

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K19227

研究課題名（和文）内軟骨性骨化に着目した顎変形症の病態解明および新規治療法の開発

研究課題名（英文）Elucidation of the pathology of jaw deformity and development of new treatment methods focusing on endochondral ossification

研究代表者

山中 茂樹 (Yamanaka, Shigeki)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：80637596

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：C型ナトリウム利尿ペプチド(CNP)は強力な内軟骨性骨化促進因子であることが証明されている。軟骨細胞特異的にCNPが抑制されたマウス（CNP-KOマウス）は野生型マウスと比較し、上顎骨や頭蓋底の矢状方向への劣成長を認めた。また、軟骨細胞特異的にCNPが促進されたマウスでは野生型マウスと比較し、上顎骨や頭蓋底の矢状方向への過成長を認めた。これにより、上顎の成長には内軟骨性骨化が重要であり、顎変形症の病態の一因となり得ることが明らかとなった。また、CNP-KOマウスと血液中のCNP濃度を上昇させたマウスとの交配により上顎の劣成長は改善し、CNPが顎変形症の新規治療法となり得ることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

顎変形症などの顎顔面形態に異常を来す疾患に対する治療は主に外科的手術による治療を行っているのが現状であり、より低侵襲な治療法の開発が必要であると考えた。そこで、顎顔面の成長における内軟骨性骨化の純粋な働きを明らかにすることにより、顎顔面の成長に起因する顎変形症などの顎顔面形態に異常を来す疾患の病態解明を出来ないかと考えた。顎顔面に特化した内軟骨性骨化の論文は非常に稀であり、今後の本領域の発展に大いに寄与すると考える。これにより、顎顔面の成長に起因する顎変形症などの顎顔面形態に異常を来す疾患の病態解明が可能となり、CNP投与を含めた新たな低侵襲性治療模索の礎となる。

研究成果の概要（英文）：C-type natriuretic peptide (CNP) has been shown to be a potent endochondral ossification promoter. Chondrocyte-specific CNP-suppressed mice (CNP-KO mice) showed inferior growth of the maxilla and skull base in the sagittal direction compared to wild-type mice. In addition, chondrocyte-specific CNP-enhanced mice exhibited sagittal overgrowth of the maxilla and skull base compared to wild-type mice. In other words, it was clarified that endochondral ossification is important for maxillary growth and may be a factor in the pathology of jaw deformity. In addition, mating of CNP-KO mice with mice with elevated CNP levels in the blood improved the undergrowth of the maxilla, suggesting that CNP could be a novel treatment for jaw deformity.

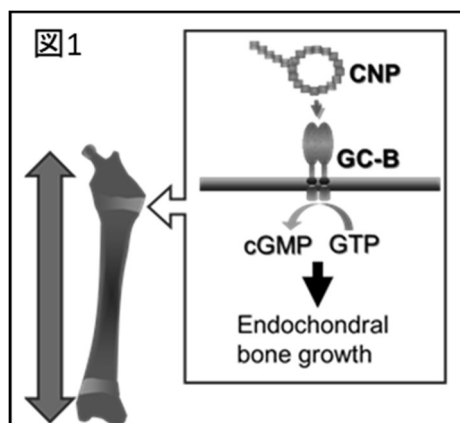
研究分野：歯科口腔外科

キーワード：顎変形症 内軟骨性骨化 C型ナトリウム利尿ペプチド CNP

## 1. 研究開始当初の背景

哺乳類の骨格は、膜性骨化または内軟骨性骨化によって形成される。前者では皮下の結合組織から直接骨化が起こるのに対し、後者では軟骨芽細胞が骨の原型となる軟骨原基を形成し、その後骨化が起こる (Lenton K et al. Genesis 2011)。大部分の哺乳類の骨は、内軟骨性骨化によって形成されるが、頭蓋骨格は膜性骨化または内軟骨性骨化の両方を介して形成される (Takigawa M et al. J Dent Res 1984, Takano T et al. J Dent Res 1987)。

CNP は、ナトリウム利尿ペプチドファミリーのメンバーの 1 つである (Nakao K et al. J Hypertens 1992)。成長板における細胞内 cGMP 産生を上昇させることによって膜性グアニリルシクラーゼ受容体、グアニリルシクラーゼ-B (GC-B) のサブタイプを介して生物学的作用を發揮し長軸方向に成長する (図 1) (Suga S et al. Endocrinology 1992)。CNP/GC-B システムは、内軟骨性骨化の強力な刺激物質であり、CNP および GC-B の両方が、長骨および椎骨の骨端線 (Chusho H et al. Proc Natl Acad Sci USA 2001) において発現される。CNP または GC-B が欠失したマウスでは、長骨および脊椎の劣成長を示し (Tamura N et al. Proc Natl Acad Sci USA 2004)、対照的に成長板軟骨における CNP が過剰発現したマウスでは、顕著な骨の過成長を示す (Yasoda A et al. Nat Med 2004)。これまで、頭蓋顔面骨格の成長における内軟骨性骨化の影響はまだ十分に解明されていない。



これまでの内軟骨性骨化による顎顔面の成長のメカニズムの報告では、ウサギの鼻中隔軟骨を除去すると、中顔面の成長が相当レベルに阻害される (BG Sarmat et al. Factors affecting growth of the midface 1976) ことなど、外科的侵襲を行った実験からの報告が根拠となることが多い。しかし、このような実験では軟骨の喪失によってではなく、外科的侵襲自体やそれに伴う侵襲部への血液供給が障害されたことなどによって、成長変化が影響を受けたとも考えられ、成長に対する影響のすべてが軟骨の除去によってもたらされたと結論づけることは困難である。顎変形症などの顎顔面形態に異常を来す疾患に対する治療は、主に外科的手術による上下顎の移動を行っているのが現状であり、低侵襲性治療の開発が期待される。しかし、顎顔面の成長における骨化の働きは明らかになっておらず、顎顔面形態に異常を来す疾患の病態についての報告は殆どない。

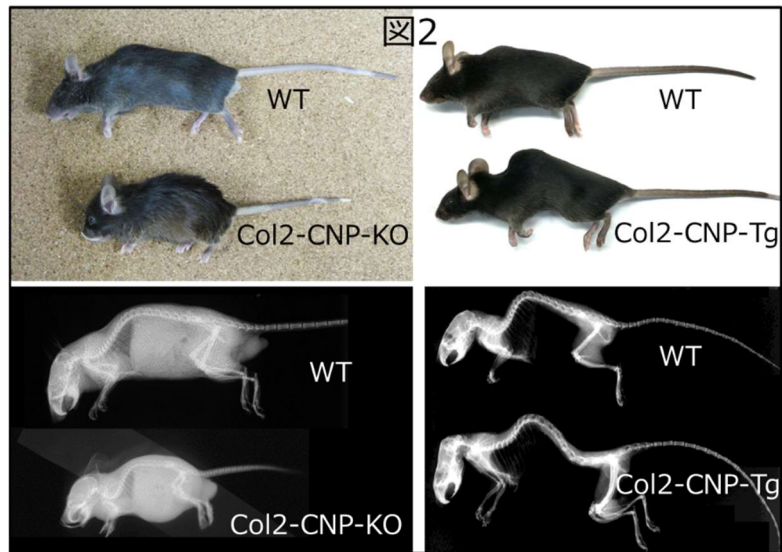
## 2. 研究の目的

本研究では、頭蓋顔面骨格形成における内軟骨性骨化の純粋な影響を明らかにし、顎変形症などの顎顔面形態に異常を来す疾患の病態解明を行う。そして、顔面形態異常に対する骨形成について明らかにし、新たな顎変形症の診断法や CNP を用いた治療の確立に寄与することを目的とする。

これまでの内軟骨性骨化による顎顔面の成長のメカニズムの報告では、外科的侵襲を行った実験からの報告が根拠となることが多い (BG Sarmat et al. Factors affecting growth of the midface 1976)。しかし、このような実験では外科的侵襲自体やそれに伴う侵襲部への血液供給が障害されたことなどによって、成長変化が影響を受けた可能性が否定できず、成長に対する影響のすべてが軟骨の除去によってもたらされたと結論づけることは困難である。

そこで、申請者らは強力な内軟骨性骨化の促進因子である CNP に着目し、**内軟骨性骨化の抑制された Co12-CNP-KO マウスと内軟骨性骨化が促進された Co12-CNP-Tg マウス** (図 2) を比較検討

することにより、外科的侵襲を伴わない、顎顔面の成長における**内軟骨性骨化の純粋な影響**を明らかにし、顎顔面形態に異常を来す疾患の病態解明を行った。本研究では、軟骨特異的に内軟骨性骨化を欠失させたマウスと軟骨特異的に内軟骨性骨化を過剰発現させたマウスを使用することにより、外科的な侵襲など他の要因に影響されることなく、頭蓋顔面骨格形成における



**内軟骨性骨化の純粋な影響**を明らかとすることが出来る。また、軟骨特異的に内軟骨性骨化を欠失させたマウスと血中 CNP 濃度が上昇するトランスジェニックマウス (Sap-CNP-Tg マウス) の交配により、CNP 投与により上顎の劣成長が改善することが出来るのかを明らかにし、顎変形症への治療に対する CNP の臨床応用の可能性を探る

### 3. 研究の方法

それぞれのマウスにおける顎顔面形態を解析し、野生型と比較することにより、顎顔面の成長における内軟骨性骨化の純粋な影響を形態学および組織学的に明らかにしていく。以下に具体的な方法を示す。

#### ① 実験動物：

実験動物として、当科にて作成した Col2-cre マウスと flox マウスを交配させ軟骨細胞特異的に CNP を欠失させた Col2-CNP-KO マウスと、軟骨細胞特異的に CNP を過剰発現させた Col2-CNP-Tg マウスを使用する。また、CNP 静脈注射モデルとして、生下時より肝臓で CNP を過剰発現し、血中 CNP 濃度が上昇するトランスジェニックマウス (Sap-CNP-Tg マウス) を使用する。

#### ② 組織学的検討：

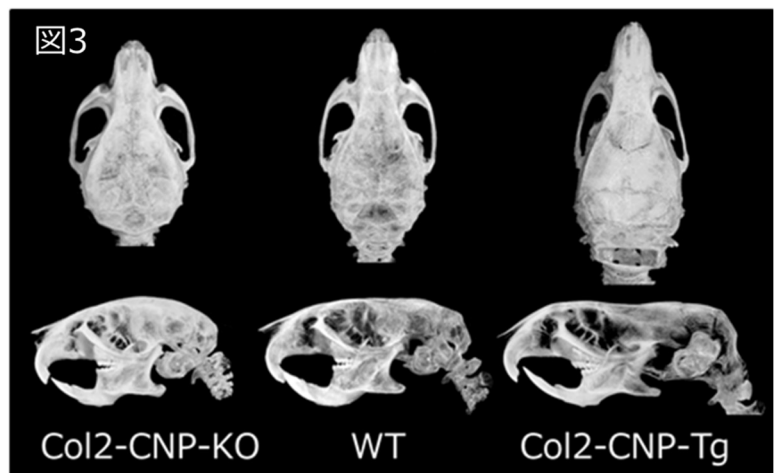
組織は厚さ 5  $\mu$ m に薄切し、組織学的、免疫組織学的観察を行う。

#### ③ マイクロCT画像：

マウスの頭蓋骨を、マイクロコンピュータ断層撮影機を用いて撮影し、TRI/3D-BON を用いて三次元データ処理することにより、三次元画像再構成を行う (図 3)。

#### ④ 形態学的検討：

$\mu$ CT データの解析は Richtsmeier らによって報告された計測点を用い、6 つの距離計測項目を設定し計測を行う。

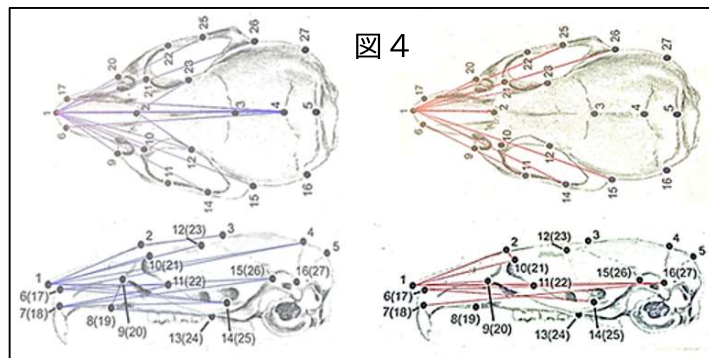


また、Arron らによって報告された頭蓋骨上に 27 個の計測点および下顎骨上に 22 個の計測点を用い、これらの計測点の平均三次元座標を使用する EDMA 法 (Euclidean distance matrix

analysis) を用い、計測を行う。結果は平均±SEM で示し、測定値について一元配置法による分散分析を行い、最小有意差法にて危険率 5%における有意差を検定する。また、EDMA 法の検定にはノンパラメトリック検定を実施する。

#### 4. 研究成果

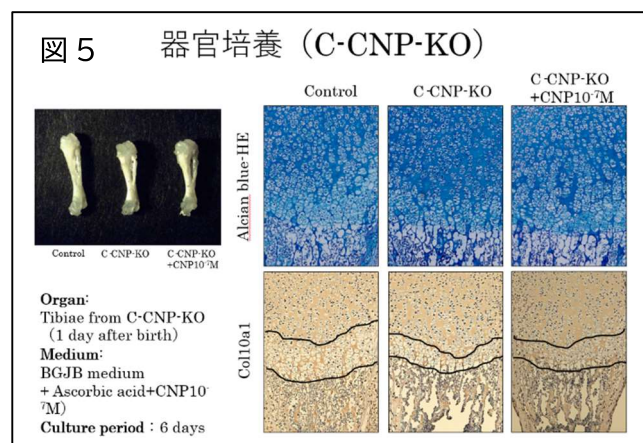
(1), 12 週齢の頭蓋骨の  $\mu$ CT 撮影を行い、 $\mu$ CT データの解析は上顎 27 ヶ所の計測点を  $\mu$ CT 上でとり、それぞれの直線距離を計測し比較をした (EDMA 法)。すると、12 週齢の  $Col2-CNP-KO$  マウスでは鼻骨、上顎骨を中心に矢状方向に劣成長を認めた。そ



れに対し、12 週齢の  $Col2-CNP-Tg$  マウスでは鼻骨、上顎骨を中心に矢状方向に過成長を認めた (図 4)。

(2), 中顔面の成長には、頭蓋底における蝶形骨間軟骨結合部 (ISS) と蝶後頭軟骨結合部 (SOS) の内軟骨性骨化による成長が重要とされている。 $Col2-CNP-KO$  マウスと野生型マウスを比較し SOS での組織学的解析を行った。組織学的解析では、野生型マウスと比較し、 $Col2-CNP-KO$  マウスの SOS の厚みの減少を認めた。次に  $Col2-CNP-Tg$  マウスと野生型マウスを比較し ISS および SOS での組織学的解析を行った。組織学的解析では、野生型マウスと比較し、 $Col2-CNP-Tg$  マウスの SOS の厚みの増加を認めた。

(3),  $Col2-CNP-KO$  マウスに認められた顎顔面骨の形態異常に対し、血中濃度上昇型  $CNP$  トランスジェニックマウスとの交配によるレスキュー実験を行ったところ、 $CNP$  の血中濃度上昇により上顎の劣成長は有意に改善した。また、 $Col2-CNP-KO$  マウスより採取した脛骨の器官培養を行い、 $CNP$  の添加実験を行った。すると、 $Col2-CNP-KO$  マウス由来の軟骨細胞は内軟骨性骨化抑制を認め



たが、 $CNP$  添加により軟骨細胞の肥大化および軟骨基質産生の増大を認めた (図 5)。

(4), 上顎の劣成長は内軟骨性骨化の抑制が一因となり得ることが明らかとなり、 $CNP$  が顎変形症の新規治療法となり得ることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 柏木まりな, 中尾一祐, 山中茂樹, 別所和久
2. 発表標題 C型ナトリウム利尿ペプチドの中顔面の成長促進作用の検討
3. 学会等名 日本口腔外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柏木まりな, 中尾一祐, 山中茂樹, 別所和久
2. 発表標題 ムコ多糖症モデルマウスを用いた顎顔面形態異常のメカニズムについての検討
3. 学会等名 日本口腔科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山中茂樹, 中尾一祐, 柏木まりな, 小山典昭, 別所和久
2. 発表標題 内軟骨性骨化の顎変形症に対する影響について
3. 学会等名 第29回 日本顎変形症学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中茂樹, 中尾一祐, 小山典昭, 柏木まりな, 別所和久
2. 発表標題 ニコチンが内軟骨性骨化に与える影響
3. 学会等名 第37回 日本骨代謝学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山中茂樹、中尾一祐、小山典昭、柏木まりな、別所和久
2. 発表標題 軟骨無形成症の顎顔面形態異常に対する新規治療法の検討 第二報
3. 学会等名 第64回 日本口腔外科学会総会・学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 中尾一祐 山中茂樹 八十田明宏 中尾一和 別所和久	4. 発行年 2021年
2. 出版社 科学評論社	5. 総ページ数 9
3. 書名 循環器内科 第89巻 第4号	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------