

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 21 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24390429

研究課題名(和文) マクロファージ賦活化による慢性筋痛新規治療法の開発

研究課題名(英文) Development of a novel method using macrophage-activated for therapy against chronic muscle pain

研究代表者

土谷 昌広 (TSUCHIYA, MASAHIRO)

東北大学・歯学研究科(研究院)・大学院非常勤講師

研究者番号：60372322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：顎関節症に伴う慢性筋痛の発症メカニズムは不明な点が多い。マウス咬筋部の疲労における筋疲労におけるマクロファージ(M ϕ)の動態や機能について検討した。マウスの咀嚼様運動に伴う咬筋疲労を誘導したが組織内M ϕ の増加は認められなかった。その一方で、M ϕ 欠損(リポソーム封入クロドロネート(Clo-Lip)の静脈内投与)により咀嚼様運動持続量の有意な減少が示された。くわえて、咬筋のIL-1 β 発現量の低下が示され、IL-6誘導障害と糖代謝異常について確認された。本結果は、運動時のM ϕ の筋機能維持における重要な役割を示す所見であり、疲労回復過程においてM ϕ が必須な存在であることを示すものである。

研究成果の概要(英文)：Pathological mechanism of chronic muscle pain associated with temporomandibular joint disease (TMD) is still unclear. Using a unique masticatory model, we examined whether macrophages (M ϕ) plays roles to recover from muscle fatigue. The masticatory activity didn't increase the number of M ϕ in masseter muscle. On the other hand, M ϕ depletion by the administration of clodronate-liposome (i.v.) significantly decrease the masticatory-like behavior. In addition, the decrease of IL-1 β expression level in the masseter followed by the impairment of IL-6 induction have been observed. Interestingly, we also confirmed that the failure of glucose uptake in skeletal muscle tissues. Our data also underscore the importance of M ϕ in IL-1-mediated local interplay between autocrine myokines including IL-6 and paracrine cytokines in active skeletal muscles. This interplay is directly involved in MM performance and fatigability, perhaps mediated through maintaining muscular glucose homeostasis.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：筋疲労 顎関節症 IL-1 マクロファージ 糖代謝

1. 研究開始当初の背景

近年、顎関節症に伴う慢性筋痛が増加傾向にあり、うつ発症の危険因子となることから社会問題となっている。顎関節症に伴う慢性筋痛の多くは筋・筋膜性疼痛疾患(MPS)と同様の症状を含み、異常な線維性構造(索状硬結)の存在と遷延化した炎症性サイトカイン産生を特徴とする。しかしながら、その発症メカニズムは不明であり、治療法も確立されていない。

歯牙接触癖(TCH)に代表されるように、過剰な筋活動は顎顔面領域の筋、特に咀嚼筋組織内に疲労と微小外傷を蓄積させ、その帰結として慢性疼痛を引き起こすと認識されている。その様な背景の中、最近の研究から筋組織障害の治癒過程におけるマクロファージ(M₁)の重要性が報告されている。しかしながら、より生理的な筋疲労などではその役割については明らかとなっていない。

運動に伴い筋組織にはIL-6などの炎症性サイトカイン(マイオカイン)が誘導され、代謝や微小循環が維持されることは良く知られた事象である。このことから、IL-6は筋疲労のマーカー分子として多くの報告がある。運動に伴うIL-6の主な作用は末梢血管の透過性亢進と考えられ、筋肉微小循環、および代謝機構の維持に大きな役割を果たすと推察されている。しかしながら、筋疲労に伴い産生されるIL-6の誘導メカニズムについて明らかとした研究はない。

2. 研究の目的

本研究では、慢性筋痛発症メカニズムにおけるM₁の役割を明らかとするため、咀嚼筋疲労モデルにおける組織内細胞局在とIL-1の発現動態について、我々の確立したマウスを用いたユニークな咀嚼運動モデルを中心に検討を行った。

特にM₁が産生するIL-1は主要なマイオカインであるIL-6の誘導することが他の組織においてよく知られている。マイオカインは

糖代謝を介して筋活動の持久性に直接的に関与することが予想され、筋の治癒・疲労回復に重要な役割を果たすことから、本研究課題の対象として重要であることが予想される。

今回、M₁の機能的役割とその産生するサイトカイン、特にIL-1に着目し、咀嚼筋におけるその抗疲労効果を示すことに加え、下流分子であるIL-6を介した咀嚼筋の糖代謝の維持機構を動物実験で明らかとすることで、顎関節症患者で頻見される咀嚼筋のダメージ蓄積に伴う易疲労性発症への治療への応用を目的とした、メカニズムの解明を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

5週齢の雄性マウス、2系統(BALB/c, IL-1^{-/-} / 遺伝子欠損マウス(IL1K0))を用いて実験を行った。

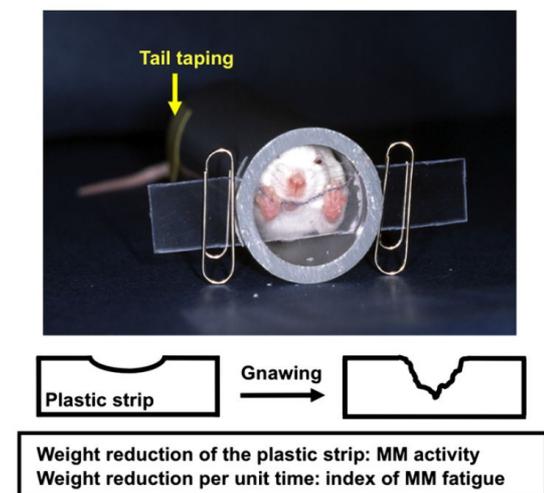


図1. マウスをプラスチック板(幅:1.5 cm, 厚さ:1.0 mm)にて前方を遮蔽した円筒(径:2.5 cm, 長さ:10 cm, プラスチック製)内に入れると、マウスは咀嚼様運動を開始する。これは“自発的”な運動であり、生理的な筋肉疲労を解析可能な実験系といえる。

(1) 咬筋活動量の評価法

マウスを細い筒に入れ、出口をプラスチック板で閉じると、マウスは脱走用の隙間を作るため、この板を長時間咬み続ける(図1.これをR+G+と仮称)。実験前後の板の重量

差は咬筋運動量を反映する。この実験系を用いて、咬筋の活動量や咀嚼疲労について検討した。

(2) M 枯渴マウスの作製

Clodronate-Liposome (Clo-Lip) を 0.2ml/mouse で静脈内投与することで、24 時間~4 日目まで間は貪食性 M が枯渴する。それらのマウスを用いて、易疲労性や咬筋内の分子動態などについて検討した。

(3) ELISA によるサイトカイン測定

摘出組織は -80 で使用前まで保存した。マウス筋組織を Lysis buffer 中でホモゲナイズし、その抽出液を採取する。IL-1 および IL-6 について ELISA kit を用いて、蛍光体として検出されるタンパク量の測定を行った。

(4) 定量 PCR による遺伝子発現解析

IL-1 と IL-6 に対する特異的プライマーを作製し、realtime RT-PCR 法により定量的解析を行った。Reference gene としては eEF1a1 を用いた。

(5) 強制歩行による疲労耐性

電動回転式トレッドミルにて強制歩行 (8.0s/回転) させ、脱落の早さによりその疲労耐性をみた。

(6) 統計解析

Student's T-test, もしくは one-way ANOVA を用いて検討を行った ($p < 0.05$ により判定)。

4. 研究成果

最初に BALB/c のマウスを用いて咀嚼様運動にともない、咬筋における IL-1 の遺伝子発現は有意な上昇を示した。しかし、その上昇はトレーニングによって著明な低下を示し、従来の疲労分子 (IL-6 など) と同様であ

った。加えて、ELISA ではその検出は非常に困難であり、微量かつ局所的な作用であることが推察された。

次に Clo-Lip 投与 1 日後 (好中球枯渴) に咀嚼様運動の負荷を行い、その噛み砕き量を計測した。結果として、好中球枯渴により、咀嚼様運動量が低下した。加えて、IL-1 および IL-6 の有意な遺伝子発現の低下が確認された。

IL1K0 では、咀嚼様運動の活動量が有意に低い値を示した。以上の結果から、咀嚼様運動においては IL-1 の疲労耐性への関与が示された。

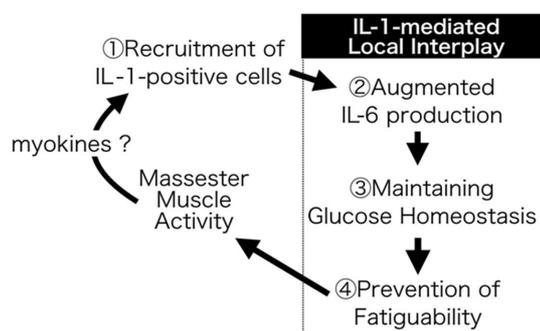


図 2 . M による筋活動維持に関する仮説。M (IL-1 陽性免疫系細胞) による筋活動のサポートでは IL-1,特に が中心となって維持する機構がある一方で、過剰な運動は産生された IL-1 の持続的作用により遅発性に痛みなどを生じる可能性が考えられる (雑誌論文 より引用)。

我々の結果は筋組織に常在する M が運動負荷により IL-1 を産生し、筋組織で産生されるマイオカイン、IL-6 を介して、筋組織の糖取り込み能を活性化し、結果として運動機能 (咀嚼運動) の持久性を高める役割を果たすことを示している (図 2)。本研究の結果は、顎関節症患者で頻見される、過剰な活動に伴う疲労・微小外傷の蓄積、それに起因する易疲労性の発症メカニズムの一端を解明し、その改善とそれに伴う筋症状の改善を目的とする IL-1 の誘導を考慮した治療法が有効であることを予想させるものである。

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19件)

Hagiwara Y, Yabe Y, Sugawara Y, Sato M, Watanabe T, Kanazawa K, Sonofuchi K, Koide M, Sekiguchi T, Tsuchiya M, Tsuji I, Itoi E. Influence of living environments and working status on low back pain for survivors of the Great East Japan Earthquake. *J Orthop Sci*. 査読有, 2016;21(2):138-42. doi: 10.1016/j.jos.2015.12.015.

Nemoto E, Sakisaka Y, Tsuchiya M, Tamura M, Nakamura T, Kanaya S, Shimonishi M, Shimauchi H. Wnt3a signaling induces murine dental follicle cells to differentiate into cementoblastic/osteoblastic cells via an osterix-dependent pathway. *J Periodontal Res*. 2016;51(2):164-74. doi: 10.1111/jre.12294.

Yabe Y, Hagiwara Y, Tsuchiya M, Honda M, Hatori K, Sonofuchi K, Kanazawa K, Koide M, Sekiguchi T, Itaya N, Itoi E. Decreased elastic fibers and increased proteoglycans in the ligamentum flavum of patients with lumbar spinal canal stenosis. *J Orthop Res*. 査読有, 2015. doi: 10.1002/jor.23130.

Chiba K, Tsuchiya M, Koide M, Hagiwara Y, Sasaki K, Hattori Y, Watanabe M, Sugawara S, Kanzaki M, Endo Y. Involvement of IL-1 in the Maintenance of Masseter Muscle Activity and Glucose Homeostasis. *PLoS One*. 査読有, 2015;10(11):e0143635. doi: 10.1371/journal.pone.0143635.

Tsuchiya M, Aida J, Hagiwara Y, Sugawara Y, Tomata Y, Sato M, Watanabe T, Tomita H, Nemoto E, Watanabe M,

Osaka K, Tsuji I. Periodontal Disease Is Associated with Insomnia among Victims of the Great East Japan Earthquake: A Panel Study Initiated Three Months after the Disaster. *Tohoku J Exp Med*. 査読有, 2015;237(2):83-90. doi: 10.1620/tjem.237.83.

Sakisaka Y, Tsuchiya M, Nakamura T, Tamura M, Shimauchi H, Nemoto E. Wnt5a attenuates Wnt3a-induced alkaline phosphatase expression in dental follicle cells. *Exp Cell Res*. 査読有, 2015;336(1):85-93. doi: 10.1016/j.yexcr.2015.06.013.

Kanazawa K, Hagiwara Y, Tsuchiya M, Yabe Y, Sonofuchi K, Koide M, Sekiguchi T, Itaya N, Ando A, Saijo Y, Itoi E. Preventing effects of joint contracture by high molecular weight hyaluronan injections in a rat immobilized knee model. *Int J Clin Exp Pathol*. 査読有, 2015;8(4):3426-40.

Shoji N, Kaneta N, Satoh-Kuriwada S, Tsuchiya M, Hashimoto N, Uneyama H, Kawai M, Sasano T. Expression of umami-taste-related genes in the tongue: a pilot study for genetic taste diagnosis. *Oral Dis*. 査読有, 2015;21(6):801-6. doi: 10.1111/jre.12294.

Yabe Y, Hagiwara Y, Ando A, Tsuchiya M, Minowa T, Takemura T, Honda M, Hatori K, Sonofuchi K, Kanazawa K, Koide M, Sekiguchi T, Itoi E. Chondrogenic and fibrotic process in the ligamentum flavum of patients with lumbar spinal canal stenosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 査読有, 2015;40(7):429-35. doi: 10.1097/BRS.0000000000000795.

Shinoda M, Takeda M, Honda K, Maruno M, Katagiri A, Satoh-Kuriwada S, Shoji N, Tsuchiya M, Iwata K. Involvement of peripheral artemin signaling in tongue pain: possible mechanism in burning mouth syndrome. *Pain*. 査読有, 2015;156(12):2528-37. doi: 10.1097/j.pain.0000000000000322.

Tsuchiya M, Niijima-Yaoita F, Yoneda H, Chiba K, Tsuchiya S, Hagiwara Y, Sasaki K, Sugawara S, Endo Y, Tan-No K, Watanabe M. Long-term feeding on powdered food causes hyperglycemia and signs of systemic illness in mice. *Life Sci*. 査読有, 2014 103(1):8-14. doi: 10.1016/j.lfs.2014.03.022.

Bando K, Takahashi H, Kinbara M, Tanaka Y, Kuroishi T, Sasaki K, Takano-Yamamoto T, Sugawara S, Endo Y. Resin monomers act as adjuvants in Ni-induced allergic dermatitis in vivo. *J Dent Res*. 2014 査読有, 93(11):1101-7. doi: 10.1177/0022034514552674.

Nemoto E, Gotoh K, Tsuchiya M, Sakisaka Y, Shimauchi H. Extracellular ATP inhibits IL-1-induced MMP-1 expression through the action of CD39/nucleotidase triphosphate dephosphorylase-1 on human gingival fibroblasts. *Int Immunopharmacol*. 2013;17(3):513-8. doi: 10.1016/j.intimp.2013.07.014.

Okada S, Kiyama T, Sato E, Tanaka Y, Oizumi T, Kuroishi T, Takahashi T, Sasaki K, Sugawara S, Endo Y. Inhibition of phosphate transporters ameliorates the inflammatory and necrotic side effects of the nitrogen-containing bisphosphonate zoledronate in mice. *Tohoku J Exp Med*.

査読有, 2013 231(2):145-58.

Kiyama T, Okada S, Tanaka Y, Kim S, Bando K, Hasegawa M, Yamaguchi K, Takano-Yamamoto T, Sasaki K, Sugawara S, Endo Y. Inflammatory and necrotic effects of minodronate, a nitrogen-containing bisphosphonate, in mice. *Tohoku J Exp Med*. 査読有, 2013 230(3):141-9.

Kuroishi T, Bando K, Endo Y, Sugawara S. Metal allergens induce nitric oxide production by mouse dermal fibroblasts via the hypoxia-inducible factor-2 -dependent pathway. *Toxicol Sci*. 査読有, 2013 135(1):119-28. doi: 10.1093/toxsci/kft142.

Tanaka Y, Nagai Y, Dohdoh M, Oizumi T, Ohki A, Kuroishi T, Sugawara S, Endo Y. In vitro cytotoxicity of zoledronate (nitrogen-containing bisphosphonate: NBP) and/or etidronate (non-NBP) in tumour cells and periodontal cells. *Arch Oral Biol*. 2013 査読有, 58(6):628-37. doi: 10.1016/j.archoralbio.2012.11.010.

Yabe Y, Hagiwara Y, Suda H, Ando A, Onoda Y, Tsuchiya M, Hatori K, Itoi E. Joint immobilization induced hypoxic and inflammatory conditions in rat knee joints. *Connect Tissue Res*. 2013 査読有, 54(3):210-7. doi: 10.3109/03008207.2013.786056.

Yoneda H, Niijima-Yaoita F, Tsuchiya M, Kumamoto H, Watanabe M, Ohtsu H, Yanai K, Tadano T, Sasaki K, Sugawara S, Endo Y. Roles played by histamine in strenuous or prolonged masseter muscle activity in mice. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 査読有, 2013 40:848-55. doi: 10.1111/1440-1681.12167.

〔学会発表〕(計7件)

Kuroki K, Hagiwara Y, Yabe Y, Kanazawa K, Koide M, Itaya N, Sekiguchi T, Tsuchiya M, Momma H, Nagatomi R. Association of verbal abuse and physical violence from coaches with joint and limb pains of children engaged in junior club sports activity: a cross-sectional study. The 35th SITEMSH Congress March 13-17, 2016. Fukushima.

Koide M, Hagiwara Y, Ando A, Yabe Y, Kanazawa K, Sekiguchi T, Itaya N, Yoshida S, Itoi E, Kanzaki M, Hatakeyama H, Tsuchiya M. The Human Satellite Cells can Form the Myotube Even in the Atrophic Fatty Muscle of Rotator Cuff Tear. ORS 2016 Annual Meeting March 5-8, 2016. Orlando, Florida.

Yabe Y, Hagiwara Y, Tsuchiya M, Honda M, Hatori K, Sonofuchi K, Kanazawa K, Koide M, Sekiguchi T, Itaya N, Itoi E. Decreased Elastic Fibers and Increased Proteoglycans in the Ligamentum Flavum of Patients with Lumbar Spinal Canal Stenosis. ORS 2016 Annual Meeting. March 5-8, 2016. Orlando, Florida.

Wnt3a signaling induces murine dental follicle cells to differentiate into cementoblastic/osteoblastic cells via an osterix-dependent pathway. Nemoto E, Sakisaka Y, Tsuchiya M, Tamura M, Nakamura T, Kanaya S, Shimauchi H. The 6th International Symposium for Interface Oral Health Science. January 18-19, 2016, Sendai.

千葉航, 土谷昌広, 渡邊誠, 佐々木啓一, 坪井明人, 服部佳功. 長期飼育における粉末食のマウス糖代謝機構への影響と行

動異常の誘発に関する研究. 第56回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2014/9/26, 福岡.

千葉航, 土谷昌広, 八百板(新島)富紀枝, 米田博行, 渡邊誠, 佐々木啓一. 粉末食飼育はマウスの糖代謝機構を障害し, 行動異常を誘発する. 日本老年歯科医学会第24回学術大会, 2013/6/4~6/6, 大阪. 八百板富紀枝, 荒井香, 下道麻夏, 齊藤貴之, 土谷昌広, 齊藤弘子, 村井繁夫, 荒井裕一朗, 根本互, 中川西修, 只野武, 丹野孝一. 粉末食飼育マウスにおける Social interaction の障害について. 平成25年度東北薬科大学創薬研究センターシンポジウム, 2013/5/25, 仙台.

〔図書〕(計1件)

渡邊 誠, 土谷昌広, 他4名, アーク出版, 特集/「向精神薬の副作用と対策 Update」第43巻11号, 2014.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土谷 昌広 (TSUCHIYA, Masahiro)

東北大学・大学院歯学研究科・非常勤講師
研究者番号: 60372322

(2) 研究分担者

佐々木 啓一 (SASAKI, Keiichi)

東北大学・大学院歯学研究科・教授
研究者番号: 30178644

萩原 嘉廣 (HAGIWARA, Yoshihiro)

東北大学・大学院医学研究科・准教授
研究者番号: 90436139

黒石 智誠 (KUROISHI, Yoshinobu)

東北大学・大学院歯学研究科・助教
研究者番号: 30400261

(3) 連携研究者

()

研究者番号: