

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24792284

研究課題名(和文) 食物の硬さの違いは子孫の顎形態にも影響するのか？ 形態情報エピジェネティクス

研究課題名(英文) Do epigenetics influences the form of a mandibular beyond the generation.

研究代表者

柳田 剛志 (Yanagita, Takeshi)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：90534793

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：これまで、ラットに軟食を食べさせて飼育すると、硬食を食べさせて飼育したラットに比較して顎骨の形態が変化することが知られていたが、申請者らは同成分の固形餌と粉末餌を与えることによって生じるマウス顎骨の微妙な形態変化を、3DCTを用いた形態比較手法の開発によって検出した。

これらの顎態変化を生じたマウス咬筋からサンプル採取し、遺伝子の発現様態を調べたところ、いくつかの遺伝子で著大な発現量の差を認めた。さらに、筋肉の特性を変化させる遺伝子として知られるMYH遺伝子の発現が変化していることを確認し、筋肉の特性変化が下顎骨の形態変化に影響をおよぼす可能性を見出した。

研究成果の概要(英文)：A rat fed with soft diet changes its cranial and mandibular form compared to a rat fed with hard diet. In this time, we assess the analysing method for the form of mandibular with advancing 3DCT and orthodontics cephalometric analysis. As a result, we could detect refined change of mandibular form in mice between grown with powdery feed and with fixed hard feed.

Additionally, we analysed gene expression in masseter muscles in these two group mice. Some gene expression were significantly changed between these two groups. Further more, I find out the reaction of MYH genes expression which play a role in deciding a character of muscle.

These finding shows that the hardness of feed may influence to the form of mandibular via the change of character of masseter muscle.

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：歯科矯正学 顔面形態

## 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。しかし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か？また、どのようにして形態決定情報が世代間を超えて伝わるのか？

本研究に関連する国内・国外の研究動向及び位置づけこれまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

Stravos らは、ラットに軟食を食べさせて飼育すると、硬食を食べさせて飼育したラットに比較して下顎骨の形態が変化（下顎角部が小さくなる）することを見出した。3 これは環境因子が形態に変化を生じさせた一例である。一方近年では、生活習慣や環境因子による影響が記憶され、世代を超えて伝わるエピジェネティック遺伝というシステムが注目されている。現在ではすでに代謝調節がエピゲノム制御によって世代を超えることがある程度明らかにされている。そこで申請者は、代謝調節情報のみならず、形態決定に関わる情報も世代を超えて伝わるのではないかという仮説を立てた。

応募者のこれまでの研究成果を踏まえ着想に至った経緯

何世代か飼育した後に、組織サンプルを回収してエピゲノム解析を行うためには、ゲノム情報が得やすく、継代の間隔が短いマウスで Stravos らと同様のモデルを作る必要があった。申請者らは Micro CT 装置を利用することで、マウスでも軟食により下顎角部が小さくなることを、検出出来ることを明らかにしている。（論文未発表）我々はこの手法を用いることで、マウスの形態変化を幾代かに渡って観察出来るのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

軟食で3代に渡って継代飼育したマウスと、硬食で3代に渡って継代飼育したマウスをそれぞれ比較し、形態に変化が生じるかどうか、またその形態変化は世代間を超えて伝えられるのかをマイクロCTによる形態計測で調べる。またこれらのマウスの顎骨や咬筋などからDNAサンプルを抽出し、幾つかの代表的な成長因子のプロモーター領域がメチル化されているかどうかについて、MIAMI法、リアルタイムMSP法(Methylation-specific PCR)を用いて解析を行う予定であった。しかしながら実際に3世代飼育して同様に頭部の形態を比較したところ、はっきりとした法則性を見出すことは難しかった。そこで、3世代以降の飼育を行うか、もしくは1世代目のより詳細な解析、すなわち粉末食を与える期間を変化させることによって形態的特徴がどのように変化するか、また生後何週間でエピジェネティックな影響が出てくるのかを検討することとした。

## 3. 研究の方法

平成24年度

実験的不正咬合モデルマウスの確立と網羅的なメチル化遺伝子の探索

(1) Stavros ら(1985)は、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をすでに報告している。われわれはまず、これから行う分子生物学的解析をより効率的に進めるため、同様のモデルをマウスで作製する。一方には通常の固形餌を与え、もう一方には同成分の粉末状餌を与える。

(2) それぞれの条件で10週齢になるまで飼育し、頭蓋骨と下顎骨を採取する。

(3) 採取後、Stavros らの論文を参考にし、頭蓋骨と下顎骨の形状、大きさを計測する。また、当施設ではマイクロCT撮影と解析が可能な設備を有しているため、より詳細な計測が可能である。

(4) 組織サンプルからゲノム DNA を採取し、エピジェネティックな制御を受けている遺伝子を網羅的に解析する。また、RNA を回収して発現遺伝子を網羅的に観察した。

平成 25 年度

抽出した遺伝子の発現様態、発現部位の解析

(1) 両サンプル間のクロマチンに差異が認められ、かつ頭蓋骨や下顎骨の形態形成にかかわりがあると考えられるいくつかの遺伝子を抽出する。

(2) 抽出した領域についてアセンブリ解析を行い、関与している遺伝子の解析を行う。

(3) 実際にエピジェネティックな制御が起きているのかどうかを解析する。組織サンプルから抽出した RNA を用いて、定量的 RT-PCR にて mRNA 発現量を解析する。

#### 4. 研究成果

申請者はこれらのモデルマウスから得られたサンプルをマイクロアレイにより解析し、大きく発現量が異なる遺伝子群を同定した。これらの遺伝子群の発現領域は、7 番染色体の 320000 ~ 350000 の領域に集中していることが分かった。しかしながら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、Predicted な転写産物情報が Gene Bank に登録されているのみであった。7 番染色体の 320000 ~ 350000 の領域から発現している mRNA の情報を明らかにするため、次世代シーケンサーを用いた RNA シークエンス法を用いて、本領域より転写産生された mRNA のエクソン構造と遺伝子配列を同定した。

本領域からの転写産物が検出されたという情報はこれまで存在せず、哺乳動物の下顎骨に特異的に発現する遺伝子である可能性もある。

さらに、食物の硬さの違いにより、発現量の異なる遺伝子発現が特定の領域に集中して

いることから、クロマチンなどのエピジェネティックな制御が行われている可能性が高い。そのため、クロマチンの展開部位を Faire sequence 法を用いて解析し、これらの制御が本当にエピジェネティックなシステムを介しているかどうか調査した。その結果やはり 7 番染色体でクロマチン展開に著大な差があることがわかった。

#### 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 5 件)

T Yanagita, R Adachi, H Kamioka, T Yamashiro. Severe open bite due to traumatic condylar fractures treated nonsurgically with implanted miniscrew anchorage. American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics, 査読有、2013,143,S137-147.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajodo.2012.04.024>

Y Ishihara, N Kawanabe, K Sumiyoshi, Y Yoshikawa, M Nakamura, Y Imai, T Yanagita, H Fukushima, H Kamioka, T Takano-Yamamoto, T Yamashiro. Gap-junction-mediated Communication in Human Periodontal Ligament Cells. Journal of Dental Reserch. 査読有、2013,92,635-640  
doi: 10.1177/0022034513489992

S Hayano, H Kurosaka, T Yanagita(他 10 人、3 番目) Roles of heparan sulfate sulfation in dentinogenesis, JBC, 査読有、2012, 6, 12217-12229.  
doi: 10.1074/jbc.M111.332924

N Kawanabe, S Murata, T Yanagita (他  
9人、5番目) Stage-specific embryonic  
antigen-4 identifies human dental  
pulp stem cells, Experimental cell  
research, 査読有, 318;1247-1255,  
2012  
[http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.  
2012.01.008](http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2012.01.008)

H Fukushima, N Kawanabe, S Murata, Y  
Ishihara, T Yanagita, T.A. Balam, T  
Yamashiro. SSEA-4 is a Marker of  
Human Deciduous Periodontal Ligament  
Stem Cells. JDR, 査読有、2012, 95,  
955-966.  
doi: 10.1177/0022034512458123

[学会発表](計 2 件)

柳田剛志、河野加奈、星島光博、山城隆. 粉  
末食を与えたマウスは骨格性ハイアングル  
の形態的特徴を持つ -micro 3D-CTによる  
形態解析-第 72 回 日本矯正歯科学会大会  
(長野県松本市) 2013 年 10 月 7 日 ~ 9 日

柳田剛志、久保田聡、滝川正春、山城隆 粉  
末食で飼育したマウスの下顎骨形態変化  
第 55 会 歯科基礎医学会 (岡山県岡山市)  
2013 年 9 月 20 日 ~ 22 日

[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 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :  
取得状況(計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]  
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

柳田 剛志 (Yanagita Takeshi)  
岡山大学・岡山大学病院・助教  
研究者番号 : 90534793

(2)研究分担者

( )

研究者番号 :

(3)連携研究者

( )

研究者番号 :