

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 24 年 6 月 18 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2010 年度～2011 年度

課題番号：22792073

研究課題名（和文）第三臼歯欠損モデルマウス舌筋、咀嚼筋の生後発達における miRNA の機能

研究課題名（英文） The function of miRNA in postnatal development of the muscle of mastication and gupro of the third molar deficit model mouse.

研究代表者

友廣 忠文 (TOMOHIRO TADAFUMI)

鶴見大学・歯学部・臨床助手

研究者番号：30460231

研究成果の概要（和文）：

第三臼歯欠損突然変異マウスを用いた実験から、正常な咬合活動が、咬筋における神経筋接合部でのシナプス形成に重要である可能性が示唆された。また、野生型マウスを用いた実験から miRNA-1 が咬筋のミオシン重鎖の発現を調節している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

The results using mutant mice with deficiency of the 3rd molars suggest that normal occlusal activity is essential for synaptogenesis in the masseter muscle. The results using wild type mice suggest that miRNA-1 regulates the expression of myosin heavy chains in the masseter muscle.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	900,000	270,000	1,170,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,700,000	510,000	2,210,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：矯正・小児系歯学

キーワード：EL マウス、第三臼歯欠損、シナプス形成、miRNA、ミオシン重鎖、咬筋

1. 研究開始当初の背景

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。また、高齢期において齶蝕や歯周病などにより歯が欠損し咬合状態が悪化することにより、舌、咀嚼筋などの萎縮や機能低下し、摂食・嚥下障害を起こしやすくなることが知られている。以上述べたように、歯の欠損など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、研究協力者の一人である山根らのグループは多くの研究を行っている。例えば、非交合状態が舌、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。

最近、申請者らはすべての歯が先天的に欠損している小眼球症マウスを用いて、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アセチルコリン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)

本研究においては自然発症の突然変異により第三臼歯が欠損している EL マウスを用いる。研究協力者の一人である朝田らのグループによりこの EL マウスには第三臼歯が欠損していることが発見された。この EL マウスをモデル系として用いることにより、非侵襲的に第三臼歯の欠損が舌、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。

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-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おり (Naguibneva et al., Nature Cell Biol 8:278-284, 2006. Chen et al., Nature Genet 38: 228-233, 2006 など)、第三臼歯の欠損が舌、咀嚼筋の性質の変化の調節に、これらの miRNA が関与している可能性が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では以下の 3 点を明らかにすることを試みる。

- (1) EL マウスおよび野生型マウスの咬筋、顎二腹筋、側頭筋など咀嚼筋と舌筋におけるアクチン、ミオシントロポミオシンなどの収縮蛋白質、アセチルコリン受容体のサブユニットの mRNA、蛋白質発現変化を明らかにし、EL マウスと野生型マウスの間で比較を行い、第三臼歯の欠失が舌、咀嚼筋の性質に及ぼす影響を明らかにする
- (2) EL マウスおよび野生型マウスの咬筋、顎二腹筋、側頭筋など咀嚼筋と舌筋におけ

る miR-1、24、133、188 などこれまで骨格筋の発生調節に関与が報告されている miRNA の発現量を Real-time PCR 法により、筋組織内での分布を in situ hybridization 法により解析し、EL マウスと野生型マウスの間で比較を行い、第三臼歯の欠失による舌、咀嚼筋の性質の調節機序への miRNA の関与を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 第三臼歯の欠失が咬筋、顎二腹筋、側頭筋など咀嚼筋や舌筋の生後発達に及ぼす影響を明らかにする実験を行った。
- (2) 咬筋、顎二腹筋、側頭筋など咀嚼筋と舌筋の生後発達における miRNA の機能を調べた。

4. 研究成果

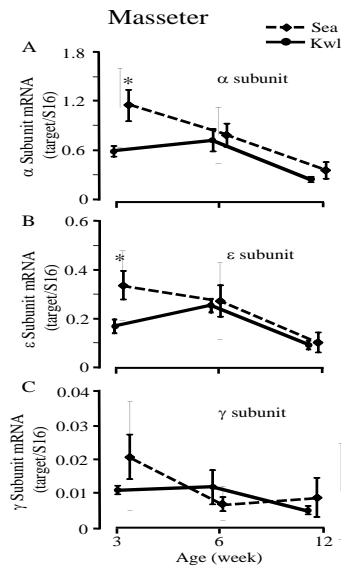
平成 22 年度

第三臼歯の欠如を示す EL/Sea マウスを用いて、歯の部分的欠如が咀嚼筋のシナプス形成に及ぼす影響を明らかにするため、nAChR サブユニットの mRNA 発現を分析した。

【材料と方法】第三臼歯が正常に萌出する EL/Kw1 をコントロールとして用い、EL/Kw1、EL/Sea 共に生後 3 週まで母乳で飼育し、その後離乳させた。生後 3、6、12 週目に EL/Kw1、EL/Sea をそれぞれ 6 匹ずつ安楽死させ、咬筋、側頭筋、腓腹筋を摘出した。摘出した筋組織より RNA を抽出・精製し、逆転写を行い、cDNA を調整した。咬筋、側頭筋、腓腹筋より得られた cDNA を用いて Real-Time PCR を用い、nAChR の α 、 ϵ 、 γ サブユニットの mRNA 量を測定した。各週齢における EL/Kw1 と EL/Sea の咬筋、側頭筋、腓腹筋のそれぞれの mRNA 発現量の比較を Mann-Whitney U 検定を用いて統計解析を行った。

【結果】EL/Sea の咬筋において 3 週齢における nAChR の α 、 ϵ 、 γ サブユニットの mRNA 発現量は EL/Kw1 よりそれぞれ 1.92 倍、2 倍、1.91 倍高く、特に α 、 ϵ サブユニットでは有意差 ($p < 0.05$) が認められた。6、12 週齢ではすべてのサブユニットに有意差は認められなかった。側頭筋、腓腹筋においては調べたすべての週齢、サブユニットの mRNA 発現量は EL/Kw1 と EL/Sea との間で有意差は認められなかった。

【考察】咬筋では 3 週齢における α 、 ϵ サブユニットの mRNA 発現量が EL/Kw1 と EL/Sea との間で有意差が認められたことから、3 週齢前後に第三臼歯が正常に萌出しないことが、咬筋における神経筋接合部でのシナプス形成時期に影響を与えている可能性が示唆された。

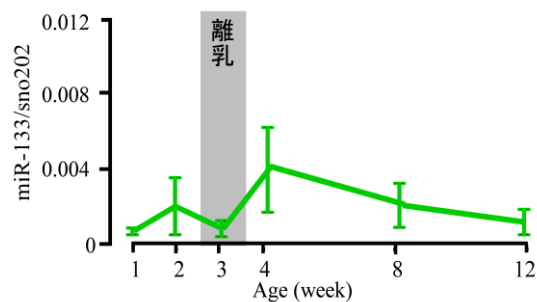
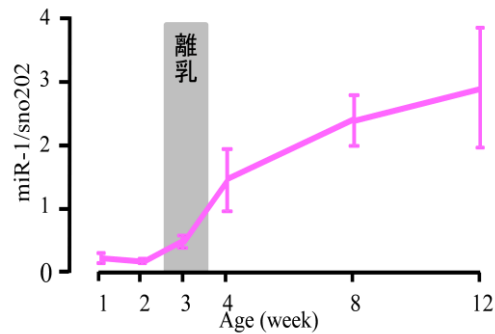


平成 23 年度

成長期において齲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・発達異常は、顎全体の正常な発育・発達に大きな影響を及ぼすと考えられる。また、高齢期において齲蝕や歯周病などにより歯が欠損し咬合状態が悪化することにより、舌、咀嚼筋などの萎縮や機能低下し、摂食・嚥下障害を起こしやすくなることが知られている。以上述べたように、歯の欠損など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。本年度は野生型マウスの咬筋におけるミオシン重鎖および miR-1 の発現に及ぼす影響について検討した。

【材料と方法】 1、2、3、4、8、12 週齢の野生型マウスを安楽死させ咬筋を摘出し total RNA、miRNA、蛋白質を分離・精製した。Real-time PCR 法を用いて、咬筋におけるミオシン重鎖(MyHC) I、IIa、IIb、IIx の mRNA 発現量を測定した。Real-time PCR 法を用いて、咬筋における miR-1 の発現量を測定した。

【結果】 MyHC I の mRNA 発現量は 1 週齢で最大で、1 から 2 週齢にかけて急激に減少し、その後大きく変化しなかった。IIa の mRNA 発現量は 1 週齢から 3 週齢の間で増加し、その後減少した。IIb の mRNA 発現量は 1~8 週齢において経時的に増加した。IIx の mRNA 発現量は 1 週齢から 4 週齢の間で増加し、その後減少した。miR-1 の発現量は、1~12 週齢の生後発達過程において経時的に増加した。一方、miR-133 については発現量にほとんど変化はみとめられなかった。また、miR-1 の発現量は miR-133 に比較し、顕著に大きかった。



【結論】 miR-1 が、MyHC の発現調節に関与してい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 1 件)

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.* 20(2):122-129, 2010

〔学会発表〕 (計 2 件)

1. 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
2. NARIYAMA, M., KOTA, Y., YAMANE, A., TOMOHIRO, T. and ASADA, Y.: Effects of lack of cclusal activity on masticatory myogenesis. 88th General Session & Exhibition of the IADR. Centre de Convencions Internacional Barcelona, Barcelona, Spain, July 14-17, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者
友廣忠文 (TOMOHIRO TADAFUMI)
鶴見大学・歯学部・臨床助手
研究者番号：30460231

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし