

令和元年6月3日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K17325

研究課題名(和文)食餌性状の違いがマウス下顎骨の形態を変化させるメカニズムの解析

研究課題名(英文)A Novel Method to Detect 3D Mandibular Changes Related to Soft-Diet Feeding

研究代表者

河野 加奈 (KONO, Kana)

岡山大学・医歯薬学総合研究科・助教

研究者番号：40780862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：食餌性状を変化させた実験モデルはこれまで広く用いられてきたが、この研究は2次元のレントゲン写真による側面図の線計測および角度測定に基づいており、3次元の変化を詳細に検出することは困難であった。そのため食餌性状の変化に関連した下顎骨の3次元変化を詳細に解析するために、マイクロCTを用いた下顎骨表面形態の3次元的な形態解析手法を新たに開発し、報告した(Frontiers in Physiologyにて報告)。これらの知見より、後天的因子に伴う咀嚼活性の違いが骨表面上の部位特異的応答にいかに関与し、マウス下顎骨の3次元的な成長にどのように影響するのかという定量的所見が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、環境要因がエピジェネティック制御に影響を与え、その結果、形態形成異常が生じるという全く新しい概念を提案するものである。その知識基盤が確立されれば、不正咬合患者の診断において、特定の遺伝子のエピジェネティック変異があるかどうかを調べることにより、成長予測や治療効果の予測が行えるようになるかもしれない。さらに薬剤の投与によってそれをコントロールすることができれば将来の矯正歯科治療における治療の一つのありかたに大きな変化をもたらすことができる。このように、本研究がもたらす研究結果は学術的意義が非常に高いと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Soft-diet feeding is a widely-used experimental model for studying the association between the skeletal morphology and muscle-related loading on the bone. Traditionally, these studies have been based on two-dimensional (2D) radiographs in the lateral view. However, 2D observation cannot detect three-dimensional (3D) changes in detail. Therefore, we have newly developed and reported a modified surface-based analysis using micro-3D computed tomography (CT) to examine and detect 3D changes of the mandible associated with soft diet feeding.

研究分野：歯科矯正学分野

キーワード：3D CT 軟食 マウス 下顎骨 形態変化 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

柔らかい食物を摂取するようになり、顎骨は小さくなったとされている。事実、萌出スペースの不足に伴う不正咬合の増加は、歯科疾患実態調査の結果からも明らかである。しかし食生活のような後天的因子が、このような短期間に顎態の変化をもたらすのだろうか？その科学的根拠は未だ乏しい。ところで、近年生活習慣や環境因子が後天的に遺伝子制御に影響を与えるエピジェネティックな制御システムが注目されている。すでに内分泌系では後天的なエピジェネティック制御によって組織が影響を受けることが明らかにされている (Ahrens et al., 2013)。そこで、形態決定に関わるメカニズムもエピジェネティック制御の影響を受けるのではないかと仮説を立てた。このような着眼点での研究は国内外問わず報告されていない。

2. 研究の目的

不正咬合の頻度は増加している(図1)。これは食生活の変化に伴い、咀嚼機能が低下した結果、顎骨がしだいに退化縮小したためであると考えられている。しかし、食生活の変化というような後天的因子がどのように顎骨の形態決定に関与するのであるか？

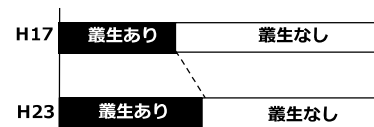


図1. 叢生の割合変化
(厚生労働省の歯科疾患実態調査より)

本研究の目的は、後天的因子に伴う咀嚼活性の違いが骨表面上の部位特異的応答にいかに影響し、マウス下顎骨の3次元的な成長にどのように影響するのかという定量的所見が明らかになるとともに、塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現の変化であるエピジェネティクスという概念に基づき、顎骨形態決定に関わる遺伝情報のエピジェネティックな制御システムを明らかにし、その下流に存在すると思われる顎骨形態形成の鍵になる遺伝子を同定する。さらに、同定された遺伝子の発現を調節する物質を投与することで、顎骨形態をコントロールしようという全く新しい矯正治療システムを実現させる基礎的知見を得ることである。

3. 研究の方法

(1) 動物

生後3週間で離乳させた16匹のICRマウスを無作為にグループに分け、9週齢まで対照(HD)群には通常の固形餌および水道水を与え、軟食(SD)群には同じ栄養価の粉末食を与え飼育した。(動物実験は、岡山大学の動物実験委員会(OKU-2014520)によって承認された研究プロトコルの下で行われた。)

(2) マイクロCT

SD群(n=9)のマウスおよびHD群(n=7)のマウスを屠殺し、生後9週齢で断頭し、頭部を4%パラホルムアルデヒド中で12時間固定した。マイクロCT画像は、Ratheta LCT-200 In Vivo Micro-CT Scanner (HITACHI-Aloka, Tokyo, Japan)を用いて、90 kVおよび110 mAで96 μmのスライス幅、および1-ボクセルサイズで撮影した。

(3) Segmentation

マイクロCTデータからの表面生成は、分析のためのオープンソースソフトウェアプラットフォームである3Dスライサー (version 4.5.0-1, <http://www.slicer.org>) (Kikinis and Pieper, 2011)を用いて行った。CTデータの可視化、下顎3Dモデルを取得するため、GrowCut

と呼ばれる領域成長アルゴリズムを使用してこのプラットフォーム上で半自動セグメンテーションを実行した。

(4) ランドマークの決定

下顎骨の形態を詳細に解析するために必要な 69 個のランドマーク (36 個のランドマークは以前の研究で既に定義されているものを用い (Kiliaridis et al., 1985; Odman et al., 2008; Boell and Tautz, 2011)、33 個のランドマークは本研究で新たに定義した。) を画像の目視検査によって同定し、HBM-Rugle (Medic Engineering Co, Kyoto, Japan) を使用してデジタル化した。

(5) Homogeneous modeling

各下顎モデルについて、各 3D 画像に割り当てられたランドマークに基づいて、HBM-Rugle を使用して高解像度テンプレートメッシュ (Brett et al., 2003) を適合させ、各モデルについてワイヤメッシュ上の 12,186 個の点 (すなわち、適合させたメッシュの節点) からなる均質モデルを自動的に生成した。ワイヤメッシュ上の対応する各点の座標値の算術平均を計算し、各群 (SD 群および HD 群) について平均化された 3D 下顎画像を生成するために使用した。

表面変位は、x 軸、y 軸、および z 軸において定量的に評価した。HD 群と SD 群との間の各メッシュ上の 12,186 点について、実際の変位および差の有意性を計算し、3D モデル上で色分けして視覚化した。その後、対応する各点の座標値の算術平均を、t 検定を用いて統計的に分析し、HD 群と SD 群との間の有意差を視覚化するために、x、y、および z 値の有意確率マップ (Duffy et al., 1981) を作成した。

4. 研究成果

本研究の最終的な目的は、食生活の変化というような後天的因子がどのように顎骨の形態決定に関与するのか? という、顎骨形態決定に関わる遺伝情報のエピジェネティックな制御システムを明らかにすることである。

頭蓋顔面形態は個体間で異なり、これは遺伝子と環境との間の相互作用によって調節される。軟食給餌による飼育モデルは、骨格形態と骨への筋肉関連負荷との関連を研究するために広く使用されている実験モデルである。しかし、これまでこれらの研究は、2次元 (2D) のレントゲン写真による側面図の線計測および角度測定に基づいていた。2D 観察は解剖学的構造の単純化に基づいており、3次元 (3D) 変化を詳細に検出することはできなかった。そのため本研究では、食生活の変化というような後天的因子に伴う咀嚼活性の違いが、骨表面上の部位特異的応答にいかに関与し、マウス下顎骨の3次元的な成長にどのように影響するのかという定量的所見が明らかにするために、マイクロCTを用いた改良表面分析を新たに開発し、報告した (Frontiers in Physiologyにて報告)。

生後 3 週齢のマウスに、9 週齢まで同成分で形状の異なる粉末食 (SD) または固形食 (HD) を与え飼育し、解剖学的構造画像を再構築するためにマイクロCT画像を9週齢で撮影した。形態学的表現型を直接視覚化するために、コンピュータで作成した平均的な下顎骨モデルとの重ね合わせを行なった (図2)。

結果、水平方向の変化として、左右の筋突起間の幅径が SD 群において有意に減少した。また、下顎頭の幅径も SD 群において有意に減少した。歯槽骨の幅径も SD 群において減少した。

垂直方向の変化は、3次元のうち最も顕著に観察された。有意な差を示す領域は下顎骨の下縁に広く分布しており、SD群において下顎骨の顕著な上方への変化が観察され、下顎枝高の明らかな減少が観察された。下顎骨の上方への変化は下顎角部で最も有意であったため、下顎下縁平面角が急峻となった。下顎頭では、上方への変化が、後方表面よりも前方表面でより顕著であったため、SD群においては、側面図において前方切痕の浅い顎頭となった。臼歯の垂直位置に関しては、平均変位は非常に小さく、0.05mm未満であったが、有意な上方向への変化、すなわち臼歯の挺出が観察された。

前後方向の変化としては、下顎角部と下顎枝の前方方向への有意な変位が観察された。これらの結果は、SD群ではHD群よりも下顎角部が前後方向に小さく、ゴニアルアングル（下顎角）はより大きいということを示唆していた。

これらの知見より、後天的因子に伴う咀嚼活性の違いが骨表面上の部位特異的の応答にいかん影響し、マウス下顎骨の3次元的な成長にどのように影響するのかという定量的所見が明らかとなった。

さらにH29年度、H30年度にわたり、後天的因子が上顎骨の形態形成に及ぼす影響を詳細に解析した（第76回日本矯正歯科学会学術大会、94rd European Orthodontic Society Congressにて発表）。今後、論文として報告予定である。

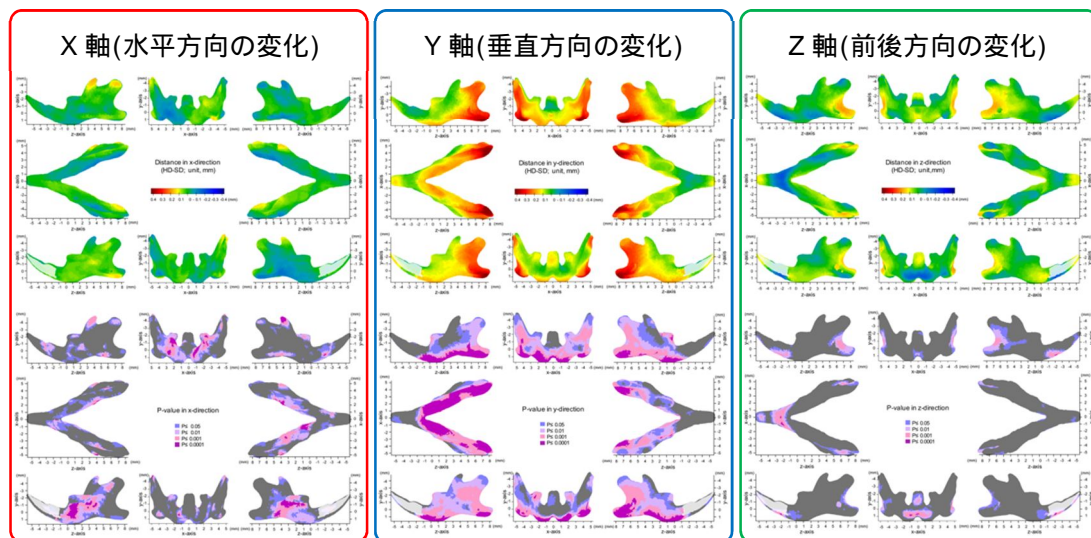


図2. 食餌性状の変化に伴う下顎骨の形態変化 (Frontiers in Physiology より)

また、軟食を与えたマウスと硬食を与えたマウスの咬筋のRNAを用いてマイクロアレイを行い、これらの刺激に应答する遺伝子の同定と、同遺伝子のクローニングならびにリコンビナントタンパク質の精製に成功している（図3）。これらの遺伝子群の発現領域は、7番染色体の特定領域に集中していることが分かったが（図4）、マウス遺伝子のこの部位の領域から転写されるmRNAの情報は未だ無く、そこからクローニングしてきた遺伝子は未知のものであった。また、同部のゲノムをクロマチン解析の手法の一つであるFAIRE法で解

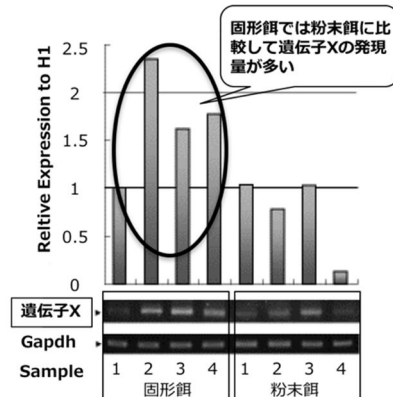


図3. 食餌性状の違いと遺伝子Xの発現量の関係(未発表データ)

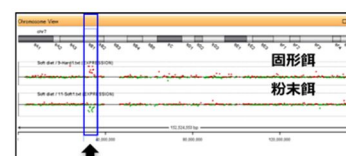


図4. 遺伝子Xの発現領域
食餌性状の違うサンプル間で7番染色体qB1領域(矢印)に着しい発現量の違いが見られた

析したところ、近接領域のゲノムがクロマチンから遊離していることが確認された。これはエピジェネティクスに特徴的な現象であるため (Robertson, 2005)、エピジェネティックなメカニズムで制御されている可能性は高いと考えられる。

上記遺伝子が咬筋の性質及び下顎骨の形態形成をコントロールしているのであれば、上記遺伝子のリコンビナントタンパク質の局所または全身投与によって、咬筋の性質及び下顎骨の形態形成を制御できるのではないかと考えられるため、今後も研究を継続し、顎骨形態決定に関わる遺伝情報のエピジェネティックな制御システムを明らかにしていく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 1 件)

Kono Kana, Tanikawa Chihiro, Kamioka Hiroshi, and Yamashiro Takashi: A novel method of detecting three-dimensional maxilla changes related to soft-diet feeding. *Front Physiol*, 8, 567, 2017. 査読有
DOI: 10.3389/fphys.2017.00567

〔学会発表〕 (計 3 件)

Kana Kono, Chihiro Tanikawa, Takeshi Yanagita, Hiroshi Kamioka, Takashi Yamashiro. A novel method of detecting three-dimensional maxilla changes related to soft-diet feeding. 94rd European Orthodontic Society Congress. 2018.

河野加奈、谷川千尋、柳田剛志、上岡寛、山城隆、食餌性状がマウス上顎骨の三次元形態に及ぼす影響、第 76 回日本矯正歯科学会学術大会、2017 年

河野加奈、谷川千尋、柳田剛志、上岡寛、山城隆、食餌性状がマウス下顎骨の三次元的形態変化に及ぼす影響、第 60 回中・四国矯正歯科学会大会、2017 年

〔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:

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：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：谷川 千尋、山城 隆、上岡 寛

ローマ字氏名：TANIKAWA Chihiro, YAMASHIRO Takashi, KAMIOKA Hiroshi

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。