

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 17 日現在

機関番号：32710

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22791912

研究課題名（和文） 加齢による舌・咀嚼筋委縮のオートファジー、ユビキチン・プロテアソーム系の機能解析

研究課題名（英文） Study on the function of autophagy and ubiquitin-proteasome systems in the atrophy of tongue and masticatory muscles induced by aging

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

研究成果の概要（和文）：

老化により口の周りの筋や舌の筋のサイズが小さくなりかつ弱くなるしくみについて調べた。口の周りの筋や舌の筋は生命を保つために必要なもので、手足や体の筋と比較して、老化しても活発に活動しているおり、蛋白質を分解する働きも活発であることが推測された。また、老化の影響は口の周りの筋や舌の筋のなかでも異なっていることが推測された。

研究成果の概要（英文）：

In the present study, the mechanism for sarcopenia was explored. The activity of masticatory and tongue muscles such as protein degradation was more active than limb and trunk muscles in aged mice. The influence of aging varied among masticatory and tongue muscles.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・補綴系歯科学

キーワード：顎口腔機能学、摂食・嚥下機能障害

1. 研究開始当初の背景

超高齢社会の到来を目前として、舌筋や咀嚼筋の萎縮による摂食・嚥下機能障害により、窒息や誤嚥などの事故の増加が予想される。骨格筋の萎縮は筋蛋白質の合成-分解のバランスが萎縮側に傾いた時に起こる。筋蛋白質の分解は主に非選択的な蛋白質分解系であるオートファジー系および選択的な蛋

白質分解系であるユビキチン・プロテアソーム系によって行われていることが明らかになってきた(Mammucari C. et al., Cell Metabolism 6, 458-471, 2007; Lagirand-Cantaloube J. et al., EMBO J 27, 1266-1276, 2008)。

オートファジー系ではまず細胞質の一部が隔離膜によって取り囲まれ、細胞の成分をそのまま含んだオートファゴソームが形

成される。次にオートファゴソームと分解酵素を含んだリソソームが融合することによってオートファゴソームの内容物が分解する。

一方ユビキチン・プロテアソーム系では、まず分解するべきタンパク質にユビキチンという小さな標識が数珠状に結合する。このユビキチン鎖が目印となって、プロテアソームという分解酵素複合体によって蛋白質が分解される。しかし、老化による骨格筋の委縮にこれら2つの蛋白質分解系がどのように関与しているかは明らかになっていない。

舌、咀嚼筋の生化学、生理学、発生学的な性質は体幹や四肢の筋とは大きく異なっていることが知られている (Yamane, A. et al., *Cell and Tissue Res*, 322: 183-189, 2005)。例えば、本研究の研究協力者である山根 明 (鶴見大・歯・物理) らのグループは咀嚼筋の一種である咬筋に含まれる成体幹細胞(衛星細胞)のプールが体肢の筋と比較して大きいことをすでに報告している (Yamane A. et al., *Am J Physiol Cell Physiol* 289:C42-48, 2005)。これらのことから、舌、咀嚼筋における筋萎縮のメカニズムは体肢の筋とは異なる可能性が考えられる。

2. 研究の目的

老化に伴う舌、咀嚼筋委縮は摂食・嚥下機能障害の原因になる可能性がある。骨格筋の委縮には、オートファジー系およびユビキチン・プロテアソーム系が関与しているといわれている。本研究の目的は、老化に伴って起こる舌、咀嚼筋萎縮のメカニズムに、オートファジー系およびユビキチン・プロテアソーム系が関与しているかどうかを明らかにし、その結果をもとにして、この二つの蛋白質分解系に作用する薬物のなかから、舌、咀嚼筋の萎縮を防止する薬物やサプリメントとして有効なものを探索することである。

3. 研究の方法

(1) 4週齢の Klotho マウスおよび野生型マウスを安楽死させ舌、咬筋、腓腹筋を摘出し蛋白質を分離・精製した。Western blotting法を用いて、これらの筋における IGF シグナル伝達因子 (IGF 受容体, Akt, Fox03) のリン酸化レベルおよび mTOR シグナル伝達経路の下流の構成因子 (4E-BP1, S6K) のリン酸化レベル、オートファゴソーム・リソソーム系のマーカーである IC3, Gabarap, ユビキチン・プロテアソーム系のマーカーである MAFbx, MuRF1 の発現について調べた。

(2) 6、12、24ヶ月齢の野生型マウスを安楽死させ咬筋、オトガイ舌筋、オトガイ舌骨筋を摘出し RNA、蛋白質を分離した。老化

に伴う筋特性変化を明らかにするため SDS-PAGE、Real-time PCR 法を用いて、これらの筋におけるミオシン重鎖のタイプ I, IIa, IIb, IIc/d/x の発現を解析した。

4. 研究成果

(1) Klotho マウスの咬筋、舌筋、腓腹筋の湿重量は、正常マウスと比較して、それぞれ 59%、33%、68%という顕著な減少を示した ($p < 0.01$)。IGFRI, Akt1, Fox03 のリン酸化フォームおよび MAFbx, MuRF1 の咬筋、舌筋、腓腹筋における発現については Klotho 及び野生型マウスの間で有意な差異は認められなかった。mTOR 下流のシグナル伝達因子である 4E-BP1, S6K のリン酸化レベルは、Klotho マウスの咬筋では約 50~60% ($p < 0.01$)、舌筋で 40~45% ($p < 0.01$)、野生型と比較して低下していたが、腓腹筋では Klotho マウスと野生型マウスの間で統計学的な有意差は認められなかった (図 1)。

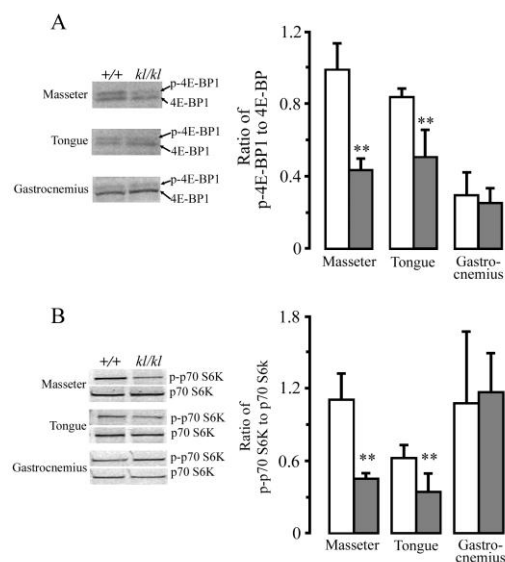


図 1 : 4E-BP1, S6K のリン酸化レベル

Klotho マウスの咬筋、舌筋において Gabarap (図 2)、LC3-II (図 3) の発現量が正常マウスと比較してそれぞれ 249% ($p < 0.05$)、279% ($p < 0.01$) の増加が認められた。

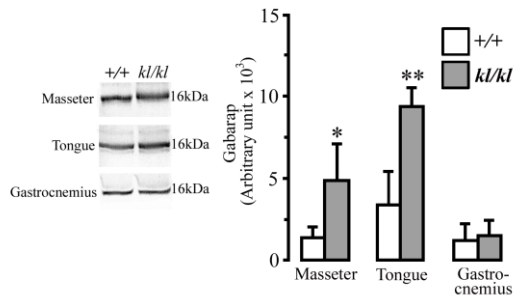


図 2 : Gabarap の発現量

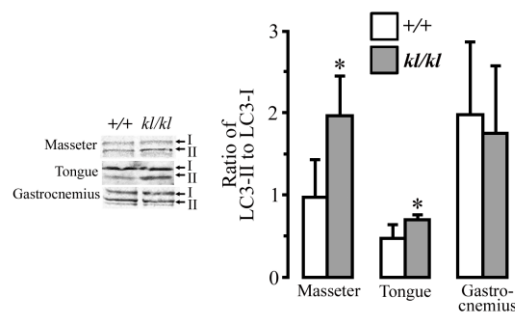


図 3 : LC3-II の発現量

以上の結果より Klotho マウスの咬筋と舌筋におけるオートファジー系の活性化には IGF シグナルではなく、直接 mTOR を介する経路が関与していることが示唆された。咬筋や舌筋では咀嚼、嚥下、呼吸などの生存のために必須な活動に関与しているため活発に活動し、腓腹筋と比較してアミノ酸不足が起こっていたため mTOR を介してオートファジーが活性化されたことが推測された。

(2) 咬筋においては、蛋白質、mRNA とともにタイプ IIb、II d/x の発現が観察されたが、老化に関連する発現量の統計学的に有意な変化は認められなかった。オトガイ舌筋においては蛋白質、mRNA とともにタイプ IIa、IIb、II d/x の発現が観察された。蛋白質、mRNA とともに IIb の発現量が老化に伴って減少していることが観察された。IIb、II d/x の発現量には老化に関連する大きな変化は観察されなかった。オトガイ舌骨筋においては蛋白質、mRNA とともにタイプ IIa、IIb、II d/x の発現が観察されたが、老化に関連する発現量の統計学的に有意な変化は認められなかった。

咬筋、オトガイ舌筋、オトガイ舌骨筋などの口腔周囲筋においては老化に関連する筋の特性変化は小さいことが示唆された。ま

た、老化の影響は口腔周囲筋の間でも差があることが示唆された。

以上の結果からオートファジー系およびユビキチン・プロテアソーム系に作用する薬物のなかから、舌、咀嚼筋の萎縮を防止する薬物やサプリメントとして有効なものを探索するための基礎的なデータが得られたと思われる。

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 7 件)

- ① KANEKO, S., IIDA, R., SUGA, T., MORITO, M. and YAMANE, A. Age-related changes in rat genioglossus, geniohyoid, and masseter muscles. Gerodontology In press 査読有
- ② ABO, T., IIDA, R., KANEKO, S., SUGA, T., YAMADA, H., HAMADA, Y. and YAMANE, A. IGF and myostatin pathways are respectively induced during the earlier and the later stages of skeletal muscle hypertrophy induced by clenbuterol, a beta2-adrenergic agonist. Cell Biochem. Func. 30(8):671-676, 2012 査読有
- ③ KANEKO, S., IIDA, R., SUGA, T., FUKUI, T., MORITO, M. and YAMANE, A. Changes in triacylglycerol-accumulated fiber type, fiber type composition, biogenesis in the mitochondria of the soleus muscle in obese rats. Anat. Rec. 294 (11): 1904-1912, 2011 査読有
- ④ IIDA, R., KANEKO, S., SUGA, T., MORITO, M. and YAMANE, A. Autophagic-lysosomal pathway functions in the masseter and tongue muscles in the klotho mouse, a mouse model for aging. Mol. Cell. Biochem. 348(1):89-98, 2011 査読有
- ⑤ YAMANE, A., FUKUI, T., SUGA, T., IIDA, R. and MORITO, M. TGFβ3 is expressed in differentiating muscle of the embryonic mouse tongue. Int. J. Dev. Biol. 54(1):221-226, 2010 査読有
- ⑥ FUKUI, T., SUGA, T., IIDA, R., MORITO, M., LUAN, X., DIERKWISCH, T.G.H., NAKAMURA, Y. and YAMANE, A. BMP-2 regulates the formation of oral sulcus in mouse tongue by altering the balance between TIMP-1 and MMP-13. Anat. Rec. 293(8):1408-1415, 2010 査読有
- ⑦ 飯田良平、菅 武雄、山根 明、森戸光彦. Klotho 遺伝子突然変異マウス骨格筋にお

けるインスリン様増殖因子およびその受容体 mRNA 発現. 鶴見歯学、36(2):95-102, 2010 査読有

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

なし

(3) 連携研究者

なし