

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792313

研究課題名(和文) 咬合の欠如が咀嚼筋、舌筋の生後発達のエピジェネティクスとmiRNAに及ぼす影響

研究課題名(英文) Effect of epigenetics and the expression of miRNAs on occlusal activity during the postnatal development of masticatory and tongue muscle

研究代表者

成山 明具美 (Nariyama, Megumi)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：90440304

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円、(間接経費) 750,000円

研究成果の概要(和文)：エピジェネティクスとは、クロマチンへの後天的な修飾によりゲノムのDNA配列を変化させることなく、遺伝子発現を制御するシステムのことである。またmicroRNA(miRNA)は、21～23塩基対からなる機能性non-coding RNAであり、遺伝子発現を抑制する機能を持っている。今回の結果から、咬筋の生後発達過程においては主にmiR-1の経路が機能しているが、コントロールとして用いた腓腹筋の生後発達過程においてはmiR-133aの経路が機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Epigenetics involves genetic control by mechanisms other than DNA sequence. These epigenetic mechanisms have ability to switch on or off various important genes. MicroRNAs (miRNAs) are single-stranded 19-25 nucleotide-long RNAs and have an important role in post-transcriptional gene expression. In this study, the regulatory pathway of miR-1 plays a more prominent role during postnatal development in the masseter muscle than in the gastrocnemius muscle, whereas the regulatory pathway of miR-133a plays a more prominent role in gastrocnemius muscle than in the masseter muscle.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正、小児歯科学

キーワード：咬合の欠如 咀嚼筋 生後発達 エピジェネティクス miRNA

1. 研究開始当初の背景

成長期において齲蝕や事故などによる歯の喪失や無汗型外胚葉異形成症などの疾患にみられる無歯症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咀嚼筋、舌筋の発育・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。

エピジェネティクスとは、クロマチンへの後天的な修飾によりゲノムの DNA 配列を変化させること無く、遺伝子発現を制御するシステムのことである。最近、このエピジェネティクスによる遺伝子の発現調節が、胚性幹細胞の多能性・細胞増殖・発生・分化・代謝・アポトーシスなど多くの生命現象に重要な役割を果たしており、その異常は癌などの疾患とも密接に関わっていることが明らかになっている。

microRNA(miRNA)は、21~23 塩基対からなる機能性 non-coding RNA であり、遺伝子発現を抑制する機能を持っている。miRNA は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、その翻訳を抑制している。骨格筋細胞の発育・発達過程において、ヒストン脱メチル化酵素 (HDAC) の機能を miRNA が調節していることがすでに報告されている。

2. 研究の目的

本研究における最終目的は、*mi/mi* マウスを用いて咬合の欠如が咀嚼筋、舌筋の生後発達のエピジェネティクスと miRNA の機能に及ぼす影響を明らかにすることである。

3. 研究の方法

実験動物:C57B6 マウスを生後3週まで母乳で飼育し、その後、離乳させた。離乳後は固形飼料を与えた。生後1、2、3、4、8、12週目にそれぞれ6匹ずつを安楽死させ、体重を測定後、咬筋および腓腹筋を摘出し、筋重量

を測定した。

microRNA の発現量の測定: 咬筋および腓腹筋の筋組織から microRNA を抽出・精製し、逆転写を行い、cDNA を調製した。得られた cDNA を用いて Real-Time PCR により、1、2、3、4、8、12 週齢における miR-1、miR-133a の発現量を測定した。

蛋白質の発現量の測定: 咬筋および腓腹筋より 2%SDS 溶液を用いて蛋白質を抽出後、Western Blotting 法を用いて、2、12 週齢における HDAC 4、5、7、9、MEF2、Myf5、MyoD、Myogenin、MRF4、MCK、SRF、 α -actin の発現量を解析した。 α -actin はローディングコントロールとして用いた。

4. 研究成果

咬筋および腓腹筋における miR-1 の発現量は、1~12 週齢の生後発達過程でどちらも経時的に増加した。特に、咬筋では吸綴から咀嚼へ変化する3週齢前後に大きな変化が認められた。

咬筋において、HDAC4 は2週齢において発現していたが、12週齢においては発現していなかった。HDAC5 は2、12週齢ともに発現していなかった。HDAC7、9 は2週齢では発現していなかったが、12週齢ではわずかに発現していた。MEF2 は12週齢では発現していたが、2週齢では発現していなかった。Myf5 は、12週齢においてはわずかに発現していたが、2週齢では発現していなかった。MyoD、Myogenin、MRF4、MCK は2、12週齢ともに発現していたが、発現量は12週齢の方が顕著に大きかった。

腓腹筋において、HDAC4 は2、12週齢ともに発現していたが、HDAC4 の発現量は、2週齢の方が顕著に大きかった。HDAC5 は2、12週齢ともに発現していなかった。HDAC7、9 の発現量は2、12週齢ともに発現していたが、発現量にほとんど差は認められなかった。また、すべての骨格筋関連遺伝子で2、12週

齢ともに発現していたが、発現量はいずれも12週齢の方がわずかに大きかった。

咬筋における miR-133a の発現量は1~12週齢の生後発達過程で顕著な変化はみとめられなかった。一方、腓腹筋における miR-133a の発現量は、1~12週齢で経時的に増加した。SRF は、咬筋および腓腹筋において2、12週齢ともに発現していたが、咬筋では2、12週齢での発現量にほとんど差はみとめられなかった。一方、腓腹筋における SRF の発現量は、2週齢の方が明らかに大きかった。

よって、今回の結果から咬筋の生後発達過程においては主に miR-1 が HDAC4、MEF2 を介した MyoD family の経路が機能しているが、コントロールとして用いた腓腹筋の生後発達過程においては miR-1 HDAC4 MEF2 MyoD family と miR-133a SRF の経路が存在し、主に miR-133a SRF の経路の方が機能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 2 件)

Mori M, Nariyama M, Abo T, Hirai S, Ogawa T, Hamada Y, Yamane A, Asada Y: Role of occlusion in masseter muscle acetylcholine receptor clustering. J Dent Res. 査読あり, Vol92, 2013, pp352-357. DOI: 10.1177/0022034513476038

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 Funct. 査読あり, Vol.30, 2012, pp82-88. DOI:10.1002/cbf.1821

[学会発表](計 8 件)

島崎絵美, 森愛美, 成山明具美, 山根明, 朝田芳信: 咬合様式の違いが咬筋における miR-206 の発現に及ぼす影響, 第52回日本小児歯科学会大会, 2014年05月16-17日, 品川区立総合区民会館(東京都)

森愛美, 成山明具美, 阿保徳寿, 山根明, 朝田芳信: 咬合様式の違いが咬筋の神経筋接合部におけるアセチルコリン受容体クラスター形成および運動神経分布に及ぼす影響, 第28回日本小児歯科学会関東地方会大会, 2013年10月27日, 神奈川歯科大学(神奈川県)

成山明具美, 伊平弥生, 宗正隆明, 朝田芳信: 歯種特異的な歯胚消失メカニズムの解明に向けて, 第51回日本小児歯科学会大会, 2013年05月23-24日, 長良川国際会議場(岐阜市)

Mori M, Yamane A, Nariyama M, Asada Y: Occlusal activity in clustering of acetylcholine receptor in masseter, 91st General Session & Exhibition of the International Association for Dental Reserch, 2013年03月20-23日, Washington State convention Center (USA)

森愛美, 成山明具美, 阿保徳寿, 山根明, 朝田芳信: 咬合状態の変化が咀嚼筋の神経筋接合部のアセチルコリン受容体クラスター形成に及ぼす影響の解明, 鶴見歯学会総会第76回例会, 2012年12月15日, 鶴見大学会館(神奈川県)

成山明具美, 森愛美, 阿保徳寿, 山根明, 朝田芳信: 咬筋と腓腹筋の生後発達過程における miR-1、133 と HDAC の発現変化について, 第49回日本口腔組織培養学会, 2012年11月17日, 広島大学医学部(医学部)

成山明具美，森愛美，阿保徳寿，山根明，
朝田芳信：咀嚼筋の生後発達における
miRNA と HDAC の役割について，第 12 回日
本抗加齢医学会総会，2012 年 06 月 22-24
日，パシフィコ横浜（神奈川県）

森愛美，成山明具美，阿保徳寿，山根明，
朝田芳信：マウス咬筋の神経筋接合部のア
セチルコリン受容体クラスター形成に及ぼ
す飼料性状および咬合状態の影響，第 12 回
日本抗加齢医学会総会，2012 年 06 月 22-24
日，パシフィコ横浜（神奈川県）

6．研究組織

(1)研究代表者

成山 明具美 (NARIYAMA MEGUMI)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：90440304

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし