

## 鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

## 内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍) 伊藤愛子(東京都)  
博士の専攻分野 博士(歯学)  
学位記番号 甲第501号  
学位授与年月日 令和元年9月30日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
研究科専攻 鶴見大学大学院歯学研究科  
(博士課程) 歯学専攻  
学位論文題目 Role of  $\beta$ -adrenergic signaling in masseter muscle  
(咬筋における $\beta$ アドレナリン受容体シグナル伝達役割)  
PLoS One 14 e0215539 頁掲載 2019年4月15日発行  
論文審査委員 主査 教授 山越康雄  
副査 教授 奥村敏 副査 教授 友成博

## 内容の要旨

## 【緒言】

ベータアドレナリン受容体( $\beta$ -AR)には、3種類のサブタイプ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ )が報告されているが、その発現量は臓器により異なる。骨格筋における発現量は、 $\beta_2$  (90%) >  $\beta_1$  であるのに対して、心筋では $\beta_1$  (80%) >  $\beta_2$  である。 $\beta$ -ARのサブタイプ特異的な役割について、心筋においてはこれまで薬理学的手法ならびに遺伝子操作動物を用いて数多くの研究が行われている。 $\beta_1$ -ARシグナルの過剰な刺激は心臓リモデリング(心肥大、心臓線維化、アポトーシス)を誘発して心不全発症の原因になるのに対し、 $\beta_2$ -ARシグナルは心臓保護効果を示し $\beta_1$ -ARシグナルとは相異なる作用を示すことが報告されている。一方骨格筋では、 $\beta_2$ -ARの特異的作動薬を用いた研究は多数報告があるが、サブタイプ特異的な役割に関する報告はない。

本研究では $\beta_1$ -ARの特異的作動薬であるドブタミンと $\beta_2$ -ARの特異的作動薬であるクレンブテロールを用いて、咬筋(骨格筋)における $\beta$ -ARのサブタイプ特異的な役割を解明することを目標とする。

## 【材料と方法】

マウス(C57BL/6)を、ドブタミン(DOB;  $\beta_1$ 特異的作動薬: 2 mg/kg/day)投与群、クレンブテロール(CB;  $\beta_2$ 特異的作動薬: 2 mg/kg/day)投与群、Control群の3群に分け、投与7日目に咬筋と心筋の重量測定後、組織学的ならびに生化学・分子生物学的解析を行った。体重、食物および水分摂取量を実験期間の1週間を通してすべての動物について計測した。なおこの研究で使用したCBの投与量は、体重に影響を与えずに骨格筋重量を増加させることを先行研究で確認している。各薬剤の投与終了後、マウスをイソフルランで麻酔し、心筋、左咬筋および右咬筋をそれぞれ切除し、重量を測定し、液体窒素中で凍結し、 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。筋肉量(mg)および筋肉量/脛骨長さ(mm)を筋肉成長の指標として用いた。

筋線維の直径と断面積は、切除した左の咬筋で凍結切片を製作し、切片をヘマトキシリン-エオジン(HE)で染色し、光学顕微鏡下で観察した。筋線維の断面サイズは、断面積(CSA)を測定することによって評価した。表層部の100本の筋線維のCSAを画像解析ソフトウェア(Image J 1.45)で測定し、平均して各マウスの平均値を得た。線維化の評価はMasson-trichrome染色を用いて行った。アポトーシスの評価は、TUNEL染色によって測定した。

ウェスタンブロッティングは、マウスから切除した右咬筋とタンパク質濃度をDCタンパク質アッセイキットを用いて測定した。一次抗体はAkt, CaMK II, リン-CaMK II, ERK1/2, LC3, mTOR, PLNを用いた。ホースラディッシュペルオキシド結合抗ウサギまたは抗マウスIgGを二次抗体として使用した。一次および二次抗体を、0.1% Tween20 および5%ウ

シ血清アルブミンを含むトリス緩衝食塩水 (pH7.6) で希釈した。

#### 【結果および考察】

DOB (2 mg/kg/日) 及び CB (2 mg/kg/日) 投与で体重、餌、水の摂取量に変化はなかった。DOB と CB の投与により、心筋重量 / 脛骨長の比は有意に増加した。咬筋において、CB 投与で咬筋重量 / 脛骨長は増加した。

CSA は、心筋では CB, DOB 投与群で有意増加し、咬筋において CB 投与群で有意に増加した。Masson-trichrome 染色を用いて線維化の増加を調べた。心筋および咬筋において DOB の投与によって、線維化が有意に増加した。心筋および咬筋における DOB の処置によって、TUNEL 染色で筋細胞アポトーシスが有意に増加した。

ウェスタンブロッティングにおける結果を以下に示す。Akt シグナル伝達は、CB の処置によって有意に増加したが、心筋および咬筋における DOB の投与によっては増加しなかった。

これらのデータは、Akt 活性化が、 $\beta_2$ -AR シグナルを介する心筋肥大を誘導することを示唆している。ERK1/2 活性化は、DOB 投与によって心筋および咬筋の両方で有意に増加した。これらのデータは、心臓および骨格筋のいずれの組織においても ERK1/2 の活性化は線維化の形成に重要であることを示唆している。心筋および咬筋におけるアポトーシスの促進因子である BAX の変化を調べ、DOB の処置によって、心筋、咬筋において発現が有意に増加した。オートファジーの因子である Lc3-II は、CB の処置によって心筋および咬筋において増加した。これらのデータは、オートファジーの活性化が、心筋および肥大筋の両方における CB の処置によって効率的に誘発されることを示唆している。mTORC1 は、CB により活性化され、mTORC2 は DOB により活性化された。これらのデータは、DOB 投与における線維化およびアポトーシスが、mTORC2 シグナル伝達の活性化によって誘導され得ることを示唆している。DOB の処理後、CaMKII リン酸化および酸化が有意に増加した。CaMKII は動物およびヒト心不全で増加することが知られており、重要な役割を果たしている。しかし、咬筋、骨格筋における CaMKII の役割は未だ解明されていない。CaMKII リン酸化および咬筋におけるその酸化における DOB または CB の効果を検討した。PLN リン酸化は、咬筋における DOB の処置後に有意に増加した。心不全発症における PL の過剰なリン酸化が重要であることは先行研究で確認している。これらのデータは、心筋と同様に、セリン 16 およびトレオニン 17 の PLN リン酸化の増加が、DOB による咬筋のリモデリング (線維化およびアポトーシス) 発症過程に重要であることを示唆している。

#### 【結 論】

心筋と同様に咬筋でも  $\beta_1$ -AR 刺激により、線維化ならびにアポトーシスを誘導するが、筋肥大は骨格筋においては誘導されないことが分かった。

本研究成果は、これまで有効な治療方法がなかった加齢による咬筋、骨格筋の筋重量の減少ならびに機能低下 (サルコペニア) に対する有効な治療方法開発に寄与する可能性が示唆された。

#### 審査の結果の要旨

ベータアドレナリン受容体 ( $\beta$ -AR) には3種類のサブタイプ ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$ ,  $\beta_3$ ) が報告されているが、その発現量は骨格筋と心筋で異なる。本研究では  $\beta_1$ -AR の特異的作動薬であるドブタミン (DOB) と  $\beta_2$ -AR の特異的作動薬であるクレンプテロール (CB) を用いて、咬筋 (骨格筋) における  $\beta$ -AR のサブタイプ特異的な役割を解明することを目的とした。

一般的な近交系実験用マウスを DOB 投与群, CB 投与群, 対照群の3群に分け、投与7日目に咬筋と心筋の重量を測定後、心筋、左咬筋および右咬筋を切除して組織学的実験および生化学・分子生物学的実験を行った。組織学的実験は、切除したそれぞれの筋重量を測定後、作製した凍結切片をヘマトキシリン-エオジン (HE) で染色し、光学顕微鏡下で観察しながら筋線維の断面積を測定した。また、線維化の評価をマッソントリクローム染色にて、アポトーシスの評価を TUNEL 染色にて行った。次に生化学・分子生物学的実験は、マウスから切除した右咬筋からタンパク質を抽出して、タンパク質濃度測定および  $\beta$ -AR シグナル伝達に関連する抗体を用いたウェスタンブロットを行った。

DOB および CB 投与で体重に変化は見られなかったが、咬筋においては CB 投与で咬筋重量 / 脛骨長比が増加した。筋線維の断面積は、心筋では DOB および CB 投与群で、咬筋では CB 投与群で有意に増加した。また線維化は心筋および咬筋において DOB の投与によって有意に線維化が見られた。さらに心筋および咬筋における DOB の投与によって筋細胞のアポトーシスが有意に増加した。ウェスタンブロットによる結果では、CB 投与が  $\beta_2$ -AR を介した Akt シグナルにより心筋肥大を誘導すること、DOB 投与が ERK1/2 シグナルによる心筋と骨格筋における線維化に重要であること、オートファジーの活性化が CB 投与により心筋と咬筋で誘発されること、DOB 投与により活性化された mTORC2 シグナル伝達によ

り線維化およびアポトーシスが誘導されることが示唆された。さらに咬筋におけるホスホランパンのリン酸化が DOB 投与によって有意に増加したことより、咬筋の線維化とアポトーシスの発症過程に重要であることが示唆された。

本研究により心筋と同様に咬筋でも  $\beta_1$ -AR 刺激により、線維化ならびにアポトーシスが誘導され、筋肥大は骨格筋においては誘導されないことが明らかになった。

本研究では、これまで効果的な治療方法が確立されていない加齢による咬筋、骨格筋の筋重量の減少および機能低下（サルコペニア）に対する有効な治療開発の発展に寄与する可能性を見出すことができた。よって、本論文は博士（歯学）の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。