

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 22 日現在

機関番号：32622
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2015～2016
課題番号：15K15760
研究課題名(和文)咬合に起因するエピジェネティックな変化

研究課題名(英文) Epigenetic change due to occlusion

研究代表者

横 宏太郎 (MAKI, Koutaro)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：80219295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：唾液中のゲノムワイドなDNAメチル化に及ぼす顎顔面手術の影響を観察した。顎顔面外科手術手術前および手術3ヶ月後に、顎顔面外科手術を受けた9人の患者とコントロールの2人の唾液を採取した。ゲノムワイドDNAメチル化プロファイリングは、Infinium HumanMethylation450 Beadchipsを用いて行った。有意な($P < 0.05$) DNAメチル化変化が、術前と術後の間の10000を超える部位で観察された。

研究成果の概要(英文)：We observed the influence of maxillofacial surgery on genome-wide methylation in saliva. Maxillofacial Surgery prior to surgery and 3 months after surgery, saliva of nine patients undergoing maxillofacial surgery and two controls were sampled. Genome-wide DNA methylation profiling was performed using Infinium Human Methylation 450 Beadchips. Significant ($P < 0.05$) DNA methylation changes were observed in more than 10,000 sites between preoperative and postoperative.

研究分野：歯科矯正学

キーワード：メチル化 顎顔面外科手術 エピジェネティック EWAS 咬合

1. 研究開始当初の背景

20 33 歳を対象とした前後の顎顔面の形態的特徴 (骨格性上顎前突と下顎前突) は咀嚼筋の myosin heavy chain の mRNA に有意差を認める (J Appl Genet, 46:227-236, 2005)。否定的な結果も報告されているが (Arch Oral Biol, 45:431-440, 2000)、18 40 歳を対象とした垂直的顎顔面の形態的特徴も咀嚼筋組成ならびに遺伝子発現に有意差を認める (J Oral Maxillofac Surg, 70:440-448, 2012)。II 級不正咬合より III 級不正咬合の方が咀嚼筋における KAT6B と HDAC 遺伝子の発現が多い。加えて KAT6B と HDAC は開咬より過蓋咬合で発現が多い (Am J Orthod Dentofacial Orthop, 144:568-576, 2013)。中央値 27.5 歳を対象とした顎側方偏位患者の左右の咀嚼筋組成は健常と異なることも報告されている (J Craniofac Surg, 22:1093-1098, 2011)。したがって、成長発育により形成された顎顔面形態は咀嚼筋における RNA レベルでも発現差として観察できる可能性が窺われる。

下顎骨の orthognathic surgery 後、わずか 6 か月において myosin heavy chain の mRNA に変化が観察される (J Craniomaxillofac Surg, 34 Suppl 2:110-115, 2006; J Craniomaxillofac Surg, 39:401-406, 2011; Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 104:486-490, 2007; Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, 106:487-492, 2008)。また、pig において bite plates の装着により使用 28 日で咀嚼筋における myosin heavy chain の発現に変化が観察される (Arch Oral Biol, 46:215-220, 2001)。いずれにしても、口腔環境の変化は、年単位でない比較的短期でも mRNA の発現差として同定できる可能性が示唆されている。最近の興味深い報告では、成長発育途中の mandibular prognathism 患者における serum miRNAs (let-7i-3p, miR-595, miR-16-2-3p, and miR-367-5p) が評価され、いくつかの miRNAs で対照者群と異なる発現が確認されている (Oral Dis, 20:55-61, 2014)。

以上のことから、著しい顎顔面骨格の違いや外科的矯正治療によるドラステックな咬合変化を発現差として描出できる可能性がある。

2. 研究の目的

Melvin L. Moss は『Functional matrix theory』を著述する中で顎発育におけるエピジェネティックな関与を理論上、定義づけている。しかし、その実像を視る試みはなされていない。発生や疾患におけるエピジェネティックな遺伝子制御で重要な役割を果たしている DNA メチル化は近年のマイクロアレイによる高次のゲノム解析技術の進展により、極めて効率良く網羅的に解析することが可能となった。本研究は著しい顎顔面骨格の

違い、ならびに外科的矯正治療によるドラステックな咬合変化について、ゲノム全域の DNA メチル化プロファイルを解析 (Epigenome wide association studies; EWAS) し、エピジェネティックな修飾の存在を確認するとともに、共通したエピジェネティクス制御を受ける遺伝子 (群) を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

本課題は既に関連倫理委員会の承認を得ている (昭和大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理委員会 承認番号 108 号 平成 20 年 12 月 16 日付)。昭和大学歯科病院矯正歯科に来院されている患者について協力を依頼、文書による同意を得たものを対象とした。顎の離断を要する骨格性不正咬合を含む不正咬合患者。日本人成人。意志の疎通が困難な患者は除外した。喫煙者は除外した。メチレーションアレイ解析、メチレーションアレイデータの解析によるゲノムワイドな網羅的 DNA メチル化解析を実施した。

4. 研究成果

本課題において最も苦慮する研究ステージはメチレーションアレイデータの解析である。研究分担者 田嶋敦が豊富な解析経験を有することに加え、アレイに搭載されているプローブデータの質 (Detection Pval) のフラグを用いて、一定水準に達しない質のプローブを除去した。また、正規化の方法として Quantile Normalize 法を用いて、全サンプルの値 (メチル化の程度を表す) の範囲を統一する等、工夫したデータマイニング戦略で取り組んだ。

咬合様式の区分を口腔内模型、レントゲン写真 (側面セファロ、正面セファロ、パノラマ X 線写真、コーンビーム X 線撮影画像) を用いて多角的に解析した。

有意な ($P < 0.05$) DNA メチル化変化が、術前と術後の間の 10000 を超える部位で観察された。これらについて DAVID Functional Annotation Bioinformatics Microarray Analysis を実施した。

BIOCARTA による解析結果を記す。

RT	%	P-Value	Benjamini	ni
Map Kinase Inactivation of SMRT Corepressor	5	0.0	4.5E-2	1.0E0
Nuclear Receptors in Lipid Metabolism and Toxicity	9	0.0	7.7E-2	1.0E0
IL-10 Anti-inflammatory Signaling Pathway	5	0.0	7.9E-2	1.0E0
Adhesion and Diapedesis of Lymphocytes	5	0.0	9.9E-2	1.0E0

KEGG_PATHWAY による解析結果を記す。

RT	%	P-Value	Benjamini	ni
Pathways in cancer	74	0.0	3.0E-8	8.4E-6
Platelet activation	30	0.0	1.6E-5	2.2E-3
PI3K-Akt signaling pathway	59	0.0	2.2E-5	2.0E-3
ECM-receptor interaction	23	0.0	2.2E-5	1.5E-3
Hippo signaling pathway	31	0.0	1.2E-4	6.5E-3
Acute myeloid leukemia	16	0.0	2.2E-4	1.0E-2
Calcium signaling pathway	33	0.0	5.3E-4	2.1E-2
Insulin resistance	23	0.0	6.5E-4	2.2E-2
Focal adhesion	36	0.0	7.8E-4	2.4E-2
MAPK signaling pathway	41	0.0	1.7E-3	4.6E-2
Wnt signaling pathway	26	0.0	1.7E-3	4.3E-2
Aldosterone synthesis and secretion	18	0.0	1.8E-3	4.2E-2
Cell adhesion molecules	26	0.0	2.6E-3	5.4E-2

RT	%	P-Value	Benjamini	ni
(CAMs)				
Amoebiasis	21	0.0	3.0E-3	5.7E-2
Small cell lung cancer	18	0.0	3.2E-3	5.7E-2
HTLV-I infection	40	0.0	3.3E-3	5.6E-2
Natural killer cell mediated cytotoxicity	23	0.0	3.4E-3	5.4E-2
Adrenergic signaling in cardiomyocytes	26	0.0	3.8E-3	5.7E-2
Rap1 signaling pathway	34	0.0	4.0E-3	5.8E-2
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	25	0.0	4.4E-3	6.0E-2
Circadian entrainment	19	0.0	4.5E-3	5.8E-2
Basal cell carcinoma	13	0.0	6.0E-3	7.3E-2
Dopaminergic synapse	23	0.0	6.1E-3	7.2E-2
Transcriptional misregulation in cancer	28	0.0	6.5E-3	7.3E-2
Glutamatergic synapse	21	0.0	6.9E-3	7.5E-2
AMPK signaling pathway	22	0.0	7.2E-3	7.4E-2
Insulin signaling pathway	24	0.0	7.5E-3	7.5E-2
Melanogenesis	19	0.0	7.7E-3	7.5E-2
Salivary secretion	17	0.0	8.5E-3	7.9E-2
Protein digestion and absorption	17	0.0	1.1E-2	9.4E-2
Graft-versus-host disease	9	0.0	1.2E-2	1.1E-1

RT	%	P-Value	Benjami ni	
Type II diabetes mellitus	11	0.0	1.6E-2	1.3E-1
Hematopoietic cell lineage	16	0.0	1.7E-2	1.4E-1
Insulin secretion	16	0.0	1.7E-2	1.4E-1
Pancreatic secretion	17	0.0	1.8E-2	1.4E-1
Type I diabetes mellitus	10	0.0	1.8E-2	1.4E-1
Cholinergic synapse	19	0.0	2.2E-2	1.6E-1
Long-term depression	12	0.0	2.9E-2	2.0E-1
Fc epsilon RI signaling pathway	13	0.0	3.1E-2	2.1E-1
Proteoglycans in cancer	29	0.0	3.3E-2	2.1E-1
cGMP-PKG signaling pathway	25	0.0	3.3E-2	2.1E-1
Thyroid hormone synthesis	13	0.0	3.8E-2	2.3E-1
Adipocytokine signaling pathway	13	0.0	3.8E-2	2.3E-1
Glycerophospholipid metabolism	16	0.0	4.2E-2	2.5E-1
Sphingolipid signaling pathway	19	0.0	4.4E-2	2.5E-1
Neuroactive ligand-receptor interaction	37	0.0	4.6E-2	2.6E-1
Oxytocin signaling pathway	23	0.0	5.7E-2	3.0E-1
Nicotinate and nicotinamide metabolism	7	0.0	5.8E-2	3.1E-1
Thyroid cancer	7	0.0	5.8E-2	3.1E-1

RT	%	P-Value	Benjami ni	
Morphine addiction	15	0.0	5.8E-2	3.0E-1
Regulation of actin cytoskeleton	29	0.0	5.9E-2	3.0E-1
Allograft rejection	8	0.0	6.5E-2	3.2E-1
T cell receptor signaling pathway	16	0.0	7.6E-2	3.6E-1
Chagas disease (American trypanosomiasis)	16	0.0	8.1E-2	3.7E-1
Inflammatory bowel disease (IBD)	11	0.0	9.2E-2	4.0E-1

興味深いいくつかのカスケードが検出された。

この結果は、唾液中の DNA メチル化を変化させるという考えが、顎顔面外科手術の患者に關与する可能性があることを示すものである。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎宏太郎 (MAKI, Koutaro)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号: 80219295

(2)研究分担者

山口徹太郎 (YAMAGUCHI, Tetsutaro)
昭和大学・歯学部・准教授
研究者番号： 40384193

(3)研究分担者

田嶋敦 (TAJIMA, Atsushi)
金沢大学・医薬保健研究域医学系・教授
研究者番号： 10396864

(4)研究分担者

市川雄大 (ICHIKAWA, Yuta)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号： 30635058

(5)研究分担者

権佳奈 (GON, Kana)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号： 50750650