

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K17187

研究課題名（和文）咀嚼筋機能低下による顎骨退行性変化でのミトコンドリア関連シヤストレス蛋白の関与

研究課題名（英文）Involvement of mitochondria-associated share stress protein in jaw bone degenerative changes due to masticatory muscle hypofunction

研究代表者

近藤 愛理（井野愛理）（Kondo (Ino), Airi）

長崎大学・医歯薬学総合研究科（歯学系）・客員研究員

研究者番号：70827633

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：咀嚼筋機能低下に伴う骨密度減少と顎骨の形態変化ならびにミトコンドリア関連シヤストレス蛋白との関連を検討することを目的とした。ラット両側の咬筋にBotulinum Toxin Type Aを注射し、咀嚼筋力低下を惹起したモデルラットを作製した。骨形態計測ではBotulinum Toxin Type A投与ラットにおいて、顎骨の海綿骨の減少が認められた。また破骨細胞の増加がみられ、シヤストレス蛋白fkbp5の発現の増加傾向がみられた。これらの結果から咀嚼筋機能低下により骨密度が減少し破骨細胞は増加するが、そこにミトコンドリアシヤストレス蛋白が関わる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、咀嚼筋力低下による間欠的で緩急のある力学的ストレスの低下が、顎骨の骨密度・形態に及ぼす影響を探求する。さらには、力学的ストレスと一般生体ストレスの双方に共通に働く因子の関与を探求する。そして、顎骨形態変化の原因に迫ることにつながっていく可能性があることが学術的意義のあるところである。さらに、顎顔面形態の変化は歯列形態の変化に直結しており、メカニズムの解明により、将来的に不正咬合の予想・予防につながることに社会的意義がある。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to investigate the relationship between the decrease in bone mineral density and jaw bone morphology and mitochondria-associated shear stress protein in a mouse model of masseter muscle dysfunction. Botulinum Toxin Type A was injected into the bilateral masseter muscle of bilateral rats to induce masseter muscle hypofunction. Bone morphometry showed a decrease in trabecular bone in the jaw bone of rats treated with Botulinum Toxin Type A. There was an increase in osteoclasts. In addition, there was an increase in osteoclasts and a tendency toward an increase in the expression of the shear stress protein fkbp5. These results suggest that mitochondrial share stress protein may be involved in the decrease in bone mineral density and increase in osteoclasts due to the decrease in masseter muscle function.

研究分野：歯科医学

キーワード：咀嚼筋機能 退行性変化 シヤストレス

1. 研究開始当初の背景

力学的（メカニカル）ストレスと骨密度・骨形態の変化との因果関係には様々な報告がある。一例として、無重力空間での宇宙飛行士の骨密度減少があげられる。無重力による骨密度の減少は、骨吸収が加速することで起こり、症状の進行を抑えるために力学的ストレスが有効であることが証明されている。一方、力学的ストレスと骨変化については、顎顔面形態の変化に関してもその関与が示唆されており、実際、近代の加工食による軟食化とともに顎骨が退化してきたという事実が考古学的に裏付けられている。この顎顔面形態の変化において最も顕著に認められるのは、咬筋の付着部位（停止）である咬筋粗面の退化に伴う顎角部骨の縮小である。この縮小により、古代人の頑丈でしっかりとした四角い顔立ちから次第に現代人の顔は細く長くなってきたと考えられ、この傾向は今後もさらに進んで行くものと思われる。

力学的ストレスと骨変化との関連については、分子生物学的にも活発に研究が進められており、関連する因子が次第にわかってきた。最近、水生生物のメダカにおいても陸上哺乳類のマウスと同様に、無重力環境において骨量の減少を認め、そこでは、*fkbp5* と *ddit4* という二つの蛋白の発現が破骨細胞のミトコンドリアを形態変化させ活性化を引き起こし、それにより骨密度が減少することが報告された (Chitani M et al. Scientific reports, 5, 14172, 2015)。さらに、培養細胞実験において、*fkbp5* の強制発現が破骨細胞の分化を促進するという報告もなされており (Kimura M et al. Mod Rheumatol. 23, 1133-9, 2013)、骨質変化への関与が強く示唆されている。また、視床下部-下垂体-副腎皮質ホルモンを軸にした生体のストレス応答軸、いわゆる HPA 軸 (hypothalamic-pituitary-adrenal axis) においても、重要と考えられている因子の中に、*fkbp5* と *ddit4* があることが報告されている (Sautron V et al. BMC Genomics, 16, 961, 2015)。力学的ストレスと一般生体ストレス等の異種のストレスにおいて、共通に働く因子が存在していること、さらに、HPA 軸の最終産物であるステロイドホルモンも骨量変化に作用すること、は興味深いことであり、本研究において *fkbp5* と *ddit4* が咀嚼筋力低下による顎骨変化のターゲット因子になりうるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、咀嚼筋力低下（咀嚼筋機能低下）モデルマウスを用いて、咀嚼筋力低下に伴う骨密度減少と顎骨の形態変化ならびにミトコンドリア関連シヤストレス蛋白との関連を検討し、力学的ストレスに伴う顎顔面形態変化のメカニズム解明に迫ることである。

力学的ストレスのレセプターは未だに発見されていないが、骨粗しょう症の治療や、無重力空間での骨密度低下の原因・予防などの分野でその研究が進められている。閉経等に伴う骨粗しょう症はホルモン低下が主要な原因の疾患であり、一方、宇宙飛行士の骨密度低下は無重力

による力学的ストレス低下が原因である。本研究では、咀嚼筋力低下による間欠的で緩急のある力学的ストレスの低下が、顎骨の骨密度・形態に及ぼす影響、さらには、力学的ストレスと一般生体ストレスの双方に共通に働く因子の関与を探求する。また本研究により、骨粗しょう症および無重力宇宙空間での骨密度低下のメカニズム解明に関わるだけでなく、顎骨形態変化の原因に迫ることにつながっていくことを期待している。さらに、顎顔面形態の変化は歯列形態の変化に直結しており、メカニズムの解明により、将来的に不正咬合の予想・予防につながると考えている。

3. 研究の方法

10週齢のウイスター系雄ラットを、咬筋機能低下群と対照群に分けた。Botulinum Toxin Type Aをラットの両側の咬筋に、40 μ Lの整理食塩水に入ったBotulinum Toxin Type Aを2U、合計4Uを注射した。CNTには同量の生理食塩水を注入した。

マイクロCT撮影は全身麻酔下で行った。0.75mg/kgのメドトミジン、2mg/kgのミダゾラム、2.5mg/kgの酒石酸ブトルフェノールを腹腔内に注射し、麻酔を導入・維持した。すべての実験手順が終了した後、0.75 mg/kg アチパメゾールの投与によりラットを覚醒させた。マイクロCTは0日目と14日目に撮影した。飼育実験終了後、ラットを過量の二酸化炭素下で安楽死させ、両側の咬筋を切除し、重量を測定した。各群のラットの咬筋をpH7.4のリン酸緩衝液中10%ホルマリンで1日間固定した。固定後、標本は通常の組織学的処理を行い、パラフィンワックスに包埋し、6 μ mの切片に切り出した。筋線維を観察するためにヘマトキシリン・エオジン染色を行った。筋線維の量はImage Jを用いて測定した。一部の筋線維の組織像を観察し（倍率40倍）、筋線維面積/総面積の割合を測定した。3次元（3D）画像再構成ソフトウェアを用いて、マイクロCT画像上で歯の移動量を測定した。骨形態解析は、3D画像解析ソフトウェアを用いて行った。

顎骨をとりだし液体窒素で凍結し、ステンレス乳鉢で粉碎後、全RNAを抽出し、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Erase (TaKaRa)を用いてcDNAを合成した。RT-PCR解析は、EX Taq (TAKARA社製)を用いて行った。プライマーの配列は以下の通りである。fkbp5の順鎖にTGTCAGGGTTTGATGTGGA、逆鎖にGTTCTTTGCGTTCCCGACTGを用いた。また、ddit4の順鎖にGTCCAACAATGG CAGCAGAA 逆鎖にTTCCTCCAGTGGGTCAAAGAAを用いた。コントロールのハウスキーピング遺伝子としてグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) の順鎖に5'-AACTTTGGCATTGTGGAAGG-3'、逆鎖に5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'を用いた。GAPDHをもとに各値を標準化した。

4. 研究成果

Botulinum Toxin Type Aを注射したラットではコントロールのラットほど体重が増加しなか

った。14日目、コントロールラットの体重は 173.0 ± 7.6 gで、Botulinum Toxin Type Aを注射したラットでは 165.3 ± 32.5 gであった。

咬筋の重量を計測した結果、コントロールラットでは 0.62 ± 0.09 gであったが、Botulinum Toxin Type Aを注射したラットでは 0.34 ± 0.13 gであった。Botulinum Toxin Type Aを注射したラットの咬筋重量は、コントロールの咬筋重量の約半分に減少した。14日目に得られた組織切片は、コントロールのラットでは筋繊維が密に並び間質が少なかったが、Botulinum Toxin Type Aを注射したラットでは筋繊維の萎縮が見られた。組織中の筋線維の割合は、コントロールラットでは $86.7 \pm 5.0\%$ であったのに対し、Botulinum Toxin Type Aを注射したラットの咬筋重量は $53.9 \pm 6.9\%$ で統計学的に有意な差が認められた。

また、マイクロCT画像による骨形態計測では咬筋附着部位（下顎角部）の皮質骨においては、BMDはコントロールラットで 1050 ± 95 mg/cm²であったが、Botulinum Toxin Type Aを注射したラットのBMDは 1035 ± 106 mg/cm²であった。BMCはコントロールラットで 9.53 ± 0.23 mg/cm²、Botulinum Toxin Type Aを注射したラットのBMDは 9.75 ± 106 mg/cm²であった。BVはコントロールラットで 0.010 ± 0.0011 mgで、Botulinum Toxin Type Aを注射したラットのBVは 0.009 ± 0.0012 mgであった。このように皮質骨においては、Botulinum Toxin Type Aの注射による変化を認めなかった。しかしながら海綿骨においてBMD、BV、BMCの値が減少する傾向がみられた。海綿骨のBMDはコントロールラットで 610 ± 85 mg/cm²であったが、Botulinum Toxin Type Aを注射したラットのBMDは 594 ± 93 mg/cm²であった。BMCはコントロールラットで 2.5 ± 0.73 mgであり、Botulinum Toxin Type A注射したラットのBMCは 2.4 ± 0.65 mg/cm²であった。BVはコントロールラットで 0.0040 ± 0.0016 mgで、Botulinum Toxin Type Aを注射したラットのBVは 0.0038 ± 0.0010 mgであった。統計学的に有意差はなかったが、Botulinum Toxin Type Aを注射したラットでは骨形態計測値の減少傾向がみられた。

TRAP染色において、破骨細胞の染色をおこなった。破骨細胞は皮質骨では検出できず、海綿骨で検出された。Botulinum Toxin Type Aを注射したラットでは破骨細胞数が増加していた。

リアルタイムPCR法において、fkbp5とddit4のmRNAの検出を行った。その結果、両mRNAとも海綿骨においてその発現が確認された。Botulinum Toxin Type A注射したラットにおいてfkbp5は1.2倍に増加した。一方でddit4の量はコントロールとBotulinum Toxin Type A注射したラットの間には差異を認めなかった。

結論として、Botulinum Toxin Type A注射した咬筋機能低下モデルラットにおいて、14日後に顎骨の形態変化は認めなかったが、海綿骨での骨形態計測値の減少とともに破骨細胞の増加がみられ、fkbp5の増加がみられた。これらの結果から咬筋機能低下により骨密度が減少し破骨細胞は増加するが、そこにミトコンドリアシヤストレス蛋白が関わる可能性が示唆された。さらにこれらの代謝変化は顎骨の形態変化に関わる可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 名城 友香子、佛坂 斉社、佛坂 由可、井野-近藤 愛理、森田 幸子、中村 琢也、上田-一瀬 悠依華、西岡-坂本 紀栄、舟木 真梨子、吉田 教明
2. 発表標題 矯正力による歯根吸収発症における炎症性因子12 / 15 - L0Xの関与
3. 学会等名 第18回九州矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 井野愛理, 佛坂斉社, 佛坂由可, 近藤崇伸, 有菌ケイラ, 橋本恵, 吉田教明
2. 発表標題 塩化リチウム投与による歯槽骨の形態変化、歯の移動および歯根吸収への影響 - ラット実験モデル - Effects of Lithium chloride on alveolar bone morphometry, tooth movement and root resorption in rats.
3. 学会等名 第80回日本矯正歯科学会学術大会 & 第5回国際会議, The 80th Annual Meeting of Japanese Orthodontic Society & The 5th International Congress. (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------