

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：22592171

研究課題名（和文）舌・咀嚼筋の老化による委縮時の miRNA の役割と委縮予防法の探索

研究課題名（英文）The function of miRNAs in the atrophy of tongue and masticatory muscles with aging and searching for the treatment

研究代表者

菅 武雄（SUGA TAKEO）

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号：40247333

研究成果の概要（和文）：老化により舌や口の周りにある筋のサイズが小さくなったり（萎縮）、筋力が弱くなったりするときの miRNA（20 塩基前後の小さい RNA）の働きと筋萎縮の予防法について調べた。その結果、miRNA が舌や口の周りにある筋ができてくる時に非常に大事な働きをしていることが明らかになった。この miRNA を利用して老化により舌や口の周りにある筋の萎縮を予防できるかもしれない。

研究成果の概要（英文）：The present study attempt to elucidate the function of miRNAs in the atrophy of tongue and masticatory muscles with aging and to explore the treatment. The miRNA play significant roles in the development of tongue and masticatory muscles and might provide the muscle atrophy with very useful treatment for the muscle atrophy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
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	3,000,000	900,000	3,900,000

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

超高齢社会を迎え、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、高齢になると舌筋や咀嚼筋の萎縮がおこり筋力低下することが考えられる。この加齢による舌筋や咀嚼筋の萎縮によって誘発される誤嚥の予防、治療法を開発することは、高齢者歯科医学にとって非常に重要な課題である。

microRNA(miRNA)は、21～23 塩基対からなる機能性 non-coding RNA であり、その機能は、遺伝子発現の転写後抑制であり、

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。miRNA の機能は細胞増殖・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与し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-195、miR-181、miR-206 などの miRNA 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)。最近、荷重をかけて肥大させた骨格筋においては miRNA-1、miRNA-133a が減少していることが報告 (McCarthy and Esser, J Appl Physiol 102: 306-313, 2007)されており、加齢による舌筋、咀嚼筋の委縮の誘発機序に miRNA が関係している可能性が考えられる。しかし、この加齢による骨格筋の萎縮における miRNA の役割についてまったく調べられていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、microRNA (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

(1) 老齢マウスの解析を開始する準備段階として、マウス胎仔の舌発生過程における miRNA の発現変化を解析した。胎齢 11、12、13、14、15 日のマウス胎仔から舌と摘出し、miRNA を抽出した。次に、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、目的の成熟 miRNA の発現量を測定した。胎齢 12、13、14、15 日のマウス胎仔より舌を摘出し、4%パラフォルムアルデヒドかブアンで固定した。Whole mount miRNA in situ hybridization 法を用いて、摘出した舌全体における miR-1 の分布を解析した。舌標本のほぼ中央付近の凍結切片し、miRNA in situ hybridization 法を用いて、筋線維内の miR-1 の分布を解析した。

(2) マウス胎仔より舌を摘出し、BGJb 培養液を用いて器官培養を行った。培養液に miR-1 に対する Antisense Morpholino Oligonucleotide を添加し 2、4 日間培養した。培養終了後、舌より miRNA を分離・精製し、Real-time PCR 法を用いて miR-1 の発現量を計測することにより Antisense の抑制効果を確認した。さらに筋分化マーカーである myoD、myogenin、muscle creatine kinase (MCK)の mRNA 発現量を計測した。

(3) 老化にともなう舌、咀嚼筋の性質の変化を明らかにするために以下の実験を行った。3、6、12、24ヶ月齢の野生型ラットを安楽死させ咬筋、オトガイ舌筋、オトガイ舌骨筋を摘出し RNA、蛋白質を分離した。老化に伴う筋特性変化を明らかにするために

SDS -PAGE、Real-time PCR 法を用いて、これらの筋におけるミオシン重鎖の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) Real-Time PCR 法を用いた発現解析により 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(図 1)。

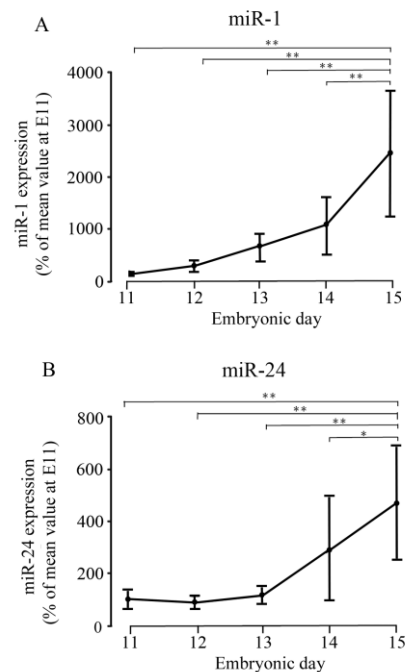


図 1 : miR-1、24 の発現

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。また、miRNA in situ hybridization 法を用いた実験より miR-1 は舌筋線維内に分布しており、舌筋の発生に伴い染色強度が上昇していることが示された(図 2)。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。

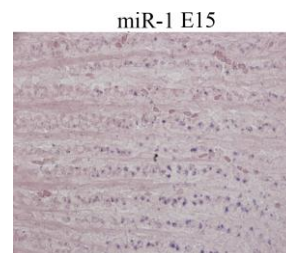


図 2 : 舌筋組織内の miR-1 の分布

(2) 舌の器官培養系において、miR-1の発現量は培養2日目から4日目の間に増加した。Antisense処理はこのmiR-1の増加を抑制した。myogenin、MCKの発現量は培養2日目から4日目の間に増加した。しかし、Antisense処理によってもこの増加は抑制できなかった(図3)。以上の結果より、Antisense Morpholino OligonucleotideによるmiRNA機能抑制のための実験条件が確立できたことが示された。

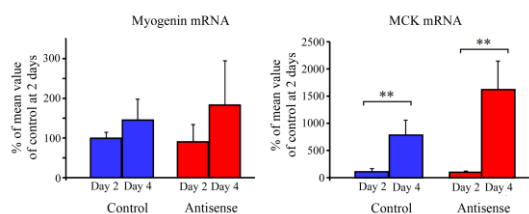


図3 : Antisense の効果

(3) 咬筋、オトガイ舌筋、オトガイ舌骨筋におけるミオシン重鎖の蛋白質、mRNAの発現において加齢に伴う顕著な変化は観察されなかった。

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 formation 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

菅 武雄 (SUGA TAKEO)

鶴見大学・歯学部・講師

研究者番号:40247333

(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