

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：32710

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25463035

研究課題名(和文) PPAR アンタゴニストの閉塞性睡眠時無呼吸症治療薬としての可能性の検討

研究課題名(英文) Investigation of PPAR-gamma antagonists as antiOSA drug.

研究代表者

飯田 良平 (Iida, Ryohei)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：70339810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：HX531と同様な機能を有するアンタゴニストであるクレンプテロールをラットに投与し、咬筋量の変化を調べたところ、クレンプテロール経口投与群の体重は、対照群と同様に21日目まで一貫して増加したが、咬筋繊維の最小直径は14日目以降増加が停止した。対照群では咬筋繊維最小直径も増加し続けた。14日目以降の咬筋の肥大をクレンプテロールが抑制させる働きを有することが確認され、従って咬筋の筋量調節にも関わるクレンプテロールは睡眠時無呼吸症候群の治療薬として使用出来る可能性があることが示唆された。またクレンプテロールの咬筋肥大抑制における作用機序の1つにIGF-1の発現量増加が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was HX531 or clenbuterol could be the drug for obstructive sleep apnea (OSA). Growth of the minimum diameter of masseter muscle fibers was stopped within 2 weeks in rats gave an antagonist of PPAR, clenbuterol, although that increased until 3 weeks in control. Body weight was kept increased in both of rats, This result suggests clenbuterol may have the ability as the antiOSA drug. Our next focus was the mechanism how diameter of masseter reduced by clenbuterol. We investigated miogenic factors such as MyoD, myogenin, MCK, myostatin and IGF-1. Among them, expression of IGF-1 mRNA was markedly increased in masseter of rats with clenbuterol for 2 weeks. This result indicates that IGF-1 may have a role for repressing the growth of masseter, not gastrocnemius muscle.

研究分野：医歯薬学

キーワード：クレンプテロール PPAR IGF-1

1. 研究開始当初の背景

睡眠障害は生活習慣病の一つで、最近の疫学調査によれば、一般人口の約 20%に達しているといわれている。なかでも睡眠時無呼吸症候群 (sleep apnea syndrome, SAS) は日中に眠気を生じ、公共機関の運転手が居眠り騒動を引き起こしたことは記憶に新しい。SAS は「日中に眠気があり、睡眠時に大きないびきを伴い、夜間睡眠時に 1 時間あたりに 10 秒間停止する無呼吸の状態が 5 回以上生じるもの」と定義されている。睡眠学会によれば、睡眠障害は 88 種類に分類され、特に閉塞型睡眠時無呼吸症候群 (obstructive sleep apnea, OSA) は罹患率が高い。現在 OSA の原因として最も重要なファクターの一つが肥満であると言われている。肥満により上気道が狭窄し、さらに舌根が上気道方向に後退することにより OSA が発症すると言われている。

我々は高脂肪食を摂取させた肥満ラットにおいて、オトガイ舌筋、オトガイ舌骨筋、咬筋への脂肪の沈着による筋線維の肥大が上気道の体積を減少させていることを報告した (Saito T, Yamane A et al, Arch Oral Biol 2010)。この結果は舌筋、咬筋などの口腔周囲の筋線維中に存在する脂肪を分解し、肥大を解消することが OSA の治療法の一つとなることを示唆している。

ペルオキシゾーム増殖剤応答性受容体 (Peroxisome Proliferator - Activated Receptor γ , PPAR γ) は核内受容体スーパーファミリーであり、レチノイド X 受容体 (retinoid X receptor, RXR) と結合し、脂肪細胞形成のマスター遺伝子として機能している。PPAR γ のヘテロ欠損マウスや Pro12Ala 多型マウスは脂肪細胞が小型化し、インスリン抵抗性が改善される。また HX531 は PPAR γ と競合して RXR に結合し、脂肪細胞の形成を抑制することが知られている (Yamauchi T et al, J Clin Invest. 2001)。

以上によれば HX531 やクレンプテロールを口腔周囲の筋に投与すれば脂肪が分解され、筋線維の肥大を解消することができ、OSA の治療法となり得ることを示唆している。

2. 研究の目的

PPAR γ のアンタゴニストである HX531 やクレンプテロールをラットに投与し、咬筋、顎二腹筋、舌外筋、舌内筋など口腔周囲筋群の脂肪の蓄積による筋線維肥大を抑制するのかを解析する。また口腔周囲筋群の筋肥大を抑制することにより、上気道容積の減少を回避することができるかを追究し、HX531 やクレンプテロールの OSA の治療薬としての可能性を検討する。

3. 研究の方法

<咬筋筋線維最小直径の測定>

高脂肪食を摂取させて肥満したラットに HX531 と同様な機能を持つアンタゴニストであるクレンプテロールをラットに投与し、

口腔周囲筋の一種である咬筋の筋量に与える影響を調べた。雄性ウイスター系ラット 8~9 週齢に 3,7,14,21 日間 30 μ g/mL のクレンプテロールを経口投与し、コントロール群には純水を投与した。ラットの咬筋、顎二腹筋、舌外筋、舌内筋を摘出し、その重量を測定した。組織学的解析用の咬筋標本は 4%パラホルムアルデヒドで固定した。ラット右咬筋のほぼ中央部付近で厚さ 10 μ m の凍結切片を、クリオスタットを用いて製作した。NADH-TR 染色により筋線維タイプ IIA/X とタイプ IIB を可視化し、遅筋線維と速筋線維に染め分け、それぞれの筋線維最小直径を測定した。NADH-TR 染色では、タイプ IIA/X 線維は IIB 線維よりも濃染するため、染め分けることができた。1 匹のラットの 50 本の線維の最小直径を計測し、その平均値をそのラットの代表値として用いた。1 群に 5 匹のラットを用いた。

また組織切片をオイル・レッドで染色し、染色像を光学顕微鏡により画像解析装置に入力し、オイル・レッド陽性筋線維数、染色強度を測定した。筋組織マーカーであるデスミン、ミオシン抗体、タイプ I, III のコラーゲン抗体に対する抗体を用いて免疫染色し、染色画像を共焦点レーザー顕微鏡によりワークステーション (IBM6233) に取り込み、画像解析装置画像解析ソフトウェア (Amira 4.1.1) を用いて口腔周囲筋群の三次元再構築モデルを作製した。

<クレンプテロールの作用機序解析>

雄性ウイスター系ラット 8~9 週齢に 3,7,14,21 日間 30 μ g/mL のクレンプテロールを経口投与し、コントロール群には純水を投与した。咬筋およびヒラメ筋を摘出し、これらにおける筋分化マーカーである MyoD, myogenin, MCK, IGF-1 遺伝子の発現量の比較解析を Realtime-PCR 法により行なった。

<マイクロ CT を用いた口腔周囲筋群の体積、上気道容積の測定>

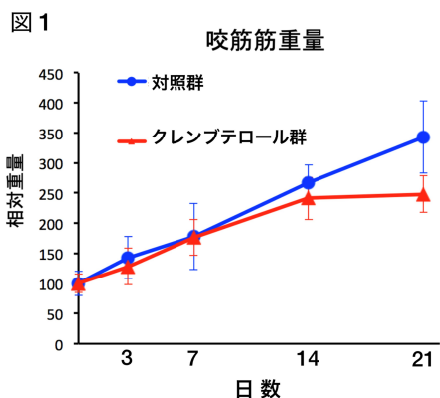
12 週齢のラットを 3 群に分け、それぞれ、高脂肪食 (High Fat Diet 32 $\text{\textcircled{R}}$, 日本クレア) のみ、0.1% のクレンプテロールを含む高脂肪食、および対照食 (Low Fat Diet $\text{\textcircled{R}}$, 日本クレア) を 10 週間与えた。マイクロ CT (ALOKA, LaTheta) による撮影し、三次元画像を構築し、上気道と口腔周囲筋の形態や体積との関連について、3 群間で得られた結果の比較解析を行なった。

統計学的解析には Tukey の方法および Mann-Whitney の方法を用いた。

4. 研究成果

クレンプテロールを投与したラットの咬筋量の変化を調べたところ、クレンプテロール経口投与群の体重は、対照群と同様に 21 日目まで一貫して増加したが、咬筋の筋線維

の最小直径は 14 日目以降増加が停止した。対照群では咬筋の筋繊維最小直径も増加し続けた。さらに 14 日目以降の咬筋の肥大をクレンプテロールが抑制させる働きを有することが確認され、従って咬筋の筋量調節にも関わることが明らかとなった。クレンプテロールは睡眠時無呼吸症候群の治療薬として使用出来る可能性があることが予想どおり示唆された(図 1)。



クレンプテロールが咬筋の筋量調節に関わっていることが示唆されたので、クレンプテロールがどのような筋分化マーカーの発現を促進あるいは抑制するのか解析した。MyoD, myogenin, myostatin, MCK, IGF-1 の 4 遺伝子について調べたところ、高脂肪食 + クレンプテロール投与群の咬筋では IGF-1 mRNA の発現量が顕著に上昇していた。ヒラメ筋ではクレンプテロール投与群も対照群も有意差は見られなかった。また IGF は myostatin と共にシグナル伝達経路を形成していることが知られる (Abo et al. Cell Biochem Funct. 2012) が、myostatin については有意な差は現れなかった。また IGF-1 の翻訳抑制作用の知られる microRNA である miR-206 の mimic 分子を投与したところ、咬筋筋繊維の最小直径の増加がやや回復した。以上により、クレンプテロール投与により IGF-1 発現量が上昇するが myostatin を介さない経路により咬筋の筋量調節が行なわれていることが示唆された。IGF は一般に筋分化因子であり、筋量増加を促進することが知られるが、同じ骨格筋でも四肢の筋と咀嚼筋のような頭部筋とでは発生、再生過程で作用する筋発生関連因子が微妙に異なっていることがわかってきていて、今回の結果はさらなる詳細な検討をする価値のあるものであった(図 2)。

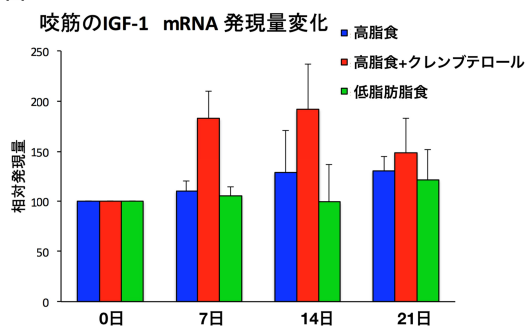
さらにマイクロ CT 撮影による筋の体積と上気道容積の測定を試みた。咬筋、顎二腹筋、舌外筋、舌内筋の体積に関しては、いずれも重量や筋繊維最小直径と非常に高い相関を示したが、最も興味のある上気道容積については、個体差が非常に大きく、明確な結果を得ることができなかった。上気道容積は咬筋の体積との逆相関があると予想していたが、この結果には以下のような事情が考えられ

る。上気道の体積はラットの姿勢や周囲の様々な筋の発している力により大きな差が出るのではないかと予想する。また固定後は口蓋部、咽頭部の組織の収縮の影響もあり測定誤差は一層大きくなる懸念される。したがって本研究では麻酔時における上気道容積の測定を行なったが、興味のあるのは活動時および睡眠時における上気道容積で、これらを測定する方法の探究が必要であると考えられた。睡眠時無呼吸症候群の直接の原因は上気道の狭窄と言われているが、その最も大きな原因となるのはどの筋の肥大であるか、これが明らかにされればクレンプテロールの最も有効な投与方法や、あるいはさらに効果の高い筋肥大抑制薬を見出す事ができると考えられる。

なおクレンプテロールの投与方法として経口投与以外に筋組織への注射、噴霧を試みたが、どちらも効果が安定せず、今回の研究には適さなかった。

本研究で明らかになったのは、クレンプテロールは睡眠時無呼吸症候群の治療薬となりうること、およびクレンプテロールは咬筋においては IGF-1 の発現を促進することが示唆されたことである。いっぽう上気道容積の測定には課題が残った。

図 2



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 4 件)

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. DOI: 10.1177/0022034513476038 査読有

KANEKO S., IIDA R., SUGA T., MORITO M. and YAMANE A. Age-related changes in rat genioglossus, geniohyoid, and masseter muscles. Gerodontology 31(1): 56-62, 2014. DOI: 10.1111/ger.12004 査読有

NARIYAMA M, MORI M, SHIMAZAKI

E, ANDO H, OHNUKI Y, ABO T, YAMANE A, ASADA Y. Function of miR-1 and miR-133a during the postnatal development of masseter and gastrocnemius muscles. Mol. Cell. Biochem. 407(1-2): 17-27, 2015. DOI: 10.1007/s11010-015-2450-y. 査読有

CHIKENJI A, ANDO H, NARIYAMA M, SUGA T, IIDA R, GOMI K. MyoD is regulated by the miR-29a-*Tet1* pathway. J. Oral Sci. in press. 査読有

[学会発表](計6件)

飯田良平. 摂食嚥下リハビリテーションの輪 ~ 気仙沼・南三陸での4年間の活動から学ぶ~. 第21回日本摂食嚥下リハビリテーション学会学術大会. 2015年9月12日, 国立京都国際会館, 京都府京都市.

島崎絵美, 成山明具美, 安藤 準, 山根 明, 朝田芳信. 咬筋におけるmiR-206とアセチルコリン受容体形成因子との関連性について. 第56回日本歯科基礎医学会学術大会. 2014年9月27日, 福岡国際会議場, 福岡県福岡市.

飯田良平. 地域完結型歯科医療システムの構築をめざして. 第26回日本老年歯科医学会総会. 2014年6月13日, パシイフイコ横浜, 神奈川県横浜市.

Ando H, Okura S, Yamane A. The evolution of microRNA targets in striated muscle genes. 第36回日本分子生物学会年会. 2013年12月3日, 神戸国際展示場, 兵庫県神戸市.

安藤 準, 山根 明. 筋発生関連因子における筋関連 microRNA 標的の進化 (The Evolution of MyomiR Targets on Striated Muscle Genes). 第55回日本歯科基礎医学会学術大会. 2013年9月22日, 岡山コンベンションセンター, 岡山県岡山市.

千見寺 亮吉, 山根 明, 安藤 準, 五味 一博. C2C12 培養筋芽細胞の増殖における miR-29 の役割について. 第55回日本歯科基礎医学会学術大会. 2013年9月21日, 岡山コンベンションセンター, 岡山県岡山市.

6. 研究組織

(1)研究代表者

飯田 良平 (Iida, Ryohei)
鶴見大学・歯学部・助教
研究者番号: 70339810

(2)研究分担者

小川 匠 (Ogawa, Takumi)

鶴見大学・歯学部・教授
研究者番号: 20267537

安藤 準 (Ando, Hitoshi)
鶴見大学・歯学部・講師
研究者番号: 00282765