

令和 3 年 5 月 10 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K17014

研究課題名(和文)顎口腔系における力学刺激下での運動器制御機構の解明

研究課題名(英文) Regulation of locomotor tissues in the maxillofacial region under mechanical stimuli

研究代表者

小野 岳人 (ONO, Takehito)

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・助教

研究者番号：40772471

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)：食物の摂取時には、咀嚼筋は力を発揮し顎骨はその力を受ける。強い咀嚼力は顎骨や咀嚼筋を強化するが、そのメカニズムには不明な点が多い。そこで、咀嚼運動による力学刺激下で機能し、筋や骨を強化する分子の探索に取り組んだ。

マウスに高硬度飼料を与えて咀嚼を強化するモデルを作出・解析したところ、咬筋が肥大し、顎骨形態が変化した。このとき、顎骨の骨細胞でIGF-1発現が上昇していた。IGF-1は腱細胞の骨芽細胞への分化を誘導した。また、咬筋ではIGF-1受容体の発現が増加していた。以上より、咀嚼力が顎骨骨細胞におけるIGF-1産生を増加させ、これが顎骨や咀嚼筋を強化すると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題では、筋組織と骨組織が運動に伴い産生し、相互に制御する因子、すなわち“運動器間相互制御因子=インターロコモレギュレーター”の本体を明らかにし、相互制御機構の実態を解明することを目標としたものである。本研究により、インターロコモレギュレーター分子および候補分子を三種を同定できた。同定された分子を標的とした顎変形症、骨粗鬆症、サルコペニアなどの骨や筋の疾患に対する治療法の開発への道が拓ける可能性があり、臨床的、社会的に意義が大きい。

研究成果の概要(英文)：Strong mastication is well-known to reinforce masticatory muscles and jawbone. However, the mechanisms underlying has long been poorly understood. Thus, exploration for the molecules regulating such effects was conducted in this project. It was found in a mouse model of strong mastication that there was an increase of IGF-1 in the osteocytes of the jawbone. IGF-1 was shown to enhance osteoblastogenesis of the cells harvested from the tendon. Expression of IGF-1 receptor increased in the masseter muscle in these model mice. These together indicate that strong mastication reinforces the muscles and bones in maxillofacial region via IGF-1 derived from osteocytes.

研究分野：運動器科学

キーワード：運動器科学 咀嚼 骨代謝 筋代謝 メカニカルストレス

1. 研究開始当初の背景

あらゆる生物は、生命活動を営む中で絶えず外的/内的環境からのさまざまな刺激にさらされ、それに適応するよう組織を再構築する。運動に際しては、骨格筋が収縮することにより、腱を介して付着する骨が動く。運動量や運動強度の大きい個体においては、大きな力を発揮するために骨格筋が発達し、その力に耐えられるよう骨の強度も増加する。一方、運動量の少ない個体では、骨格筋と骨の両方が減少する。

顎口腔領域では、食物を摂取する際に咀嚼筋が下顎骨を動かし、顎骨に植立する歯を介して咀嚼が行われる。また、精神的に緊張している状態では咀嚼筋が収縮し、食いしぼりが起こる。咀嚼時や咬合時には咀嚼筋が時に体重と同等の大きな力を発揮し、歯と顎骨はそれを受容する。咀嚼筋は咀嚼力を十分に発揮できるよう、顎骨は咀嚼力に耐えられるよう、組織量と強度が調節されている。特に、顎骨は他の骨とは異なり、力学刺激が強度だけでなく形態にまで影響するという特徴がある (Sassouni, *Am. J. Orthod.*, 1969)。我々の祖先の顎骨は現代人と比べ大きかったと言われているが、これは食物の硬さや咀嚼力の違いによると考えられている (Wood, *J. Anat.*, 2008)。

骨や筋は力学刺激に反応して種々の生理活性物質を産生する (Benatti, *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2014; Bakker, *Curr. Osteoporos. Rep.*, 2015)。この中には骨と筋の両方を制御する分子も含まれ、それらを介した骨と筋の相互制御機構の存在が示唆される。しかし、骨や筋が力学刺激下で産生し、相互に制御する因子はほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

骨格筋は、運動器の構成要素の一つで、収縮/弛緩するによって骨を動かす。筋収縮時には IL-6、IL-15、VEGF など様々な生理活性物質が産生されることから、骨格筋には内分泌器官としての側面もあることが指摘されている (Manabe, *J. Phys. Fitness Sports Med.*, 2012)。これらの分子は、糖代謝、脂質代謝、免疫系、さらには骨代謝など多くの生体システムを調節することが報告されている (Benatti, *Nat. Rev. Rheumatol.*, 2015)。

骨は、リン酸カルシウム塩であるハイドロキシアパタイトとコラーゲン線維からなり、硬さとしなやかさを併せ持つ運動器の構成要素である。骨の主たる機能は生体を衝撃から保護し、運動を可能にすることである。近年、骨が産生する FGF23 やオステオカルシンが、エネルギー代謝やミネラルの制御に関与することが明らかになり (Roosa, *J. Bone Miner. Res.*, 2011; Karsenty, *Cell*, 2016)、骨の運動器以外の機能にも注目が集まっている。

以上のように、筋や骨のさまざまな機能やその分子メカニズムが明らかにされてきたものの、両者は独立した基礎・臨床医学の研究分野を構成し、それぞれが個別に検討されてきた。しかし、骨と筋のどちらか一方が強靱でもう一方は脆弱であるという状況はなく、両者の制御は同調している (Elkasrawy, *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.*, 2010; Terracciano, *Osteoporos. Int.*, 2013)。顎口腔系においては、咀嚼運動の低下が筋量と顎骨の骨密度の両方を低下させ、咀嚼運動の増加は筋量を増加させるとともに骨形態にも影響することがわかっている (Fukushima-Nakayama and Ono, *J. Dent. Res.*, 2017)。したがって、筋や骨は独立した組織として扱われるべきではなく、力学刺激下で両者がお互いをどのように制御するのかを検討すべきである。筋や骨が産生する因子は多数報告されているが、その中の何が運動に伴う組織の再構築に重要であるかは不明である。

本研究課題では、筋組織と骨組織が運動に伴い産生し、相互に制御する因子、すなわち“運動器間相互制御因子=インターロコモレギュレーター”の本体を明らかにし、相互制御機構の実態を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 咀嚼強化マウスモデルの確立

本研究においては、咀嚼運動による顎口腔組織への力学刺激を増加させるために、通常より硬度が高い飼料を用いてマウスを飼育し、そのマウスの表現系解析とそのメカニズムの解析を行った。粉末飼料を用いた信頼性の高い咀嚼運動の低下モデルがすでに確立されている一方、高硬度飼料を用いたモデルの報告はこれまでほとんどない上、熱処理による栄養成分の変性が問題であった。そこで、まずは高硬度飼料の作製を行った。

(2) 咀嚼強化モデルの解析

作出した咀嚼強化モデルマウスの解析を行った。咀嚼運動の変化に伴う咀嚼筋組織の変化を筋重量と筋線維の幅径により検討した。骨組織の変化については、マイクロ CT を用いた形態学的評価と免疫組織学的解析を行った。

筋組織や骨組織における遺伝子発現の解析を実施し、運動刺激によって発現が変動するインターロコモレギュレーターの候補因子を検討した。

(3) 培養細胞を用いた解析

*In vivo*の力学刺激付加実験により筋や骨で誘導される遺伝子発現の変動は、力学刺激の筋や骨の構成細胞に対する直接的な応答だけではなく、間接的な応答の結果である可能性が否定できない。そこで、運動刺激により直接誘導されるインターロコモレギュレーター候補因子を探索するために、培養細胞に対して伸展刺激を付加し、遺伝子発現を解析した。

(4) 制御因子の生体レベルでの機能解析

上記の過程で抽出された分子の機能を生体レベルで検討するため、候補因子の欠損マウスを作出した。これらのマウスの筋や骨の表現型を解析した。

(5) 筋や骨の薬物による人為的強化法の探索

咀嚼によって顎骨や咀嚼筋が強化されるメカニズムが解明されれば、臨床において咀嚼トレーニングを推進する原動力になることが期待される。しかし、嚥下障害や精神・神経疾患がある場合、咀嚼トレーニングを実施することは困難である。そこで、薬物により筋と骨を強化するアプローチも行った。現時点では単剤で筋と骨の両方を強化する薬物は存在しないことから、そのような薬剤を *in vitro* スクリーニングによって探索し、さらに *in vivo* での薬効試験を実施した。

4. 研究成果

(1) 咀嚼強化マウスモデルの確立

実験マウスの飼育に際しては、通常ペレット飼料を用いる。このペレットの組成を変化させることで硬度が 3 倍の飼料を作出した。マウスにこの高硬度飼料を与えたところ、咀嚼回数が増加し、咬筋の筋線維幅径が増大した。このことから、咀嚼強化マウスモデルが確立したといえる。

(2) 咀嚼強化モデルの解析

作出した咀嚼強化モデルマウスの顎骨を解析するに先立ち、コンピューターシミュレーションを行った。その結果、下顎角の突出、下顎枝高の減少がおり、咀嚼に伴い下顎骨に生じる応力が減少することが予想された。マイクロ CT 解析により下顎骨の形態を解析したところ、咀嚼強化モデルマウスでは通常飼料で飼育したマウスよりも下顎角が突出、下顎枝高が減少しておりシミュレーションの結果と一致した。さらに、歯の解析も行ったところ、臼歯の歯軸傾斜の増加も認められた。

咀嚼強化による咬筋筋線維幅径の増大や顎骨の形態変化に寄与する分子を探索したところ、下顎骨の咬筋腱付着部において IGF-1 遺伝子 (*Igf1*) 発現が上昇していた。免疫組織学的解析により、咀嚼強化モデルマウスの下顎骨の咬筋腱付着部の骨細胞において、IGF-1 産生が増加することが明らかになった。また、咬筋では IGF-1 受容体の発現が増加しており、筋線維幅径の増大が IGF-1 シグナルの増強によるものである可能性が示唆された。以上より、顎口腔系におけるメカニカルストレスが顎骨骨細胞における IGF-1 産生を増加させ、これがインターロコモレギュレーターとして作用し、顎骨や咀嚼筋を強化すると考えられた。

(3) 培養細胞を用いた解析

*In vivo*の解析から得られたインターロコモレギュレーターが、力学刺激により直接誘導される分子であるかを検討するために、細胞の伸展培養を行い、それらの細胞の遺伝子発現を解析した。前項で見出された *Igf1* は骨細胞の伸展培養により上昇することが示された。*In vitro* の添加実験により、IGF-1 は腱細胞の骨芽細胞への分化を誘導することが確認された。伸展培養された骨細胞の培養上清を腱細胞に添加したところ骨芽細胞分化が促進し、この効果が抗 IGF-1 中和抗体により消失したことから、骨細胞由来の IGF-1 は腱細胞の骨芽細胞分化を促進することが示された。

伸展培養系から得られた遺伝子発現プロファイルから *Igf1* 以外のインターロコモレギュレーター候補分子の探索を行い、力学刺激に伴い発現が変動する遺伝子の中から、サイトカイン作用が予想される分子、*Interleukin 1 (Ilr1)* および *Ilr2* を見出した。ILR1 を骨芽細胞分化系に添加したところ分化が促進し、破骨細胞分化系に添加したところ分化が抑制された。以上より、ILR1 は骨を強化するサイトカインであると考えられた。

(4) 制御因子の生体レベルでの機能解析

前項で見出された *Ilr1* および *Ilr2* について、生体レベルでの分子機能を検討するために *lox* マウスを作出した。*Ilr1-lox* マウスと骨や筋で特異的に *Cre* リコンビナーゼを発現するマウスを交配することにより、それらの細胞・組織で特異的に *Ilr1* を欠損するマウスを数種類作製した。これらの中で、筋細胞特異的 *Ilr1* 欠損マウスでは骨量が増加した。したがって、筋由来の ILR1 は骨を脆弱化することが示された。これは、前項の *in vitro* の実験と反対の結果であった。ILR1 は *in vivo* では直接作用によって骨を強化する以上に、間接作用によって骨を脆弱化する可能性が考えられた。

同様に、*Ilr2-lox* マウスを作出した。このマウスと骨芽細胞系列の細胞で特異的に *Cre* リコンビナーゼを発現するマウスを交配することによって、骨芽細胞特異的に *Ilr2* を欠損するマウス

スを得た。このマウスでは筋量の低下傾向が認められ、トレッドミル走行試験やグリップテストにおいても運動機能の低下傾向が見られた。このことから、骨由来の **ILR2** は筋を強化すると考えられた。

(5) 骨や筋の薬物による人為的強化法の探索

単独で骨や筋を強化する薬剤、すなわち運動器強化薬をハイスループットスクリーニングにより探索した。まずは、筋細胞分化、骨芽細胞分化、破骨細胞分化をそれぞれ定量的かつ半自動的に評価できるスクリーニング法を開発した。これらの方法を用いて、ケミカルライブラリより段階的に運動器強化薬の候補化合物を抽出した。その結果、筋細胞分化を促進、骨芽細胞分化を促進、破骨細胞分化を抑制する化合物 **locamidazole (LAMZ)** を見いだした。

LAMZ の *in vivo* での薬効を確認すべく経口、皮下注射、塗布という異なるルートで投与したところ、血中および標的臓器の筋と骨への移行が認められた。2週間の投与により体重の変化や血液学的な異常といった明らかな副作用は見られなかった。組織学的解析、放射線学的解析により、**LAMZ** を投与したマウスでは筋と骨の両方が強化され、トレッドミル走行試験やグリップテストにおいても運動機能の向上が認められた。以上より、**LAMZ** は運動器強化薬として作用することが示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ono Takehito, Hayashi Mikihiro, Sasaki Fumiyuki, Nakashima Tomoki	4. 巻 40
2. 論文標題 RANKL biology: bone metabolism, the immune system, and beyond	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Inflammation and Regeneration	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41232-019-0111-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kim Yusoon, Hayashi Mikihiro, Ono Takehito, Yoda Tetsuya, Takayanagi Hiroshi, Nakashima Tomoki	4. 巻 -
2. 論文標題 Suppression of hematopoietic cell kinase ameliorates the bone destruction associated with inflammation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Modern Rheumatology	6. 最初と最後の頁 1~8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/14397595.2018.1553266	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masamu Inoue, Takehito Ono, Yoshitaka Kameo, Fumiyuki Sasaki, Takashi Ono, Taiji Adachi, Tomoki Nakashima	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Forceful mastication activates osteocytes and builds a stout jawbone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1~12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-40463-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 小野 岳人、中島 友紀	4. 巻 48(6)
2. 論文標題 矯正歯科治療における骨リモデリング	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 内分泌・糖尿病・代謝内科	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小野 岳人
2. 発表標題 骨補填材料に求められる免疫学的要件
3. 学会等名 第41回 日本バイオマテリアル学会大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野 岳人, 井上 雅, 佐々木 文之, 中島 友紀
2. 発表標題 咀嚼強化は骨細胞のサイトカインバランスを調節し頑強な顎骨を形造る
3. 学会等名 第5回 日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 維, 小野 岳人, 中島 友紀, 小野 卓史
2. 発表標題 成長期の咀嚼強化が下顎骨に与える影響の解析
3. 学会等名 第78回 東京矯正歯科学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 林 幹人, 金 裕純, 小野 岳人, 高柳 広, 中島 友紀
2. 発表標題 非受容体型チロシンキナーゼHck阻害剤は炎症に関連した骨破壊を抑制する
3. 学会等名 第5回 日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尹 文強, 岡本 一男, 寺島 明日香, 小野 岳人, 高柳 広
2. 発表標題 外傷誘導性異所性骨化モデルマウスの確立
3. 学会等名 第5回 日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 井上 維, 小野 岳人, 中島 友紀, 小野 卓史
2. 発表標題 成長期の咀嚼強化が下顎骨に与える影響の解析
3. 学会等名 日本矯正歯科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野 岳人
2. 発表標題 骨細胞による顎骨リモデリング制御
3. 学会等名 口腔器官の再構築から器官の発生・再生の統一原理の解明 2018年度セミナーシリーズ (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小野 岳人, 井上 維, 佐々木 文之, 中島 友紀
2. 発表標題 咀嚼強化は骨細胞のサイトカインバランスを調節し頑強な顎骨を形造る
3. 学会等名 日本骨免疫学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中島 友紀, 小野 岳人, 林 幹人	4. 発行年 2019年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 213
3. 書名 運動器産生分子がつなぐ臓器連環と動的恒常性	

〔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
---------	---------