

令和 3 年 6 月 25 日現在

機関番号：12602

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19605

研究課題名（和文）頭蓋顎顔面先天異常の表現型を機械学習により定量化する試み

研究課題名（英文）Quantification of craniofacial growth by machine learning

研究代表者

井関 祥子（Sachiko, Iseki）

東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・教授

研究者番号：80251544

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：頭蓋顎顔面に生じる先天性疾患の表現型は、主観的な評価に頼ることが多く、客観的手法に基づく表現型の評価が必要とされている。本研究ではSaethre-Chotzen、Apert及びCrouzon症候群モデルマウスを対象に、離乳期以降の成長に伴う頭蓋形態の変化を、 $\mu$ CT画像を用いた幾何学的形態解析法により検討した。Saethre-Chotzenマウスは成長に伴う頭蓋形態の変化が野生型と類似していた。Apert及びCrouzonマウスでは、野生型と異なり、顔面領域の前下方への伸長が乏しいが頭蓋冠の扁平化傾向は認められた。一方、各症候群に共通の冠状縫合癒合に基づく形態的特徴は定量的に検出できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

先天異常はその60%以上が原因不明であることから、診断について、定性的な表現型を診断する者の経験や裁量に頼ることが多い。よって、表現型を客観的に認識する必要がある。本研究では、遺伝的背景がより均一であるマウスを用いて、頭蓋に先天異常を示すモデルマウスを複数用いて、生後の頭蓋形態の成長を $\mu$ CT画像を機械学習させ、パターン化が得られることを示した。将来的には形態の変化によるより正確な診断や適正な治療計画の決定や予後の予測につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The diagnosis of congenital anomalies on craniofacial region is usually evaluated by doctors subjectively or based on their experience. However, the objective method to evaluate the phenotypes has been required for diagnoses. In this study, we investigated the morphological change of the skull on 3 mouse craniosynostosis models of Saethre-Chotzen syndrome, Apert's syndrome and Crouzon syndrome after weaning period by geometric morphometric approach using micro-computed tomography images by paying attention to the shape change. Saethre-Chotzen syndrome mice showed similar morphological change to WT mice. Apert syndrome and Crouzon syndrome mice showed different growth pattern. Both of them showed impaired growth in anterior-downwards extension of facial area while calvarial flattening was observed. The common morphological feature among 3 mouse models base on coronal suture fusion was not detected by quantitatively.

研究分野：先天異常学、発生生物学

キーワード：頭蓋 成長 機械学習 定量化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

頭蓋顔面の先天異常は形態の異常を主徴とし、その表現型は定性的に記述されてきた。表現型の定性的な認識は診断する者の経験や裁量に頼ることが多く、診断が困難な場合があり、表現型的確かつ客観的な認識が必要である。一方、ゲノム解析の進歩は先天異常の遺伝学的要因の解明につながっているが、現在までに単一遺伝子疾患として要因が明らかとなったものは全体で約 30%に過ぎず、大部分は環境要因と遺伝的要因による多因子疾患であり、要因を明らかにするには複雑な解析が求められる。

このような事情は、表現型の確かつ客観的な認識が、より正確な診断や適正な治療計画の決定および予後の予測、さらには同じ表現型を有する患者のグループ化を可能とし、遺伝学的原因解明に比較対象となるグループを提供すると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究では、将来患者で表現型の定量化を行うシステムのための基盤的な情報の第一段階を提供することを目的として、ヒトと比較して遺伝的背景がより均一であるマウスを用いる。複数の頭蓋縫合早期癒合症の疾患モデルマウスの頭蓋の micro-CT 像を取得し、データ上にランドマーク(目印)を設定する。ランドマークから得られる三次元情報に対して主成分分析等の多変量解析を行い、野生型と疾患モデルマウスとの間で定量化された表現型を抽出して疾患モデルマウスを特徴づける。さらにその過程を機械学習し、特徴的な形態変化を自動抽出してカテゴリ化するを試みる。

### 3. 研究の方法

本研究では、micro-CT 画像を用いた幾何学的形態解析法により、成長によるサイズの変化を除外してシェイプの変化を明らかにすることにした。3 種類の頭蓋縫合早期癒合症モデルを対象に頭蓋形態が野生型と客観的に区別可能であるかを検討した後、成長に伴う頭蓋形態がどのように変化しているかについて、野生型と比較した。まず離乳期(3 週齢)以降の Saethre-Chotzen 症候群 (*Twist1*<sup>+/-</sup>)、Apert 症候群 (*Fgfr2*<sup>+S252W</sup>) 及び Crowzon 症候群 (*Fgfr2*<sup>C342Y/+</sup>) モデルマウスについて micro-CT 画像を取得

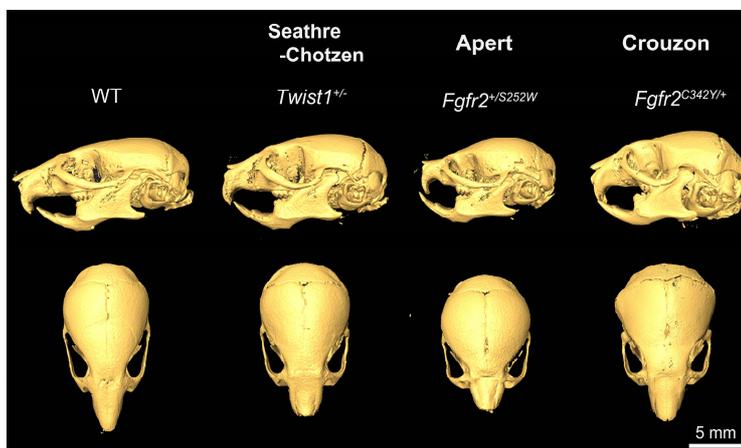


図 1. 本研究で用いた 3 系統の頭蓋縫合早期癒合症モデルマウス

(図 1) 次に三次元再構築ソフトウェア Avizo 6.3 を用いて三次元再構築した各頭蓋の画像上に、33 点のランドマークを設定した(図 2)。各ランドマークの三次元位置情報をもとに、Morpho J v1.07 により多変量解析を実施した。

### 4. 研究成果

#### (1) Saethre-Chotzen 症候群 (*Twist1*<sup>+/-</sup>) モデルマウスの解析

Saethre-Chotzen 症候群 (*Twist1*<sup>+/-</sup>) モデルマウス及びその同腹仔野生型マウスについて、週齢と遺伝子型で群分けし、各ランドマークの位置情報をもとに正準判別分析 Canonical Variate Analysis (CVA) を行った (*Twist1*<sup>+/+</sup>: 33 例、*Twist1*<sup>+/-</sup>: 52 例)。*Twist1*<sup>+/-</sup>マウスと野生型マウスは CV1 (全体の分散の説明率: 84.3%) に沿って明確に分布が分かれた。*Twist1*<sup>+/-</sup>マウスでは野生型と比較して、頭蓋が高く幅が広がっているのに対し、前後方向の長さは短く、明瞭に短頭蓋様の形態を示していた。また頬骨弓が前後方向に狭まっており、野生型と比較して顔面領域の前方への発達に乏しいと考えられた。更に、CV2 (説明率: 9.43%) 方向の分布を見ると、野生型、*Twist1*<sup>+/-</sup>マウスともに週齢順(3, 5, 7, 9 週齢の順)に分布しており、両者の成長パターンは類似していると考えられた。形態的には、成長とともに頭頂骨を中心として頭蓋冠が扁平化すると共に、頬骨弓前頭突起を中心として、顔面領域の前方への伸長が認められた。

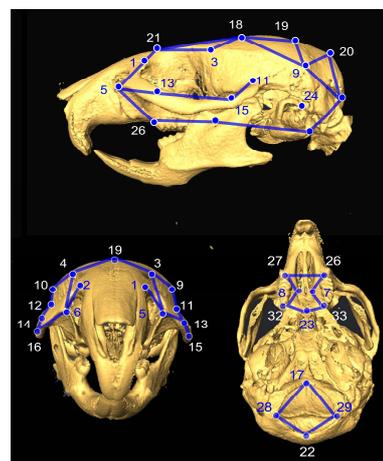


図 2. 本研究において頭蓋上に設定したランドマーク

## (2) Apert 症候群 ( $Fgfr2^{+/S252W}$ ) モデルマウス

同様に Apert 症候群 ( $Fgfr2^{+/S252W}$ ) モデルマウス及びその同腹仔非変異型マウスについて CVA を行った ( $Fgfr2^{+/+}$ : 32 例、 $Fgfr2^{+/S252W}$ : 16 例)。  $Fgfr2^{+/S252W}$  マウスと非変異型マウスについても、CV1 (説明率: 74.3%) に沿って明確に分布が分かれた。それぞれの形態的特徴を確認したところ、 $Twist1^{+/-}$  マウスと同様に短頭蓋様の形態を示すとともに、頬骨弓が外下方に変位していること、臼歯列の傾きが大きく変位していることから、頭蓋のみならず顔面領域の発達にも強く影響が現れていた。また、CV2 (説明率: 14.1%) 方向の分布を見ると、非変異型、 $Fgfr2^{+/S252W}$  マウスともに週齢順 (3, 5, 7, 9 週齢の順) に分布しているものの、同時に CV1 に沿った変化も示しており、その傾向は野生型で強く認められた。すなわち、 $Fgfr2^{+/S252W}$  マウスと非変異型マウスとで、成長に伴う変化の方向が異なっており、 $Fgfr2^{+/S252W}$  マウスでは成長に伴って CV2 が示すランドマークの共変動を起こしやすい一方、CV1 が示すランドマークの共変動を起こしにくいと考えられた。形態的には、頭頂骨から頭頂間骨を中心とした頭蓋冠の扁平化は示すものの、顔面領域の前下方への伸長に乏しいと考えられた。

## (2) Crouzon 症候群 ( $Fgfr2^{C342Y/+}$ ) モデルマウスの解析

Crouzon 症候群 ( $Fgfr2^{C342Y/+}$ ) モデルマウスと同腹仔非変異型マウスについても同様に CVA を行った。 ( $Fgfr2^{+/+}$ : 11 例、 $Fgfr2^{C342Y/+}$ : 17 例)。他の 2 つのモデルマウスと同様に、 $Fgfr2^{+/C342Y}$  マウスと非変異型マウスも CV1 (説明率: 83.5%) に沿って分布が分かれ、両者の区別が可能であった。形態的には短頭蓋様であるものの、前 2 つのモデルマウスとも明らかに異なり、頭頂骨から頭頂間骨にかけて頭蓋冠が大きく上方に変位し、頭蓋後方の幅が著しく広がっていた。また、顔面領域については、頬骨弓が前後方向に縮まっていることから、前方への発達に乏しいと考えられた。さらに、後頭孔下部が下方に広がる点はこのモデルマウスに特徴的であった。CV2 (説明率: 10.5%) 方向の分布を見ると、 $Fgfr2^{+/S252W}$  マウスと同様に、非変異型、 $Fgfr2^{+/C342Y}$  マウスともに週齢順 (3, 5, 7, 9 週齢の順) に分布しているものの、同時に CV1 に沿った変化も示し、その傾向は非変異型で強く認められた。すなわち、 $Fgfr2^{+/C342Y}$  マウスも非変異型マウスと成長に伴う変化の方向が異なり、前頭骨から頭頂骨を中心とした頭蓋冠の扁平化は示すものの、顔面領域の前下方への伸長に乏しいと考えられた。 $Fgfr2^{C342Y/+}$  マウスでは頭蓋底の蝶形骨間軟骨結合の癒合が認められることが知られており (Liu et al., 2013)、これが頭蓋領域の前下方への成長が乏しい主要因と考えられた。そこで Apert 症候群モデルマウスの micro-CT データを詳細に観察したところ、蝶形骨間軟骨結合の癒合が認められた。またこの頭蓋底を組織学的に観察し、軟骨結合が骨組織に置き換わっていることを確認した。以上の結果より、Apert 及び Crouzon 症候群モデルマウスの顔面領域の前下方への伸長が乏しい主要因として、蝶形骨間軟骨結合の癒合に起因する可能性が考えられた。

## (3) 頭蓋縫合早期癒合症モデルマウス 3 系統の総合的解析

3 種類の疾患モデルマウス全てに見られる冠状縫合の癒合の影響により生じる共通の形態的特徴を定量的に検出し得るかを検討するため、冠状縫合の癒合が認められた全てのモデルマウス ( $Twist^{+/-}$ : 52 例、 $Fgfr2^{+/S252W}$ : 3 例、 $Fgfr2^{C342Y/+}$ : 12 例) と、非変異型同腹仔全て ( $Twist^{+/+}$ : 33 例、 $Fgfr2^{+/+ (S252W)}$ : 32 例、 $Fgfr2^{+/+ (C342Y)}$ : 11 例) を対象として、主成分分析 (Principal Component: PCA) を行った。その結果、非変異型マウスが、どの疾患モデルマウスの同腹仔であるかにかかわらず、同領域上に分布したのに対し、各モデルマウスは全体の分散の説明率が 3% 以上である PC1-5 のいずれの成分に対しても分布は重ならなかったことから、冠状縫合の癒合に基づく共通の形態的特徴は、定量的には検出できないと結論づけた。出生前後の頭蓋縫合早期癒合症疾患モデルマウスを用いた過去の報告においても、当該疾患モデルマウスが示す特徴的な形態は、冠状縫合の癒合のみでは説明することができないとされており (Persons et al., 2014)、離乳期以降のマウスを対象とした本解析結果とも一貫した結果である。

本研究では、3 種類の異なる頭蓋縫合早期癒合症モデルマウスを用いて、非変異型マウスや疾患モデルマウス同士の形態的特徴について客観的手法により解析した。更に、成長に伴う頭蓋形態の変化パターンはモデルマウスごとに異なるものの、頭蓋冠の扁平化については、全てのマウスに共通の変化としてみられることが明らかになった。本研究によりは、頭蓋縫合早期癒合症モデルマウスに関する基礎的な情報を提供することができた。現在、本研究で得られた解析過程を機械学習 (特徴的な形態変化を自動抽出してカテゴリー化する) させるためのプログラムの作成を進めている。今後は自動化されたプログラムにより当該疾患モデルマウスの多検体による再解析を行うとともに、他の疾患モデルマウスを用いても同様の解析を進めていく予定である。

### < 引用文献 >

Liu, J., Nam, H. K., Wang, E. and Hatch, N. E. (2013). Further analysis of the Crouzon mouse: effects of the FGFR2(C342Y) mutation are cranial bone-dependent. *Calcif. Tissue Int.* 92, 451-466.

Parsons, T. E., Weinberg, S. M., Khaksarfard, K., Howie, R. N., Elsalanty, M., Yu, J. C. and Cray, J. J., Jr. (2014). Craniofacial shape variation in *Twist1*<sup>+/-</sup> mutant mice. *Anat Rec* (Hoboken) 297, 826-833.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamada Takahiko, Takechi Masaki, Yokoyama Norisuke, Hiraoka Yuichi, Ishikubo Harumi, Usami Takako, Furutera Toshiko, Taga Yuki, Hirate Yoshikazu, Kanai Azuma Masami, Yoda Tetsuya, Ogawa Goto Kiyoko, Iseki Sachiko	4. 巻 249
2. 論文標題 Heterozygous mutation of the splicing factor Sf3b4 affects development of the axial skeleton and forebrain in mouse	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 622 ~ 635
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Zhao Lu, Matsumoto Yoshiro, Ono Takashi, Iseki Sachiko	4. 巻 101
2. 論文標題 Effects of mechanical force application on the developing root apex in rat maxillary molars	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Oral Biology	6. 最初と最後の頁 64 ~ 76
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.archoralbio.2019.03.010	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Vu Tri H., Takechi Masaki, Shimizu Miki, Kitazawa Taro, Higashiyama Hiroki, Iwase Akiyasu, Kurihara Hiroki, Iseki Sachiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Dlx5-augmentation in neural crest cells reveals early development and differentiation potential of mouse apical head mesenchyme	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-81434-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takenoshita Manami, Takechi Masaki, Vu Hoang Tri, Furutera Toshiko, Akagawa Chisaki, Namangkalakul Worachat, Aoto Kazushi, Kume Tsutomu, Miyashin Michiyo, Iwamoto Tsutomu, Iseki Sachiko	4. 巻 250
2. 論文標題 Cell lineage and expression based inference of the roles of forkhead box transcription factor Foxc2 in craniofacial development	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Developmental Dynamics	6. 最初と最後の頁 1-15
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dvdy.324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Tri Vu Hoang, Masaki Takechi, Miki Shimizu, Taro Kitazawa, Hiroki Higashiyama, Akiyasu Iwase, Hiroki Kurihara, Sachiko Iseki
2. 発表標題 Dlx5-augmentation in neural crest cells induces ectopic calvarial cartilages.
3. 学会等名 第59回日本先天異常学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Manami Takeoshita, Masaki Takechi, Kazushi Aoto, Tsutomu Kume, Michiyo Miyashin, Sachiko Iseki
2. 発表標題 Cell lineage- and expression-based inference of molecular function of fork head box transcription factor Foxc2 in craniofacial development
3. 学会等名 4th Meeting of the International Association for Dental Research Asia Pacific Region (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	武智 正樹  (Takechi Masaki)  (10455355)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・講師   (12602)	
研究分担者	塗 隆志  (Nuri Takashi)  (40445995)	大阪医科大学・医学部・准教授   (34401)	
研究分担者	二宮 洋一郎  (Ninomiya Youichirou)  (90237777)	国立情報学研究所・大学共同利用機関等の部局等・特任研究員   (62615)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	上田 晃一  (Ueda Koichi)  (90257858)	大阪医科大学・医学部・教授    (34401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	Imperial College London			
米国	Northwestern University			