬筋では産生されていた。本結果は、全身健康に役立つ因子が咀嚼に使用される筋組織内で産生される、すなわち咀嚼して栄養摂取することが全身健康を向上させる機序を説明できる重要な知見につながりうる。

研究成果の概要(英文)：This study tried to search the specifically expressed myokines in masticatory muscles to elucidate the biological mechanisms for enhancing the general health by oral nutrition ingestion. As the results, while WAP four-disulfide core domain 12 gene did not express in limb muscle tissues, it expressed in masseter muscle tissues. However, the expression level of this gene was lower than that expressed in submaxillary gland, which actively work during mastication like masseter muscle.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：咀嚼筋 マイオカイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまで、健全な咀嚼器官の増進、維持と全身健康の関連について様々な観点から検討が行われてきた。そのような中、最近、周術期の術後栄養管理において、同レベルの栄養摂取量でも、経管ではなく経口摂取することで健康状態の回復が速く、退院までの日数が有意に短縮することが知られるようになり、口から栄養摂取することの全身への影響が脚光を浴びるようになった。すなわち、咀嚼して食事を取ることが全身健康の向上になんらかの影響を与えていることが推測されるが、咀嚼の能動器官である咀嚼筋、顎関節、歯や歯周組織、舌などを介して全身にどのような作用が伝播されているかは全く不明である。この疑問の解明にあたり、申請者は咀嚼筋の機能に着目した。近年、骨格筋では、筋活動に伴って種々の生理活性物質が産生され、全身に作用することが知られている。このような物質、いわゆる「マイオカイン」として同定されているものは約30種存在し、代謝調節能、抗炎症作用、発がん抑制作用、抗動脈硬化作用など、様々な機能をもつことが知られている。一方、筋組織内で産生されるマイオカインは、組織を構成する筋線維タイプの割合によって異なることも明らかとなっている。従って、四肢の筋と比較して遅筋が高い構成割合を占める咀嚼筋では、組織内で産生されるそれらも四肢筋とは異なり、特異的なものや多量に産生されるものが存在することも推測される。そのような中、以前、我々は慢性咀嚼筋痛の病態機序解明を目的として、咀嚼筋活動によって筋組織内に発現する因子の解析を行っていた。一連の研究の中で、まず、咀嚼筋の反復収縮運動を模倣した妥当性の高い動物モデルを確立し、小規模の網羅的解析で高発現した因子の発現を確認した。すなわち、ラット咬筋に電気刺激を与えて反復収縮を持続させた際のインターロイキン6 (IL-6) の遺伝子発現を比較したところ、①咬筋組織内では IL-6 mRNA の発現量が約3倍増加すること、②筋弛緩剤投与下では電気刺激を付加しても IL-6 mRNA の発現は変化しないこと、③炎症性サイトカインとして知られる IL-1 β の遺伝子発現は変化しないことがわかった。次に、同様に確立したマウスのモデルを用い、咬筋活動後に発現する遺伝子を cDNA マイクロアレイ解析で網羅的に探索したところ、2倍以上の発現亢進は IL-6 を含む 28 種の遺伝子に認め、抑制されたものは 25 種であった。これらの結果は、咀嚼筋においても筋活動により多様なマイオカインが産生され、全身に作用している可能性を示すとも考えられる。しかし、上記の検討では、筋活動後の筋組織全体から遺伝子を抽出しているため、組織内の腱、結合組織や血管など様々な組織由来のものも含み、筋細胞から特異的に発現、産生されるマイオカインの解析には、精度高く筋細胞のみを特異的に標的とした研究実施が必要である。

2. 研究の目的

本研究では、経口摂取で栄養をとることが全身健康に与える影響を、咀嚼筋のバイオロジーの観点から紐解くことを目的とする。具体的には、咀嚼筋活動時の筋組織で産生、分泌される生理活性物質がどのようなものであり、全身健康にどのように関わるかの解明を試みる。

3. 研究の方法

代表的な咀嚼筋である咬筋内で産生される生理活性物質を四肢の筋で産生されるそれらと網羅的に比較する。筋細胞自体が産生する因子 (マイオカイン) を明らかとするためには、対象筋組織の中から腱、血管や結合組織などを含まず、筋細胞部のみから遺伝子を抽出する必要がある。従ってマイクロダイセクション法で特異的に筋細胞を回収し、少量の mRNA で解析可能な次世代シーケンサーによる RNA-seq 解析を用いて網羅的定量比較解析する。本計画に基づいて C57BL/6J マウスを頸椎脱臼により確実に屠殺し、咬筋と上腕三頭筋、腓腹筋組織からマイクロダイセクシ

ョン法で筋細胞の回収を試みた。しかしながら、予備的検討において、筋細胞から抽出した mRNA のクオリティーチェックの結果、解析に耐えられるクオリティーのサンプルを得ることができなかった。従って、研究期間内に研究目的に沿った結果を得るためには方法の変更が必要と考え、以下の方法により、咬筋組織内で産生が亢進している因子の検索を行うこととした。

- 1) C57BL/6J マウスを頸椎脱臼により確実に屠殺し、咬筋と上腕三頭筋、腓腹筋、大腿四頭筋組織のサンプリングを実施。
- 2) サンプリングした各筋組織をホモジナイズ後に mRNA を抽出した。
- 3) Web 提供されているデータベース (<http://muscledb.org/#>) から検索を行い、咬筋組織内で遺伝子発現量が亢進している可能性がある候補因子について、対照とした他の筋組織と比較した。
- 4) 候補因子として一酸化窒素合成酵素 1 (Nos1)、アポリポロタン E (ApoE)、Rac2、Wfdc12 を挙げ、定量 PCR 法にて遺伝子発現量を解析、比較した。
- 5) 咬筋組織内で発現している上記の 4 候補の遺伝子発現を咬筋周囲組織である舌、顎下腺における発現量とも比較した。

4. 研究成果

1) 咬筋組織内で遺伝子発現が亢進している可能性のある候補因子の発現量

4 匹のマウスからの各筋組織から抽出した mRNA を用いた定量 PCR 法にて遺伝子発現量を比較した結果を図 1～4 に示す。図 1～3 に示すように、咬筋組織内で発現している Nos1、ApoE、Rac2 遺伝子量は、対照として設定した他の四肢筋において発現している量と差があるとは考えられなかった。一方、Wfdc12 については今回の対照として設定した四肢の筋ではほとんど発現せず、咬筋組織内で特異的に多く発現している可能性が示された。この Wfdc12 は Whey acidic protein (WAP) メンバーに属し、抗菌作用、抗炎症作用を有するタンパクである。

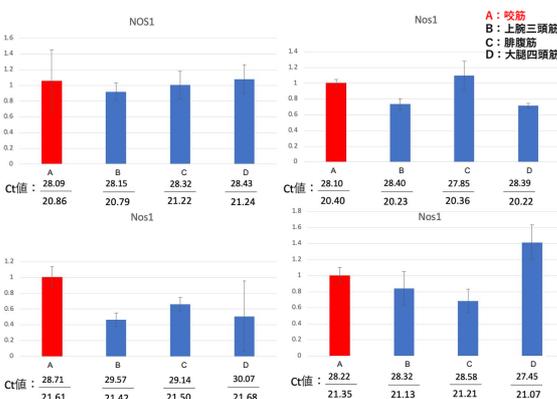


図1. 各筋組織内におけるNOS1遺伝子の発現量

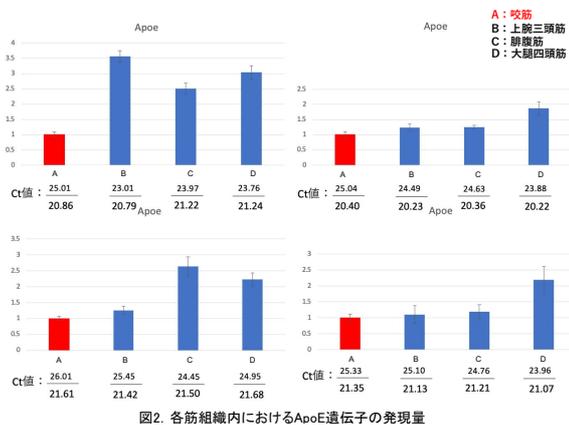


図2. 各筋組織内におけるApoE遺伝子の発現量

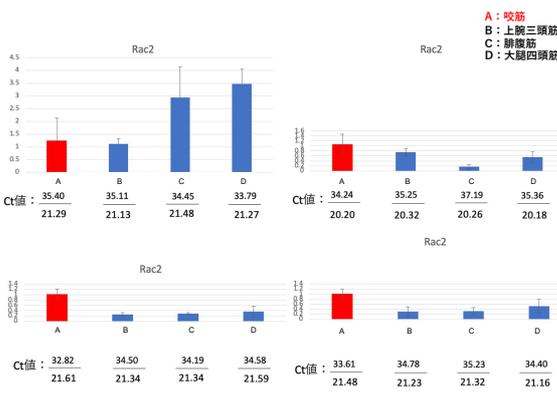


図3. 各筋組織内におけるRac2遺伝子の発現量

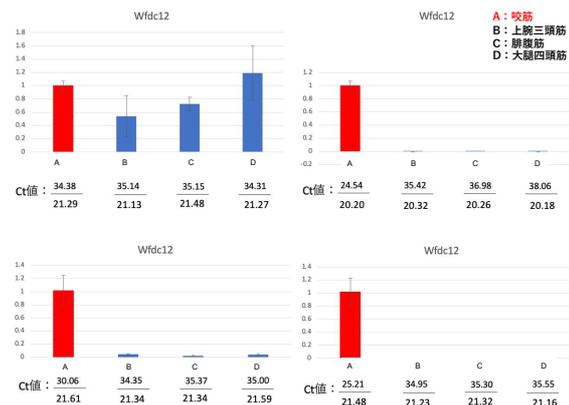


図4. 各筋組織内におけるWfdc12遺伝子の発現量

2) 口腔周囲組織である顎下腺, 舌における遺伝子発現との比較

咬筋組織内における上記4因子の遺伝子発現量を顎下腺, 舌組織内における発現量と比較した結果, Nos1 については顎下腺, 舌における発現量と比較して, 咬筋組織内におけるそれは多い傾向を示した。一方, ApoE の発現量は少ない傾向を示した。また, Wfdc12 に関しては, 顎下腺における発現量に比較すると, 咬筋や舌といった筋組織では低いことを確認した。Rac2 については, 顎下腺, 舌, 咬筋で発現量に差は見られない傾向にあった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	前川 賢治 (Maekawa Kenji)		
研究協力者	大野 充昭 (Ono Mitsuaki)		
研究協力者	北川 若奈 (Kitagawa Wakana)		
研究協力者	窪木 拓男 (Kuboki Takuo)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------