

研究種目：若手スタートアップ
研究期間：2008 ～ 2009
課題番号：20890223
研究課題名（和文）咀嚼変化が下顎骨成長発育に及ぼす影響—遺伝子発現評価及び 3 次元形態評価の融合
研究課題名（英文）Effect of mastication on mandibular growth
研究代表者 榎本 明子 (Enomoto Akiko)
昭和大学・歯科矯正学教室・普通研究生
研究者番号：60514982

研究成果の概要（和文）：

咀嚼が下顎骨成長発育に大きく影響を与える事は良く知られているが、そのメカニズムについては十分明らかにされていない。離乳直後の生後 3 週齢 ICR マウスを用い、硬食を与えた群 (Hard 群)、軟食を与えた群 (Soft 群)、硬食と軟食を交互に与えた群(Hard/Soft 群)の 3 群に分類する。実験開始 1 週後および 4 週後に μ CT により下顎骨の 3 次元形態計測を行う。遺伝子発現変化の観察には、Laser Microdissection 法を用い下顎頭軟骨を選択的に採取した上で、Micro Array および Real time PCR 法にて軟骨性成長に関連する遺伝子の探索ならびに発現量の定量評価を行った。さらに組織学的検討や軟骨細胞の増殖能の評価も合わせて行った。顎形態の成長を理解するためには、下顎骨の成長中心であるといわれている下顎頭軟骨は欠くことができない。また、下顎頭軟骨は他の成長軟骨に比べ力学的環境変化に影響を受けやすいと言われており、メカニカルファクターとの関連性を知ることが重要である。過去に当教室では、Laser Microdissection 法を用い下顎頭軟骨を選択的に採取した上で、Micro Array および Real time PCR 法を用いた解析によって下顎頭軟骨成長に関与する様々な遺伝子の発現が咀嚼運動開始期に一致して大きく変化をする事を報告している。しかしながら、成長期の咀嚼運動の違いが下顎骨成長発育に与える影響に関して下顎頭軟骨の遺伝子発現評価と 3 次元的下顎骨形態評価を両方行った研究はない。本研究では、成長期の咀嚼変化によって下顎頭軟骨における軟骨内骨化に影響を与え、下顎骨成長発育に変化をもたらすと仮説を立て、 μ CT による 3 次元形態計測ならびに Micro Array による遺伝子発現変化の観察によって明らかにする事を目的とした。

研究成果の概要（英文）：The aim of this investigation was to ascertain whether changes in mastication influence on mandibular growth. Three-week-old male ICR mice were assigned to the following three diet groups: mice fed a hard diet (HD group); mice fed a soft diet (SD group); and mice alternately fed hard and soft diets (HSD group). The mandibular condylar cartilage was evaluated histologically by hematoxylin and eosin staining. Chondrocyte proliferative ability was evaluated by immunostaining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA). For the observation of changes in gene expression of osteopontin and type X collagen, the mandibular condylar cartilage was selectively collected and expressions of genes related to cartilaginous growth were quantitatively evaluated by real-time PCR and immunostaining. And we investigated how the shape of the mandible in mice is affected by food hardness using micro computed tomography (μ CT).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1340000	402000	1742000
2009年度	1200000	360000	1560000
年度			
年度			
年度			
総計	2540000	762000	3302000

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：成長発育、形態計測、下顎頭軟骨、咀嚼、 μ CT

1. 研究開始当初の背景

顎形態の成長を理解するためには、下顎骨の成長中心であるといわれている下顎頭軟骨は欠くことができない。また、下顎頭軟骨は他の成長軟骨に比べ力学的環境変化に影響を受けやすいと言われており、メカニカルファクターとの関連性を知ることが重要である。過去に当教室では、Laser Microdissection 法を用い下顎頭軟骨を選択的に採取した上で、Micro Array および Real time PCR 法を用いた解析によって下顎頭軟骨成長に関与する様々な遺伝子の発現が咀嚼運動開始期に一致して大きく変化をする事を報告している。(Watahiki J 2004 J Dent Res.; 83(3):245-9)また、咀嚼と下顎骨の成長に関する幾つかの報告 (Kiliaridis S 1999 Am.J orthod Dentofacial Orthop. ; 116(2):121-5、Luca L 2003 Prog Orthod. ; 4:3-7) Kantomaa T 1994 J Dent Res. ; 73(6) : 1150-6)も出されている。しかしながら、成長期の咀嚼運動の違いが下顎骨成長発育に与える影響に関して下顎頭軟骨の遺伝子発現評価と3次元的下顎骨形態評価を両方行った研究はない。

2. 研究の目的

本研究では、成長期の咀嚼変化によって下顎頭軟骨における軟骨内骨化に影響を与え、下顎骨成長発育に変化をもたらすと仮説を立て、 μ CTによる3次元形態計測ならびにMicro Arrayによる遺伝子発現変化の観察によって明らかにする事を目的とした。

3. 研究の方法

1. 実験群

3週齢のICR mouse 雄のみ50匹を用いる。硬食(Hard Diet)として、通常の球粒の餌、軟食(Soft Diet)には通常の球粒の餌と水を

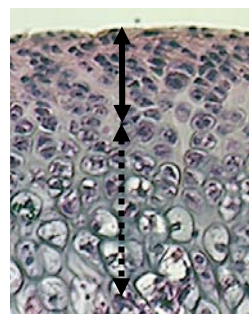
2:5の割合で混合した物を用いる。実験群は、以下の5群に分類する。①硬食のみを1週間与えた群(HD1W)②軟食のみを1週間与えた群(SD1W)③硬食のみを4週間与えた群(HD4W)④軟食のみを4週間与えた群(SD4W)⑤硬食と軟食を1週間ごとに交互に4週間与えた群(HSD4W)。

2. パラフィン切片作成

取り出した下顎頭軟骨を4%パラフォルムアルデヒド(pH 7.4)を用いて4℃で固定する。その後、2週間10%Na₂EDTA(pH 7.2)にて脱灰を行い、パラフィン包埋し、7- μ mの切片を作成する。

3. 下顎頭軟骨の組織学的評価

各群それぞれ、ヘマトキシレンエオジン染色(H.E.染色)を行う。下顎頭軟骨細胞層を増殖層APC-zone(APC-zone thickness)と肥大軟骨細胞層(H-zone thickness)に分け(Kiliaridis *et al.*, 1999)、それぞれ層の厚さを計測し、その平均値を各個体の値として用いる。表層から深層に向かうにつれ細胞の分過度は高くなるため分化の進行を検討する(図4)。



←→
増殖層
APC-zone
←.....→
肥大軟骨細胞層
H-zone

図4

4. 下顎頭軟骨細胞の増殖能の評価

diluted mouse anti-proliferating cell nuclear antigen (PCNA) antibody (Oncogene, Boston, MA)とEnVision + HRP Mouse (DAKO, Copenhagen, Denmark)の免疫

反応を室温で1時間反応させる。その後それらの切片を Liberate Antibody Binding (LAB Solution) (Polysciences Inc, Eppelheim, Germany) で室温にて7分間反応させる。非特異的反応を防ぐため、normal mouse serum を含有する blocking 試薬でさらに1時間反応させる。diaminobenzidine (DAB) を用いて反応を確認する。顕微鏡下にて、増殖層に計測部位を局限し、単位面積あたりの PCNA positive cell の数を計測し、その平均値を各固体の値として用いる。

5. 下顎頭軟骨の遺伝子発現評価

① Laser Microdissection 法

LM (P. A. L. M) (Microlaser Technologies) により、メタノール固定した凍結切片上から、UV-laser にて下顎頭軟骨細胞層を選択的に採取し RNeasy Protect Mini および RNase-free DNase set にてジェノミック DNA (Genomic DNA) Free な total RNA の分離を行う。

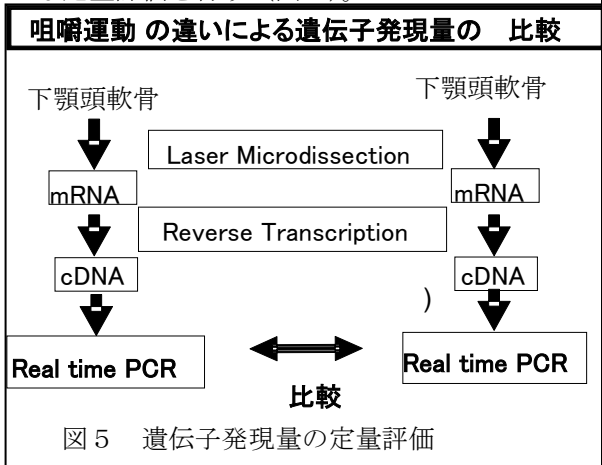
② 網羅的遺伝子発現の観察 (マイクロアレイ法)

分離した total RNA をリニア増幅法にて増幅した後、蛍光標識した Probe DNA を製作する。製作した Probe を GeneChip® Mouse Gene 1.0 STArray へハイブリダイゼーションし Affymetrix GeneChip® Scanner 3000 7G 4C (Affymetrix) にて、Scan した後、得られた画像 data を合計約 28853 の網羅的遺伝子発現の解析を行う。

●平成 21 年度

③ Real Time PCR 法

次に Micro Array によって得られた候補遺伝子について ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Germany) にて $10 \mu\text{l}$ の TaqMan Universal PCR Master Mix (Perkin-Elmer Applied Biosciences, Foster City, CA) と $1 \mu\text{l}$ の各種遺伝子の primer を用いて、Real time PCR 法にて各候補遺伝子の発現量の更なる正確な定量評価を行う (図 5)。



4. 研究成果

咀嚼が下顎骨成長発育に大きく影響を与える事は良く知られているが、そのメカニズムについては十分明らかにされていない。そこで、本実験では、食べ物の性状 (硬食・軟食) による咀嚼変化が下顎骨成長発育にどのような影響を与えるのかを形態学および遺伝子発現変化を観察することで検討する事を目的とした。離乳直後の生後 3 週齢 ICR マウスを用い、硬食を与えた群 (Hard 群)、軟食を与えた群 (Soft 群)、硬食と軟食を交互に与えた群 (Hard/Soft 群) の 3 群に分類する。実験開始 1 週間および 4 週後に μCT により下顎骨の 3 次元形態計測を行う。遺伝子発現変化の観察には、Laser Microdissection 法を用い下顎頭軟骨を選択的に採取した上で、Micro Array および Real time PCR 法にて軟骨性成長に関連する遺伝子の探索ならびに発現量の定量評価を行った。さらに組織学的検討や軟骨細胞の増殖能の評価も合わせて行った。

1. μCT の体積測定結果から実験開始 4 週間 (7 週齢) で Soft 群の下顎骨が他の 2 群に比べて有意に小さい値を示した。

2. 距離計測においては、実験開始 1 週間 (4 週齢) 下顎頭幅径は、Hard 群で Soft 群に比べ有意に大きかった。実験開始 4 週間 (7 週齢) では、Ramus height、下顎骨長は、Hard/Soft 群が他の 2 群に比べて有意に長かった。

3. 遺伝子発現量の変化においては、Hard 群において軟骨細胞の石灰化および最終分化に関与する遺伝子 (Osteopontin, Type X collagen) が有意に高い発現を示していた。

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 1 件)
Effect of mastication on mandibular growth evaluated by microcomputed tomography
Akiko Enomoto, Junichi Watahiki, Tetsutaro Yamaguchi, Tarou Irie, Tetsuhiko Tachikawa, Koutaro Maki
European Journal of Orthodontics, 2010, (32) 66-70

[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◇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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 明子 (Enomoto Akiko)
昭和大学・歯科矯正学教室・普通研究生
研究者番号：60514982

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：