

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861803

研究課題名(和文) マウス咀嚼筋適応機構の解明

研究課題名(英文) Masticatory muscle plasticity in mouse

研究代表者

梅木 大輔 (UMEKI, DAISUKE)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：10514937

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：咀嚼筋は四肢の骨格筋と同様に可塑性を有し、その表現型や生理機能は様々な咬合の状態に適応することが報告されている。しかしながら、その適応機構の詳細は未だ不明な点が多い。本研究では、実験動物にマウスを用い、咬筋とヒラメ筋における強制的開口(B0)による筋肥大効果および、それに対するデキサメタゾン(DEX)の拮抗作用について検討した。今回の結果から、咬筋とヒラメ筋ではDEXに対する感受性またはその作用機序が異なることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Masticatory muscles have the potential to adapt their mass and fiber types to a wide range of functional demands, as observed in limb muscles. However, these molecular mechanisms are poorly understood. In this study, we analyzed the effects of bite-opening treatment (B0) on muscle phenotypes of mice masseter muscle. To examine hypertrophic effects of B0 on masseter and soleus muscles as well as antagonistic action of dexamethasone (DEX), a glucocorticoid, against hypertrophy, we analyzed both muscle mass and fiber diameter of masseter, soleus muscles in B0 and/or DEX-treated mice. These results suggest that differences in the sensitivity to DEX or in the mechanisms of DEX antagonism between masseter and soleus muscles.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：咀嚼筋 シグナル伝達 デキサメタゾン 筋萎縮

### 1. 研究開始当初の背景

平成 23 年歯科疾患実態調査により、不正咬合を有する患児の割合は増加しているとの報告がある。しかし不正咬合の成立要因は、原因遺伝子が明らかなくつかの先天疾患以外未だ不明である。

近年、分子生物学的解析手法を用いた研究によって、咬合関係の違いにより咀嚼筋の遺伝子発現が異なることなどが報告され、顎態の変化と咀嚼筋の相互関係が注目されている。歯科矯正治療（咬合の改善）の目的の一つに口腔機能の改善がある。一方、口腔機能の中心的役割を果たす咀嚼筋は可塑性を有し、その表現型（筋線維サイズ、筋線維タイプ）や生理機能は様々な咬合の状態に適応することが知られている。しかしながら、その分子レベルでの詳細な機序には不明な点が多い。また、矯正治療過程、治療後の咬合および口腔機能の安定には咀嚼筋の適応が必要不可欠である。

したがって、口腔機能の改善を効率的に行うには咀嚼筋の適応機構の詳細を解明する必要がある。

これまでに研究代表者は、実験動物にラットを用いて咀嚼筋の適応現象を解析し、咬合状態の変化が咀嚼筋の表現型および生理機能に影響を及ぼすことを観察した (Arai C, Umeki D et al. *Jpn J Physiol.* 55, 173-179, 2005; Ohnuki Y et al. *Arch Oral Biol.* 783-789, 2009)。下顎切歯に咬合挙上板を装着した咬合挙上（顎間距離の増大、図 1）により咬筋の筋線維肥大および遅筋化（筋線維タイプが、短縮速度の遅い、難疲労性のタイプへ変化（エネルギー効率の良いタイプへ変化すること）が誘発されることを明らかにした。

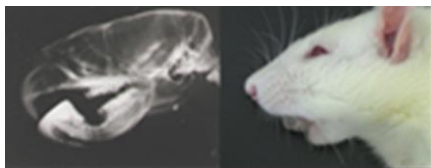


図1 咬合挙上モデル動物(ラット)

また、テレメトリーシステムによる筋電図記録を用いて自由行動下におけるラットの咀嚼筋の筋活動量を定量的に解析した結果、咬合挙上により咬筋および顎二腹筋の daily duty time (1日あたりの筋活動時間) の増加も観察された。さらに、咬合挙上により活性化される細胞内シグナル伝達経路の解析から、咬筋の咬合挙上への適応機構に Akt/mTOR 経路および Calcineurin 経路が関与することを示唆した (Umeki D et al. *J Pharmacol Sci.* 122, 278-288, 2013)。

これまで、実験動物にラットを用いて解析を行っていたが、今後 mRNA および miRNA の発現解析、機能解析を行うのにあたり、遺伝情報の豊富なマウスを実験動物に用い、マウスの咬合挙上モデルを作製することとした。

### 2. 研究の目的

本研究ではマウスの咬合挙上モデルを作製し、咬合状態の変化に対する咀嚼筋の表現型と生理機能の適応現象、およびその誘発機構をその他の骨格筋(ヒラメ筋)と比較し解明することを目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 予備実験として、C57BL/6 雄性マウスを、対照群 (Cont n=5)、咬合挙上 (BO) 群 (下顎切歯に咬合挙上板装着 n=5) の 2 群に分け 14 日後に咬筋を摘出 (咬筋との比較のため、ヒラメ筋も摘出) し、筋重量を測定した。挙上は切歯で 1 mm 程、14 日間の飼育にも耐えることを確認した (図 2)。

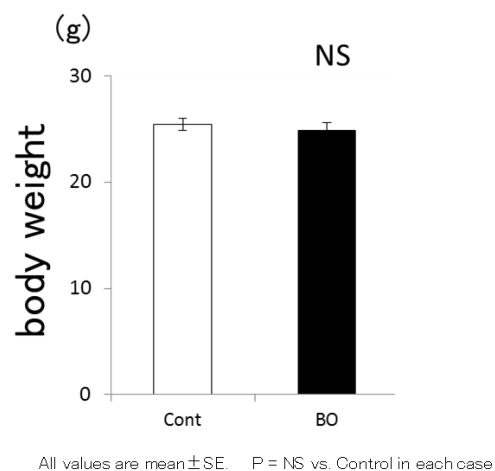


図2 対照群とBO群との体重差

(2) 予備実験終了後、咬合挙上により活性化されるシグナル伝達経路に対する阻害薬としてデキサメタゾン (DEX) 投与を単独もしくは咬合挙上と併用し、本実験を行った。

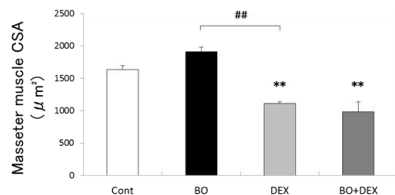
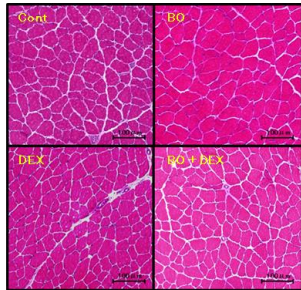
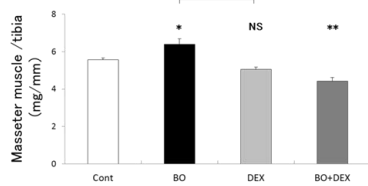
10 週齢の C57BL/6 雄性マウスを、対照群 (Cont n=5)、咬合挙上 (BO) 群 (下顎切歯に咬合挙上板装着 n=5)、DEX 群 (1.6mg/kg/2 日、i. p. n=5)、BO+DEX 群 (n=5) の 4 群に分けた。2 週間飼育後、咬筋、ヒラメ筋を摘出し、筋重量/脛骨長の比 (mg/mm) および筋線維断面積 (CSA:  $\mu\text{m}^2$ ) を計測した。

その後、適応現象を誘発する分子機構を解明するため、可能性のあるシグナル伝達経路に關与する因子 (Akt, ERK1/2) の発現量およびリン酸化レベルを Western blotting 法にて定量的に解析した。

### 4. 研究成果

(1) 筋重量/脛骨長の比および筋線維断面積  
 ①咬筋において BO 群では、咬筋の CSA と筋重量の増加傾向を認めた。DEX 群では、咬筋 CSA の萎縮 ( $p < 0.01$ ) を伴う筋重量の減少 ( $p < 0.05$ ) を認めた。BO+DEX 群では、咬筋 CSA

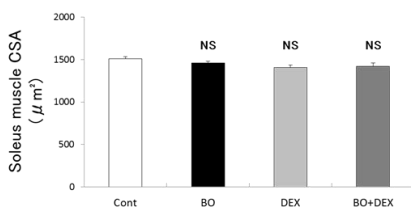
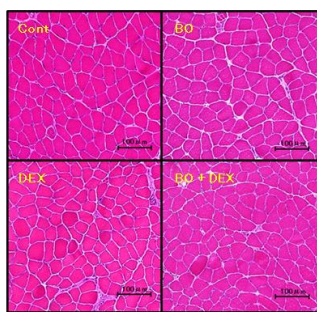
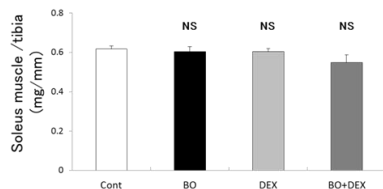
の萎縮 ( $p < 0.01$ ) を伴う筋重量の著しい減少 ( $p < 0.01$ ) が認められた (図 3)。



P = NS, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  vs. Control. ## $p < 0.01$  vs. DEX.

図3 各群の咬筋筋重量/脛骨長の比および咬筋筋線維断面面積

②ヒラメ筋においては各群間で筋重量/脛骨長の比および筋線維断面面積に有意な差は認められなかった。



P = NS vs. Control

図4 各群のヒラメ筋筋重量/脛骨長の比およびヒラメ筋線維断面面積

(2) Akt, ERK1/2 のリン酸化レベルの解析

Western blotting 法にて咬筋の ERK1/2, Akt のリン酸化レベルを定量的に解析した。

①Akt のリン酸化レベル

BO, BO+DEX 群では, Akt のリン酸化レベルの増加傾向が認められ, DEX 群ではリン酸化レベルの増加を認めた ( $p < 0.05$  図 5)。

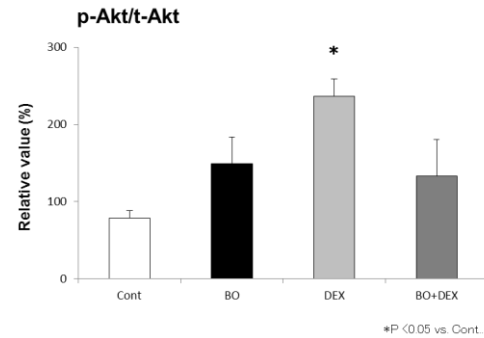


図5 各群におけるAktのリン酸化レベル

②ERK1/2 のリン酸化レベル

BO, BO+DEX 群で, ERK1/2 のリン酸化レベルの減少が認められた ( $p < 0.05$  図 6)。

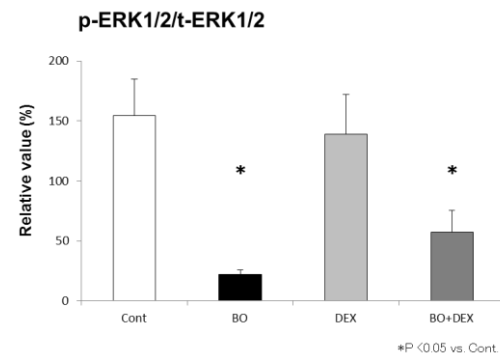


図6 各群におけるERK1/2のリン酸化レベル

以上の結果より、咬筋ではラットと同様、咬合挙上による筋重量の増加と筋線維の肥大および、DEX 投与による筋重量の減少、筋線維の萎縮が認められた。一方、ヒラメ筋では DEX 投与による筋重量の減少、筋線維の萎縮は認められなかった。また、Western blotting の結果より、咬合挙上による機械的刺激が Akt/mTOR 経路を介し、ERK1/2 経路を抑制することで、マウス咬筋の筋肥大を誘発している可能性が示唆された。このことから、咬筋とヒラメ筋では DEX に対する感受性またはその作用機序が異な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 3 件)

①Ohnuki Y, Umeki D, Mototani Y, Shiozawa K, Nariyama M, Ito A, Kawamura N, Yagisawa Y, Jin H, Cai W, Suita K, Saeki Y, Fujita T, Ishikawa Y, Okumura S.

Role of phosphodiesterase 4 expression in

the Epacl signaling-dependent skeletal muscle hypertrophic action of clenbuterol. *Physiol Rep.* 査読あり 2016 May;4(10). pii: e12791. doi: 10.14814/phy2.12791.

②Shiozawa K, Ohnuki Y, Mototani Y, Umeki D, Ito A, Saeki Y, Hanada N, Okumura S. Effects of food diameter on bite size per mouthful and chewing behavior. *J Physiol Sci.* 査読あり 2016 Jan;66(1):93-8.

③Umeki D, Ohnuki Y, Mototani Y, Shiozawa K, Suita K, Fujita T, Nakamura Y, Saeki Y, Okumura S. Protective Effects of Clenbuterol against Dexamethasone-Induced Masseter Muscle Atrophy and Myosin Heavy Chain Transition. *PLoS One.* 査読あり 2015 Jun 8;10(6):e0128263. doi:10.1371/journal.pone.0128263. eCollection 2015.

④Ohnuki Y, Umeki D, Mototani Y, Jin H, Cai W, Shiozawa K, Suita K, Saeki Y, Fujita T, Ishikawa Y, Okumura S. Role of cyclic AMP sensor Epacl in masseter muscle hypertrophy and myosin heavy chain transition induced by  $\beta$ 2-adrenoceptor stimulation. *J Physiol.* 査読あり 2014 Dec 15;592(24):5461-75. doi: 10.1113/jphysiol.2014.282996. Epub 2014 Oct 24.

[学会発表] (計 4 件)

①梅木大輔、大貫芳樹、伊藤愛子、八木澤由佳、成山明具美、石川美佐緒、川村直矢、中村芳樹、奥村 敏：咬筋および心筋における咬合挙上の筋肥大効果とデキサメタゾンの拮抗作用，第 58 回歯科基礎医学会学術大会，2016 年 8 月 24-26 日，札幌コンベンションセンター（北海道 札幌市）

②伊藤愛子、大貫芳樹、梅木大輔、石川美佐緒、八木澤由佳、中村芳樹、奥村 敏：咬筋における  $\beta$  アドレナリン受容体のサブタイプ特異的な役割，第 58 回歯科基礎医学会学術大会，2016 年 8 月 24-26 日，札幌コンベンションセンター（北海道 札幌市）

③梅木大輔、大貫芳樹、伊藤愛子、中村芳樹、奥村 敏：デキサメタゾン投与による咬筋の萎縮と遅筋化に対するクレンブテロールの拮抗作用，第 57 回歯科基礎医学会学術大会，2015 年 9 月 11-13 日，朱鷺メッセ（新潟県新潟市）

④梅木大輔、大貫芳樹、新井千博、奥村 敏、中村芳樹： $\beta_2$  アゴニストによるラット咬筋および顎二腹筋の肥大と速筋化に対する糖質コルチコイドの拮抗作用，第 56 回歯科基

礎医学会学術大会・総会，2014 年 9 月 25-27 日，福岡国際会議場（福岡県 福岡市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

梅木 大輔 (UMEKI DAISUKE)

鶴見大学・歯学部・助教

研究者番号：10514937