

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：25463037

研究課題名(和文)非咬合モデルマウス咀嚼筋におけるmiR-206によるAChRクラスター形成の調節

研究課題名(英文)Regulation of AChR cluster formation by miR-206 in masticatory muscles of mi/mi mice.

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：生後発達過程におけるmiR-206の発現量は咬筋では、4週齢においてmi/miマウスにおけるmiR-206の発現量は野生型と比較して有意に低かった。この現象は被覆筋では見られず、miR-206は咀嚼筋の発達に関与していることが示唆された。しかしmiR-206の機能抑制および促進実験では、アセチルコリン受容体クラスターの数に変化が起らなかった。もう1種miR-29aについても解析し、歯の萌出前後に発現量変化が見られることは分かったが、ACh受容体クラスター形成因子群の発現量変化との関係は分からなかった。

研究成果の概要(英文)：Expression of endogenous miR-206 markedly increased with a peak at 4 weeks in the masseter of wild mice, but it kept low level until 12 weeks in those of the mi/mi mice. It suggested that miR-206 has a role in the formation of ACh receptor clusters. However, The average number of ACh receptor clusters was not changed when expression of miR-206 was inhibited or enhanced. More successful method of loss and gain of function experiments for microRNAs. We also investigated expression change of miR-29a which is another important microRNA in myogenesis. Expression pattern of miR-29a was similar to miR-206, but it could not change expressions of Agrin, MuSK, Lrp4 and Rapsin, which are regulation genes of ACh receptor cluster formation.

研究分野：医歯薬学

キーワード：miR-206 miR-29 mi/mi mouse 咬筋

1. 研究開始当初の背景

高齢化社会を迎え、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、舌筋や咀嚼筋の筋力低下が考えられる。この高齢者における筋力の低下の大きな原因の一つとして、齲蝕や歯周病による歯の喪失により非咬合状態になることが挙げられる。また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。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。

これまでに我々は歯が萌出しない小眼球症マウス(mi/mi マウス)を用いて、非咬合状態が咀嚼筋の性質に与える影響の検討を行っている。この mi/mi マウスはアルギニンが欠失し DNA 結合能を持たない mitf 遺伝子が発現している突然変異体である。またこのマウスは小眼球症以外に難聴、色素異常によるアルビノ、大理石骨症などの異常が報告されている。さらに mi/mi マウスは破骨細胞が正常に発生しないため、上下顎のすべての歯が萌出していない。よって mi/mi マウスを用いることにより非咬合状態が咀嚼筋の性質に及ぼす影響を明らかにすることが容易である。筋の動きを制御する神経の情報は、神経終末から放出されたアセチルコリン(ACh)が、ニコチン性アセチルコリン受容体(nACh受容体)に結合することにより伝達される。神経と筋のシグナル伝達を効率よく行なうために、AChが結合するnACh受容体は、凝集されクラスターを形成する必要があると報告されている。

mi/mi マウスを用いた研究では、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nACh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が報告されている(Kota, Yamane, Tomohiro, Asada. J Dent Res 88(8):768-772, 2009)。また我々は共焦点レーザー顕微鏡を用いて3次元解析を行ない野生型マウスと比較してmi/miマウスの咬筋のnACh受容体のクラスターの体積が減少し、クラスターの断片化が促進されるという異常がおきていることを抗加齢医学会で発表している。

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(RISC)を形成して標的となるmRNAに結合し、その翻訳能を抑制している。miRNAの機能は幹細胞の多能性、細胞の増殖・発生・分化・代謝など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(Bushati & Cohen, Annu Rev Cell Dev Biol 2007)。骨格筋の発生過程においてはmiR-1, 24, 29, 133, 181, 206, 208, 499が

様々なターゲットを介して骨格筋細胞の発生を調節することがすでに報告されている(Ge & Chen, Cell Cycle 2012)。これらのmiRNAのなかでも特にmiR-206がヒストン脱アセチル化酵素(Histone Deacetylase, HDAC)の抑制を介して筋萎縮性側索硬化症(Amyotrophic lateral sclerosis, ALS)モデルマウスの神経筋接合部の再生を促進しているという報告がある。この結果はmiR-206がHDACを介して神経筋接合部におけるクラスター形成を調節していることを示唆している。

2. 研究の目的

非咬合モデルマウス(mi/mi)の咀嚼筋におけるmiR-206およびmiR-29によるACh受容体クラスター形成調節機構を解明することである。

3. 研究の方法

<内源性miR-206, miR-29a, 関連因子の発現量解析>

生後発達過程におけるmi/miおよび野生型マウスの咀嚼筋に内在するmiR-206の発現量を明らかにするための実験を行なった。
□野生型, mi/mi 共に生後3週まで母乳で飼育し、その後離乳させた。離乳後mi/miには粉末飼料を、野生型には固形飼料と粉末飼料を与えた。生後1, 4, 12週目にそれぞれ6匹ずつの体重を測定後咬筋と腓腹筋を摘出した。摘出した咬筋と腓腹筋の重量を測定し、筋組織よりmicroRNAを抽出・精製し、逆転写を行ない、cDNAを調整した。得られたcDNAを用いてReal-Time PCRを行ない、miR-206の発現量を測定し、核小体低分子RNA202(snoRNA202)の発現量を用いて補正を行なった。miR-29aについても同様に解析を行なった。さらにAgrin, MuSK, Lrp4, RapsinについてもmRNAの発現量解析を行なった。発現量補正にはハウスキーピング遺伝子GAPDHを用いた。

<miR-206の機能抑制, 促進実験解析>

アテロコラーゲンを用いて咀嚼筋に局所的にmiR-206に対するモルフォリノアンチセンスオリゴを投与することにより機能抑制実験を行なった。1週齢のマウスの咬筋および腓腹筋に高研社製アテロコラーゲン(AteloGene®)と混合したmiR-206に対するモルフォリノアンチセンスオリゴを注入した。モルフォリノアンチセンスオリゴの投与は1週齢から8週齢までの2日に1回行い、投与終了後、咬筋と腓腹筋を摘出した。Real-time PCR法を用いて咬筋と腓腹筋におけるターゲットmiRNAの発現量を計測し、アンチセンス鎖の抑制効果を確認した。

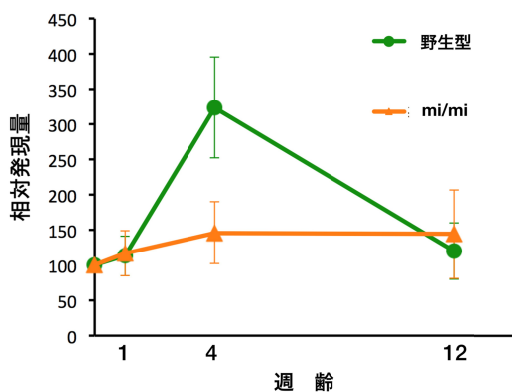
またmiR-206の機能促進実験を行なった。抑制実験同様にアテロコラーゲンを用いて咀嚼筋に局所的にmiR-206を組み込んだ発現ベクターを投与した。摘出した咬筋と腓腹

筋は、クリオスタットをもちいて筋標本のほぼ中央部付近で厚さ 20 μm の凍結切片を作成した。ラミニン抗体を用いる蛍光免疫染色法により筋線維膜を染色した。ローダミンなどの蛍光色素で標識したブンガロトキシンで ACh 受容体クラスターを染色し、共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行なった。共焦点レーザー顕微鏡を用いて 0.5 μm の厚さで断層組織染色像を採集し、市販の三次元立体構築用ソフトウェア(Amira 3.1, Mercury Computer Systems)を用いてクラスターの成熟度の指標となる形態、体積、断片数を解析した。mi/mi マウスは出産数が非常に少なく、研究全般にわたり供することができなかつたため、一部の実験は野生型マウスの萌出歯を物理的に切断し、mi/mi マウスの代替とした。

4. 研究成果

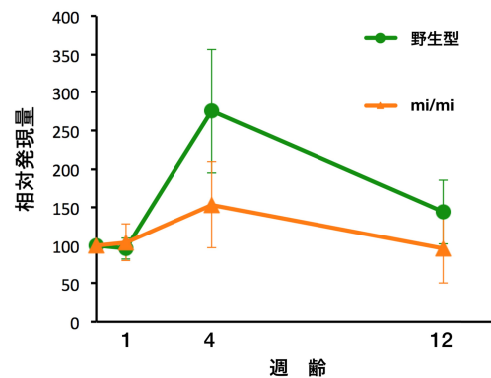
生後発達過程における miR-206 の発現量は、咬筋では 4 週齢において野生型は顕著に増加し 12 週齢で減少した。mi/mi は 1 週齢から 12 週齢の間で顕著な変化は認められなかった。つまり 4 週齢において mi/mi における miR-206 の発現量は野生型と比較して有意に低かった($P < 0.05$)。いっぽう腓腹筋では mi/mi も野生型も加齢とともに減少し、各週齢において野生型と mi/mi で有意差は認められなかった。吸啜から咀嚼への転換が終了した 4 週齢において野生型と mi/mi との間で miR-206 の発現量に差が見られたことから、咬合様式の違いが miR-206 の発現に何らかの影響を及ぼしている可能性が示唆された(図 1)。

図 1 内在性miR-206



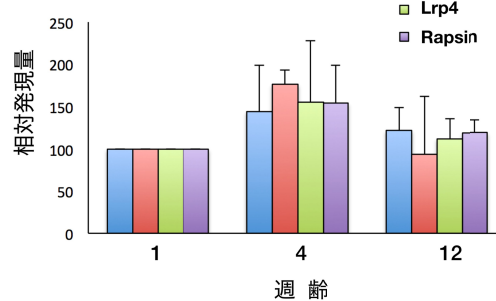
さらに当初の計画とは異なるが、筋の発生・分化への関与がやはり注目される miR-29a についても内在性の発現量を調べてみたところ、miR-29a も miR-206 同様に野生型では 1 週齢から 4 週齢にかけて発現量が顕著に上昇し、12 週齢では 1 週齢とほぼ等しい発現量に減少した。mi/mi ではやはり miR-206 と同様に 12 週齢までに大きな発現量変化は無かった(図 2)。

図 2 内在性miR-29a



次いで ACh 受容体クラスター形成因子である Agrin, MuSK, Lrp4, Rapsin についてもこれらの mRNA の発現量変化を調べたが、これらのすべてが、変化量の大小はあるものの野生型の咬筋では 4 週齢において発現量が極大化したが、mi/mi では 12 週齢までに顕著な変化がなかった(図 3)。

図 3 mi/mi におけるACh受容体形成因子の発現量変化



mi/mi マウスの出産数が少なく、研究期間内に十分な個体数の mi/mi マウスの入手ができなかつたため、物理的に歯を除去したマウスにおける実験を試みた。しかし物理除去マウスにおける miR-206 の発現量は 12 週齢までに多少の変動はあったものの mi/mi よりも野生型のものに近かった。Agrin, MuSK, Lrp4, Rapsin においても同様の結果であった。一方 miR-29a の発現量変化を、Realtime RT-PCR 法にて解析した。miR-29a も miR-206 同様に野生型では 1 週齢から 4 週齢にかけて発現量が顕著に上昇し、12 週齢では 1 週齢とほぼ等しい発現量に減少した。mi/mi ではやはり miR-206 と同様に 12 週齢までに大きな発現量変化は無かった。miR-29a に関しては miR-206 と異なり、物理除去マウスにおける発現量変化は mi/mi に近い結果が得られた。ACh 受容体クラスター形成因子(Agrin, MuSK, Lrp4, Rapsin)に関しては野生型と物理除去マウス間で大きな相違はなかつたが、miR-29a の発現量変化は顕著に異なり、物理除去マウスと mi/mi が類似の結果となったことから、生後発達過程における miR-29a, 29b, 29c の発現量変化を詳細に比較解析した。3

種の miR-29 は物理除去マウスにおいて類似した発現量変化を示したが, miR-29a の変化量が最も著しかった。

miR-206 の機能抑制実験では, モルフォリンアンチセンスオリゴ投与により miR-206 の発現量は野生型の 4 週齢で約 55% に抑制できたが, Ach 受容体クラスター数は野生型, 歯の物理除去マウス共にほとんどが 3-5 個であり, 有意差は認められなかった。ACh 受容体クラスター形成因子(Agrin, MuSK, Lrp4, Rapsin)のいずれについても miR-206 の機能抑制により大きな発現量の変化は認められず, miR-206 が Ach 受容体形成に関与しているとは考えられなかった。また機能促進実験も試みた。歯の物理的除去マウスに miR-206 mimic を投与すると Ach クラスター数の増加あるいはこの形成因子の発現量増加が期待されたが, 全く変化が認められなかった。投与後の miR-206 量を測定してみると投与の効果が認められず, microRNA を局所にとどらせるためには更なる工夫が必要であることが分かった。

本研究の成果をまとめると以下のとおりである。まず miR-206 はアセチルコリン(ACh)受容体クラスター形成に関与している可能性はあるが, 作用機序の解明には至らなかった。また miR-29a も歯の萌出前後に発現量変化が見られるので, これが ACh 受容体クラスター形成に関与している可能性が示された。

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6件)

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

鈴木 絵美, 鈴木 聡行, 飯田 貴俊, 菅 武雄, 戸原 玄. 介護老人保健施設における摂食嚥下障害の取り組み内容と介入の効果(原著). 日本口腔リハビリテーション学会雑誌 28 巻 1 号: 44-53, 2015. 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

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

浅野 倉, 中島 丘, 三宅 一徳, 山本 真樹, 磯部 博行, 加藤 喜夫, 岡田 春夫, 飯田 良平, 菅 武雄, 森戸 光彦. 地域歯科医師会と日本老年歯科医学会地域支部主催による「高齢者歯科医療を实践するための研修会」での受講者の関心度および総合満足度について(原著). 老年歯科医学 28 巻 1 号: 34-42, 2013. 査読有

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

[学会発表](計6件)

菅 武雄 ら. 在宅歯科医療における運動障害性咀嚼障害への対応例. 第26回日本咀嚼学会学術大会. 2015年9月26日. 鶴見大学会館, 神奈川県横浜市.

菅 武雄 ら. 「食」のサポートに貢献するレオロジー. 第38回日本バイオレオロジー学会バイオレオロジーフォーラム. 2015年6月6日. 国立情報学研究所 学術情報センター, 東京都千代田区.

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.

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

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

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