

機関番号：3 2 7 1 0

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20592190

研究課題名(和文) 舌筋、咀嚼筋発生における microRNA の機能

研究課題名(英文) The function of microRNA during the development of tongue and masseter muscles

研究代表者

山根 明 (YAMANE AKIRA)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：20166763

研究成果の概要(和文): マウス胎仔の舌筋発生過程における microRNA (miRNA) の発現変化を解析した。miR-1、-24 は胎齢が進むにつれ発現量が増加し、舌筋細胞の分化が活発に進行している胎齢 13～15 日には大量に発現していた。逆に、miR-199a3p、199a5p の発現量は胎齢 11 日では最も高く、その後、胎齢が進むにつれて減少した。以上の結果から miR-1、24 が舌筋細胞の分化調節に関与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文): In the present study, the expressions of microRNA (miRNA) was analyzed during the embryonic development of mouse tongue muscle. The expression levels of miR-1 and 24 increased with the embryonic development and peaked between embryonic day (E) 13 and 15 during which tongue muscle cells are actively differentiating. On the contrary, those of miR-199a and 199b peaked at the beginning of the tongue muscle development (E11) and decreased thereafter. These results suggest that miR-1 and 24 are involved in the differentiation of tongue muscle cells.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・機能系歯科基礎学

キーワード：miRNA、舌筋、咀嚼筋、マイクロアレイ、Real-time PCR、in situ hybridization

## 1. 研究開始当初の背景

microRNA(miRNA)は、21～23塩基対からなる機能性 non-coding RNA であり、複数のタンパク質と複合体を形成して標的となる mRNA に結合し、その翻訳を抑制する。加えて、RNAi と類似の機構により標的 mRNA を分解する場合もあると考えられている。標的となる mRNA は、その認識が配列の完全一致だけでなく、ミスマッチも含まれるため複数ある。このように、miRNA が

多くの mRNA を制御していることから、細胞増殖・アポトーシス・発生と分化・代謝などの多岐にわたり、その異常は癌などの疾患とも密接に関わっており、多くの生命現象に深く関わっていることが明らかになっている。

骨格筋の発生においても、おもに C2C12 などの培養筋芽細胞を用いた研究から、miR-1、miR-133、miR-181、miR-206 などの miRNA が重要な役割を果たしていること

がすでに報告されている (Naguibneva et al., Nature Cell Biol 8:278-284, 2006. Chen et al., Nature Genet 38: 228-233, 2006 など)。舌筋、咀嚼筋は体幹や四肢の骨格筋とは異なる発生学的、生理学的、生化学的特徴をもっている (Yamane, Cell and Tissue Res 322: 183-189, 2005、Noden, Francis-West, Dev Dyn 235: 1194-1218, 2006)。また、咀嚼筋、舌筋などは生存する上に非常に重要であり、これらの筋に障害が起こると直ちに日常生活に支障が生じる。しかし、これらの筋は歯科以外の筋研究者の興味はひかず、研究者数も少なく、研究も活発とは言えない状況である。

## 2. 研究の目的

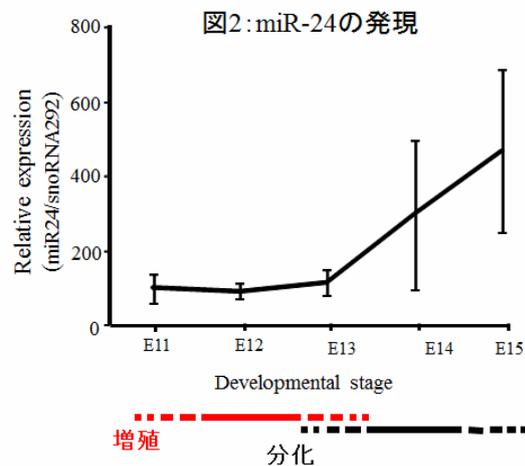
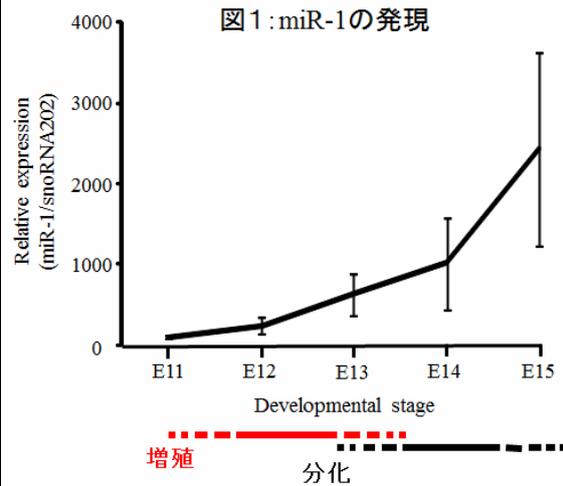
本研究の目的は舌筋、咀嚼筋の発生における miRNA の機能を解析し、体肢の筋と比較することにより咀嚼筋との違いを明らかにする。さらに舌筋、咀嚼筋の発生における miRNA の機能を促進または抑制する薬物を探求し、咀嚼筋の再生療法、筋萎縮を防止する薬物やサプリメントを開発するための基礎的なデータを得ることである。

## 3. 研究の方法

胎齢 11、12、13、14、15 日のマウス胎仔から舌を摘出し、miRNA アレイおよび Real-time PCR 用の標本は -80 で凍結保存した。また、In situ hybridization 用の標本は 70%エタノールで固定した。Real-time PCR のために miRNA を抽出し、それぞれの miRNA に特異的なプライマーを結合させ逆転写を行った。逆転写後、それぞれの miRNA に特異的なフォワードプライマーと、逆転写で付加した人工的な配列に特異的なリバースプライマーを用いて Real-time PCR を行い、miR-1、24、133、181、199、208 の成熟 miRNA の発現量を測定した。snoRNA202 を用いて規格化を行った。In situ hybridization 法のために miR-1、24 に特異的なプローブを用いて局在変化の解析を行った。

## 4. 研究成果

発生過程にある舌筋、咀嚼筋における miRNA の発現パターンを、miRNA アレイを用いて網羅的に解析を行った。その結果、舌筋細胞の分化が活発に進行している胎齢 13~15 日のマウス舌に、これまで骨格筋発生に関与が報告されていない miR199 の顕著な発現が観察された。



Real-time PCR 法を用いた解析より以下のことが明らかになった。miR-1(図 1)、miR-24(図 2)は胎齢が進むにつれ発現量が増加し、舌筋細胞の分化が活発に進行している胎齢 13~15 日には大量に発現していた。逆に、miR-199a3p、199a5p の発現量は胎齢 11 日では最も高く、その後、胎齢が進むにつれて減少した。miR-133a の発現量は胎齢 11~13 日に増加した後、減少した。miR-181a の発現量は胎齢 11~15 日において大きな変化は観察されなかった。

In situ hybridization 法を用いた解析により miR-1、24 は舌筋に発現していることが示された。

以上の結果から miR-1、24 が舌筋細胞の分化調節に関与している可能性が示唆された。

## 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 13 件)

1. IIDA, R., KANEKO, S., SUGA, T., MORITO, M. and YAMANE, A.: Autophagic-lysosomal pathway functions in the masseter and tongue muscles in the klotho mouse, a mouse model for aging. *Mol. Cell. Biochem.* 348(1):89-98, 2011 査読有
2. KATAYAMA, 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 査読有
3. YAMANE, A., FUKUI, T., SUGA, T., IIDA, R. and MORITO, M.: TGF $\beta$ 3 is expressed in differentiating muscle of the embryonic mouse tongue. *Int. J. Dev. Biol.* 54(1):221-226, 2010 査読有
4. 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.* 293(8):1408-1415, 2010 査読有
5. 飯田良平、菅 武雄、山根 明、森戸光彦: Klotho 遺伝子突然変異マウス骨格筋におけるインスリン様増殖因子およびその受容体 mRNA 発現. *鶴見歯学*, 36(2):95-102, 2010 査読有
6. SHINOHARA, A., TAKAKURA, J., YAMANE, A. and SUZUKI, M.: Effect of the classic 1 week glycogen-loading regimen on the fat-loading in the rat and human. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 56(5):299-304, 2010 査読有
7. 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.* 20(2):122-129, 2010 査読有
8. SAITO, T., YAMANE, A., KANEKO, S., OGAWA, T., IKAWA, T., SAITO, K. and SUGISAKI, M.: Changes in the lingual muscles of obese rats induced by high-fat diet. *Arch. Oral Biol.* 55(10) 803-808, 2010 査読有
9. ISHIKAWA, C., OGAWA, T., IKAWA, T. and YAMANE, A.: Effects of clenbuterol, a

$\beta$ 2-adrenergic agonist, on sizes of masseter, temporalis, digastric, and tongue muscles. *Open Dent. J.* 3:191-196, 2009 査読有

10. 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 査読有
11. 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 査読有
12. 山根 明: シリーズ 分析機器 何がわかるか 「リアルタイム PCR」DE 171: 30-32, 2009 査読有
13. 山根 明: ビスホスホネートの薬理, 歯界展望 111(6):1094-1097, 2008 査読無

〔学会発表〕(計 24 件)

1. 山根 明、鈴木栄里佳、青山佳代子、福井只美、中村芳樹: マウス舌横紋筋細胞の最終分化過程における血小板由来増殖因子の役割. 第 33 回日本分子生物学会年会、第 83 回日本生化学会大会合同学会、神戸ポートアイランド、2010 年 12 月 7 日
2. YAMANE, A., NARIYAMA, M., KOTA, Y. and ASADA, Y.: Lack of teeth and expression of myosins in masticatory muscles. 58th annual meeting of JADR. Kyushu Dental College, Kitakyushu, November 20, 2010
3. 福井只美、鈴木栄里佳、青山佳代子、山根 明、中村芳樹: BMP-2 は TIMP-1、TIMP-13 の発現を変化させることによってマウス舌側溝形成を調節している. 第 69 回日本矯正歯科学会大会、パシフィコ横浜、2010 年 9 月 27~29 日
4. 青山佳代子、鈴木栄里佳、福井只美、山根 明、中村芳樹: マウス胎仔舌筋細胞の最終分化過程における BMP-2 の機能. 第 52 回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会、タワーホール船堀、東京、2010 年 9 月 22 日
5. UMEKI, D., ARAI, C., FUKUI, T.\*, NAKAMURA, Y.\*, YAMANE, A., OHNUKI, Y. and SAEKI, Y.: Effects of clenbuterol and dexamethasone on rat masseter muscle. 88th General Session & Exhibition of the IADR. Centre de Convencions Internacional Barcelona, Barcelona, Spain, July 14-17, 2010
6. NARIYAMA, M., KOTA, Y., YAMANE, A.,

- TOMOHIRO, T. and ASADA, Y.: Effects of lack of occlusal activity on masticatory myogenesis. 88th General Session & Exhibition of the IADR Centre de Convencions Internacional Barcelona, Barcelona, Spain, July 14-17, 2010
7. SAEKI, Y., OHNUKI, Y., YAMANE, A., UMEKI, D., FUKUI, T. and NAKAMURA, Y.: Stretch-induced morphology adaptation in rat masseter muscle. 88th General Session & Exhibition of the IADR. Centre de Convencions Internacional Barcelona, Barcelona, Spain, July 14-17, 2010
  8. 成山明具美、古宇田ゆき、田島 格、友廣忠文、山根 明、朝田芳信: マウス第三臼歯欠如が咀嚼筋の発達過程に及ぼす影響. 第48回小児歯科学会、名古屋国際会議場、2010年5月19-20日
  9. 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
  10. 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、東京慈恵会医科大学、2009年12月19日
  11. 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
  12. 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
  13. KOTA, Y., YAMANE, A. and ASADA, Y.: Contribution of occlusal activity on expression of MyHC in masseter muscle. 50th Korean academy of pediatric dentistry, SETEC, Seoul, Korea, April 24-26, 2009
  14. 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
  15. 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
  16. 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
  17. 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
  18. 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
  19. 山根 明、福井只美: 分化過程のマウス舌筋細胞におけるTGF 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
  20. 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
  21. 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
  22. 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
  23. 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
  24. 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
- [図書](計1件)  
山根 明: スタディ歯科薬理学、永末書店 2009年

〔その他〕

ホームページ等

<http://ccs.tsurumi-u.ac.jp/dental/kouza/butsuri.htm>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山根 明 (YAMANE AKIRA)

鶴見大学・歯学部・教授

研究者番号：20166763

### (2) 研究分担者

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・講師

研究者番号：40247333

### (3) 連携研究者

なし