

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

日本大学歯学部歯科補綴学第 I 講座

研究講座員 竹内 健

(指導：祇園白 信仁 教授，高津 匡樹 准教授)

## 緒 言

身体諸器官に現れる加齢変化は、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<sup>1-3)</sup>と筋力の低下<sup>2,4)</sup>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や、これに伴う ADL 低下に影響を及ぼす<sup>5,6)</sup>。

Janssen ら<sup>1)</sup>は、18 歳から 88 歳の男女 468 名を対象とした研究において、全身の筋量は 45 歳以降で顕著に減少し、体重のおよそ 0.3%に相当する筋量が毎年失われると報告している。しかしながら、加齢による筋量の減少は全身の骨格筋において一様に発現するわけではない。例えば、上肢と下肢の筋では下肢の方が減少量は大きく<sup>1,3)</sup>、同一肢内であっても下肢では下腿部より大腿部で<sup>3)</sup>、上腕二頭筋と三頭筋では二頭筋でそれぞれ減少量が大きい<sup>2)</sup>。

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。Newton ら<sup>7)</sup>は、ヒトの咬筋および内側翼突筋において、加齢に伴う断面積の縮小と筋線維密度の減少を報告している。また、超音波測定器を用いた研究においても、咬筋の厚さは 60 歳以降に減少することが明らかにされている<sup>8)</sup>。一方、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<sup>9-12)</sup>。24 歯以上を保有する 8 歳から 68 歳の男女 122 名を対象に、片側咬みしめ時の大白歯部における最大咬合力を測定したところ、咬合力は男性で 45 歳以降、女性で 25 歳以降に低下すると報告されている<sup>9)</sup>。さらに、加齢に伴う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<sup>7,11,12)</sup>。

加齢に伴い萎縮した骨格筋では、筋再生能の低下による筋線維数の減少、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<sup>13)</sup>。そのメカニズムには未だ不明な点が多いが、成長ホルモンや insulin-like growth factor-1<sup>14,15)</sup>、transforming growth factor- $\beta$  や fibroblast growth factor などの増殖因子<sup>16,17)</sup>、さらに

interleukin-6 や tumor necrosis factor- $\alpha$  などのサイトカイン<sup>18,19)</sup>の関与が知られている。また、数千以上の遺伝子の発現変化を網羅的に解析する 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<sup>20-24)</sup>。

しかし、咀嚼筋における遺伝子発現の加齢変化に関しては、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<sup>25,26)</sup>。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、DNA 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。

## 材料および方法

### 1. 実験動物および抜歯処置

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 ヶ月齢のマウスは、18 ヶ月齢時にネンブタール麻酔下（40 mg/kg, 腹腔内投与）で上顎両側臼歯すべてを抜歯し、3 ヶ月（13 週）後の 21 ヶ月齢まで飼育したマウスを抜歯群とし、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。6 ヶ月齢のマウスは、何も行うことなく飼育し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。また、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。

### 2. RNA 抽出

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 (RNAlater, Ambion) に 24 時間浸漬したのち、RNA を抽出するまで -80°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 NanoDrop ND-1000 (Thermo Fisher Scientific) 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。

### 3. マイクロアレイハイブリダイゼーション

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) に従い、以下の手順で行った。最初に、1  $\mu$ g の total RNA を逆転写させて cDNA を合成したのち、ビオチンラベル化 cRNA を合成した。これを断片化して hybridization mix と混合し、アレイ内部に注入して 45°C にてハイブリダイゼーションを行った。16 時間のハイブリダイゼーション後、アレイを洗浄してストレプトアビジン-フィコエリスリン染色を行い、Scanner 3000 7G (Affymetrix) でスキャニングした。

#### 4. マイクロアレイデータ解析

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 singled-rank 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、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。

## 5. 統計学的解析

マウス体重の各測定時点における老齢群と抜歯群との比較は、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。

## 結 果

### 1. マウスの体重変化

老齢群および抜歯群の体重変化を、平均 ± 標準誤差で第 1 図に示す。18 か月齢における処置時の体重は、老齢群が  $36.7 \pm 1.6$  g、抜歯群が  $36.9 \pm 1.4$  g で、2 群間に有意差はみられなかった ( $p = 0.915$ )。麻酔処置のみの老齢群の平均体重は、観察期間内で処置時体重の ±4% の範囲内で推移した。一方、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。しかしながら、すべての測定時点で両群の平均体重に有意差は認められなかった ( $p = 0.092 \sim 0.558$ )。

### 2. 加齢に伴う遺伝子発現変化

老齢群では若齢群と比較して、212 遺伝子で 2 倍以上の発現変化が認められ、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。加齢に伴う発現上昇および発現低下が大きい上位 10 遺伝子を第 1 表に示す。最も発現が上昇した遺伝子は Bpifa2 (BPI fold containing family A, member 2)、最も発現が低下した遺伝子は Aplnr (apelin receptor) で、 $\log_2$  変動率はそれぞれ 6.6 と -2.1 であった。

遺伝子機能カテゴリーごとに発現変化した遺伝子数を第 2 表に示す。加齢に伴う発現変化は、発生、輸送、タンパク代謝のカテゴリーで多くみられ、免疫反応、細胞接着・細胞外基質で少なかった。これらを発現上昇および発現低下遺伝子ごとにみても (第 3 表)、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。

### 3. 抜歯に伴う遺伝子発現変化

老齢群と抜歯群の比較において、抜歯群では 210 遺伝子に 2 倍以上の発現変

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。最も発現上昇した遺伝子は Krt10 (keratin 10) ,最も発現が低下した遺伝子は Ada (adenosine deaminase) で、 $\log_2$  変動率はそれぞれ 2.5 と -3.5 であった (第 4 表)。

抜歯に伴う遺伝子発現変化は、加齢に伴う発現変化と同様に、発生、タンパク代謝、輸送のカテゴリーで多く、免疫反応、細胞接着・細胞外基質で少ない傾向を示した (第 2 表)。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 (第 3 表)。

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において発現上昇遺伝子数の減少と発現低下遺伝子数の増加がみられ、発現低下遺伝子の割合が有意に高くなっていた。また、タンパク代謝に関するカテゴリーでは、発現上昇遺伝子数の増加と発現低下遺伝子数の減少がみられ、発現上昇遺伝子の割合が有意に高くなっていた。

#### 4. 加齢と抜歯に伴う遺伝子発現変化のパターン

加齢に伴い発現変化を認めた免疫反応に関する 12 遺伝子を第 5 表に示す。このうち、抜歯に伴い発現変化を示したのは 4 遺伝子のみであった。加齢に伴い発現上昇した 8 遺伝子のうち、3 遺伝子が抜歯に伴い発現低下を示したが、発現上昇した遺伝子は認められなかった。一方、加齢に伴い発現低下した 4 遺伝子のうち、1 遺伝子が抜歯に伴い発現上昇していたが、発現低下した遺伝子は認められなかった。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 (第 6 表)。

加齢に伴い発現変化を認めた 212 遺伝子と、抜歯に伴い発現変化を認めた 210

遺伝子の発現変化パターンを第 7 表に示す。加齢または抜歯に伴う発現変化は 364 遺伝子で認められ、そのうち 58 遺伝子は加齢と抜歯の両条件で発現変化を認めた。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。

## 考 察

ヒトの骨格筋でみられる加齢に伴う筋量低下は、マウス<sup>27,28)</sup>やラット<sup>29,30)</sup>などで確認されており、これらの動物は筋の老化のメカニズムに関する研究でも広く用いられている。加齢に伴う咬筋の遺伝子発現変化を解析した研究では、**Klotho** 変異マウスが用いられている<sup>25,26)</sup>。**Klotho** 変異マウスは平均寿命が約 9 週と短く、また、ヒトの加齢関連現象に類似した複数の表現型を呈することから、老化研究に用いられている<sup>31)</sup>。しかし、このマウスは単一遺伝子の障害によるヒト早発性老化症候群モデルであるため、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現の網羅的解析を目的とした本研究には適していないため、本研究では正常老化を示す野生型動物である C57BL/6J 雄性マウスを使用した。この系統のマウスは 3~6 ヶ月齢が若齢期、18~24 ヶ月齢が老齢期で、それぞれヒトの 20~30 歳、56~69 歳に相当すると考えられている<sup>32)</sup>。したがって本研究では、若齢群として 6 ヶ月齢、老齢群として 21 ヶ月齢のマウスをそれぞれ用いた。また、臼歯抜歯の時期は、ヒトの初老期に相当すると考えられる 18 ヶ月齢に設定した。

骨格筋量は体重の影響を受けることから<sup>33)</sup>、抜歯または麻酔処置時の体重に差がないよう高齢群と抜歯群のマウスを選定した。また、抜歯したマウスでは、食餌摂取量の減少により体重が減少する可能性が考えられたため、抜歯後の体重を継続して測定し、麻酔処置のみを行った高齢群の体重と比較した。その結果、抜歯群は抜歯直後に痛みやストレスによると考えられる約 10 %の体重減少がみられた。しかしながら、その後は徐々に回復し、いずれの測定時点においても両群の体重に有意差は認められなかった。本研究でみられた抜歯後のマウスの体重変化は、他系統のマウスにおいても同様に観察されている<sup>34,35)</sup>。臼歯の有無に関わらず体重が同程度で推移したことについて穂積ら<sup>34)</sup>は、臼歯の喪失によって咀嚼能力は著しく低下するが切歯で固形飼料を齧り取る摂食行動は

損なわれず、また飼料は粉末をペレット状に固めたもので消化されやすいためであると考察しており、本研究結果もこの説に合致することが考えられた。

マイクロアレイで解析した 45,037 プローブセットのうち、若齢群では 17,150 (38.1%)、老齢群では 15,923 (35.4%)、抜歯群では 16,920 (37.6%) のプローブセットでシグナルが検出された。本研究では、3 群すべてにおいてシグナルが検出された 14,423 (32.0%) プローブセットを解析対象とした。このうち、加齢に伴う遺伝子発現変化は 224 プローブセットで、また、抜歯に伴う遺伝子発現変化は 221 プローブセットでそれぞれ認められ、その数はほぼ同等であった。

DNA マイクロアレイを用いて加齢に伴う骨格筋の遺伝子発現変化を網羅的に解析したこれまでの研究では、ヒトの外側広筋<sup>23,24)</sup>、アカゲザルの外側広筋<sup>21)</sup>、マウスの腓腹筋<sup>20)</sup>、ラットのヒラメ筋<sup>22)</sup>と、いずれも下肢筋が用いられ、タンパク代謝<sup>20-22)</sup>、エネルギー代謝<sup>20,21,23)</sup>、ストレス反応<sup>20-23)</sup>、免疫・炎症反応<sup>21-24)</sup>、転写<sup>24)</sup>、細胞外基質<sup>22)</sup>などに関連する遺伝子の発現変化が報告されている。しかし、加齢による筋量の減少量は筋の部位により異なることから<sup>1-3)</sup>、咬筋と下肢筋では遺伝子発現変化のパターンが異なることが予想された。

本研究において、咬筋では加齢に伴い 212 遺伝子で発現変化が認められた。このうち、10 遺伝子については下肢筋のマイクロアレイ解析においても発現変化が認められている (第 8 表)。さらに、発現上昇または発現低下が一致していたのは、Fst (follistatin)、Col4a1 (collagen, type IV, alpha 1)、Ccnd2 (cyclin D2)、Col3a1 (collagen, type III, alpha 1)、Colla1 (collagen, type I, alpha 1)、Colla2 (collagen, type I, alpha 2) の 6 遺伝子のみであった。ラットのヒラメ筋<sup>22)</sup>とヒトの外側広筋<sup>23)</sup>におけるマイクロアレイ解析と同様に、マウスの咬筋でも加齢に伴い follistatin の発現は増加していた。Follistatin は骨格筋形成抑制因子である activin や myostatin と結合してその活性を阻害することで、骨格筋の成長や再生

を制御する<sup>36)</sup>。そのため、加齢に伴う follistatin の発現上昇は筋萎縮を抑制すると考えられる。一方、Pattison ら<sup>22)</sup>は follistatin の翻訳過程あるいは follistatin により誘発されたシグナル伝達下流での制御が不完全なため、follistatin は筋萎縮を防止できないと推察している。咬筋では activin および myostatin の特異的レセプターである activin receptor IIB をコードする Acvr2b の発現が加齢に伴い減少していることから (第 6 表)、本研究の結果はこの推察を支持するものと考えられる。

骨格筋細胞外基質の主要構成成分である type I, type III および type IV collagen をコードする遺伝子では、Pattison ら<sup>22)</sup>のマイクロアレイ解析と同様に老齢マウスの咬筋でも発現低下を示した。これらマイクロアレイ解析の結果は、*in situ* hybridization を用いた Goldspink ら<sup>37)</sup>の報告とも一致する。Goldspink ら<sup>37)</sup>は同時に加齢に伴う骨格筋の線維化についても報告しているが、この原因の 1 つとして、コラーゲン遺伝子の発現上昇によるものではなく、コラーゲン分解系の抑制によって生じる可能性が高いことを示唆している。

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、実際に 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、下肢筋のマイクロアレイ解析においても発現変化が認められている 10 遺伝子の発現変化の確認は、今後の検討課題である。

咬筋において加齢に伴う発現変化を認めた 212 遺伝子について機能カテゴリーごとにみると、脂質・炭水化物代謝、免疫反応、発生、ストレス反応では発現上昇した遺伝子が多い傾向が示された。このうち、ストレス反応に関しては下肢筋における Lee ら<sup>20)</sup>、Kayo ら<sup>21)</sup>、Pattison ら<sup>22)</sup>の報告と、免疫反応に関しては Kayo ら<sup>21)</sup>、Pattison ら<sup>22)</sup>の報告と同様な結果であった。一方、脂質・炭水

化物代謝および発生に関しては、下肢筋のマイクロアレイ解析では報告がみられず、咬筋を用いてそれらの遺伝子発現変化を明らかにした本研究は、新たな知見を提供したと考えられる。

一方、タンパク代謝、転写、増殖因子・サイトカインの各カテゴリーでは加齢に伴って発現低下を示す遺伝子が多くなる傾向を認めた。このうち、タンパク代謝関連遺伝子の発現低下は Lee ら<sup>20)</sup>、Kayo ら<sup>21)</sup>の報告と一致するものであった。しかし、ヒトの筋を解析した Welle ら<sup>23)</sup>は、転写および増殖因子・サイトカインに関連する遺伝子は発現上昇するものが多いことも報告しており、本研究結果はこれとは異なるものであった。

このように、マイクロアレイ解析における加齢に伴う咬筋の遺伝子発現変化は、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いて、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るストレス反応に関する遺伝子の発現変化については、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<sup>38-40)</sup>、全身の組織で生じる加齢変化である可能性も考えられた。

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<sup>23,24)</sup>。これら咬筋と先行研究<sup>20-24)</sup>である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、筋の部位の違いが影響していると考えられる。

骨格筋の筋線維は、その収縮特性から遅筋線維 (type I) と速筋線維 (type II)

に大別され、速筋線維はさらに type IIa と type IIb に細分される。また、これらの筋線維を構成するミオシン重鎖 (MHC) のサブクラスには、遅筋型である MHC-I と、速筋型である MHC-IIa, MHC-IIc, MHC-IIb が存在する。若年者においてほぼ同数の type I 線維と type II 線維から構成される外側広筋では、加齢に伴い両線維が同程度に減少するが、断面積の減少率は type I 線維より type II 線維で大きく、筋断面積に占める type I 線維の比率は増加する<sup>13)</sup>。一方、若齢期および成熟期のマウス咬筋は、ヒトの外側広筋とは異なり type II 線維のみから構成され<sup>41,42)</sup>、MHC サブクラスでは MHC-2b が 32%、MHC-2d が 68%と、収縮速度の速いタイプが占める<sup>43)</sup>。老齢マウスの咬筋における筋線維組成は不明であるが、下肢筋と咬筋で異なる発現変化パターンには、両筋における筋線維組成およびその加齢変化の違いが関係している可能性が考えられる。

ヒトの咬筋では加齢に伴い萎縮が生じ、さらに歯の喪失により萎縮は顕著となる<sup>7)</sup>。そのため、歯の喪失は咬筋の加齢変化を亢進することが考えられる。その一方で、歯の喪失に伴い咬合力が低下することから<sup>11,12)</sup>、咬筋では廃用性萎縮が亢進することも考えられる。

安静臥床<sup>44)</sup>、ギプスや装具固定<sup>45)</sup>、関節疾患<sup>46)</sup>に伴う長期間の不活動や活動低下状態は、機械的負荷が減少した骨格筋の廃用性萎縮を招き、高齢者では筋の萎縮と筋力低下がさらに亢進する。廃用性萎縮と加齢に伴う萎縮では、IGF-1 シグナルの障害<sup>47)</sup>など共通のメカニズムを有する。また、組織学的には筋線維の断面積減少が共通して観察されるものの、廃用性萎縮では加齢に伴う萎縮と異なり筋線維数の減少はみられないなど<sup>48,49)</sup>、両萎縮には根本的な違いがあることが示されている。

咬筋における加齢と抜歯に伴う遺伝子発現変化を機能ごとにみると、免疫反応とタンパク代謝に関するカテゴリーでは、発現上昇遺伝子と発現低下遺

伝子の比率に有意差が認められた。また、これらのカテゴリーに分類される遺伝子個々の発現変化パターンをみると、加齢と抜歯の両方で発現上昇した遺伝子、または発現低下した遺伝子は認められなかった。さらに、加齢に伴い発現変化を認めた 212 遺伝子と、抜歯に伴い発現変化を認めた 210 遺伝子の発現変化パターンをみても、加齢と抜歯の両条件でともに発現上昇または発現低下した遺伝子はなかった。これらの結果は、マウスの臼歯抜歯と加齢に伴ってみられる遺伝子発現の変化には相関関係がなく、本研究で示された咬筋の遺伝子発現パターンの変化はおそらく廃用性萎縮に関連したものであることが考えられた。

## 結 論

DNA マイクロアレイを用いて加齢に伴うマウス咬筋の遺伝子発現変化を網羅的に解析するとともに、臼歯抜歯に伴う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した。その結果、以下の結論を得た。

1. 加齢に伴い 212 遺伝子で 2 倍以上の発現変化が認められ、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。特に、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で発現上昇を示し、逆にタンパク代謝、転写、増殖因子/サイトカインに関連する遺伝子では発現低下を示した。
2. 抜歯に伴い 210 遺伝子で 2 倍以上の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。特に、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を示し、逆に免疫反応、増殖因子・サイトカイン、ストレス反応に関する遺伝子では発現低下を示した
3. 加齢または抜歯に伴い発現変化を認めた個々の遺伝子をみると、加齢と抜歯の両条件でともに発現上昇した遺伝子、または発現低下した遺伝子は認められなかった。

以上のことから、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。

## 文 献

- 1) Janssen I, Heymsfield SB, Wang ZM, Ross R (2000) Skeletal muscle mass and distribution in 468 men and women aged 18-88 yr. *J Appl Physiol* 89, 81-88.
- 2) Klein CS, Rice CL, Marsh GD (2001) Normalized force, activation, and coactivation in the arm muscles of young and old men. *J Appl Physiol* 91, 1341-1349.
- 3) Miyatani M, Kanehisa H, Azuma K, Kuno S, Fukunaga T (2003) Site-related differences in muscle loss with aging: a crosssectional survey on the muscle thickness in Japanese men and women aged 20 to 79 years. *Int J Sport Health Sci* 1, 34-40.
- 4) Lindle RS, Metter EJ, Lynch NA, Fleg JL, Fozard JL, Tobin J, Roy TA, Hurley BF (1997) Age and gender comparisons of muscle strength in 654 women and men aged 20-93 yr. *J Appl Physiol* 83, 1581-1587.
- 5) Szulc P, Beck TJ, Marchand F, Delmas PD (2005) Low skeletal muscle mass is associated with poor structural parameters of bone and impaired balance in elderly men--the MINOS study. *J Bone Miner Res* 20, 721-729.
- 6) Janssen I, Baumgartner RN, Ross R, Rosenberg IH, Roubenoff R (2004) Skeletal muscle cutpoints associated with elevated physical disability risk in older men and women. *Am J Epidemiol* 159, 413-421.
- 7) Newton JP, Yemm R, Abel RW, Menhinick S (1993) Changes in human jaw muscles with age and dental state. *Gerodontology* 10, 16-22.
- 8) Palinkas M, Nassar MS, Cecilio FA, Siéssere S, Semprini M, Machado-de-Sousa JP, Hallak JE, Regalo SC (2010) Age and gender influence on maximal bite force and masticatory muscles thickness. *Arch Oral Biol* 55, 797-802.

- 9) Bakke M, Holm B, Jensen BL, Michler L, Möller E (1990) Unilateral, isometric bite force in 8-68-year-old women and men related to occlusal factors. *Scand J Dent Res* 98, 149-158.
- 10) Yeh CK, Johnson DA, Dodds MW, Sakai S, Rugh JD, Hatch JP (2000) Association of salivary flow rates with maximal bite force. *J Dent Res* 79, 1560-1565.
- 11) Hatch JP, Shinkai RS, Sakai S, Rugh JD, Paunovich ED (2001) Determinants of masticatory performance in dentate adults. *Arch Oral Biol* 46, 641-648.
- 12) Ikebe K, Nokubi T, Morii K, Kashiwagi J, Furuya M (2005) Association of bite force with ageing and occlusal support in older adults. *J Dent* 33, 131-137.
- 13) Lexell J, Taylor CC, and Sjöström M (1988) What is the cause of the ageing atrophy? Total number, size and proportion of different fiber types studied in whole vastus lateralis muscle from 15- to 83-year-old men. *J Neurol Sci* 84, 275-294.
- 14) Giovannini S, Marzetti E, Borst SE, Leeuwenburgh C (2008) Modulation of GH/IGF-1 axis: potential strategies to counteract sarcopenia in older adults. *Mech Ageing Dev* 129, 593-601.
- 15) Velloso CP (2008) Regulation of muscle mass by growth hormone and IGF-I. *Br J Pharmacol* 154, 557-568.
- 16) Eash J, Olsen A, Breur G, Gerrard D, Hannon K (2007) FGFR1 inhibits skeletal muscle atrophy associated with hindlimb suspension. *BMC Musculoskelet Disord* 8, 32.
- 17) Carlson ME, Conboy MJ, Hsu M, Barchas L, Jeong J, Agrawal A, Mikels AJ, Agrawal S, Schaffer DV, Conboy IM (2009) Relative roles of TGF- $\beta$ 1 and Wnt in the systemic regulation and aging of satellite cell responses. *Aging Cell* 8, 676-689.
- 18) Visser M, Pahor M, Taaffe DR, Goodpaster BH, Simonsick EM, Newman AB,

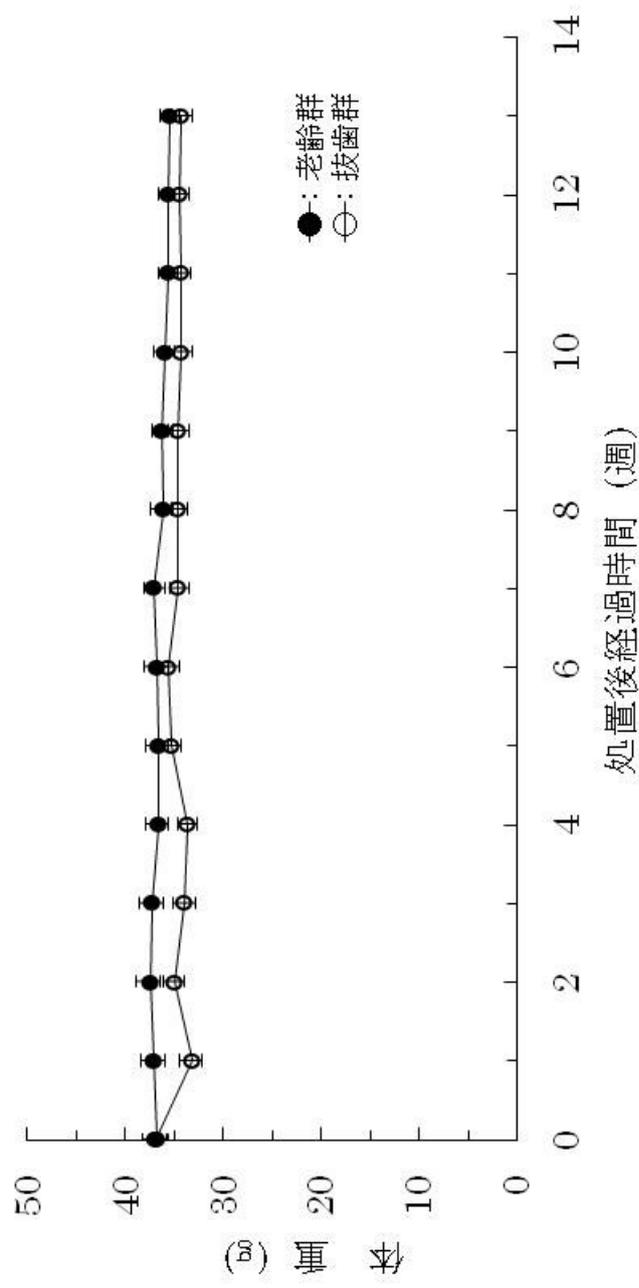
- Nevitt M, Harris TB (2002) Relationship of interleukin-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  with muscle mass and muscle strength in elderly men and women: the Health ABC Study. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 57, M326-332.
- 19) Petersen AM, Pedersen BK (2005) The anti-inflammatory effect of exercise. *J Appl Physiol* 98, 1154-1162.
- 20) Lee CK, Klopp RG, Weindruch R, Prolla TA (1999) Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 285, 1390-1393.
- 21) Kayo T, Allison DB, Weindruch R, and Prolla TA (2001) Influences of aging and caloric restriction on the transcriptional profile of skeletal muscle from rhesus monkeys. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 5093–5098.
- 22) Pattison JS, Folk LC, Madsen RW, Childs TE, Booth FW (2003) Transcriptional profiling identifies extensive downregulation of extracellular matrix gene expression in sarcopenic rat soleus muscle. *Physiol Genomics* 15, 34-43.
- 23) Welle S, Brooks AI, Delehanty JM, Needler N, Thornton CA (2003) Gene expression profile of aging in human muscle. *Physiol Genomics* 14, 149-159.
- 24) Giresi PG, Stevenson EJ, Theilhaber J, Koncarevic A, Parkington J, Fielding RA, Kandarian SC (2005) Identification of a molecular signature of sarcopenia. *Physiol Genomics* 21, 253-263.
- 25) Murata M, Miwa Y, Sato I (2009) Expression of respiratory chain enzyme mRNA and the morphological properties of mitochondria in the masseter muscles of klotho mutant mice. *Okajimas Folia Anat Jpn* 86, 93-103.
- 26) Iida RH, Kanko S, Suga T, Morito M, Yamane A (2011) Autophagic-lysosomal pathway functions in the masseter and tongue muscles in the klotho mouse, a mouse model for aging. *Mol Cell Biochem* 348, 89-98.

- 27) Lee CM, Aspnes LE, Chung SS, Weindruch R, Aiken JM (1998) Influences of caloric restriction on age-associated skeletal muscle fiber characteristics and mitochondrial changes in rats and mice. *Ann N Y Acad Sci* 854, 182-191.
- 28) Bruusgaard JC, Liestøl K, Gundersen K (2006) Distribution of myonuclei and microtubules in live muscle fibers of young, middle-aged, and old mice. *J Appl Physiol* 100, 2024-2030.
- 29) Holloszy JO, Chen M, Cartee GD, Young JC (1991) Skeletal muscle atrophy in old rats: differential changes in the three fiber types. *Mech Ageing Dev* 60, 199-213.
- 30) Larkin LM, Kuzon WM, Halter JB (2003) Effects of age and nerve-repair grafts on reinnervation and fiber type distribution of rat medial gastrocnemius muscles. *Mech Ageing Dev* 124, 653-661.
- 31) Kuro-o M, Matsumura Y, Aizawa H, Kawaguchi H, Suga T, Utsugi T, Ohyama Y, Kurabayashi M, Kaname T, Kume E, Iwasaki H, Iida A, Shiraki-Iida T, Nishikawa S, Nagai R, Nabeshima YI (1997) Mutation of the mouse *klotho* gene leads to a syndrome resembling ageing. *Nature* 390, 45–50.
- 32) Flurkey K, Curren JM, Harrison DE (2007) Mouse models in Aging Research. In *The Mouse in Biomedical Research* 2nd ed, Fox JG, Davisson MT, Quimby FW, Barthold SW, Newcomer CE, Smith AL eds. American College Laboratory Animal Medicine, Burlington, MA, 637–672.
- 33) Gallagher D, Visser M, De Meersman RE, Sepúlveda D, Baumgartner RN, Pierson RN, Harris T, Heymsfield SB (1997) Appendicular skeletal muscle mass: effects of age, gender, and ethnicity. *J Appl Physiol* 83, 229-239.
- 34) 穂積英治, 加藤大輔, 村上 弘, 横山 隆, 伊藤 裕, 前田初彦, 亀山洋一郎 (2001) 加齢および臼歯喪失が老化促進モデルマウスの咀嚼能力に及ぼ

す影響. 日補綴歯会誌 45, 602-611.

- 35) Onozuka M, Watanabe K, Fujita M, Tomida M, Ozono S (2002) Changes in the septohippocampal cholinergic system following removal of molar teeth in the aged SAMP8 mouse. *Behav Brain Res* 133, 197-204.
- 36) Lee SJ, McPherron AC (2001) Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9306-9311.
- 37) Goldspink G, Fernandes K, Williams PE, Wells DJ (1994) Age-related changes in collagen gene expression in the muscles of mdx dystrophic and normal mice. *Neuromuscul Disord* 4, 183-191.
- 38) Prolla TA (2002) DNA microarray analysis of the aging brain. *Chem Senses* 27, 299-306.
- 39) Cao SX, Dhabhi JM, Mote PL, Spindler SR (2001) Genomic profiling of short- and long-term caloric restriction effects in the liver of aging mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10630-10635.
- 40) Misra V, Lee H, Singh A, Huang K, Thimmulappa RK, Mitzner W, Biswal S, Tankersley CG (2007) Global expression profiles from C57BL/6J and DBA/2J mouse lungs to determine aging-related genes. *Physiol Genomics* 31, 429-440.
- 41) Tuxen A, Kirkeby S (1990) An animal model for human masseter muscle: histochemical characterization of mouse, rat, rabbit, cat, dog, pig, and cow masseter muscle. *J Oral Maxillofac Surg* 48, 1063-1067.
- 42) Eason JM, Schwartz GA, Pavlath GK, English AW (2000) Sexually dimorphic expression of myosin heavy chains in the adult mouse masseter. *J Appl Physiol* 89, 251-258.
- 43) Gojo K, Abe S, Ide Y (2002) Characteristics of myofibres in the masseter muscle of

- mice during postnatal growth period. *Anat Histol Embryol* 31, 105-112.
- 44) Kortebein P, Ferrando A, Lombeida J, Wolfe R, Evans WJ (2007) Effect of 10 days of bed rest on skeletal muscle in healthy older adults. *JAMA* 297, 1772-1774.
- 45) D'Antona G, Pellegrino MA, Adami R, Rossi R, Carlizzi CN, Canepari M, Saltin B, Bottinelli R (2003) The effect of ageing and immobilization on structure and function of human skeletal muscle fibres. *J Physiol* 552, 499-511.
- 46) Suetta C, Aagaard P, Magnusson SP, Andersen LL, Sipilä S, Rosted A, Jakobsen AK, Duus B, Kjaer M (2007) Muscle size, neuromuscular activation, and rapid force characteristics in elderly men and women: effects of unilateral long-term disuse due to hip-osteoarthritis. *J Appl Physiol* 102, 942-948.
- 47) Nakao R, Hirasaka K, Goto J, Ishidoh K, Yamada C, Ohno A, Okumura Y, Nonaka I, Yasutomo K, Baldwin KM, Kominami E, Higashibata A, Nagano K, Tanaka K, Yasui N, Mills EM, Takeda S, Nikawa T (2009) Ubiquitin ligase Cbl-b is a negative regulator for insulin-like growth factor 1 signaling during muscle atrophy caused by unloading. *Mol Cell Biol* 29, 4798-4811.
- 48) Hortobágyi T, Dempsey L, Fraser D, Zheng D, Hamilton G, Lambert J, Dohm L (2000) Changes in muscle strength, muscle fibre size and myofibrillar gene expression after immobilization and retraining in humans. *J Physiol* 524, 293-304.
- 49) Yasuda N, Glover EI, Phillips SM, Isfort RJ, Tarnopolsky MA (2005) Sex-based differences in skeletal muscle function and morphology with short-term limb immobilization. *J Appl Physiol* 99, 1085-1092.



第1図 抜歯および麻酔処置後の体重変化

第1表 加齢に伴う遺伝子発現変化

| Probe Set ID   | 遺伝子    | 変動率 ( $\log_2$ )<br>(老齡群/若齡群) |
|----------------|--------|-------------------------------|
| 発現上昇 (上位10遺伝子) |        |                               |
| 1419348_at     | Bpifa2 | 6.6                           |
| 1421001_a_at   | Car6   | 4.9                           |
| 1417976_at     | Ada    | 4.4                           |
| 1449212_at     | Pip    | 4.4                           |
| 1435493_at     | Dsp    | 3.9                           |
| 1438394_x_at   | Krt4   | 3.8                           |
| 1416325_at     | Crisp1 | 3.2                           |
| 1417404_at     | Elovl6 | 2.8                           |
| 1416271_at     | Perp   | 2.7                           |
| 1426166_at     | Mup5   | 2.5                           |
| 発現低下 (上位10遺伝子) |        |                               |
| 1438651_a_at   | Aplnr  | -2.1                          |
| 1442073_at     | Inpp1  | -1.8                          |
| 1428192_at     | Kbtbd7 | -1.7                          |
| 1438951_x_at   | Nup54  | -1.6                          |
| 1416450_at     | Taf8   | -1.6                          |
| 1439302_at     | Uba6   | -1.5                          |
| 1457276_at     | Sik2   | -1.5                          |
| 1423110_at     | Colla2 | -1.5                          |
| 1450027_at     | Sdc3   | -1.5                          |
| 1418518_at     | Furin  | -1.5                          |

第2表 各機能カテゴリーの発現変化遺伝子数

| 遺伝子機能       | 加 齢        | 抜 歯        |
|-------------|------------|------------|
| アポトーシス・細胞周期 | 26 (12.3%) | 31 (14.6%) |
| 発 生         | 50 (23.6%) | 52 (24.5%) |
| 細胞接着・細胞外基質  | 16 ( 7.5%) | 13 ( 6.1%) |
| 免疫反応        | 12 ( 5.7%) | 13 ( 6.1%) |
| ストレス反応      | 26 (12.3%) | 29 (13.7%) |
| タンパク代謝      | 39 (18.4%) | 49 (23.1%) |
| 脂質・炭水化物代謝   | 20 ( 9.4%) | 26 (12.3%) |
| 転 写         | 30 (14.2%) | 39 (18.4%) |
| 増殖因子・サイトカイン | 19 ( 9.0%) | 16 ( 7.5%) |
| 輸 送         | 42 (19.8%) | 40 (18.9%) |

括弧内は発現変化を示した遺伝子総数に対する割合を表す。

第3表 各機能カテゴリーの発現上昇と発現低下遺伝子数

| 遺伝子機能       | 加 齢  |      | 抜 歯  |      | p value |
|-------------|------|------|------|------|---------|
|             | 発現上昇 | 発現低下 | 発現上昇 | 発現低下 |         |
| アポトーシス・細胞周期 | 14   | 12   | 20   | 11   | 0.432   |
| 発 生         | 29   | 21   | 32   | 20   | 0.840   |
| 細胞接着・細胞外基質  | 8    | 8    | 6    | 7    | 1.000   |
| 免疫反応        | 8    | 4    | 1    | 12   | 0.004   |
| ストレス反応      | 15   | 11   | 12   | 17   | 0.285   |
| タンパク代謝      | 15   | 24   | 31   | 18   | 0.031   |
| 脂質・炭水化物代謝   | 14   | 6    | 12   | 14   | 0.139   |
| 転 写         | 12   | 18   | 24   | 15   | 0.093   |
| 増殖因子・サイトカイン | 8    | 11   | 6    | 10   | 1.000   |
| 輸 送         | 23   | 19   | 20   | 20   | 0.825   |

第4表 抜歯に伴う遺伝子発現変化

| Probe Set ID   | 遺伝子              | 変動率 ( $\log_2$ )<br>(抜歯群/老齢群) |
|----------------|------------------|-------------------------------|
| 発現上昇 (上位10遺伝子) |                  |                               |
| 1452166_a_at   | Krt10            | 2.5                           |
| 1425115_at     | Rbbp6            | 1.8                           |
| 1457276_at     | Sik2             | 1.8                           |
| 1420757_at     | Myf5             | 1.7                           |
| 1442073_at     | Inpp1            | 1.7                           |
| 1450027_at     | Sdc3             | 1.7                           |
| 1419963_at     | Deptor           | 1.6                           |
| 1433743_at     | Dach1            | 1.5                           |
| 1442873_at     | Figf             | 1.5                           |
| 1428192_at     | Kbtbd7           | 1.5                           |
| 発現低下 (上位10遺伝子) |                  |                               |
| 1419684_at     | Ccl8             | -1.8                          |
| 1434588_x_at   | Tbca             | -1.9                          |
| 1419348_at     | Bpifa2           | -1.9                          |
| 1452417_x_at   | Igk-V28 /// Igkc | -1.9                          |
| 1455578_x_at   | Rpl41            | -2.0                          |
| 1448792_a_at   | Cyp2f2           | -2.0                          |
| 1416022_at     | Fabp5            | -2.3                          |
| 1417851_at     | Cxcl13           | -2.3                          |
| 1438394_x_at   | Krt4             | -3.3                          |
| 1417976_at     | Ada              | -3.5                          |

第5表 免疫反応に関する遺伝子の発現変化

| Probe Set ID | 遺伝子                      | 変動率 (log <sub>2</sub> ) |      |
|--------------|--------------------------|-------------------------|------|
|              |                          | 加 齢                     | 抜 歯  |
| 1421898_a_at | Mr1                      | 1.0                     | 0.1  |
| 1441855_x_at | Cxcl1                    | 1.1                     | -0.5 |
| 1429692_s_at | Gch1                     | 1.2                     | -0.6 |
| 1424948_x_at | H2-D1 /// H2-K1          | 1.1                     | -0.7 |
| 1427351_s_at | Ighm                     | 1.8                     | -0.9 |
| 1419684_at   | Ccl8 ///<br>LOC100503254 | 1.1                     | -1.8 |
| 1417851_at   | Cxcl13                   | 1.9                     | -2.3 |
| 1417976_at   | Ada                      | 4.4                     | -3.5 |
| 1452383_at   | Rps6ka3                  | -1.2                    | 1.4  |
| 1450534_x_at | H2-K1                    | -1.1                    | 0.6  |
| 1437939_s_at | Ctsc                     | -1.1                    | 0.6  |
| 1427883_a_at | Col3a1                   | -1.3                    | 0.1  |

イタリック : 2倍以上の発現上昇または低下

第6表 タンパク代謝に関する遺伝子発現変化

| Probe Set ID | 遺伝子            | 変動率(log <sub>2</sub> ) |      |
|--------------|----------------|------------------------|------|
|              |                | 加 齢                    | 抜 歯  |
| 1432489_a_at | Wdyhv1         | 1.1                    | 0.4  |
| 1425518_at   | Rapgef4        | 1.0                    | 0.1  |
| 1423062_at   | Igfbp3         | 1.1                    | 0.0  |
| 1421679_a_at | Cdkn1a         | 1.2                    | 0.0  |
| 1418946_at   | St3gal1        | 1.1                    | -0.1 |
| 1435742_at   | Smek1          | 1.1                    | -0.3 |
| 1417382_at   | Entpd5         | 1.1                    | -0.4 |
| 1419034_at   | Csnk2a1        | 1.1                    | -0.6 |
| 1455252_at   | Tsc1           | 1.2                    | -0.6 |
| 1448301_s_at | Serpina1a      | 1.5                    | -0.7 |
| 1440972_at   | Nsd1           | 1.2                    | -0.7 |
| 1427351_s_at | Ighm           | 1.8                    | -0.9 |
| 1435493_at   | Dsp            | 3.9                    | -1.0 |
| 1435196_at   | Ntrk2          | 1.0                    | -1.2 |
| 1455426_at   | Epha3          | 1.2                    | -1.2 |
| 1425115_at   | Rbbp6          | -1.1                   | 1.8  |
| 1457276_at   | Sik2           | -1.5                   | 1.8  |
| 1451115_at   | Pias3          | -1.5                   | 1.5  |
| 1452383_at   | Rps6ka3        | -1.2                   | 1.4  |
| 1417087_at   | Glg1           | -1.4                   | 1.3  |
| 1418518_at   | Furin          | -1.5                   | 1.3  |
| 1439302_at   | Uba6           | -1.5                   | 1.2  |
| 1436970_a_at | Pdgfrb         | -1.3                   | 1.1  |
| 1450971_at   | Gadd45b        | -1.3                   | 1.0  |
| 1416920_at   | Rbm14 /// Rbm4 | -1.1                   | 1.0  |
| 1436892_at   | Spred2         | -1.2                   | 1.0  |
| 1434278_at   | Mtm1           | -1.3                   | 0.8  |
| 1443486_at   | Cog7           | -1.4                   | 0.8  |
| 1418015_at   | Pum2           | -1.3                   | 0.8  |
| 1419140_at   | Acvr2b         | -1.1                   | 0.8  |
| 1427486_at   | Ptprb          | -1.1                   | 0.6  |
| 1437939_s_at | Ctsc           | -1.1                   | 0.6  |
| 1452097_a_at | Dusp7          | -1.1                   | 0.5  |
| 1416238_at   | Tie1           | -1.0                   | 0.5  |
| 1448190_at   | Mirpl33        | -1.1                   | 0.4  |
| 1451912_a_at | Fgfr1l         | -1.1                   | 0.4  |
| 1455956_x_at | Ccnd2          | -1.1                   | 0.1  |
| 1427883_a_at | Col3a1         | -1.3                   | 0.1  |
| 1460049_s_at | 1500015O10Rik  | -1.1                   | -0.6 |

第5表下説参照

第7表 加齢と抜歯に伴う遺伝子発現変化のパターン

| 加 齢  | 抜 歯  |      |      |
|------|------|------|------|
|      | 発現上昇 | 変化なし | 発現低下 |
| 発現上昇 | 0    | 85   | 25   |
| 変化なし | 68   | —    | 84   |
| 発現低下 | 33   | 69   | 0    |

第8表 下肢筋と一致した加齢に伴う咬筋の遺伝子変化

| Probe Set ID | 遺伝子    | 変動率<br>(log <sub>2</sub> ) | 下肢筋での<br>発現変化 |
|--------------|--------|----------------------------|---------------|
| 1418769_at   | Myoz2  | 1.7                        | ↓ 22)         |
| 1434458_at   | Fst    | 1.3                        | ↑ 22), 23)    |
| 1419621_at   | Ankrd2 | 1.2                        | ↓ 22)         |
| 1427584_at   | Amot   | 1.2                        | ↓ 22)         |
| 1423062_at   | Igfbp3 | 1.1                        | ↓ 22)         |
| 1452035_at   | Col4a1 | -1.1                       | ↓ 22)         |
| 1455956_x_at | Cend2  | -1.1                       | ↓ 22)         |
| 1427883_a_at | Col3a1 | -1.3                       | ↓ 22)         |
| 1455494_at   | Colla1 | -1.4                       | ↓ 22)         |
| 1423110_at   | Colla2 | -1.5                       | ↓ 22)         |

↑ : 発現上昇 ↓ : 発現低下 22), 23): 文献番号