

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26463127

研究課題名(和文)非咬合モデルマウス咀嚼筋の生後発達過程におけるエピジェネティクス制御機能の解明

研究課題名(英文)Epigenetics in the postnatal development of masticatory muscles

研究代表者

成山 明具美(Nariyama, Megumi)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：90440304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：咀嚼筋と四肢の筋ではmicroRNAによってその発現パターンが異なり、さらにそのターゲットとなる遺伝子発現においても差がみられた。筋の生後発達過程において、microRNAの発現量の増加にともなってターゲット遺伝子の蛋白質の発現量は減少したが、mRNAの発現量は変化がなかったことから、microRNAはtranslational levelではなく、transcriptional levelにおいてターゲット遺伝子の発現を抑制的に調節していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The regulatory pathway of miR-1 via HDAC4 and MEF2 plays a more prominent role during postnatal development in the masseter muscle than in the gastrocnemius muscle, whereas that of miR-133a via SRF plays a more prominent role in the gastrocnemius muscle than in the masseter muscle.

MiR-1 promotes the differentiation of skeletal muscle directly through the post-transcriptional inhibition of HDAC4 expression and that miR-133a promotes the proliferation of skeletal muscle directly through the post-transcriptional inhibition of SRF expression.

MiR-1 promotes the differentiation of skeletal muscle directly through the post-transcriptional inhibition of HDAC4 expression and that miR-133a promotes the proliferation of skeletal muscle directly through the post-transcriptional inhibition of SRF expression.

研究分野：小児歯科学

キーワード：咀嚼筋 非咬合モデルマウス 生後発達 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

成長期において齲蝕や事故などによる歯の喪失や無汗型外胚葉異形成症などの疾患にみられる無歯症によって歯が欠損し、咬合関係が喪失することにより引き起こされた咀嚼筋の成長・発達異常が、顎全体の正常な成長・発達に大きな影響を及ぼすことが考えられる。また、高齢期において齲蝕や歯周病などにより歯が喪失し咬合状態が悪化することにより、咀嚼筋、舌筋などの萎縮や機能低下、摂食・嚥下障害を起こしやすくなることが知られている。

エピジェネティクスとは、クロマチンへの後天的な修飾によりゲノムの DNA 配列を変化させることなく、遺伝子発現を制御するシステムのことである。主に DNA 塩基のメチル化およびヒストンの化学修飾(メチル化、アセチル化)により遺伝子発現の制御を行っている。最近、このエピジェネティクスによる遺伝子の発現調節が、胚性幹細胞の多能性・細胞増殖・発生・分化・代謝・アポトーシスなど多くの生命現象に重要な役割を果たしていることが明らかになっている。骨格筋の生後発達においても、エピジェネティック遺伝子による調節によりコントロールされていると思われる。

研究代表者らは歯が萌出せず、*mitf* 遺伝子に変異のある小眼球症マウス(*mi/mi* マウス)を用いて、咬合の異常が咀嚼筋、舌筋の性質に与える影響の検討を行うこととした。

2. 研究の目的

本研究における目的は、*mi/mi* マウスを用いて咬合の欠如が咀嚼筋の生後発達のエピジェネティクスの機能に及ぼす影響を明らかにすることである。

3. 研究の方法

野性型(C57B6)マウスを生後1、2、3、4、8、12週目にそれぞれ6匹ずつを安楽死させ、体重を測定後、咬筋、腓腹筋を摘出し、筋重量を測定した。咬筋および腓腹筋における *miR-1* の発現量は、1~12週齢の生後発達過程でどちらも経時的に増加し、また咬筋における *miR-133a* の発現量 1~12週齢の生後発達過程で顕著な変化はみとめられないが、腓腹筋における *miR-133a* の発現量は 1~12週齢で経時的に増加する。*miR-1* のターゲットとなる HDAC4、5、7、9、MEF2、Myf5、MyoD、Myogenin、MRF4、MCK、および *miR-133a* のターゲットとなる SRF の mRNA について測定した。

さらに、*mi/mi* マウスを用い、クレンブテロール(CB)(β -2-AR(骨格筋の主要なサブタイプ)アゴニスト)投与による骨格筋肥大に対する *mitf* 変異の影響を解析した。12週齢の野生型、*mi/mi* マウスをそれぞれコントロ

ール群と CB 群にわけて、それぞれのマウスにおける咬筋(速筋)、前脛骨筋(速筋)、ヒラメ筋(遅筋)、心筋の脛骨長に対する筋重量の比(筋重量/TL)について、CB 投与の影響を調べた。

4. 研究成果

咬筋、腓腹筋において、*miR-1* の発現の発現量が生後1~12週齢にかけて経時的に増加したのに対し、HDAC4の蛋白発現量は生後2~12週齢にかけて減少した。さらに、咬筋では MEF2、MyoD、Myogenin、MCK 蛋白、腓腹筋では MRF4、MCK 蛋白の発現量が生後2~12週齢にかけて増加した。しかし、それらの発現量の変化率は、腓腹筋より咬筋で有意に大きかった。一方、*miR-133a* の発現量は生後1~12週齢にかけて、咬筋では有意に増加しなかったのに対し、腓腹筋では有意に増加した。また、SRF、CyclinD1の発現量は生後2~12週齢にかけて咬筋では有意に変化しなかったが、腓腹筋では有意な減少と増加が観察された。咬筋、腓腹筋において2~12週齢にかけて HDAC4 蛋白質の発現量は減少したが、HDAC mRNA の発現量には変化がなかった。咬筋では MEF2、MyoD 蛋白質の発現量が有意に増加したが、mRNA の発現量には変化がなかった。また、腓腹筋では SRF、Cyclin D1 蛋白質の発現量が有意に減少したが、mRNA の発現量には変化がなかった。

咬筋と腓腹筋では microRNA (*miR*) の発現パターンが異なり、さらにそのターゲットとなる遺伝子発現においても差がみとめられた。筋の生後発達過程において、microRNA の発現量の増加にともなってターゲット遺伝子の蛋白質の発現量は減少したが、mRNA の発現量は変化がなかったことから、microRNA は translational level ではなく、transcriptional level においてターゲット遺伝子の発現を抑制的に調節していることを明らかにした。

また、WT マウスでは、CB 投与により、咬筋、前脛骨筋、心筋の筋重量/TL が有意に増加($p<0.05$)したのに対し、*mi/mi* マウスでは、すべての筋で有意差がみとめられなかった。*mitf* は心筋同様に、速筋型骨格筋においても β -AR を介した筋肥大に重要な役割を果たすことが示唆された。

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4件)

Ohnuki Y, Umeki D, Mototani Y, Shiozawa K, Nariyama M, Ito A, Kawamura N, Yagisawa Y, Jin H, Cai W, Suita K, Saeki Y, Fujita T, Ishikawa Y, and Okumura S : Role of phosphodiesterase 4 expression in the

Epac1 signaling-dependent skeletal muscle hypertrophic action of clenbuterol. *Physiol Rep.* 査読あり, Vol 4, 2016, e12791, DOI: 10.14814/phy2.12791.

Chikenji A, Ando H, Nariyama M, Suga T, Iida R, and Gomi K : MyoD is regulated by the miR-29a-Tet1 pathway in C2C12 myoblast cells. *J Oral Sci.* 査読あり, Vol 58, 2016, pp219-229, DOI:10.2334/josnusd.15-0684.

Nariyama M, Mori M, Shimazaki E, Ando H, Ohnuki Y, Abo T, Yamane A, and Asada Y : Functions of miR-1 and miR-133a during the postnatal development of masseter and gastrocnemius muscles. *Mol. Cell Biochem.* 査読あり, Vol 407, 2015, pp17-27, DOI: 10.1007/s11010-015-2450-y.

Fukui T, Suga K, Fukui K, Tsuruta M, Galang-Bouquiren S, Invisible treatment of a severe Class I crowding with multilingual bracket system using new double mushroom archwire technique, *Jouranl of the World Federation of Orthodontists* Vol 4, 2015, pp151-161, DOI: 10.1016/j.ejwf.2015.10.001

[学会発表](計 12 件)

Nariyama M, Ohnuki Y, Umeki D, Ito A, Kawamura N, Yagisawa Y, Okumura S, and Asada Y : Role of Microphthamia-Associated Transcription Factor in Masseter Muscle Hypertrophy Induced by β 2-adrenoceptor Stimulation, 第 58 回 歯科基礎医学会学術大会、2016 年 8 月 24-26 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

Ohnuki Y, Umeki D, Nariyama M, Ito A, Kawamura N, Yagisawa Y, Okumura S : Epac1-dependent hypertrophic effects of β 2-adrenoceptor stimulation differ between slow- and fast-twitch muscles, 第 58 回 歯科基礎医学会学術大会、2016 年 8 月 24-26 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

Umeki D, Ohnuki Y, Ito A, Yagisawa Y, Nariyama M, Ishikawa M, Kawamura N, Nakamura Y, Okumura S : Inhibitory effects of dexamethasone on bite opening-induced hypertrophy in masseter and cardiac muscles, 第 58 回 歯科基礎医学会学術大会、2016

年 8 月 24-26 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

Ando H : MyoD and CDK6 are regulated by miR-29a-Tet1 pathway in the C2C12 myoblast cells, 第 58 回 歯科基礎医学会学術大会、2016 年 8 月 24-26 日、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市)

Nariyama M, Ohnuki Y, Umeki D, Ito A, Kawamura N, Okumura S, and Asada Y : Role of Microphthamia-Associated Transcription Factor in Masseter Muscle Hypertrophy Induced by β 2-adrenoceptor Stimulation, P D A A (第 10 回 アジア小児歯科学会), 2016 年 5 月 26-28 日、東京ドームホテル (東京都文京区)

小林和弘、濱中一将、成山明具美 他 17 名 : A case of longitudinal dental management of autistic patient refused the dental treatment for several years by worse of condition, 第 32 回 日本障害者歯科学会総会および学術大会、2015 年 11 月 6-8 日、名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

成山明具美、島崎絵美、安藤 準、大貫芳樹、奥村 敏、朝田芳信 : 咬筋と腓腹筋の生後発達過程における miR-1, miR-133a の機能, 第 57 回 歯科基礎医学会学術大会、2015 年 9 月 11-13 日、朱鷺メッセ 新潟コンベンションセンター (新潟県新潟市)

Fukui T : Double Archwire Technique for the lingual bracket treatment with Fujita Lingual Bracket, the 6th Scientific Congress of World Society of Lingual Orthodontics, July 3dr-5th, 2015, COEX Intercontinental Hotel, Seoul, Korea

山崎 茂、成山明具美 他 17 名 : 審美性を回復した事により、障害者家族の口腔ケアに対する関心が向上した 1 症例, 第 31 回 日本障害者歯科学会総会および学術大会、2014 年 11 月 14-16 日、仙台国際センター (宮城県仙台市)

成山明具美、船山ひろみ、守安克也、井出正道、朝田芳信 : 鶴見大学歯学部小児歯科学講座における学生実習の現状, 第 28 回 日本小児歯科学会関東地方会、2014 年 9 月 28 日、大宮ソニックシティ (埼玉県さいたま市)

島崎絵美、成山明具美、安藤 準、山根 明、朝田芳信 : 咬筋における miR-206 とアセチルコリン受容体形成因子との関連性につ

いて、第 56 回歯科基礎医学会学術大会、
2014 年 9 月 25-27 日、福岡国際会議場（福
岡県福岡市）

島崎絵美、森愛美、成山明具美、山根 明、
朝田芳信：咬合様式の違いが咬筋における
miR-206 の発現に及ぼす影響、第 52 回日本
小児歯科学会大会、2014 年 5 月 16-17 日、
品川区立総合区民会館（東京都品川区）

〔図書〕（計 2 件）

成山明具美、朝田芳信：I. 乳幼児期（乳
歯列期）の子どもの治療と対応のポイント、
9 乳幼児の外科的処置 局所麻酔時の対応、
日本歯科評論増刊、ヒョーロン・パブリッ
シャーズ、pp60-61、2015

成山明具美、朝田芳信：I. 乳幼児期（乳
歯列期）の子どもの治療と対応のポイント、
10 乳幼児の治療を安全に行うためのポイン
ト 薬剤、日本歯科評論増刊、ヒョーロ
ン・パブリッシャーズ、pp66-67、2015

6. 研究組織

(1) 研究代表者

成山 明具美（NARIYAMA MEGUMI）
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：90440304

(2) 研究分担者

安藤 準（ANDO HITOSHI）
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号：00282765

福井 只美（FUKUI TADAYOSHI）
鶴見大学・歯学部・非常勤講師
研究者番号：10267544

朝田 芳信（ASADA YOSHINOBU）
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：20184145