

平成22年5月21日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19390501

研究課題名（和文）加齢が舌、咀嚼筋の成体幹細胞に及ぼす影響

研究課題名（英文） The effect of ageing on the adult stem cells of tongue and masticatory muscles

研究代表者：

森戸 光彦（MORITO MITSUHIKO）

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：30089429

研究成果の概要（和文）：本研究により筋萎縮の程度とインスリン様増殖因子受容体1を介した、骨格筋の成体幹細胞の活性に何らかの関係があること、マイオスタチンは成体幹細胞の活性を調節し、骨格筋細胞の分化速度を減速させ生理的な範囲に収める機能を果していること、成体幹細胞の活性、増殖、分化状態に及ぼすトリグリセロールの影響は小さいことが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The present results suggest that the extent of skeletal muscle atrophy is associated with activity of adult stem cells through IGF1, myostatin down-regulate the velocity of differentiation of skeletal muscle cell lineage via activity of adult stem cell and the influence of triglycerol on the activity, proliferation and differentiation of adult stem cells is limited.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2008年度	2,900,000	870,000	3,770,000
2009年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

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：成体幹細胞、骨格筋、インスリン様増殖因子、マイオスタチン、トリグリセロール

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、舌筋や咀嚼筋の萎縮による筋力低下が考えられる。一般的に骨格筋萎縮の主要な原因には、骨格筋の再生、修復、肥大に重要な役割を果たしている筋衛星細胞数や活性の

低下が考えられている。筋衛星細胞とは、筋膜と基底間に存在する単核、静止期にある成体幹細胞の一種であり、損傷、荷重、薬物などの様々な刺激に反応して活性化され、増殖を開始し、筋線維の再生、修復、肥大を引き起こす（Charge and Rudnicki, *Physiol Rev* 84:209-238, 2004）。また、最近ではフローサ

イトメトリーの進歩により、衛星細胞とは異なる細胞集団が筋線維の再生、修復、肥大に関与しているという報告もある (Wagers and Conboy, *Cell* 122:659-667, 2005)。加齢に伴い筋組織におけるこれらの衛星細胞を含めた成体幹細胞数や活性が減少するために、筋線維の再生、修復能が低下するために、加齢による筋萎縮が起こると考えられる。舌、咀嚼筋の生化学、生理学、発生学的な性質は体幹や四肢の筋とは大きく異なっていることが知られている (Yamane, *Cell and Tissue Res*, 322: 183-189, 2005)。例えば、Superfast myosin など咀嚼筋に特異的な筋蛋白質アイソフォームが存在する、体肢筋では成体になると消失する myosin、tropomyosin, AChR subunit の胎仔型アイソフォームが成体になっても残存している (A. d'Albis et al., *Eur J Biochem* 156, 291-296, 1986)。また、我々は咀嚼筋の一種である咬筋に含まれる成体幹細胞の一種である衛星細胞のプールが体肢の筋と比較して大きいことをすでに報告している (A. Yamane et al., *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C42-48, 2005)。

これらのことから、舌、咀嚼筋の成体幹細胞に及ぼす加齢の影響は、体肢の筋とは異なる可能性が考えられる。しかし、加齢が舌、咀嚼筋の成体幹細胞に及ぼす加齢の影響はまったくといってよいほど調べられていない。

2. 研究の目的

本研究においては加齢が舌、咀嚼筋の成体幹細胞に及ぼす影響を明らかにし、さらに成体幹細胞の活性化、増殖、分化を促進、抑制する薬物を探求し、加齢に伴う筋萎縮を防止する薬物やサプリメントを開発するための基礎的なデータを得ることが目的である。この目的を達成するために以下の実験を行った。

- (1) 骨格筋の成体幹細胞はインスリン様増殖因子 (IGF) によって調節されている可能性がある。よって本年度は IGF シグナルについて研究を行った。IGF はインスリン様増殖因子受容体 1 (IGFR1) を介して細胞内にシグナルが伝達される。そのシグナルが低下することにより筋萎縮が起こると考えられている。老化に伴い顕著な筋萎縮が起きるとはよく知られているが、老化による筋萎縮と IGF シグナルの関係は明らかになっていない。本研究においては、この関係を明らかにするために、老化促進マウス (Klotho) の咬筋、舌筋、腓腹筋における IGFR1 の発現変化を調べた。
- (2) クレブテロールなどの $\beta 2$ アゴニストは骨格筋量を増大させることが良く知られている。マイオスタチンは骨格筋発生、発達の負の制御因子として知られている。これらの因子は骨格筋の成体幹細胞であ

る衛星細胞の活性化、増殖、分化を調節している可能性がある。本研究では、クレブテロールによる筋量調節機構におけるマイスタチンの役割について検討した。

- (3) 成体型幹細胞の分化状態は存在しているニッチェの環境に大きく影響されることはよく知られている。また加齢により骨格筋組織にはトリグリセロール (TG) 蓄積がおこることは報告されている。TG の蓄積がラット骨格筋に及ぼす影響を調べた。

3. 研究の方法

- (1) 実験には 6 週齢の Klotho 及び正常マウス各 6 匹を用いた。咬筋、舌筋、腓腹筋を摘出し、湿重量を測定した。Real time PCR 法によりこれらの筋における IGFR1 mRNA 発現量を測定した。
- (2) 培養筋芽細胞系 C2C12 をクレブテロール単独、マイオスタチンのアンタゴニストである ACVR2B/Fc とクレブテロールで 4 日間処理した骨格筋分化マーカーである骨格筋クレアチンキナーゼの蛋白質発現をウエスタンブロッティング法により調べた。
- (3) 12 週齢、雄性 Wister 系ラットに高脂肪食 (HighFatDiet32、日本クレア) またはコントロール食 (LowFatDiet、日本クレア) を与えた。高脂肪食給餌開始から 1、5、10 週後にラットを安楽死させ、ヒラメ筋などの骨格筋を摘出した。骨格筋標本のほぼ中央付近の凍結標本を製作し、Oil Red O 染色法を行い、観察した筋線維数に対する TG の蓄積が認められる筋線維数の割合の経時的変化を観察した。ついで、Real-time PCR 法を用いて CPT-1 β 、Insulin receptor などのエネルギー代謝関連遺伝子 mRNA 発現量の解析を行った。

4. 研究成果

- (1) Klotho マウスの咬筋、舌筋、腓腹筋の湿重量は、正常マウスと比較して、それぞれ 71%、45%、72% という顕著な減少を示した ($p < 0.01$)。体重当たりの相対的な筋重量は、Klotho マウスの咬筋、腓腹筋では、正常マウスと比較してそれぞれ 19% (有意差なし)、23% ($p < 0.05$) の減少を示したが、舌筋は逆に Klotho マウスの方が正常マウスより 51% 大きくなっていた ($p < 0.01$)。IGFR1 mRNA 発現量は、Klotho マウスの咬筋、腓腹筋では、正常マウスと比較してそれぞれ 1100%、71% の増加を示したが ($p < 0.01$)、舌筋では Klotho マウスと正常マウス間で有意な差は認められなかった。老化が筋萎縮に及ぼす影響は、咬筋、腓腹筋と比較して舌筋が小さいことが示され

た。筋萎縮の程度と IGFRI mRNA 発現の間に何らかの関係があると考えられる。

- (2) 処理開始 2 日後において、クレンプテロール (Clen) 処理群における骨格筋クレアチンキナーゼ (MCK) の発現は対照群と比較して約 2 倍の増加を示したが、4 日後においては対照群における MCK の発現が増加したため、Clen 処理群と対照群の間の有意な差は消失した。マイオスタチンの発現は、処理開始 2 日後において Clen 処理群のほうが対照群よりも 3~4 倍大きかったが、4 日後においては、対照群における Mstn の発現が増加したため、Clen 処理群と対照群の間の有意な差は消失した。Clen+ ACVR2B/Fc 処理群においては MCK の発現が Clen 処理群と比較して 3~4 倍増加していたが、2 日後には Clen 処理群の 80~50% まで減少した。マイオスタチンは成体幹細胞の活性を調節し、Clen により促進された C2C12 の分化速度を減速させ生理的な範囲に収める機能を果していることが示唆された。
- (3) 高脂肪食給餌開始 1、5、10 週後では、高脂肪食群においてはそれぞれ 34%、35%、63% のヒラメ筋線維に TG の蓄積が認められた。これに対してコントロール食群ではそれぞれ 22%、18%、14% であり、5、10 週後において、コントロール食群と比較して高脂肪食群に有意な増加が認められた ($p < 0.01$)。CPT-1 β 、Insulin receptor mRNA 発現量のみが、高脂肪食群とコントロール食群の間に有意な差が認められた。これ以外の調べたエネルギー代謝関連遺伝子の発現量にコントロール食群と高脂肪食群の間に有意な差は認められなかった。ラットのヒラメ筋におけるエネルギー代謝関連遺伝子の発現量に及ぼす TG 蓄積の影響は比較的早期に現れることが明らかになった。またその影響は予想より小さかった。成体型幹細胞の分化状態に及ぼす TG の影響は小さいと思われる。

5. 主な発表論文等 (計 13 件)

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

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. TGF β 3 is expressed in differentiating muscle of the embryonic mouse tongue. *Int. J. Dev. Biol.* 54(1):221-226, 2010
- ④ KATAYMA, 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 β_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 TAI, T., MORITO, M. (他 7 名、5 番目): Protective effect of lecithinized SOD on reactive oxygen species-induced xerostomia. *Radiation Res.* 172:331-3381, 2009
- ⑨ IKEDA, T., MORITO, M. (他 5 名 6 番目): The inhibition of apoptosis by glycyrrhizin in hepatic injury induced by injection of lipopolysaccharide /D-galactosamine in mice. *Arch. Histol. Cytol.* 71(3):163-167, 2008
- ⑩ 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
- ⑪ 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
- ⑫ 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

- ⑬ 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. Gerodontol. 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 金子周平、飯田良平、菅 武雄、福井只美、山根 明、森戸光彦. トリグリセロール蓄積がラット骨格筋のエネルギー代謝関連遺伝子発現に及ぼす影響. 第32回日本分子生物学会年会、横浜パシフィコ、2009年12月12日
- ④ 鈴木栄里佳、福井只美、山根 明、中村芳樹. 血小板由来増殖因子アンタゴニストが培養マウス舌筋細胞の増殖、分化に及ぼす影響. 第46回日本口腔組織培養学会学術大会、昭和大学、東京、2009年12月5日
- ⑤ 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
- ⑥ 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
- ⑦ 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
- ⑧ 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

- ⑨ 山根 明、金子周平、飯田良平、菅 武雄、森戸光彦. マイオスタチンのアンタゴニストであるActRIIB/Fcはクレンブテロールにより誘導されるC2C12の分化を一時的に加速した. 第82回日本薬理学会学会年会、パシフィコ横浜、2009年3月17日
- ⑩ 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
- ⑪ 金子周平、飯田良平、菅 武雄、斎藤 高、福井只美、山根 明、森戸光彦. 高脂肪食がラット咬筋におけるミオシン重鎖、アセチルコリン受容体サブユニットに与える影響. 第68回鶴見大学歯学会例会、鶴見大学会館、横浜、2008年12月20日
- ⑫ 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
- ⑬ 山根 明、金子周平、飯田良平、菅 武雄、森戸光彦. マイオスタチンはクレンブテロールによる培養筋芽細胞C2C12の分化促進に拮抗している. 第45回日本口腔組織培養学会、松本歯科大学、2008年11月15日
- ⑭ 山根 明、福井只美. 分化過程のマウス舌筋細胞におけるTGF β 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
- ⑮ 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
- ⑯ 山根 明、飯田良平、菅 武雄、森戸光彦. マイオスタチンはクレンブテロールによる筋量増大調節機構に関与している. 日本動物学会第79回大会、福岡大学、2008年9月5日
- ⑰ 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
- ⑱ 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

- ①⑨ 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
- ②⑩ 山根 明、菅 武雄、篠原 暁子、金子 夏樹、森戸光彦. マイオスタチンはクレンブテロールが誘導する培養筋芽細胞 C2C12 の分化促進を調節している. 第 81 回日本薬理学会学会年会、パシフィコ横浜、2008 年 3 月 18 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：

森戸 光彦 (MORITO MITSUHIKO)
鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号：30089429

(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

福井 只美 (FUKUI TADAYOSHI)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：10267544

菅 武雄 (SUGA TAKEO)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：40247333

(3) 連携研究者

()

研究者番号：