

令和元年6月7日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26253093

研究課題名(和文) 顎成長の調和の破綻を来すバイオメカニズムのゲノム・フェノム統合解析

研究課題名(英文) Integrated genome-phenome analysis of biomechanisms which cause disharmony in jaw growth

研究代表者

森山 啓司 (Moriyama, Keiji)

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：20262206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、下顎後退症発症に関与する特異的なエピジェネティック制御機構やシグナル伝達機構の解明を目的として、モデル動物作成ならびに解析、患者の臨床情報を基に、下顎後退症患者を取り巻く内的・外的要因の双方を解析する事とした。モデル動物の解析では、ホルモンと力学的負荷の相加作用により、後天的な下顎後退症を惹起する下顎頭変形を重篤化することを示し、下顎骨の発生過程においてヒストンメチル化酵素であるSetdb1が必須であることを解明した。また、下顎後退症患者の臨床情報から、治療前後における硬軟組織の変化の検討を行った。以上の結果は、各種学会において発表するとともに国際学術雑誌に掲載された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究結果は、歯科矯正学的観点から集積した臨床症状と、動物モデルから得られた情報との統合的研究であり、多数の遺伝子・遺伝子産物の質や量の違いをもとに、これまで不明点が多かった下顎後退症発症メカニズムの分子機構を内的・外的要因の相互作用も含めて明らかにした。得られた知見は、下顎後退症発症機構に基づいた診断・治療・予防法の開発へと発展すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to clarify epigenetic regulation of gene expression and signal transduction mechanisms related to pathogenesis of mandibular retrognathia. Based on the animal model analysis and the patient's clinical information, we determined the internal and external factors surrounding patients with mandibular retrognathia. In the analysis using animal models, we elucidated the effects of combination of hormones and excessive mechanical stress on temporomandibular joint osteoarthritis which causes acquired mandibular retrusion. Furthermore, we elucidated that Setdb1, a histone methylation enzyme, is essential in the developmental process of the mandible. By using clinical information of patients with mandibular retrognathia, we investigated morphological changes of soft and hard tissues before and after orthognathic treatment. These results were presented in various meetings and published in an international academic journal.

研究分野：歯科矯正学、先天異常、顎変形症、骨代謝

キーワード：下顎後退症 進行性下顎頭吸収 モデル動物 エピジェネティクス

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成長期における下顎後退症患者に対して、機能的矯正装置を適応する場合があるが、治療に対する反応性は個人差が大きく、下顎頭軟骨部での骨形成、および下顎骨骨膜面・骨内膜面における骨リモデリングによって下顎骨の成長方向、成長量が規定されるため、成長予測は困難である。一方、進行性下顎頭吸収 (Progressive Condylar Resorption: PCR) は進行性の下顎頭吸収変化と同部の体積の減少と定義され、前歯部の開咬を伴う下顎後退症を呈する。疫学的には若年女性の特発例および 50 代以降の自己免疫疾患併発例が多く、外科的矯正治療後の発症例も数多く報告されている。下顎頭にかかる異常な圧迫・牽引力、基礎疾患、下顎頭の低形成、血中 17β -エストラジオール濃度低下が原因という説があるが、根本的な病態成立機序は全く不明であり、有効な治療法の確立はなされていないのが現状である。当科での統計によると全矯正患者のうち、年間約 1% の患者で PCR の既往が疑われている。従来の下顎骨の成長発育や疾患についての研究は、単一、あるいは少数の遺伝子や遺伝子産物、メカニカルストレス等外的要因に着目し、疾患発症機序の解明を目指すものであったが、下顎後退症のように、複雑かつ多彩な病態の解明には至らなかった。

2. 研究の目的

下顎後退症は先天的・後天的な下顎骨の形成・成長不全の結果生じる顎顔面形態の一樣相であるが、頭蓋顔面における形態決定の要因は不明な点が多く、下顎頭の変形・吸収によって後天的に下顎後退症を呈する場合もある。下顎骨形態形成の過程は環境変化への適応と再構築の上に成り立っており、逆に外界からの刺激に容易には応答しないようなシステムも存在するため、組織特異的に発現する転写因子や遺伝子群を中心としたアプローチのみでは説明がつかない現象を含有すると考えられる。本研究は、下顎後退症についての miRNA のプロモーターメチル化、miRNA、およびその標的遺伝子の発現プロファイル、miRNA の機能解析より得られた結果を統計学的手法により総合的に解析し、PCR を含む下顎後退症発症における DNA メチル化の異常やそれによる miRNA 発現制御機構ならびにシグナル伝達機構を明らかとし、疾患成立機構の新たな分子基盤を構築することを目的とする。そこで本研究は、下顎後退症患者の疾患特異的な miRNA の同定やシグナル伝達機構の解明を目的として、モデル動物作成ならびに解析、患者の臨床情報を基に、下顎後退症患者を取り巻く内的・外的要因の双方を解析する事とした。

3. 研究の方法

(1) モデル動物の作成ならびに解析

①PCR をはじめとした顎関節の退行性変化に起因した後天的に発症する下顎後退症については、エストロゲン等のホルモンと、下顎頭に加わる力学的負荷の影響がリスクファクターとして挙げられている。8 週齢雌性マウスにおいて卵巣摘出 (OVX) および片側咬合挙上 (iOVD) を行い、下顎頭に対する影響を検討することとした。解析には組織化学的解析、マイクロ CT 解析、リアルタイム PCR を用い、コントロール群、OVX 群、iOVD 群、OVX+iOVD 群の 4 群を比較した。

②成長発達段階における当該顎顔面領域におけるエピジェネティックな要因の影響を検討するため、ヒストンメチル化酵素の一つである Setdb1 を神経堤細胞由来細胞特異的にノックアウトしたマウス (Setdb1 cKO) を Cre/Loxp システムを用いて作成し解析を行った。解析には、経時的にメッケル軟骨の組織化学的解析を行い、リアルタイム PCR を用いて遺伝子発現解析を行った。また、Setdb1 cKO のメッケル軟骨および ATDC5 細胞において siRNA を用いて Setdb1 をノックダウンし、細胞増殖能を検討した。

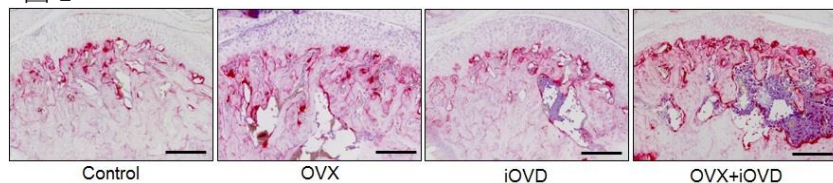
(2) 患者の臨床情報の解析

頭蓋顎顔面領域関連疾患リソースの整備のため、2009 年以降当分野に来院した下顎後退症患者において、セファロ分析値・顎関節症状・オーバージェット・オーバースト等々の臨床情報の蓄積ならびにデータベースの構築を行っている。このデータベースから、上顎前歯部歯槽骨切り術を適応した骨格性下顎後退症患者 (MR 群) を抽出し、セファロ分析値を用いた治療前後の硬軟組織形態の変化に関する評価を行った。

4. 研究成果

(1) ①我々は、OVX ならびに iOVD を行う事で後天性の下顎頭変形モデルマウス (OVX+iOVD) を作成した。OVX+iOVD マウスでは、トルイジンブルー染色ならびにサ

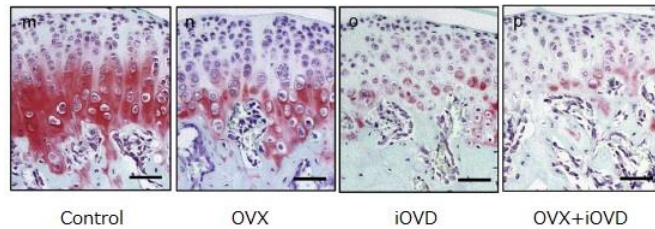
図 1



フラニン O 染色から、コントロールに比べ下顎頭における軟骨層の菲薄化が顕著であり (図 1)、変形性関節炎スコアは高い値を示した。また、OVX+iOVD マウスの下顎頭の軟骨下骨梁の減少、破骨細胞数 (図 2) ならびにアポトーシス細胞数の増加も認められた。リアルタイム PCR から炎症性サイトカイン (Il-1 α , Il-1 β , Tnf- α ならびに Il-6) の遺伝子発現レベルは高値であ

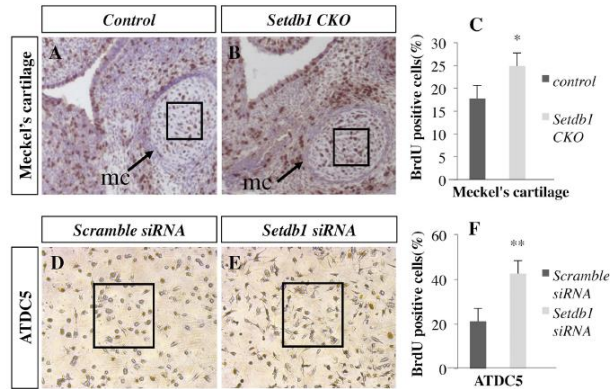
り、OVX+ioVD マウスは炎症性的下顎頭変形を呈する事が明らかとなった。さらに、蛍光免疫染色にて、エストロゲン受容体および ERK の発現量が亢進しており、OVX+ioVD マウス下顎頭における退行性変化は、ERK シグナルの促進を介して増悪した可能性が示唆された。以上の結果は、変形性顎関節症の発症機序に関する新たな知見として評価され、第 77 回日本矯正歯科学会において優秀発表賞を受賞し、国際学術雑誌に掲載された。

図 2



②Setdb1 cKO では全個体において小下顎ならびに口蓋裂を発現した。成長に伴い消失するメッケル軟骨の晩期残存を認め、前頭骨低形成ならびに歯胚形成過程異常を呈した。また、Setdb1 cKO のメッケル軟骨および siRNA を用いて Setdb1 をノックダウンした軟骨細胞株 ATDC5 は、ともに細胞増殖能の上方制御を示した (図 3)。また、Setdb1 cKO のメッケル軟骨において、SMAD1/5/8 依存性 BMP シグナルの亢進を認めた。以上の結果から、遺伝子発現のエピジェネティック制御因子である SETDB1 が顎顔面発生過程において、重要な役割を担う可能性が示唆された。以上の結果は、下顎骨の発生においてエピジェネティックな要因が必須であることを示す重要な知見であり、国際学術雑誌に掲載された。

図 3



(2) 上顎前歯部歯槽骨切り術を適応した骨格性下顎後退症患者 (MR 群) では非骨格性下顎後退症患者 (NMR 群) に比べ初診時に顎関節症状を有する患者が高頻度に認められた。また上顎前歯部歯槽骨切り術施行後、軟組織分析において MR 群は NMR 群と同等に口唇の突出感やオトガイの後退感が改善し、MR 群では上顎前歯の後方移動量と鼻下部、上唇部の後方移動量との間に正の相関が認められた。以上の事から初診時の硬組織形態の違いによって術後の軟組織の変化様相が異なることが示唆され、学術雑誌に掲載された。また当分野では受診患者のうち下顎後退症患者を抽出し、バイオリソース (血清ならびに DNA) および臨床情報の採得・データ蓄積を継続している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 23 件)

1. Wu Y, Kadota-Watanabe C, Ogawa T, Moriyama K. Combination of estrogen deficiency and excessive mechanical stress aggravates temporomandibular joint osteoarthritis in vivo. Archives of Oral Biology. 2019 ; 102: 39-46 . 査読有 . DOI: 10.1016/j.archoralbio.2019.03.012
2. Lin W, Izu Y, Smriti A, Kawasaki M, Pawaputanon C, Böttcher RT, Costell M, Moriyama K, Noda M, Ezura Y. Profilin1 is expressed in osteocytes and regulates cell shape and migration. Journal of Cellular Physiology. 2018;233(1):259-268 査読有. DOI: 10.1002/jcp.25872
3. Myat AB, Ogawa T, Kadota-Watanabe C, Moriyama K. Nuclear import of transcriptional corepressor BCOR occurs through interaction with karyopherin α expressed in human periodontal ligament. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2018 ; 507(1-4): 67-73. 査読有. DOI: 10.1016/j.bbrc.2018.10.158
4. Yahiro K, Higashihori N, Moriyama K. Histone methyltransferase Setdb1 is indispensable for Meckel's cartilage development. Biochemical and Biophysical Research Communications. 2017;482(4):883-888. 査読. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.11.128
5. Duarte C, Kobayashi Y, Morita J, Kawamoto T, Moriyama K. A preliminary investigation of the effect of relaxin on bone remodelling in suture expansion. The European Journal of Orthodontics. 2017;39(3):227-234. 査読有. DOI: 10.1093/ejo/cjw037
6. Shoji-Matsunaga A, Ono T, Hayashi M, Takayanagi H, Moriyama K, Nakashima T. Osteocyte regulation of orthodontic force-mediated tooth movement via RANKL expression. Scientific Reports. 2017 ; 7(1): 8753. 査読有. DOI: 10.1038/s41598-017-09326-7
7. Ogura K, Iimura T, Makino Y, Sugie-Oya A, Takakura A, Takao-Kawabata R, Ishizuyae T, Moriyama K, Yamaguchi A. Short-term intermittent administration of parathyroid

- hormone facilitates osteogenesis by different mechanisms in cancellous and cortical bone. *Bone Reports*. 2016 ; 5 : 7-14. 査読有. DOI: 10.1016/j.bonr.2016.01.002
8. Lin W, Ezura Y, Izu Y, Smriti A, Kawasaki M, Pawaputanon C, Moriyama K, Noda M. Profilin Expression Is Regulated by Bone Morphogenetic Protein (BMP) in Osteoblastic Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2016 ; 117(3) : 621-8. 査読有. DOI: 10.1002/jcb.25310
 9. Surapornsawas T, Ogawa T, Moriyama K. Identification of nuclear localization signals within the human BCOR protein. *FEBS Letters*. 2015 ; 589(21) : 3313-3320. 査読有. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.05.046
 10. Takada J, Miyamoto JJ, Yokota T, Ono T, Moriyama K. Comparison of the mandibular hinge axis in adult patients with facial asymmetry with and without posterior unilateral crossbite. *European Journal of Orthodontics*. 2015 ; 37(1) : 22-27. 査読有. DOI: 10.1093/ejo/cju009
 11. 三上智彦、福岡裕樹、東堀紀尚、川元龍夫、森山啓司. 上顎前歯部歯槽骨切り術を適応した骨格性下顎後退症患者の側貌軟組織変化. *日本顎変形症学会雑誌*. 2015 ; 25(1) : 17-31. 査読有. DOI:10.5927/jjdd.25.17
 12. Yokota M, Kobayashi Y, Morita J, Suzuki H, Hashimoto Y, Sasaki Y, Akiyoshi K, Moriyama K. Therapeutic effect of nanogel-based delivery of soluble FGFR2 with S252W mutation on craniosynostosis. *PLoS ONE*. 2014; 9(7):e101693. 査読有. DOI:10.1371/journal.pone.0101693
 13. Duarte C, Kobayashi Y, Kawamoto T, Moriyama K. RELAXIN enhances differentiation and matrix mineralization through Relaxin/insulin-like family peptide receptor 2 (Rxfp2) in MC3T3-E1 cells in vitro. *Bone*. 2014; 65:92-101. 査読有. DOI: 10.1016/j.bone.2014.05.005

[学会発表] (計 60 件)

1. Shoji-Matsunaga A, Ono T, Nakashima T, Moriyama K. Osteocyte-derived RANKL is a Key Regulator of Orthodontic Tooth Movement. 96th General Session & Exhibition of International Association for Dental Research. 2018
2. Wu Y, Kadota-Watanabe C, Ogawa T, Moriyama K. Combination of estrogen deficiency and excessive mechanical stress exacerbates TMJ-OA in mice. 第 77 回日本矯正歯科学会学術大会. 2018
3. Moriyama K. Early Treatment of Class II Malocclusion - Lessons Learned from our Clinical Experience. 2018 Taiwan International Orthodontic Forum. 2018
4. 森山啓司. 顎顔面先天異常患者に対する歯科矯正学的なアプローチ. 第 60 回中・四国矯正歯科学会大会. 2017
5. 東堀紀尚. 外科的矯正治療による顎顔面形態と機能の調和. 第 76 回日本矯正歯科学会学術大会. 2017
6. 八尋浩平、東堀紀尚、森山啓司. メッケル軟骨の発生過程に及ぼすヒストンメチル化酵素 Setdb1 の影響と BMP シグナルの関与. 第 76 回日本矯正歯科学会学術大会. 2017
7. Wu Y, Kadota-Watanabe C, Ogawa T, Moriyama K. Establishment of a Novel Murine Model of Temporomandibular Joint Osteoarthritis. The 30th Taiwan Association of Orthodontists Annual Meeting. 2017
8. 門田千穂. 骨量制御メカニズムにおける mRNA 分解促進因子 Cnot3 の機能解析. 第二回口腔医学科学フロンティア研究会. 2017
9. 八尋浩平、東堀紀尚、森山啓司. 顎顔面発生過程におけるヒストンメチル化酵素 Setdb1 の役割. 第 75 回日本矯正歯科学会大会. 2016
10. 小林起穂、森山啓司. 頭蓋縫合早期癒合症発症および頭蓋骨縫合部発生に関与する micro RNA の同定. 第 75 回日本矯正歯科学会大会. 2016
11. Lin W, Ezura Y, Izu Y, Moriyama K, Noda M. Role of Profilin1 in BMP-induced Activities in Skeletal Cells. 94th General Session & Exhibition of International Association for Dental Research. 2016
12. Moriyama K. Dental Equilibrium Revisited : Soft Tissue Considerations in Treatment of Dentofacial Deformity. The 10th Asia Pacific orthodontic Conference and 11th Annual Meeting of the Indonesian Association of Orthodontists. 2016
13. 林婉婷、伊豆弥生、江面陽一、森山啓司、野田政樹. Pfn1 の骨芽細胞分化における意義の検討. 第 33 回日本骨代謝学会学術集会. 2015
14. 東堀紀尚、劉世穎、八尋浩平、森山啓司. ヒストンメチル化酵素 Whsc1 はレチノイン酸による口蓋裂発症に関与する. 第 55 回日本先天異常学会. 2015
15. 小川卓也、スラポンサワッド タンヤポン、森山啓司. Oculofaciocardiodental syndrome における変異 BCOR の機能解析による核移行シグナルの同定. 第 60 回日本人類遺伝学会. 2015
16. Ogura K, Ishizuya T, Moriyama K, Yamaguchi A. PTH Facilitates Osteogenesis by Different Mechanisms between Cancellous- and Cortical-bones. 第 63 回国際歯科研究

- 学会日本部会. 2015
17. 八尋浩平、東堀紀尚、森山啓司. ヒストンメチル化酵素 SETDB1 が顎顔面発生過程に及ぼす影響. 第80回口腔病学会学術大会. 2015
 18. 東堀紀尚. 顎変形症治療における併発症の要因とその予防法～矯正歯科医の立場から～第25回日本顎変形症学会総会・学術大会. 2015
 19. Moriyama K. Treatment of surgical and non-surgical Class IIIs. Association of Orthodontists Singapore Congress (APOS). 2015
 20. Lin W, Ezura Y, Izu Y, Moriyama K., Noda M. Deletion of Pfn1 have an effect on bone formation. 第13回国際骨形態計測学会. 2015
 21. Watanabe C, Higashihori N., Hikita R, Matsumoto T, Ito Y, Kawamoto T, Moriyama K. Long-term observations after surgical orthodontic treatment for mandibular prognathism with facial asymmetry. 8th International Orthodontic Congress. 2015
 22. Matsumoto T, Higashihori N., Hikita R, Watanabe C, Miyamoto J, Kawamoto T, Suzuki S, Moriyama k. Three-dimensional analysis of lower lip movement during articulation in patients with mandibular prognathism by motion capture system. 8th International Orthodontic Congress. 2015
 23. Ogura K, Ishizuya T, Moriyama K., Yamaguchi A. Intermittent administration of parathyroid hormone facilitates osteogenesis by different mechanisms in cancellous and cortical bone. ASBMR Annual Meeting. 2015
 24. Takahashi Y, Higashihori N., Moriyama K. Correction of a high-angle class II malocclusion with condylar resorption using a skeletal anchorage system. 2015 APOS (Asian Pacific Orthodontic Society) Resident Forum. 2015
 25. Moriyama K. Consideration of soft tissue in treatment of case with dentoskeletal discrepancies. The 28th TAO annual meeting & 2015 APOS residents forum. 2015
 26. Ikeda M, Takada J, Miyamoto JJ, Moriyama K. Association between three-dimensional mandibular morphology and condylar movement in facial asymmetry subjects. 90th Congress of the European Orthodontic Society. 2014
 27. Moriyama K. Considerations on craniofacial anomalies from orthodontic and orthognathic viewpoints. 9th APOC and 20th MAOISCTE. 2014

〔図書〕(計2件)

1. 森山啓司 他、羊土社、骨ペディア (Bonepedia, 骨疾患・骨代謝キーワード事典)、2015、328
2. Kobayashi Y., Duarte C, Moriyama K. Discoveries and Applications, Biomarkers in Bone Disease. Part of the series Biomarkers in Disease: Methods, 2016, 329-353

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：小川 卓也
ローマ字氏名：(OGAWA, Takuya)
所属研究機関名：東京医科歯科大学
部局名：大学院医歯学総合研究科
職名：講師
研究者番号 (8桁)：50401360

研究分担者氏名：東堀 紀尚
ローマ字氏名：(HIGASHIHORI, Norihisa)
所属研究機関名：東京医科歯科大学
部局名：大学院医歯学総合研究科
職名：助教
研究者番号 (8桁)：50585221

研究分担者氏名：小林 起穂
ローマ字氏名：(KOBAYASHI, Yukiho)
所属研究機関名：東京医科歯科大学
部局名：大学院医歯学総合研究科
職名：助教
研究者番号 (8桁)：20596233

研究分担者氏名：稲澤 譲治
ローマ字氏名：(INAZAEA, Johji)
所属研究機関名：東京医科歯科大学
部局名：難治疾患研究所
職名：教授
研究者番号 (8桁)：30193551

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：門田 千穂
ローマ字氏名：(KADOTA-WATANABE, Chiho)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。