

## 論文の内容の要旨

氏名：竹 内 健

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：加齢および臼歯喪失によるマウス咬筋の遺伝子発現変化

身体諸器官に表れる加齢変化は、成熟期以降に進行する生理的および形態学的な衰退現象である。骨格筋においても加齢に伴う筋量の減少と筋力の低下が認められ、これらの変化は高齢者における転倒や骨折のリスク増大および ADL 低下などに影響を及ぼす。加齢による骨格筋の減少は、上肢と下肢の筋では下肢の方が大きく、また、同じ下肢であっても下腿部より大腿部で大きいなど、全身の骨格筋において一様に発現しないことが明らかにされている。

咀嚼筋においても他の骨格筋と同様に、加齢に伴い筋量は減少する。ヒトの咬筋と内側翼突筋では、加齢に伴い断面積の縮小と筋線維密度の減少が生じ、咬筋の厚さは 60 歳以降に減少する。また、咀嚼筋によって発揮される咬合力も加齢に伴い低下する。さらに、これら咀嚼筋の萎縮と咬合力の低下は、残存する歯の数や咬合支持の影響を受けることも報告されている。

加齢に伴い萎縮した骨格筋では、筋再生能の低下により筋線維数が減少するとともに、筋タンパクの合成低下と分解亢進による筋線維の萎縮が生じる。そのメカニズムには未だ不明な点が多いが、DNA マイクロアレイを用いた研究において、マウス、ラット、サルおよびヒトの下肢筋では、タンパク代謝、エネルギー代謝、ストレス反応、免疫・炎症反応、転写、あるいは細胞外基質などに関連する遺伝子で加齢に伴う発現変化が報告されている。

しかし、咀嚼筋における遺伝子発現の加齢変化は、これまでにわずか数種の遺伝子について報告されているに過ぎない。また、咀嚼筋の萎縮や咬合力に影響する咬合支持の喪失に伴う遺伝子発現変化についても不明である。そこで本研究では、マイクロアレイを用いてマウス咬筋の加齢に伴う遺伝子発現変化を網羅的に解析し、その様相を探索した。さらに、臼歯を抜歯した老齢マウスを用いて咬合支持喪失に伴うマウス咬筋の遺伝子発現変化についても解析し、加齢変化との相違について検討を行った。

実験には、18 ヶ月齢および 6 ヶ月齢の C57BL/6J Jcl 雄性マウス（日本クレア）を用いた。18 ヶ月齢時にネブタール麻酔下で上顎両側臼歯すべてを抜歯し、3 ヶ月後の 21 ヶ月齢まで飼育したマウスを抜歯群とした。一方、18 ヶ月齢時に麻酔処置のみを行い、抜歯を行うことなく 21 ヶ月齢まで飼育したマウスを老齢群とした。また、6 ヶ月齢のマウスには何の処置を行わず、若齢群として実験に供した。若齢群、老齢群、抜歯群ともに 5 匹のマウスを使用し、全ての実験期間を通して自然環境下で乾燥固形飼料と水を自由摂取させて飼育した。老齢群および抜歯群のマウスについては、麻酔処置あるいは抜歯処置後の体重を 1 週ごとに測定した。なお、本研究における実験動物の飼育、管理ならびに研究方法は、日本大学歯学部動物実験委員会の承認 (K07-08) を得ている。

各群ともジエチルエーテル麻酔下でマウスを安楽死させ、両側の咬筋浅部を迅速に摘出した。摘出した筋は RNA 安定化溶液に 24 時間浸漬したのち、RNA を抽出するまで  $-80^{\circ}\text{C}$  で保存した。total RNA は RNeasy Fibrous Tissue Mini Kit (QIAGEN) を用いて、右側咬筋から抽出した。抽出した RNA は分光光度計を用いて純度と濃度を確認し、各群とも 5 匹のマウスの RNA を等量ずつ混和してマイクロアレイ解析に用いた。

アレイには 45,037 のプローブセットを搭載し、約 34,000 のマウス遺伝子の発現を網羅的に解析できる GenChip Mouse Genome 430 2.0 Array (Affymetrix) を用いた。ラベリングおよびハイブリダイゼーションは、GeneChip Expression Analysis Technical Manual (Affymetrix) に従って行い、ストレプトアビジン-フィコエリスリン染色後に Scanner 3000 7G (Affymetrix) でスキャニングした。

各プローブセットのシグナル強度は、Expression Console Software (Affymetrix) を用いて数値化し、MAS5 統計アルゴリズムによるノーマライズを行った。また、Wilcoxon single-ranked test によりシグナル検出の有無を決定し、若齢群、老齢群および抜歯群のすべてにおいてシグナルが検出されたプローブセットを解析対象遺伝子とした。さらに、各群のシグナル値の比較から発現変動率を算出し、発現

変動率が2倍以上の遺伝子を抽出した。これにより、若齢群と老齢群の比較から加齢に伴い発現変化する遺伝子を、老齢群と抜歯群の比較から抜歯に伴い発現変化する遺伝子を検索した。

各遺伝子の機能は、MGI (Mouse Genome Informatics) が提供する Gene Ontology の biological process を用いて決定した。遺伝子機能をアポトーシス・細胞周期、発生、細胞接着・細胞外基質、免疫反応、ストレス反応、タンパク代謝、脂質・炭水化物代謝、転写、増殖因子・サイトカイン、および輸送の10カテゴリーに分類し、カテゴリーごとにその機能を有する遺伝子数を算出した。

マウス体重の統計学的解析は、Levene の検定後にt検定を行った。また、マイクロアレイ解析における発現上昇および低下遺伝子数の割合の検定には、Fisher の正確確率検定を用いた。いずれも有意水準を5%とし、統計ソフトにはIBM SPSS Statistics 20 (日本IBM)を用いた。

老齢群と抜歯群の体重変化を1週間ごとに測定した結果、抜歯群の平均体重は抜歯処置の1週後に約10%の減少を認めたが、すべての測定時点において両群の平均体重に有意差は認められなかった。このことから、本研究においてはマウスの体重の影響はないものと考えられた。

咬筋では加齢に伴い212遺伝子で発現変化を認め、110遺伝子で発現が上昇し、102遺伝子で発現が低下していた。このうち、Fst 遺伝子の発現上昇と、Col4a1, Ccnd2, Col3a1, Col1a1, Col1a2 遺伝子の発現低下は、下肢筋のマイクロアレイ解析においても報告されている。加齢と抜歯における遺伝子発現変化パターンの違いを解析する本研究は、特定の機能を有する遺伝子をターゲットとしていないため、RT-PCR 法などを用いた遺伝子発現の確認を行っていない。そのため、これらの遺伝子の発現変化の確認は今後の検討課題である。

加齢に伴い発現変化を認めた遺伝子のうち、脂質・炭水化物代謝、免疫反応、発生、ストレス反応に関連する遺伝子は発現上昇する傾向を示し、タンパク代謝、転写、増殖因子・サイトカインに関連する遺伝子は発現低下する傾向を示した。この中でも、ストレス反応、免疫反応、タンパク代謝の各カテゴリーにおける遺伝子発現変化は、これまでに報告されている下肢筋の遺伝子発現変化と同様のパターンを示した。そのため、これらのカテゴリーにおける遺伝子発現変化のパターンは、骨格筋に共通した加齢変化である可能性が示唆された。また、加齢に伴って認められたストレス反応に関する遺伝子の発現変化は、骨格筋以外にも脳や肝、肺などのマイクロアレイ解析においても同様に観察されることから、全身の組織で生じる加齢変化である可能性が考えられた。一方、咬筋では脂質・炭水化物代謝関連遺伝子で発現上昇を示す遺伝子の割合が高い傾向を示したが、下肢筋では報告がみられない。また、咬筋における転写および増殖因子・サイトカインに関する遺伝子発現は下肢筋における報告と異なる変化を示した。これら咬筋と下肢筋における発現変化パターンの違いには、サンプルの種、月齢・年齢、筋の部位による筋線維の組成の違いが影響していると考えられた。

一方、咬筋では抜歯に伴い210遺伝子に発現変化が認められ、101遺伝子で発現が上昇し、109遺伝子で発現が低下していた。アポトーシス・細胞周期、発生、タンパク代謝、転写に関する遺伝子は発現上昇する傾向を示し、免疫反応、増殖因子・サイトカイン、ストレス反応に関する遺伝子は発現低下する傾向を示した。加齢に伴う発現変化と比較して抜歯に伴う発現変化では、免疫反応に関するカテゴリーで発現低下した遺伝子の割合が有意に高く、タンパク代謝に関するカテゴリーで発現上昇した遺伝子の割合が有意に高かった。

加齢に伴い発現上昇した免疫反応に関する遺伝子のうち、抜歯により発現上昇した遺伝子はなかった。また、加齢に伴い発現低下した遺伝子においても抜歯により発現低下した遺伝子はみられなかった。同様に、タンパク代謝に関する遺伝子においても、加齢と抜歯の両条件でともに発現上昇した遺伝子、またはともに発現低下した遺伝子はみられなかった。

さらに、加齢または抜歯に伴い発現変化を認めた全364遺伝子についてみると、加齢に伴い発現上昇した110遺伝子のうち、25遺伝子は抜歯に伴い発現低下していたが、加齢と抜歯の両条件でともに発現上昇した遺伝子はみられなかった。一方、加齢に伴い発現低下した102遺伝子のうち、抜歯に伴う発現変化を認めた33遺伝子はすべて発現上昇を示し、加齢と抜歯の両条件でともに発現低下した遺伝子はみられなかった。

以上の結果から、加齢変化と臼歯抜歯後にみられる咬筋の遺伝子発現変化パターンとの間には相関関係はなく、抜歯後にみられる遺伝子発現の変化は咬筋の廃用性萎縮と関係している可能性が示唆された。