

鶴見大学大学院歯学研究科博士学位論文

内容の要旨および審査の結果の要旨

氏名(本籍)	山口 祐 希(東京都)
博士の専攻分野	博士(歯学)
学位記番号	甲第 498 号
学位授与年月日	平成 31 年 3 月 14 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科専攻	鶴見大学大学院歯学研究科 (博士課程) 歯学専攻
学位論文題目	Nutritional supplementation with myo-inositol in growing mice specifically augments mandibular endochondral growth (成長期マウスへの myo-inositol による栄養補給は, 下顎頭における軟骨内骨化の成長を特異的に促進する) Bone 第 121 巻 181 頁~190 頁掲載 平成 31 年 4 月発行
論文審査委員	主査 教授 里 村 一 人 副査 教授 山 越 康 雄 副査 教授 友 成 博

内容の要旨

【緒言】

現在, 骨格性下顎後退症の治療法として成長終了後に顎外科手術による下顎骨前方移動や成長期に下顎骨の成長促進を目的に使用する機能的矯正装置を用いることがある。しかしながら装置による下顎骨成長促進効果は短期的には認められるが長期的には安定していないことが経験的に知られている。したがって臨床的に予知性が高く効果が安定した下顎骨の成長促進法が望まれる。

下顎骨の成長は下顎頭軟骨における軟骨内骨化が中心的役割を果たしている。軟骨内骨化に影響を与える因子として遺伝、ホルモン、栄養因子などがある。栄養因子に関連して, myo-inositol 合成に関わる酵素である inositol monophosphatase を欠失させたマウスでは小下顎症になること, 同マウス母体へ myo-inositol を補充することで新生マウスの小下顎症を回避できることが報告されている。これらのことから myo-inositol が下顎頭軟骨(MCC)内での成長を促進し下顎骨成長に影響を与えたことが考えられる。

本研究課題では, 成長期マウスへの myo-inositol 補充は下顎骨の成長促進が行えると仮説を立て, その検証およびメカニズム解明を動物実験及び細胞培養実験で行うことを目的とした。

【試料および方法】

動物実験

- ・実験動物は3週齢 BALB/c 雄性マウスを用いた。通常食餌群と myo-inositol 栄養強化群 (20 または 200 mg/day/mouse) に分けて飼育した。週ごとに体重を測定し 12 週齢時に安楽死させ体長測定後 microCT を撮影した。microCT 上で下顎骨, 上顎骨, 大腿骨に計測基準点を設定しそれぞれの成長量を測定し比較した。
- ・飼育開始 4, 5 週目に Calcein, Xylenol Orange を腹腔内注射, 6 週目に安楽死させ非脱灰切片を作製し各蛍光ラベル間の距離から下顎頭における新生骨添加量の計測を行った。
- ・飼育開始 9 週目に安楽死させ下顎頭及び大腿骨を摘出しパラフィン切片を作製し HE 染色及び免疫染色を行った。
- ・Laser capture microdissection (LCM) にて下顎頭軟骨表層部及び脛骨から microdissected sample を RNA 抽出に使用し Microarray, Real-time RT-PCR 解析を行い解析した。

細胞培養実験

- ・使用した細胞はマウス軟骨前駆細胞株 (ATDC5) 及び3週齢 BALB/c 雄性マウス下顎頭より摘出, 培養を行った初代下顎頭軟骨細胞 (PMC) を使用した
- ・培養実験で使用した myo-inositol の最終濃度は 0, 1, 10, 100 μ M と設定した.
- ・ATDC5 及び PMC を myo-inositol 添加有無で培養し細胞数の計測及び Resazurin (Alamar blue) を用いた細胞増殖アッセイを行った.
- ・ATDC5 を myo-inositol 添加有無で培養し RNA 抽出後, Real-time RT-PCR にて軟骨関連遺伝子についての発現を確認した.
- ・TDC5 及び PMC に myo-inositol 及び phosphatidylinositol 3-kinase (Pi3k) 選択的阻害剤添加 (CAL101) 有無の条件下で培養し, 細胞増殖能について比較した.

【結 果】

- ・Myo-inositol が全身の成長に影響を与えるかを調べるため体重及び体長について調べたが, 実験期間中に3群間で差は認められなかった. また, microCT で測定した大腿骨長は対照群及び実験群間に差は認められなかった.
- ・MicroCT の解析より12週齢時における各マウスの下顎骨長は Myo-inositol 添加により濃度依存的に有意に増大した. 上顎骨長は, 対照群及び実験群間で差は認められなかった.
- ・組織学的解析により, MCC の厚さは対照群に比較して実験群で有意に増大した. また生体染色による新生骨の添加量計測についても同様に実験群で有意に増大した.
- ・脛骨成長板軟骨と下顎頭軟骨を比較した Microarray 解析にて myo-inositol 代謝関連酵素について発現の比較を行ったところ, phosphatidylinositol 3-kinase catalytic deltapolypeptide (Pik3CD, gene ID:18707) が下顎頭軟骨において高発現していた. また, Pik3cd について real-time RT-PCR で発現比較を行ったところ, 脛骨成長板軟骨に比べて下顎頭軟骨で高発現していることが確認された. また培養細胞である ATDC5 及び PMC においても Pik3CD が高発現しているのが認められた.
- ・培養実験にて Myo-inositol 添加の有無で細胞数増加を比較した結果, myo-inositol 添加で細胞数の有意な増加が認められた. さらに Alamar blue を用いた細胞増殖アッセイにおいても myo-inositol の添加による濃度依存的な増殖促進効果が認められた.
- ・ATDC5 への Myo-inositol 添加による軟骨分化促進効果を解析すべく, realtime RT-PCR 解析を行ったところ, 軟骨関連遺伝子である Aggrecan, Col2, Col10 の発現に有意な増加が認められた. このことから myo-inositol は細胞増殖促進効果のみならず軟骨分化促進効果も有することが示唆された.
- ・最後にこの myo-inositol による下顎頭軟骨の軟骨内骨化促進効果は Pik3cd を介しているかどうかについて調べた. Myo-inositol 及び阻害剤添加の有無で Alamar blue を用いた細胞増殖 assay を行ったところ, myo-inositol 添加で認められた細胞増殖促進は, Pik3cd 阻害剤の添加で有意に減少した. このことから, myo-inositol による下顎頭軟骨での軟骨内骨化促進効果は特異的に強発現されている Pik3cd を介していることが示唆された.

【考 察】

今回の研究で我々は, myo-inositol が成長期マウスに対して下顎骨の成長促進効果を示すことを明らかとした. しかしながら体重, 体長, 上顎骨, 大腿骨への成長促進効果は認められなかった. 以上の結果から myo-inositol 栄養強化は全身の成長に影響を与えず下顎骨における軟骨内骨化に伴う成長に対して特異的な促進効果を示した. これは, 栄養補給による下顎骨成長促進が可能であることを示した最初の報告である.

下顎骨の成長は主に MCC の軟骨内骨化に依存するため, ATDC5 及び PMC の増殖に対する myo-inositol の効果を調べた. Myo-inositol は, 軟骨細胞の増殖を強化し, その結果, 下顎頭内軟骨増殖を促進した. これらの結果は, myo-inositol が細胞内で有糸分裂期を誘導することを示している. Myo-inositol は phosphatidylinositol (PI) の前駆物質であり細胞内 myo-inositol は glucose から合成されるか, または外部からの取り込みにより補充される. 本研究においては myo-inositol を補充したことにより細胞内の myo-inositol が増加し PI が合成されたことで細胞増殖シグナリングが活性化されたと推察される.

細胞内シグナル伝達のためのセカンドメッセンジャーである PI は Pi3k によって myo-inositol から合成される. PI3K は, 3つのクラスに分類され, クラス I は PIK3CA (p110- α), PIK3CB (p110- β), PIK3CG (p110- γ) および PIK3CD (p110- δ) からなる. クラス I PI3K は, 細胞膜におけるホスファチジルイノシトール (3,4,5)-トリホスフェート (PIP3) の産生を担っ

ており、PIP3は細胞増殖を促進するタンパク質の動員を誘導する。

これらをまとめると、下顎頭軟骨特異的に成長促進効果を示した理由として myo-inositol を細胞内シグナル伝達物質へ変換する Pik3CD の発現が脛骨成長板軟骨ではほとんどなかったのに対して下顎頭軟骨では強く発現されていることで下顎頭軟骨において細胞増殖及び軟骨分化の細胞内シグナル促進が増強されることで下顎骨の特異的な成長促進が生じると推察された。

myo-inositol は水溶性ビタミン様物質で動植物中に存在し食品を通じて摂取されている。水溶性ビタミンは過剰に摂取された場合は尿中に排出されるため過剰症はみられないため安全に使用することができる。今回着目した顎顔面領域の成長に対する栄養補助の効果に関しては、現在のところ下顎骨の成長促進を促すと表記したものは存在しない。

したがって本研究課題が臨床応用されることで、特定栄養成分強化は下顎骨の成長を促すことができる所見を得ることができ、エビデンスに基づいた栄養成分による下顎骨の成長促進を将来的に可能となる。

【結 論】

myo-inositol 栄養強化は、全身に影響なく下顎頭軟骨特異的に成長促進効果を示した。下顎頭軟骨における特異的成長促進に Pik3CD が関与している可能性が示唆された。

審査の結果の要旨

現在、骨格性下顎後退症の治療は、手術による下顎骨前方移動や下顎骨の成長促進を目的とした機能的矯正により行われているが、矯正装置による下顎骨成長促進効果はその安定性に問題が残されており、臨床的により予知性が高く、安定した効果を有する下顎骨成長促進法の確立が望まれている。myo-inositol 合成に関与する酵素である inositol monophosphatase を欠失させたマウスが小下顎症を呈すること、同マウス母体へ myo-inositol 補充により新生マウスの小下顎症発生を回避できるという報告を踏まえ、本研究では、成長期マウスへの myo-inositol 投与が下顎骨に対して成長促進効果を有するか否かを検証するとともに、そのメカニズムを解明することを目指した。

3週齢 BALB/c 雄性マウスに myo-inositol (20 または 200 mg/day/mouse) を投与し、体重及び体長の計測、microCT による下顎骨、上顎骨、大腿骨の成長量の測定、蛍光色素を利用した生体染色、下顎頭の組織学的観察、さらには Microarray, Real-time RT-PCR による下顎頭軟骨に発現されている分子の解析を行うとともに、マウス軟骨前駆細胞株 (ATDC5) およびマウス下顎頭より分離した初代下顎頭軟骨細胞 (PMC) を用い、myo-inositol が細胞増殖、軟骨関連遺伝子発現に及ぼす影響の解析を行った。

その結果、myo-inositol 投与はマウスの体重、体長、上顎骨及び大腿骨の成長に影響することなく、下顎骨の成長を特異的に促進することが明らかとなった。また myo-inositol 投与により下顎頭軟骨の厚さおよび新生骨添加量の増大がみられること、phosphatidylinositol 3-kinase catalytic deltapolypeptide (Pik3CD) が下顎頭軟骨、さらには ATDC5 および PMC において高発現していることが認められた。また myo-inositol は ATDC5 および PMC の細胞増殖、ATDC5 の aggrecan, type II collagen, type X collagen 遺伝子の発現を促進することが明らかとなり、この促進効果は Pik3cd 阻害剤の添加により有意に阻害された。

以上の結果から、myo-inositol の経口投与は全身、上顎骨、大腿骨の成長に影響を与えず、下顎骨における軟骨内骨化に伴う成長に対して特異的な促進効果を有することが確認された。またそのメカニズムとして、myo-inositol が軟骨細胞の増殖と分化を促進することが確かめられ、生体外からの myo-inositol 補充により細胞内の phosphatidylinositol (PI) が増加したことで細胞増殖および分化に関与するシグナリングが活性化されたものと考えられた。さらに、PI 合成酵素の 1 である Pik3CD が下顎頭軟骨で強く発現していることから、下顎頭軟骨において特異的に細胞増殖及び軟骨分化が促進されることで下顎骨の特異的な成長促進が生じると推察された。myo-inositol は水溶性ビタミン様物質で、過剰症はみられず安全に使用することができることから、本研究成果を臨床的に応用できる可能性は高いものと考えられた。本研究は、特定栄養成分強化により下顎骨の成長を促進することができる可能性を示唆しているものと考えられた。

本研究は、myo-inositol のような特定の栄養成分を投与、補充するにより、下顎骨の成長を促進することができる可能性を示唆しているものであり、臨床的により予知性が高く、安定した効果を有する下顎骨成長促進法の確立に繋がる研究と考えられる。よって、本論文は博士(歯学)の学位請求論文として十分な価値を有するものと判定した。