

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 4 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K10120

研究課題名（和文）エピジェネティクスに着眼した顎変形症の発症機構解明：新規治療戦略への展開

研究課題名（英文）Investigation for pathogenesis of jaw deformity focusing on epigenetics: application to new therapeutic strategies

研究代表者

山田 朋弘（YAMADA, Tomohiro）

九州大学・歯学研究院・共同研究員

研究者番号：60335619

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：下顎非対称を伴う下顎前突症患者27例と対照群として11例のCT画像から咬筋の厚さと断面積を解析したところ、患者群の咬筋の厚みと断面積に左右差はなかったが、患者群は対照群より厚みは薄かった。したがって、筋の形態的なボリュームに関しては左右差よりも下顎前突等のskeletal分類が大きく寄与していることが考えられた。

2022年度から2023年度は患者群18名、対照群5名につき咬筋DNAのメチル化について検討を行った。その結果、患者群はコントロール群と比較し約150%のメチル化DNAが検出された。このことから、顎変形症の発症機構にはエピジェネティックな制御機構が関与してい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

われわれは咀嚼筋の機能異常に起因する下顎骨の変形が多くの顎変形症の主因となっている症例が多いとの仮説をたてた。筋の性状を決定する要因としては、遺伝的素因と環境的素因が考えられる。そこで本研究では環境・遺伝子相互作用に関連するエピジェネティックな制御機構に着目した。本研究の結果、顎変形症患者の咬筋特性に対するエピジェネティックな制御機構が明らかになれば、筋のエクササイズなどの機能訓練、速筋化を促進するクレンジンや脱メチル化剤などの薬物療法、脱メチル化作用をもつ食品などによる食事療法など、保存的治療法や予防的先行医療に応用できる可能性が期待できる。

研究成果の概要（英文）：When the thickness and cross-sectional area of the masseter muscle were analyzed from CT images of 27 patients with mandibular prognathism with mandibular asymmetry and 11 patients as a control group, there was no difference in the thickness and cross-sectional area of the masseter muscle in the patient group from left to right, but the patient group had a thinner thickness than the control group. Therefore, it was considered that skeletal classification such as mandibular protrusion contributed more to the morphological volume of the muscles than the left-right difference. From FY2022 to FY2023, methylation of masseter muscle DNA was examined in 18 patients and 5 controls. As a result, approximately 150% more methylated DNA was detected in the patient group than in the control group. This suggests that epigenetic control mechanisms are involved in the pathogenesis of jaw deformities.

研究分野：口腔外科学

キーワード：顎変形症 下顎骨 咀嚼筋 エピジェネティクス メチル化

1. 研究開始当初の背景

われわれの施設では顎変形症のチーム医療が行われているが、その治療体系には原因療法はなく、起こってしまった変形に対して、骨を移動させ形態を修復させる対症的な治療が中心である。顎変形症の手術は様々な改良が加えられ安全性や安定性が向上する一方、より良い結果を求めて上下顎骨切り術の適応症例は増加している。しかし、これら顎変形症の手術は比較的侵襲が大きく、治療期間も長いため患者の負担は相当に大きい。従って、より保存的、あるいは低侵襲な治療法の開発が望まれるが、そのためには発症機序を解明する必要がある。口唇口蓋裂などの劣奇形を伴わない顔面非対称患者のほとんどは下顎非対称を伴い、上顎骨には表情筋以外の筋付着がないことから、われわれは咀嚼筋が下顎骨に及ぼす影響にまず着目した。そこで、咀嚼筋の機能異常に起因する下顎骨の変形が多くの顎変形症の主因となっている症例が多いとの仮説をたて、申請者らは、2015年より九州大学臨床研究倫理審査委員会の承認(顎変形症における咀嚼筋の分子病理学的検討; 許可番号 29-583)を得た上で、臨床検体を用いた検証を行ってきた(基盤研究(C), 下顎非対称患者における咀嚼筋の分子病理学的検討)。術中に得られた臨床検体(咬筋組織)の分子病理学的解析から、下顎非対称患者の咬筋性状は偏位側や skeletal 分類によって異なる傾向が認められ、偏位側の咬筋では type II 線維が多く short face に近い特徴を有することが明らかとなった。

筋の性状を決定する要因としては、遺伝的素因と環境的素因が考えられる。顎変形症の特徴として、思春期から成人期にかけての発症例が多いこと、一卵性双生児での不完全な病態の一致がみられること、浸透率は高くないものの家系的遺伝がみられることから、顎変形症は遺伝的および環境的因子の相互作用からなる多因子疾患と考えられる。そこで本研究では環境・遺伝子相互作用に関連するエピジェネティックな制御機構に着目した。すなわち、顎変形症の主因の一つに咀嚼筋の機能異常があり、特に成長に伴うエピジェネティックな変化の影響が大きいとの仮説をたてるに至った。

2. 研究の目的

本研究はこれまで不明であった顎変形症の発症メカニズムを、咀嚼筋の物理的、生物化学的特性を切り口として明らかにしようとするものであり、特にエピジェネティックな制御機構に着目している。

顎変形症の治療法は、スプレッターや超音波切削器等の器具の改良もあり、日進月歩で改良されている。また、インプラントアンカーの登場で矯正治療での歯の移動方向や移動量の自由度が増し、上顎多分割等の複雑な手術の必要性が少なくなり、手術が単純化できるようになってきた。しかし、その一方で発症機序が不明であるため予防法がなく、成長期に顎変形の兆候がみられても成長観察にとどめ、成長完了後に手術を行うのが一般的である。この時点で顎形態の予測因子が分かれば早期の治療介入ができ、顎変形症の発症あるいは増悪を予防することが可能となる。本研究の目的は顎変形症患者の筋特性を制御している因子を明らかにすることであり、これは顎変形症の発症機序の解明への必須条件である。

顎変形症と咀嚼筋性状との関連を検討する研究は米国のチームで小規模に行われている例はあるが、対象症例が少なく未だエビデンスのあるデータが得られているとは言い難い。しかも主に Caucasian 系の人種を対象としているため、遺伝的背景の異なる東洋人には、その知見はあてはまらない可能性がある。国内では類似の研究はほとんど行われていないが、形成的側面の大きな顎変形症手術において筋組織を生検し分子生物学的・病理学的な検討を行う事は、多人種への波及効果も含め、今後の新たな機能的・保存的な治療戦略を創造していく上での基盤的データとなることが期待される。

3. 研究の方法

1. 顎変形の conventional な評価と症型分類

正面および側面セファログラムで conventional な顎変形症の診断・評価を行い、顎変形 type を垂直的 (short, average, long face) 及び水平的 (class I, II, III) かつ非対称例と対称例に分けて分類した。

3. CTでの筋および骨形態の解析

画像処理ソフトウェア Mimics 16.0 (マテリアライズジャパン) で各咀嚼筋および下顎骨の断面積および体積等を算出した。

4. 咬筋凍結試料の解析

当科にて顎矯正手術を施行した 18 名および対照群 5 名を対象とした。外科矯正手術時に、咬筋前縁から約 0.5 cm³ の筋組織を採取し、採取した筋組織は直ちに -81 の超低温冷凍室にて凍結保存した。対照群は術野に咬筋が露出すると思われた下顎骨骨折や顎骨嚢胞性病変などの症例とした。全ての咬筋採取は、術前に患者への説明とそれに対する同意の下で行われた。なお、本研究は、九州大学臨床研究倫理委員会の承認の下で行った (許可番号 2020 - 720)。

凍結保存された咬筋検体はそれぞれ QIAamp DNA Blood mini kit (QIAGEN) を用いてゲノム DNA

を抽出した。その上で Methylflash Global DNA methylation (5-mc) ELISA Easy kit (EPIGENTEK) を使用し、ELISA 法 (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) によるメチル化の定量的解析を行った。

筋の一部は組織学的解析に供し、type 1 (遅筋) 線維と type 2 (速筋) 線維の免疫組織学的検討を行った。

4. 研究成果

1. 咬筋の形状と下顎骨形態との関連

下顎非対称を伴う骨格性下顎前突症患者の偏位側と非偏位側の咬筋の形態的特徴を対照群と比較した。偏位側と非偏位側と対照群の咬筋の厚み、横断面積を比較したところ、偏位側と非偏位側間では厚みに有意差が認められなかったが、偏位側と非偏位側はともに対照群より低い値を示した (図 1)。咬筋の横断面積でも同様の結果が得られた (図 2、図 3)。

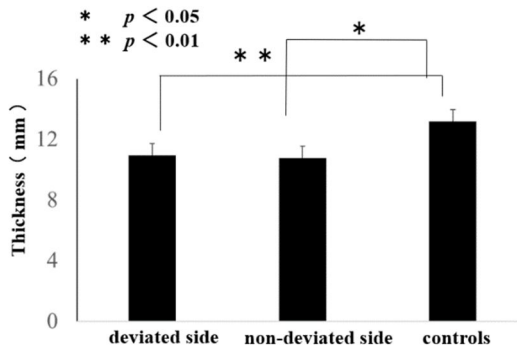


図 1 咬筋の厚みと顎変形

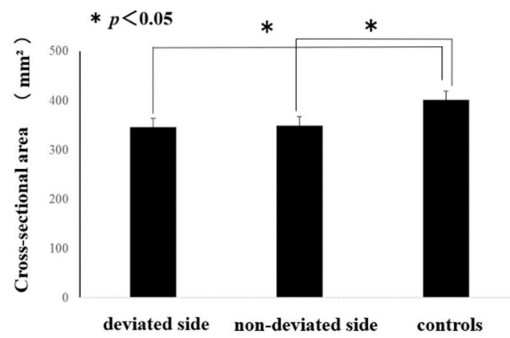


図 2 咬筋の断面積と顎変形

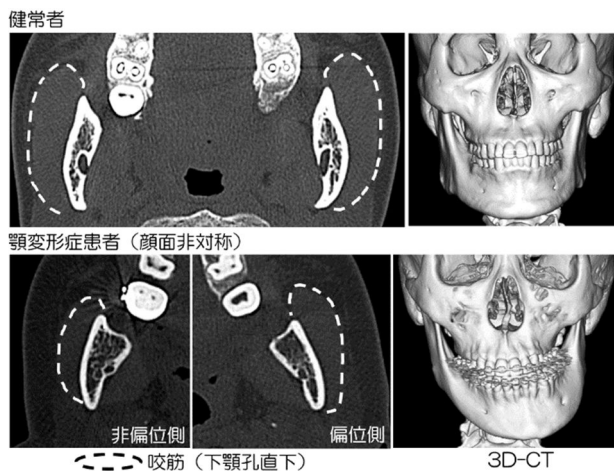


図 3. 顎変形症 (非対称症例) における骨変形と咬筋形態

顎変形症患者では咬筋の萎縮がみられる (特に非偏位側)。

2. 顎変形症患者咬筋の筋線維

偏位側と非偏位側の咬筋線維の性状を明らかにすることを目的に、術中に採取した咬筋の検体を用いて抗 MyHC 1 抗体と抗 MyHC 2X 抗体 (本学農学部より提供) を用いて type 1 (遅筋) 線維と type 2 (速筋) 線維の免疫組織学的検討を行った。蛍光顕微鏡 (BZ-800) を用いて観察を行い、画像解析ソフト BZ-X Analyzer (KEYENCE) で type 1、type 2 線維の数、断面積、線維の直径を測定、検討した。type 1 線維は赤、type 2 線維は緑にそれぞれ標識される。骨格性下顎前突症患者では type 2 線維が少なく、断面積が小さくなっている傾向が認められたが、個体差が大きく type I 優位型や type II 優位型などの様々なバリエーションがあった。

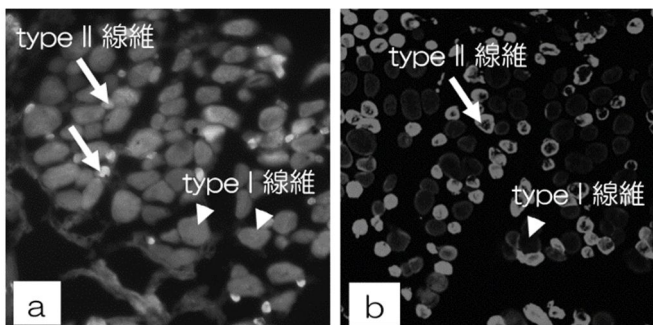


図 4 MyHC による咬筋の筋線維 typing

a: type I (遅筋) 優位型, b: type II (速筋) 優位型
バリエーションが多いものの、long face 患者では type II 線維が多いとされている。

3. 顎変形症患者咬筋のメチル化

対照群に比較し、顎変形症患者群では明らかにメチル化の程度が亢進していた（150%程度、図5）

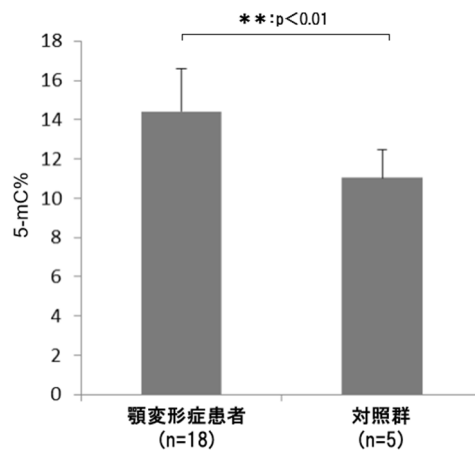


図5 顎変形症患者の咬筋メチル化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Al Bougha S, Nakano H, Yasuda K, Suzuki K, Yamada T, Takahashi I, Ueno T, Mori Y.	4. 巻 34
2. 論文標題 Three-Dimensional Geometric Morphometry of Facial Soft Tissue Changes After Bilateral Sagittal Split Ramus Osteotomy.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Craniofac Surg.	6. 最初と最後の頁 e92-e97
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Suzuki A, Sugiyama G, Kumamaru W, Yamada T, Mori Y.	4. 巻 34
2. 論文標題 Regulation of NF- κ B signalling through the PR55 -RelA interaction in osteoblasts.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 601-608
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2485/jhtb.30.221	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakashima A, Yamada T, Sugiyama G, Mizunoya W, Nakano H, Yasuda K, Takahashi I, Mori Y.	4. 巻 29
2. 論文標題 Masseter muscle properties differ between the left and right sides in mandibular Class III patients with asymmetry.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Hard Tissue Biol.	6. 最初と最後の頁 25-30
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2485/jhtb.29.25	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Yamada T, Anantanarayanan P, Mori Y
2. 発表標題 Presurgical simulation in oral and maxillofacial surgery, risk management and prediction of appearance.
3. 学会等名 14th World Congress of The Cleft Lip and Palate Foundation（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田 朋弘, 藤永 貴大, 今城 育美, 杉山 悟郎, 長野 公喜, 澁谷 南, 吉濱 直哉, 田尻 姿穂, 澁澤 伸英, 吉濱 るみ, 森信 美紀, 大山 順子, 森 悦秀, 高橋 一郎
2. 発表標題 顎矯正手術後の咬合異常に対し外科的介入を要した症例の検討
3. 学会等名 第33回日本顎変形症学会総会・学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 忽那 重彦, 矢内 雄太, 安田 光佑, 藤永 貴大, 杉山 悟郎, 石井 広太郎, 山田 朋弘, 森 悦秀
2. 発表標題 当科における咀嚼筋腱・腱膜過形成症8症例の臨床的検討
3. 学会等名 第75回日本口腔科学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田朋弘、中島 梓、杉山悟郎、安田、光佑、Safieh Al Bougha、石井広太郎、高橋一郎、森 悦秀
2. 発表標題 下顎非対称を伴う骨格性下顎前突症患者における咬筋特性に関する研究
3. 学会等名 第30回日本顎変形症学会総会・学術大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	森 悦秀 (Mori Yoshihide) (00231639)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	杉山 悟郎 (Sugiyama Goro) (00722828)	九州大学・歯学研究院・助教 (17102)	
研究分担者	山本 健 (Yamamoto Ken) (60274528)	久留米大学・医学部・教授 (37104)	
研究分担者	高橋 一郎 (Takahashi Ichiro) (70241643)	九州大学・歯学研究院・教授 (17102)	

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