

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月10日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22659375

研究課題名（和文） 不正咬合の分子機構を探る新たなパラダイム—エピジェネティクス

研究課題名（英文） The new paradigm to search the bioscientific mechanism of malocclusion

研究代表者

山城 隆 (YAMASHIRO TAKASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：70294428

研究成果の概要(和文):初年度は不正咬合モデルマウスの作成にあたった。硬い固形食の餌と、食餌時に力が要らない粉末食をそれぞれマウスに与えて飼育し続けた。これらの食生活の変化のみによって本当に顎骨の形態に影響を及ぼすのかを次年度に解析を行った。その結果、CTの矯正学的手法を用いた形態解析によって明らかな差異を見出すことができた。現在それぞれのモデルマウスから採取したサンプルを用いた遺伝子の発現解析を行っており、分子メカニズムの解明に迫る予定である。

研究成果の概要(英文): In first year of this program, we intended to make a model mouse of malocclusion with feeding different food in hardness. In one side, mice were fed hard solid food, and in the other side, mice were fed powdery food. These mice were grown in same condition for 8weeks, then we analyzed the head of these mice with orthodontic analyze method. In this result, we found out clear difference between two groups. Now we are looking for the bioscientific mechanism of making such a difference.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	0	1,500,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	2,800,000	390,000	3,190,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・矯正・小児系歯学

キーワード：不正咬合、エピジェネティクス、分子機構、実験的歯の移動モデル

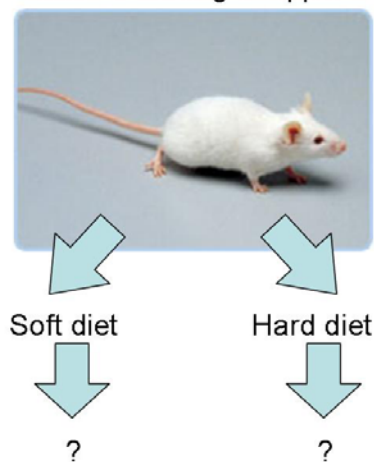
## 1. 研究開始当初の背景

近年、日本人は柔らかい食物を摂取するようになり、顎や顔全体が小さくなったと

いわれている。不正咬合の増加は、歯科疾患実態調査からも裏付けられている。食生活のような後天的因子が、どのようにして顎態の変化をもたらすのであろうか？この分子機構はこれまで解明されたことがなかった。申請者らはこれまで、DNA 配列が決定する先天的因子が、顎・顔面の形態形成を制御する分子機構の解明に努め、成果を挙げてきた。しかし、これまでの考え方や手法では、食生活などの後天的因子が顎態を縮小化させる分子機構を説明することは困難であった。一方、喫煙や化学物質、胎児の栄養状態などの環境要因が、クロマチンへの後天的な修飾によって、DNA の塩基配列を変化させることなく、遺伝子発現を選択的に活性化・不活性化させる後天的な制御（エピジェネティクス制御）に注目が集まっている。

これらの事柄から、顎口腔の機能の問題が形態に影響を及ぼす機序として、エピジェネティック変異が環境的要因によって生じ、DNA の内容そのものではなく、DNA の読み書きに影響が生じるという着想に至った。

Wether skeletal change happen or not?



## 2. 研究の目的

不正咬合の頻度は歴史的に見て増加している。咀嚼機能が低下し、顎骨がしだいに退化

縮小した結果であると考えられている。しかし、環境因子である咀嚼機能がどのように顎骨の形態の決定に関与するのであろうか？本研究の目的はエピジェネティクスという新たな概念を導入し、不正咬合の原因の分子機構を探る新たな基盤を確立することである。

## 3. 研究の方法

### 1. 実験的不正咬合モデルマウスの確立

硬さの異なる 2 種類の食餌にてそれぞれ飼育したマウスの形態的な解析を行う。マウスの飼育は、出生後から 8 週まで行った後、顎骨の大きさ、形の計測を行う。さらに、それぞれ硬さの異なる食餌にて飼育されたマウスを継代し、2 代目、3 代目のサンプルも比較を行う。



2. 顎骨の後天的形態形成に関わる、メチル化サイレンシングを受けた DNA の網羅的探索  
それぞれのマウスの顎骨から採取したゲノ

ムサンプルを用いて、網羅的なメチル化のスクリーニング検査を行う。これによってメチル化に差が生じている DNA を抽出する。スクリーニング検査には MIAMI 法を用いる。抽出後はより感度の高いバイサルシークエンシング法によって、メチル化を受けたプロモーター領域を特定する。

3. 同定した遺伝子の発現様態と機能の解析  
メチル化を受けた DNA が実際にサイレンシングを受けているかどうかを調べる。組織から抽出した RNA サンプルを用いて定量的 RT-PCR を行い、それぞれのサンプル間で、抽出した遺伝子の転写に影響が生じているかどうかを確認する。組織染色によって抽出した遺伝子の発現分布の調査、ウェスタンブロッティング法によるタンパク発現への影響も調査する。

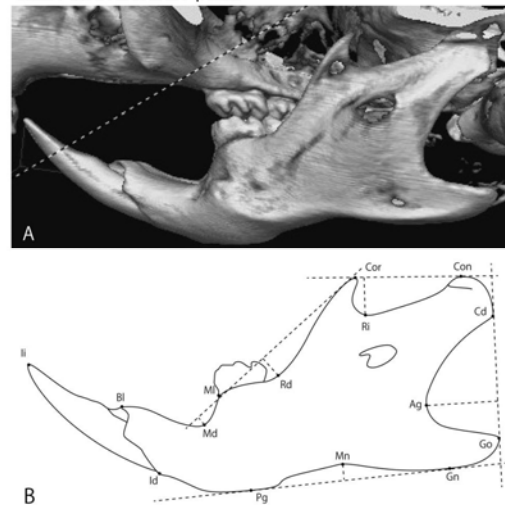
#### 4. 研究成果

近年、不正咬合患者が増加していることが報告されている。特に、やわらかい食事によって、顎骨がしだいに退化縮小したことがその一因であると考えられるようになっている。しかし、環境因子である咀嚼機能がどのように顎骨の形態の決定に関与するのであるか？本研究の目的はエピジェネティクスという新たな概念を導入し、不正咬合の原因の分子機構を探る新たな基盤を確立することである。本研究では、環境要因が、クロマチンへの後天的な修飾によって、DNA の塩基配列を変化させることなく、遺伝子発現を選択的に活性化・不活性化させる後天的な制御（エピジェネティクス制御）に注目した。

本年度は、まず実験的不正咬合モデルマウスの確立がなされた。硬い食餌と柔らかい食餌のどちらかを与え続けることにより、ラットにおいて下顎骨の形状に違いが生じること

がすでに報告されている。そこで、実験モデルを確立するために、ラットと同様の条件でマウスの飼育を行い、一方には十分に乾燥させた食餌を与え、もう一方には粉末食のような状態の食餌を与えた。で8週齢になるまで飼育し、頭蓋骨と下顎骨を採取した。採取後、マイクロCT撮影によって、頭蓋骨と下顎骨の形状、大きさを計測した。その結果、流動食の食餌を与えたマウスにおいては、下顎骨の形態が有意に変化することを見出した。

Trace and reference point



そして、これらの顎骨から得られた mRNA のマイクロアレイ解析を行っているところである。現在、成果をまとめて論文投稿の準備中である。また、本研究の結果は当初の予想に即するものであり、順調に進展している。しかしながらマイクロアレイの外注時にトラブルが生じ、数ヶ月かけて準備したサンプルを再度採取する必要が出てしまったことなどから、やや進展に遅れが生じ、論文投稿などで結果をまとめることが間に合わなかった。今後はこれら作製した2代目、3代目のモデルマウスのより詳細な解析を進めることによって、不正咬合の世代間の変化等が生じるのかについて検討を進めていく。

#### 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 1 件)

①Shintaku Y, Murakami T, Yanagita T,  
Kawanabe N, Fukunaga T, Matsuzaki K,  
Uematsu S, Yoshida Y, Kamioka H,  
Takano-Yamamoto T, Takada K, Yamashiro T.  
Sox9 Expression during Fracture Repair,  
Cells Tissues Organs, in press.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

山城 隆 (YAMASHIRO TAKASHI)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号 : 70294428

### (2) 研究分担者

中川 一路 (NAKAGAWA ICHIRO)

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 : 70294113

(H22 のみ)

柳田 剛志 (YANAGITA TAKESHI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号 : 90534793

### (3) 連携研究者