

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22592170

研究課題名（和文） 非咬合状態がマウス咀嚼筋のアセチルコリン受容体クラスター形成に及ぼす影響

研究課題名（英文） The effects of occlusal activity on AChR clustering in mouse masticatory muscles

研究代表者

石川 千恵子 (ISHIKAWA CHIEKO)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：70176163

研究成果の概要（和文）：神経筋接合部においてアセチルコリン受容体(AChR)はクラスターを形成しており、この AChR のクラスターに ACh が結合すると筋収縮が引き起こされる。本研究においては歯の欠損が AChR のクラスター形成に及ぼす影響について調べた。その結果、歯の欠損は AChR クラスターの成熟に大きな影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) clustering is a key event in the synaptogenesis of the neuromuscular junction (NMJ) for the efficient transmission of neural signals from motor neurons to skeletal muscle. The present study attempted to elucidate the contribution of occlusion to the clustering of nAChR in the NMJ of the masseter, with mi/mi as a model system. The present results indicate abnormal formation of the nAChR cluster in the NMJ of the masseter of mi/mi, suggesting that occlusion is essential for the normal progress of nAChR clustering in the NMJ.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯学

キーワード：歯科補綴学一般

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、舌筋や咀嚼筋の筋力低下が考えられる。この高齢者における筋力の低下の大きな原因の一つとして、齶蝕や歯周病による歯の喪失により非咬合状態になることが挙げられる。また、成長期において齶蝕や無汗型

外胚葉異形成症などの疾患や事故などの外傷によって歯が欠損し咬合状態が悪化することにより引き起こされた舌、咀嚼筋の発育・発達異常が、顎全体の正常な発育・発達に大きな影響を及ぼすことが考えられる。咬合状態の変化とそれに伴う舌、咀嚼筋の性質の変化は顎のみならず、全身の健康に大きな影響を及ぼすと思われる。

咬合状態と舌、咀嚼筋との関係を調べるために、我々のグループは多くの研究を行っている。例えば、非咬合状態が舌、咀嚼筋に与える影響を調べるために、マウスに与える飼料を固形から液状に転換する実験を行い、収縮蛋白質の一種であるミオシンの発現変化 (Saito et al., *Archs Oral Biol Archs oral Biol.* 47:109-115, 2002)、インスリン様増殖因子 I (Insulin-like growth factor) の発現変化 (Urushiyama et al., *Cell Tissue Res* 315:97-105, 2004) が起こることをすでに報告している。しかし、飼料を転換する実験は、咬合を完全に除くことができず、再現性に乏しいという欠点がある。機械的に歯を除去する実験は動物に大きな侵襲を与え、第三臼歯などの一部の歯を除去することは殆ど不可能である。

そこで本研究において、我々は歯が萌出しない小眼球症マウス(mi/mi マウス)をモデル動物として用いて、非咬合状態が咀嚼筋の性質に与える影響の検討を行う。小眼球症マウスは MITF (microphthalmia-associated transcription factor) 遺伝子に異常をもつ自然発症突然変異マウスである。MITF はベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス (bHLH) 構造をもつ転写調節因子で、色素細胞、肥満細胞、破骨細胞などの発生に非常に重要な役割を果たしていることが知られている。我々の使用する mi/mi マウスは MITF 遺伝子 bHLH 構造中のアルギニンが欠失しているため DNA 結合能を持たない MITF が発現している突然変異である。このマウスは小眼球症以外に難聴、色素異常によるアルビノ、大理石骨症などの異常が報告されている。破骨細胞が正常に発生しないため、右図に示すように上、下顎のすべての歯が萌出していない。よってこのマウスをモデル系として用いることにより、非咬合状態が咀嚼筋の性質に及ぼす影響を明らかにすることが可能である。

神経筋接合部においてアセチルコリン (ACh) 受容体はクラスターを形成しており、この ACh 受容体のクラスターに ACh が結合すると筋収縮が引き起こされる。最近、研究代表者らは mi/mi マウスを用いて、歯の欠損による咬合状態の変化が咀嚼筋の神経筋接合部における ACh 受容体サブユニットの発現に大きな影響を及ぼしていることを明らかにした。(KOTA, Y., YAMANE, A., TOMOHIRO, T. and ASADA, Y. *J. Dent. Res.* 88(8):768-772, 2009)

この結果は、歯の欠損による咬合状態の変化が咀嚼筋の神経筋接合部における ACh 受容体のクラスター形成に影響を与える可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究の目的は、mi/mi マウスをモデル動物として用いて非咬合状態が咀嚼筋の ACh 受容体クラスター形成に及ぼす影響を明らかにする。さらにこのマウスに義歯を装着し、義歯の装着が ACh 受容体クラスター形成をどの程度回復させるかを明らかにすることである。

3. 研究の方法

Wild type, mi/mi 共に生後 3 週まで母乳で飼育し、その後、離乳させた。離乳後 mi/mi には粉末飼料を、Wild type には固形飼料を与えた。生後 8 週目に Wild type, mi/mi を安楽死させ、咬筋と腓腹筋を摘出し、直ちに凍結した。摘出した咬筋と腓腹筋のほぼ中央付近の凍結切片を作成し、4%パラホルムアルデヒドで固定した。Alexa488 標識ブングロトキシンによりアセチルコリン受容体 (AChR) の染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡を用いて 0.5um の厚さで断層組織染色像を採集し、三次元立体構築用ソフトウェアを用いて AChR クラスターの三次元画像を得た。この三次元画像を用いて AChR クラスター成熟度の指標となるクラスター当たり断片数の変化を測定した。

4. 研究成果

1 週齢の咬筋の 1 つのクラスターに含まれる断片数は、野生型で最大 2、mi/mi で最大 3 であったが、断片化していないクラスターが多く観察された)。両系統マウスで、断片数の分布に大きな差は認められなかった (図 1)。4 週齢の咬筋の 1 つのクラスターに含まれる断片数は、野生型で最大 4、mi/mi で最大 8 でクラスターの断片数の分布に大きな差が見られた (図 2)。12 週齢の咬筋の 1 つのクラスターに含まれる断片数は、野生型で最大 5 に対し、mi/mi で最大 12 で、クラスターの断片数の分布に大きな差が見られた (図 3)。コントロールとして用いた腓腹筋では、すべての週齢で両系統マウスの間で断片数の分布に大きな差は見られなかった。

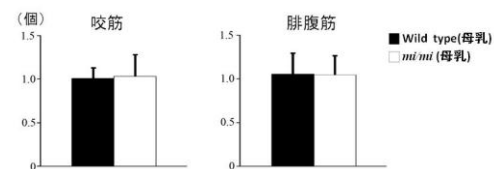


図1 1週齢のクラスターの断片数

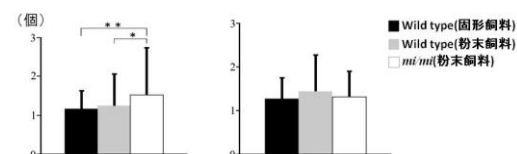


図2 4週齢のクラスターの断片数

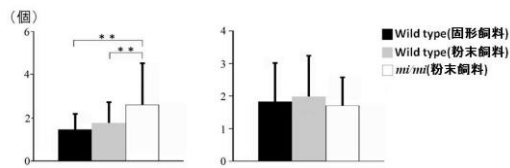


図3 12週齢のクラスターの断片数

以上の結果から、咬合状態の変化は AChR クラスターの成熟に大きな影響を与えることが示唆された。

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 14 件)

- ① KANEKO, S., IIDA, R., SUGA, T., MORITO, M. and YAMANE, A. Age-related changes in rat genioglossus, geniohyoid, and masseter muscles. Gerodontology In press 査読有
- ② MORI, M., NARIYAMA, M., ABO, T., HIRAI, S., OGAWA, T., HAMADA, Y., YAMANE, A. and ASADA, Y. Role of occlusion in mouse masseter muscle acetylcholine receptor clustering. J. Dent. Res. 92(4):352-357, 2013 査読有
- ③ NARIYAMA, M., KOTA, Y., KANEKO, S., ASADA, Y. and YAMANE, A. Association between the lack of teeth and the expression of myosins in masticatory muscles of microphthalmic mouse. Cell Biochem. Func. 30(1):82-88, 2012 査読有
- ④ SUZUKI, E., AOYAMA, K., FUKUI, T., NAKAMURA, Y. and YAMANE, A. The function of platelet derived growth factor in the differentiation of mouse tongue striated muscle. Orthod. Craniofac. Res. 15(1):39-51, 2012 査読有
- ⑤ ABO, T., IIDA, R., KANEKO, S., SUGA, T., YAMADA, H., HAMADA, Y. and YAMANE, A. IGF and myostatin pathways are respectively induced during the earlier and the later stages of skeletal muscle hypertrophy induced by clenbuterol, a β_2 -adrenergic agonist. Cell Biochem. Func. 30(8):671-676, 2012 査読有
- ⑥ 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
- ⑦ AOYAMA, K., YAMANE, A., SUGA, T., SUZUKI, E., FUKUI, T. and NAKAMURA, Y. Bone morphogenetic protein-2 functions as a negative regulator, but not as an inducer for the formations of cartilage and bone in cultured tongue, in the differentiation of myoblasts in mouse embryonic tongue. BMC Dev. Biol. 11:44, 2011 査読有
- ⑧ KANEKO, S., IIDA, R., SUGA, T., FUKUI, T., MORITO, M. and YAMANE, A. Changes in triacylglycerol-accumulated fiber type, fiber type composition, biogenesis in the mitochondria of the soleus muscle in obese rats. Anat. Rec. 294(11):1904-1912, 2011 査読有
- ⑨ 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
- ⑩ 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 査読有
- ⑪ 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
- ⑫ 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
- ⑬ 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
- ⑭ 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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川 千恵子 (ISHIKAWA CHIEKO)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号：70176163

(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

(3) 連携研究者

なし