

平成 21 年 6 月 24 日現在

研究種目：若手(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19791596

研究課題名（和文）

先天性遺伝子変異のある脳神経性骨縫合部成長の力学的負荷に対する遺伝子変化の研究

研究課題名（英文）

Genetic changes of gene mutated bone suture biomechanics

研究代表者 柴崎 礼子 (SHIBAZAKI REIKO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：30384340

研究成果の概要：

主たる頭蓋骨成長の場である骨縫合部の成長、特に、頭蓋骨全体の成長に伴う3次元の形態変化による顎顔面バイオメカニクスの変化を、中顔面の前後の成長において重要な役割を持つといわれる鼻中隔軟骨からの神経性骨新生を司る遺伝子による口蓋骨縫合部癒合調節機構に与える遺伝子の特定とその発現部位・量変化を、さらに、先天的に骨成長因子の遺伝子変異をもつ個体の縫合性成長において重要な役割を持つといわれる脳硬膜からの神経性骨新生を司る遺伝子による縫合部癒合調節機構に与える遺伝子の特定とその発現部位・量変化を目的として行った。まず、胎生期の鼻中隔軟骨および口蓋骨縫合部癒合時期の同組織から数個レベルの細胞をレーザーマイクロダイセクションを用い回収・解析し、同細胞から得られるRNA量の解析を行った。そして現在、骨縫合部成長の神経性因子の遺伝子発現変化についての詳細な検討を行っていると同時に、頭蓋骨縫合部が先天性に早期癒合しているラットを用い、同様の解析を行いつつある。頭蓋骨縫合部と咬合（歯科）は、一見異なる領域と思われがちであるが、上顎骨複合体の縫合部や下顎骨の下顎頭を含む顎関節を含む側頭骨の縫合部など、頭蓋顎顔面領域の骨形態の大きさの成長変化に寄与する膜性骨化の殆どが縫合性成長である。本研究によって各個体、そして先天性遺伝子変異個体に適した的確な治療に対する一指針を得ることができれば、生体本来の機能的生活を営むための一助となり、社会的意義のある研究と考えられる。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合 計
2007 年度	1,500,000	0	1,500,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総 計	3,000,000	450,000	3,450,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正小児系歯学

キーワード：脳・神経、遺伝子、先天性、骨縫合部、バイオメカニクス

様式 C-19 (記入例)

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

頭蓋骨縫合部癒合についての研究は、1980年代後半から、頭蓋骨早期癒合症の治療を目標に、各々の縫合部について、その癒合のメカニズムが解明されつつある。同症状を持つ場合、殆どが顎顔面領域における変形を併発し、上顎骨複合体あるいは下顎骨に至ることが殆どである。同症状に対する治療は、脳発達を障害することに対する対症療法としての骨再建術、また最近では骨延長術が広く用いられてきている。その利点としては、小児の骨新生能力を加味した、骨移植なしに骨量を増加させることが可能である点が挙げられる。しかし今後、同症状に対する根治療法“早期癒合の予防”を行い、癒合による顎顔面の変形なしに、“成長”を従来のレールのままに誘導する、更には、早期癒合の可能性のある縫合部でも縫合部成長促進を可能にすることが望まれている。

2. 研究の目的

先天的に骨成長因子の遺伝子変異をもつ個体の、成長に伴う頭蓋骨全体の3次元の形態変化による顎顔面バイオメカニクスの変化が、力学的負荷として、縫合性成長において重要な役割を持つといわれる脳硬膜からの神経性骨新生を司る遺伝子による縫合部癒合調節機構に与える遺伝子の特定とその発現部位・量変化を、組織から数個レベルの細胞を回収・解析できるレーザーマイクロダイセクションを用い、解析することを目的とする。

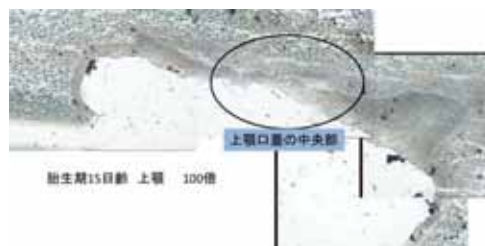
3. 研究の方法

1. 頭蓋骨領域に症状を呈する先天性遺伝子変異個体の選出
2. 先天性遺伝子変異個体の縫合部癒合の遺伝子発現メカニズムの解析
(レーザーマイクロダイセクションをもちいた数個の細胞レベルでの遺伝子発現の解析)
3. 先天性遺伝子変異体頭蓋骨への力学的負荷を付加
4. 頭蓋骨成長のシミュレート
5. 結果発表

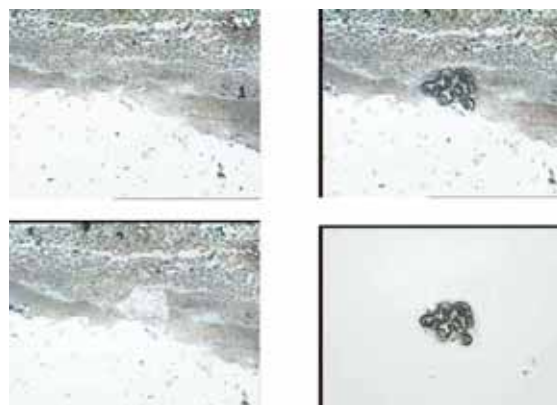
4. 研究成果

頭蓋縫合部の一つとして、上顎骨口蓋正中縫合部の縫合癒合時期の遺伝子解析を行った。
胎生15日齢 RD ラットを用い、凍結切片から LCM を用いて細胞を採取した。口蓋全体と縫合部に限局した細胞採取の2とおりを試行した結果、縫合部に限局した

細胞からも高濃度で解析に十分な RNA が採取できた。



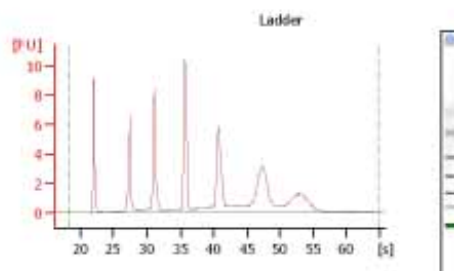
縫合部中央を拡大し LCM にて細胞採取
↓



total RNA 解析
↓

Ladder 確認

Assay Class: EukaryoteTotal RNA Pico
Data Path: C:\..._EukaryoteTotal RNA Pico_DE11400836_
Electropherogram Summary

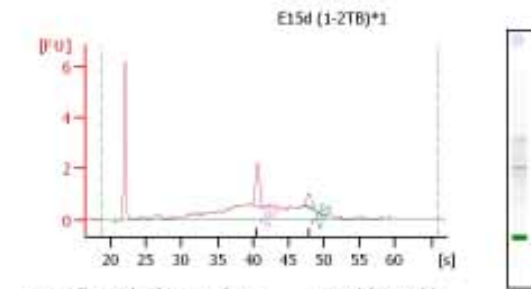


Overall Results for Ladder

RNA Area: 90.6
RNA Concentration: 1,000 pg/ul
Result Flagging Color: All Other Samples
Result Flagging Label:

各染色切片での結果

008-07-02_11-43-55.xad Created: 7/2/2008 11:
Modified: 7/2/2008 12:

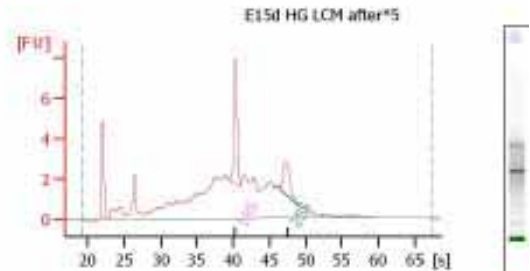


Overall Results for sample 7 : E15d (1-2TB)*1

RNA Area:	26.5
RNA Concentration:	329 pg/ul
rRNA Ratio (28s / 18s):	0.4
RNA Integrity Number (RIN):	5.2 (8.02.03)
Result Flagging Color:	
Result Flagging Label:	RIN: 5.20

Fragment table for sample 7 : E15d (1-2TB)*1

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.88	41.51	2.3	8.7
28S	47.11	49.66	1.1	4.1



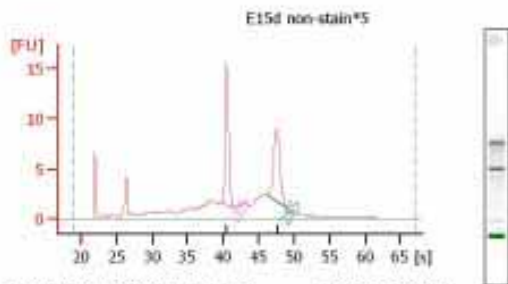
Overall Results for sample 9 : E15d HG LCM after*5

RNA Area:	97.5
RNA Concentration:	1,209 pg/ul
rRNA Ratio (28s / 18s):	0.4
RNA Integrity Number (RIN):	5.4 (8.02.03)
Result Flagging Color:	
Result Flagging Label:	RIN: 5.40

Fragment table for sample 9 : E15d HG LCM after*5

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.49	41.01	8.0	8.2

Assay Class: EukaryoteTotal RNA Pico
Data Path: C:\..._EukaryoteTotal RNA Pico_DE11400836
Electropherogram Summary Continued ...

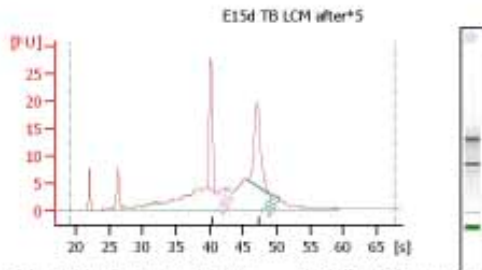


Overall Results for sample 8 : E15d non-stain*5

RNA Area:	114.7
RNA Concentration:	1,423 pg/ul
rRNA Ratio (28s / 18s):	0.8
RNA Integrity Number (RIN):	8.0 (8.02.03)
Result Flagging Color:	
Result Flagging Label:	RIN:8

Fragment table for sample 8 : E15d non-stain*5

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.72	41.42	19.4	16.9



Overall Results for sample 10 : E15d TB LCM after*5

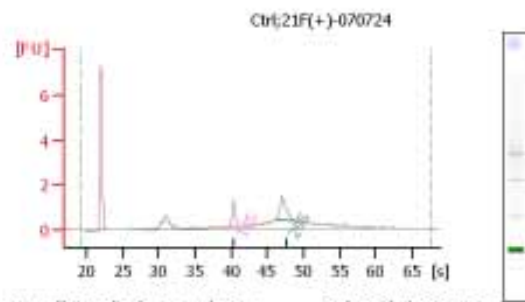
RNA Area:	244.7
RNA Concentration:	3,034 pg/ul
rRNA Ratio (28s / 18s):	1.2
RNA Integrity Number (RIN):	9.0 (8.02.03)
Result Flagging Color:	
Result Flagging Label:	RIN:9

Fragment table for sample 10 : E15d TB LCM after*5

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	38.57	41.00	30.6	12.5
28S	45.54	48.04	36.2	14.8

3-07-02_11-43-55.xad

Modified: 7/2/2008 12:09



Overall Results for sample 11 : Ctrl:21F(+)-070724

RNA Area: 17.7
RNA Concentration: 220 ug/ul
rRNA Ratio [28S / 18S]: 1.4
RNA Integrity Number (RIN): 7.7 (8.02.03)
Result Flagging Color:
Result Flagging Label: RIN: 7.70

Fragment table for sample 11 : Ctrl:21F(+)-070724

Name	Start Time [s]	End Time [s]	Area	% of total Area
18S	39.68	41.05	1.6	9.0

6. 研究組織

(1)研究代表者

柴崎 礼子 (SHIBAZAKI REIKO)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：30384340

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

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)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

○取得状況(計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等