

## 論文要旨等報告書

氏	小野剛
授与した学位	博士
専攻分野の名称	歯学
学位授与の番号	博 甲 第 3354 号
学位授与の日付	平成 19 年 3 月 23 日
学位授与の要件	医歯学総合研究科機能再生・再建科学専攻(学位規則第4条第1項該当)
学位論文題名	Muscle contraction accelerates IL-6 mRNA expression in the rat masseter muscle(筋収縮はラット咬筋内でのIL-6の遺伝子発現を亢進する)

論文審査委員 教授 窪木 拓男 教授 松尾 龍二 助教授 宮脇 卓也

## 学位論文内容の要旨

## 【緒言】

筋収縮により生じる咀嚼筋組織内の生物学的な反応を明らかにすることは、過剰筋活動に伴う咀嚼筋痛の発症メカニズムを明らかにするためにも、咀嚼運動が身体、免疫機能の向上に寄与するという最近の知見を科学的に裏づけるためにも重要である。近年、四肢の骨格筋において、筋収縮により *interleukin-6* (*il-6*) の発現が亢進することが知られるようになった。しかし、四肢の骨格筋と筋線維構成や機能が異なる咬筋において同様の知見が得られるかどうかは明らかでない。そこで本研究では、ラットを用いた咬筋の持続筋収縮モデルを構築し、この *il-6* や局所の炎症の指標となりうる *interleukin-1 $\beta$*  (*il-1 $\beta$* ) の遺伝子発現をマーカーとして、筋収縮によりどのような生物学的変化が咬筋組織に生ずるのかについて検討した。

## 【材料および方法】

雄性ウィスター系ラット (6 週齢, 52 匹) に、ペントバルビタールとウレタンの混合物で腹腔内麻酔を施した上で、以下に記述する 3 つの実験群を設定した。電気刺激により持続反復筋収縮を起こさせた電気刺激群、起炎物質であるカラゲナンを咬筋中に注入したカラゲナン注入群、および末梢性筋弛緩薬 (リアノジン受容体阻害薬) であるダントロレンを腹腔内投与した後、電気刺激を行ったダントロレン投与下電気刺激群である。各個体の左側を実験側、右側を擬似刺激側とした。電気刺激群では、10, 30, 60 分の刺激時間を、カラゲナン注入群では、10, 30, 60, 180 分の注入後経過時間を設定した。また、ダントロレン投与下電気刺激群では、30 分の刺激時間を選択した。各条件で、両側咬筋組織を回収し、粉碎した。AGPC 変法で total RNA を抽出した。逆転写後、リアルタイム PCR 法により *il-6*, *il-1 $\beta$* , および内部標準に用いた *cyclophilin A* (*cypA*) の遺伝子発現量を測定した。*il-6*, *il-1 $\beta$*  の遺伝子発現量を *cypA* の遺伝子発現量で標準化 (*il-6/cypA*, *il-1 $\beta$ /cypA*) した後、各条件における実験側と擬似刺激側の差、ならびに経時的変化が、*il-6/cypA*, *il-1 $\beta$ /cypA* に及ぼす影響を統計学的に検討した。また、ダントロレン投与下電気刺激群の実験結果は、電気刺激群のそれと比較した。

## 【結果】

咬筋への持続電気刺激により、*il-6/cypA* の平均値は、電気刺激側、擬似刺激側ともに上昇したが、電気刺激側においてその変化はより顕著であった (60 分刺激: 擬似刺激側に対して 2.83 倍)。刺激の有無と刺激時間を独立変数とした二元配置分散分析の結果、両因子ともに有意な主効果を認めた (刺激の有無:  $p=0.0306$ , 刺激時間:  $p=0.0055$ )。一方、*il-1 $\beta$ /cypA* の平均値は、電気刺激側、擬似刺激側ともに変化せず、刺激の有無による差も認めなかった。

以上から、持続反復電気刺激は、咬筋組織における *il-6/cypA* を増加させることが明らかとなった。

カラゲナン注入により、*il-6/cypA* の平均値は、カラゲナン注入側ならびに生理食塩水を注入した擬似注入側ともに上昇したが、特に刺激側においてその変化が大きかった（180分後：擬似刺激側に対して 8.13 倍）。刺激の有無と注入後の経過時間を独立変数とした二元配置分散分析の結果、両因子ともに有意な主効果を認めた（刺激の有無： $p=0.0270$ ，経過時間： $p<0.0001$ ）。一方、*il-1 $\beta$ /cypA* の平均値に関しては、注入 60, 180 分後において、カラゲナン注入側の *il-1 $\beta$ /cypA* が、擬似刺激側に比べ有意に高い値を示した（180分後：擬似刺激側に対して 2.59 倍， $t$  検定： $p=0.0241$ ）。以上から、カラゲナンを咬筋内に注入すると、*il-6/cypA* と *il-1 $\beta$ /cypA* が増加することが明らかとなった。

ダントロレン投与下電気刺激群における刺激側と擬似刺激側の *il-6/cypA* の比を、電気刺激群の刺激時間 30 分におけるそれと比較した結果、ダントロレン投与下電気刺激群における平均値（擬似刺激側に対して 1.03 倍）が電気刺激群に比較して有意に低く（擬似刺激側に対して 3.03 倍， $t$  検定： $p=0.0165$ ），電気刺激により生じる *il-6/cypA* の増大は、末梢性筋弛緩薬の全身投与により有意に抑制された。

### 【考察】

持続反復電気刺激により *il-6* の遺伝子発現が増加し、末梢性筋弛緩薬の投与により抑制されたことから、持続反復電気刺激により生じる *il-6* の遺伝子発現の増加は、電気刺激自体によるものではなく、筋収縮に起因するものと考えられた。一方、咀嚼筋の炎症モデルとして設定したカラゲナン注入側でも *il-6* の遺伝子発現の上昇が確認された。また、炎症性サイトカインである *il-1 $\beta$*  の遺伝子発現も亢進されたことから、本モデルにおける *il-6* の遺伝子発現の増加は、筋組織内に生じた炎症反応が関与するものと推測された。一方、電気刺激群においては、*il-1 $\beta$*  の遺伝子発現に変化が見られなかったことから、持続反復電気刺激により生じた *il-6* の遺伝子発現の亢進は、*il-1 $\beta$*  が関与する炎症反応とは関係がない可能性が示唆された。

### 【結論】

反復電気刺激により生じた持続反復筋収縮は、ラット咬筋組織中の *il-6* の遺伝子発現を増加させる。

## 論文審査の結果の要旨

筋収縮により生じる咀嚼筋組織内の生物学的な反応を明らかにすることは、過剰筋活動に伴う咀嚼筋痛の発症メカニズムを明らかにするためにも、咀嚼運動が身体、免疫機能の向上に寄与するという最近の知見を科学的に裏づけるためにも重要である。近年、四肢の骨格筋において、筋収縮によりinterleukin-6遺伝子 (*il-6*) の発現レベルが亢進することが知られるようになった。しかし、四肢の骨格筋と筋線維構成や機能が異なる咬筋において同様の知見が得られるかどうかは明らかでない。そこで申請者は、ラットを用いた咬筋の持続筋収縮モデルを構築し、この*il-6*の発現レベルや局所の炎症の指標となりうるinterleukin-1 $\beta$ 遺伝子 (*il-1 $\beta$* ) の発現レベルをマーカーとして、筋収縮によりどのような生物学的変化が咬筋組織に生ずるのかについて検討した。その結果、以下の点が明らかとなった。

1. 持続反復電気刺激：咬筋への持続反復電気刺激により、*il-6*の発現レベルは、電気刺激側、擬似刺激側ともに上昇したが、電気刺激側においてその変化はより顕著であった。一方、*il-1 $\beta$* の発現レベルは、電気刺激側、擬似刺激側ともに変化せず、刺激の有無による差も認めなかった。

2. 起炎物質（カラゲナン）の注入：カラゲナン注入により、*il-6*の発現レベルは、カラゲナン注入側ならびに生理食塩水を注入した擬似注入側ともに上昇したが、特に刺激側においてその変化が大きかった。一方、*il-1 $\beta$* の発現レベルに関しては、注入60、180分後において、カラゲナン注入側の方が、擬似刺激側に比べ有意に高い値を示した。

3. 末梢性筋弛緩薬（ダントロレン）の全身投与による筋収縮の抑制：電気刺激により生じる*il-6*の発現レベルの増大は、末梢性筋弛緩薬の全身投与により有意に抑制された。

これらの知見は、筋収縮により生じる筋組織中の生物学的変化を解明する上で有益な基礎研究成果と考えられる。また、実験計画および実験手法も適切であった。したがって、本申請論文は博士（歯学）の学位授与に値するものと判断した。