

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25861992

研究課題名(和文)鼻上顎複合体の劣成長の要因に対する基礎的研究

研究課題名(英文)Fundamental research on the factors of hypogrowth of the nasomaxillary complex

研究代表者

高橋 邦彰(TAKAHASHI, KUNIAKI)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号：70613777

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は不正咬合自然発症マウスを用い、不正咬合の発生機序を解明することにした。研究の方法は基質合成系の解析を行う先天的アプローチと咀嚼の脳におよぼす影響について解析する後天的要因へのアプローチとした。本研究を開始するにあたり、実験動物に肺スパスツレラ陽性の報告がされた。そのため、新たなモデル動物として変異型PTH/PTHrP受容体を有するマウス作製に成功した。現在は、同マウスの組織切片を用いて細胞外マトリックスの検討を行っている。今後は、同マウス軟骨細胞の分化について検討をすすめると同時に、不正咬合自然発症マウスを用いて、骨・軟骨基質の解析と咀嚼能率の検討を行っていく予定である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to elucidate the pathogenesis of malocclusion by focusing on inferior growth of the anterior cranial base and the nose in BALB/c-bm/bm mouse which spontaneously induces malocclusion. As begin this study, BALB/c-bm/bm mouse was infected the Pasteurella pneumotropica. Therefore, it was decided to try creating a new animal model. Parathyroid hormone (PTH) and parathyroid hormone-related peptide (PTHrP) play an important role in the differentiation and the formation of cartilage. So, it was succeeded to create a new animal model which have a variant PTH / PTHrP receptor, gene mutations have been inserted in the DNA sequence. In the future, it is planned to evaluate the histological findings of bone and cartilage at the nasal septal cartilage in embryonic and masticatory performance using variant PTH / PTHrP receptor mouse and BALB/c-bm/bm mouse which spontaneously induces malocclusion.

研究分野：矯正歯科

キーワード：モデル動物 不正咬合自然発症 鼻中隔軟骨

1. 研究開始当初の背景

不正咬合がもたらす障害には、顎口腔領域で営まれる摂食、咀嚼、発音などの顎口腔機能の障害をはじめとして、審美性が損なわれることによる社会生活における不都合や心理的障害がある。歯科矯正学において、この不正咬合を予防・抑制・回復することは患者の精神的、社会的に満足できる quality of life (QOL) の向上に大きく寄与するものと考えられる。この点において、不正咬合の発症機序を解明し、その予防に努めることは、現代社会において大きな意義をもつと考えられる。

そして、先天的に短肢症を生じる C57-BL-*bm/bm* マウスからの *bm* 遺伝子を BALB/c マウスに自然交配した BALB/c-*bm/bm* マウスが、主に鼻上顎複合体の劣成長による前歯部の左右的交叉咬合を自然発症することが明らかとなっている。一方鼻中隔軟骨は、顎顔面の成長に大きな影響を及ぼすことがすでに知られており、鼻中隔軟骨の軟骨内骨化の異常は、上顎劣成長を引き起こす要因の一つであると考えことができ、代表者は、組織学的手法を用いて BALB/c-*bm/bm* マウスの鼻中隔軟骨の軟骨内骨化に異常が認められることを解明した。

そこで、代表者は鼻中隔軟骨および周囲の骨組織においても低硫酸化プロテオグリカンの合成に異常が認められるのではないかと推測した。

2. 研究の目的

本研究では不正咬合自然発症マウスを用い、鼻上顎複合体の劣成長について着目して多因子疾患である不正咬合の発症機序を先天的要因と後天的要因の両面から解明することにした。

3. 研究の方法

(1) 先天的要因へのアプローチ

胎生期における鼻中隔軟骨のコンドロイチン硫酸プロテオグリカンをはじめとする基質合成系の微細構造学的・遺伝子学的観察と硬組織の質および量の検索に *in vivo* の解析を駆使する。具体的には、胎生期の BALB/c-*bm/bm* マウスにおけるコンドロイチン硫酸の低硫酸化による鼻中隔軟骨の軟骨結合部における軟骨形成異常を明らかにし、軟骨分化異常の作用点を解明することと、コンドロイチン硫酸と骨形成に関わる因子との相互関係を分子細胞生物学的に明らかにする。

(2) 後天的要因へのアプローチ

咀嚼が脳におよぼす影響について解析することで、頭蓋顎顔面の成長発育との関連性を考察する。具体的には、咀嚼能率について、脳組織の組織学および生理学的評価の観点から検索を進める。

4. 研究成果

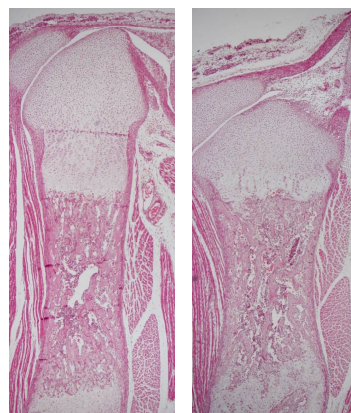
本研究は当初、胎生期の BALB/c-*bm/bm* マウスを用いる計画を立案していた。しかし、実験動物である BALB/c-*bm/bm* マウスを、名古屋文理大学健康生活学部栄養学科生理学教室より輸送しようとしたところ、同教室がマウスを預けて系統維持している名古屋市立大学大学院医学研究科病態モデル医学分野 & 実験動物センターの飼育室にて肺スパツレラ陽性のモニタリング結果が報告された。そのため、同マウスの北海道大学への輸送にあたり、マウスのクリーニング業務開始、作出された (F1) 動物の微生物学的モニタリング実施、SPF 動物を確認したうえで、交配・F2 の作出開始、妊娠動物と微生物の検査成績書を添付の上、北海道大学へ移送という手順が必要となった。同工程のため、実験に大幅な遅れが生じてしまった。そのため、

新たなモデル動物の作成を試み、研究を進めていく方法を模索した。

骨格組織である軟骨の分化形成において、副甲状腺ホルモンおよび副甲状腺ホルモン関連ペプチド、ならびにその受容体(副甲状腺ホルモン/副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体)は重要な役割を果たす。一方、副甲状腺ホルモン/副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体の遺伝子変異は、系統疾患の中でも高頻度を示す軟骨異形成症を発症させる。軟骨異形成症変異型などがあげられ、遺伝子発現の解析は進んでいるが細胞外基質の病理組織異常については未だに未解明である。その一方で、軟骨は細胞外基質に富んだ組織であり、プロテオグリカン、特に、コンドロイチン硫酸が占める割合は非常に高い。しかしながら、コンドロイチン硫酸合成は単に遺伝子発現だけでは解析ができず、組織学的に詳細な解析を必要とする。

そこで、副甲状腺ホルモン/副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体シグナルとコンドロイチン硫酸プロテオグリカンをはじめとする基質合成系の検索に *in vivo* の解析を駆使することにした。

副甲状腺ホルモン/副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体シグナルによるコンドロイチン硫酸の低硫酸化を解析するために、Blomstrand 型 PTH-R の cDNA は Kunkel 法にて point mutation が誘導し、DNA 配列で確かに遺伝子変異が挿入されていることを確認し、その遺伝子を軟骨細胞特異的 type II collagen promoter cassette に挿入し、右上図のようなトランスジェニックマウス作製に成功した。



左図：正常マウス
右図：変異型副甲状腺ホルモン/副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体を有するマウス

また、変異型副甲状腺ホルモン/副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体を有するマウスの組織切片を用いて、コンドロイチン硫酸の低硫酸化を生じている長管骨の軟骨内骨化について検討するために、成長発育中の軟骨の各層で分化過程により異なって発現する細胞外マトリックスの検討を行っている。

BALB/c-*bm/bm* マウスのうち不正咬合を自然発症するマウスは約 10%であるため、不正咬合発症マウスを用いる実験では、いかに系統維持させるかにかかっている。現段階ではまだ *bm* 遺伝子をヘテロで有するマウス (BALB/c-*bm*+マウス)を飼育しているのみである。BALB/c-*bm/bm* マウスの系統維持のため、BALB/c-*bm*+マウスの交配をすすめていきたいと考える。今後は、変異型副甲状腺ホルモン/副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体を有するマウスの Ⅰ型コラーゲン、Ⅱ型コラーゲン、アルカリ性フォスファターゼ活性(ALP 活性)の免疫染色を行い、軟骨細胞の分化についての検討を行っていくと同時に、系統維持された BALB/c-*bm/bm* マウスのうち不正咬合を自然発症しているものと正常咬合を有するものを用いて、胎生期の鼻中隔における骨・軟骨基質の解析と咀嚼能率の検討を行って

いく予定である。

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 1 件)

K. Takahashi, T. S. Kajii, S. Wada,
J. Iida, Histological evaluation of
nasal septal cartilage in BALB/c-*bm/bm*
mouse with spontaneous malocclusion,
American Association of
Orthodontists, 2014.4.25-2014.4.29,
Ernest N. Morial Convention Center (New
Orleans, USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 邦彰 (TAKAHASHI, Kuniaki)

北海道大学・大学病院・医員

研究者番号: 70613777

(2) 研究分担者

なし