

## 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と姿勢に関する研究

中島, 梓

<https://doi.org/10.15017/4060090>

---

出版情報 : Kyushu University, 2019, 博士 (歯学), 課程博士  
バージョン :  
権利関係 :



下顎非対称を伴う骨格性下顎前突症患者における  
咬筋特性と姿勢に関する研究

2020年3月

九州大学大学院歯学府 歯学専攻 口腔顎顔面外科学分野

中島 梓

九州大学大学院歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野

指導教官 森 悦秀 教授

## 対 象 論 文

本論文の一部は下記の論文に掲載されたものである。

Masseter muscle properties differ between the left and right sides in mandibular Class III patients with asymmetry

Azusa Nakashima, Tomohiro Yamada, Goro Sugiyama, Wataru Mizunoya,

Hiroyuki Nakano, Kosuke Yasuda, Ichiro Takahashi, Yoshihide Mori

Journal of Hard Tissue Biology, 2019, accepted

## 略語一覧

- BSA : bovine serum albumin (ウシ血清アルブミン)
- CT : computerized tomography (コンピューター断層撮影)
- DNA : deoxyribonucleic acid (デオキシリボ核酸)
- FGF : fibroblast growth factors (線維芽細胞増殖因子)
- FGFR : fibroblast growth factor receptor (線維芽細胞増殖因子受容体)
- FH plane: Frankfurt horizontal plane (フランクフルト平面)
- GHR: growth hormone releasing hormone (成長ホルモン放出ホルモン)
- IHC : immunohistochemistry (免疫組織化学)
- mRNA : messenger ribonucleic acid (メッセンジャーリボ核酸)
- MyHC : myosin heavy chain (ミオシン重鎖)
- MYO 1H : myosin 1H (ミオシン 1H)
- OCT : optimal cutting temperature (凍結組織切片作製用)
- PBS : phosphate-buffered saline (リン酸緩衝食塩水)
- RNA : messenger ribonucleic acid (リボ核酸)
- RT-PCR: reverse transcription polymerase chain reaction (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)
- RUNX 2 : Runt-related transcription factor 2 (Runt 関連転写因子 2)
- SDS : sodium dodecyl sulfate (ドデシル硫酸ナトリウム)
- TBS-T : tris-buffer saline Tween-20 (Tween-20 含有-トリス緩衝液)
- WB : western blotting (ウエスタンブロットイング)

## 本研究で使用した計測点および平面と角度の定義

Me menton (メントン)	オトガイ正中断面像の最下縁点
N nasion (ナジオン)	鼻骨前頭縫合の最前点
Or orbitale (オルビターレ)	眼窩骨縁最下点
Po porion (ポリオン)	骨外耳道の上縁
Pog pogonion (ポゴニオン)	下顎オトガイ隆起部の最突出点
点 A	ANS と上顎中切歯間歯槽突起最前点との間の唇側 歯槽骨縁上の最深点
点 B	下顎中切歯間歯槽突起最前点と Pog との間の最深点
ANS	前鼻棘の最先端点
FH 平面	Or と Po を結んだ平面
ANB	N-A を結んだ直線と N-B を結んだ直線のなす角度

## 目次

要旨	1
緒言	3
研究 I : 下顎非対称が脊柱弯曲および頭部傾斜に及ぼす影響	
対象と方法	6
結果	9
小括	11
研究 II : 下顎非対称患者の咬筋特性の左右差に関する研究	
対象と方法	12
結果	18
小括	25
考察	26
結語	30
謝辞	31
参考文献	32

## 要 旨

顎変形症の原因は不明であるが、遺伝的要因と環境的要因による多因子疾患と考えられる。遺伝的要因に関する研究が進む一方で、環境的要因に対する研究は多くはない。本研究では顎変形症の中でも環境的因子の影響が大きいと考えられる下顎非対称患者に着目し、研究 I では下顎の偏位と頭部傾斜ならびに脊柱側弯との関係を解析し、研究 II では症例数が多い下顎非対称を伴う骨格性下顎前突症患者に焦点を絞り、下顎の偏位と咬筋の形態的ならびに分子生物学的性状との関係について解析を行った。

研究 I では、下顎非対称を伴う顎変形症患者 45 例（男性 10 例、女性 35 例）を対象とし、外科矯正手術の前後に撮影をした頭部正面 X 線規格写真と胸部立位正面 X 線写真を用いて、下顎側方偏位角、頭部傾斜角、脊柱側弯部傾斜角（コブ角）を測定した。その結果、術前では、下顎側方偏位が大きいほど頭部傾斜と脊柱彎曲が大きい傾向があり、頭部傾斜では方向にも関連が認められた。さらに術前と術後で比較をすると、術前の頭部傾斜角が  $2^{\circ}$  以上、あるいはコブ角が  $10^{\circ}$  以上の症例に限定すれば、術後に減少する傾向がみられた。

研究 II では、患者群は下顎枝矢状分割術を施行した下顎非対称を伴う骨格性下顎前突症患者 27 例（男性 6 例、女性 21 例）を対象とし、対照群は個性正常咬合を有する 11 例（男性 5 例、女性 6 例）を対象とした。術前に撮影したコンピューター断層撮影（CT）画像を用いて、偏位側と非偏位側の咬筋の厚さと断面積の計測を行った。計測を行ったところ、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。咬筋の分子生物学的性

状は下顎枝矢状分割術の術中に採取した組織を用いて検索し、ミオシン重鎖（MyHC）のアイソフォームである MyHC 1 と MyHC 2 に対する抗体を用いた免疫組織化学（IHC）染色による type 分類を行った。さらに、定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）法により、ミオシン重鎖をコードする遺伝子（*MYH 1,2,7,8*）に対して、定量的 RT-PCR 法を用いたメッセンジャーリボ核酸（mRNA）の発現量解析とウエスタンブロッティング（WB）法による MyHC 1 と MyHC 2 の発現解析を行った。その結果、IHC 染色では、type 1 線維数の割合は対照群よりも患者群で低い傾向があり、偏位側は非偏位側よりも低かった。WB 法では MyHC 1 の発現量は偏位側の方が非偏位側よりも多く、定量的 RT-PCR 法では、type 2a 線維に発現する *MYH 2* の発現量が偏位側の方が非偏位側よりも多かった。胎児期骨格筋線維に発現する *MYH 8* は対照群に比べて患者群の偏位側で発現量が少なかった。

以上のように、下顎非対称は頭部傾斜や脊柱側弯と関連し、咬筋は形態的な左右差はないものの、偏位側では非偏位側と比較して遅筋型の type 1 線維数の減少や関連タンパク合成の変化がみられることが明らかとなった。

## 緒 言

顎変形症の原因は不明な点が多いものの、遺伝的因子に環境的要因が修飾して発症するものと考えられる (1-3)。顎変形症の原因と考えられるものは次の 5 つ 1) 既知の症候群 2) 遺伝 3) 環境と神経筋 4) 外傷 5) 腫瘍、に分類される (1) が、非症候群性の患者では遺伝的因子だけでは病因を説明できないことも多い。明らかな原因は特定できていないため、顎変形症の治療はすでに生じた骨格的異常に対して、外科的顎矯正治療による対症療法となっているのが現状である。

顎変形症の診断は一般的に頭部 X 線規格写真を用いて行われる。正面および側面頭部 X 線規格写真を基に、頭蓋顎顔面の骨格構造を三次元的に計測し、頭蓋に対する上下顎の位置、上下顎間関係、顎骨自体の形態などの骨格型分析、歯牙の位置や傾斜関係などの咬合型分析を行う。すなわち、上下顎骨の前後的な相対関係を示す前突症、後退症に加え、側方偏位や開咬など、三次元的な評価が行われる。その他にコンピューター断層撮影 (CT) による形態的診断、筋電図や顎運動検査による機能的診断も行われているが、全身的な姿勢への影響や筋の分子生物学的な特性については解析が進んでおらず不明な点が多い。

咀嚼筋が顎骨形態に与える影響は以前より指摘されており (4)、筋ジストロフィー患者は筋の萎縮とともに経年的に開咬がひどくなることが知られている (5)。筋組織は平滑筋と横紋筋に分けられ、咀嚼筋を含む骨格筋は後者に含まれる。また、筋線維の性状から、筋組織は速筋と遅筋に分けられる。1 本の筋線維は多数の筋原線維から構成され、1 本の筋原線維はいくつかの筋節から構成さ

れる。これらは 2 つの筋フィラメントから構成され、ミオシンを含む太いフィラメントとアクチンを含む細いフィラメントが規則正しく配列され、横断面において六角格子状を形成する (6)。さらに、ミオシン分子は頭部、頸部、尾部からなり、尾部のアミノ酸配列によりミオシン重鎖 (myosin heavy chain ; MyHC) の type が決定する (7)。筋線維は収縮特性、代謝特性を決定する MyHC の type により、遅筋型 (type 1 線維、赤筋) と速筋型 (type 2 線維、白筋) に分類され、このうち速筋は type 2a、type 2x、type 2b に分類される (8)。瞬発的な筋収縮を担う速筋に対して、遅筋は持続的な役割を担う。咬筋の MyHC 特性は、ラット等のげっ歯類や肉食動物では type 2 線維が 90%以上 (9-11) であるのに対し、雑食であるヒトでは個体差がかなり多いものの、type 1 線維が優位であり (12)、70% 以上が type 1 線維とされている (13)。長時間ゆっくりとした咀嚼運動を行う草食動物では、さらに多くの type 1 線維からなる (14)。白人種での検討により、ショートフェイスの患者の咬筋には type 2 線維が多く、ロングフェイスでは逆の傾向があることが報告されている (15,16)。

下顎前突症は手術適応となる症例数が最も多く、その術式もほぼ確立されている。しかしながら、左右非対称を認めることも多く、当科で経験した一卵性双生児においても変形のパターンには一貫性がなかった。前述のように顎変形症は遺伝的要因だけでは病因を説明できないことも多いことから、特に非対称症例については環境要因が強く影響しているものと思われる。また、下顎非対称患者においては、臨床的に脊柱の彎曲や頭部の傾斜など姿勢の歪みを有する症例が散見される。

下顎骨の局所環境として最も大きな影響を及ぼすのは咀嚼筋と考えられることから、下顎非対称患者では咀嚼筋の特性あるいは神経筋機構のバランスの変化が病態形成に関連している

可能性があると思われる。そこで本研究では、下顎非対称を伴う顎変形症患者について、下顎非対称と頭部傾斜や脊柱側弯など姿勢への影響、および形態学的および分子生物学的観点からの咬筋特性の左右差に関する検討を行い、興味ある知見が得られたのでここに報告する。

# 研究 I：下顎非対称が脊柱彎曲および頭部傾斜に及ぼす影響

## 対象と方法

### 1. 対象

対象は 2011 年 4 月から 2014 年 8 月までに九州大学病院顔面口腔外科にて顎矯正手術を行った 45 例（男性 10 例、女性 35 例）で、原疾患以外の疾患をもつ患者、日本人以外の患者は除外した。平均年齢は  $26.3 \pm 8.7$  歳であった。近遠心的分類では骨格性 I 級が 10 例、骨格性 II 級が 5 例、骨格性 III 級が 30 例であった。術前の評価は顎矯正手術時の術前検査資料を用いて行い、術後は平均  $11.3 \pm 5.4$  か月で評価を行った。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 24-91）。

### 2. 方法

外科矯正手術前に撮影した頭部正面 X 線規格写真、胸部立位正面 X 線写真、安静時の正面写真を用いて、下顎の側方偏位、脊柱側彎、頭部傾斜について評価した。下顎の偏位は、頭部正面 X 線規格写真を用いて下顎偏位角で評価した。両側の頬骨基部を通る直線を X 軸とし、X 軸に垂直で ANS を通過する直線を Y 軸とした。X 軸と Y 軸の交点を O とし、O とメンテン (Me) を結んだ線と Y 軸とのなす角である下顎偏位角を下顎の偏位量とした。本研究では左側に偏位しているものを正とした (図 1 A)。脊柱側彎は、胸部正面 X 線写真を用いてコブ角で評価した。彎曲部位で一番傾きの強い椎骨である、終椎から終椎までの角度をコブ角とし、本研究では右に彎曲しているものを正とした (図 1 B)。頭部の傾斜は、椅子の背もたれに寄りかかり、リラックス

した状態でカメラと床が平行になるように撮影した安静時の正面写真を用いて頭部傾斜角で評価した。瞳孔線と水平線のなす角度を頭部傾斜角とし、瞳孔線が時計回りに傾いているものを正とした(図 1 C)。下顎の側方偏位、脊柱側弯、頭部傾斜の 3 項目を評価し、1. 下顎の偏位と脊柱側弯との相関 2. 下顎の偏位と頭部傾斜との相関 3. 頭部傾斜の術前後の変化 4. 脊柱側弯の術前後の変化の 4 項目について検討した。統計学的検討には各項目の相関を Spearman の順位相関係数を用いて、術前後の比較は F 検定で当分散と仮定し、Student-t 検定を行った。 $p < 0.05$  を統計学的に有意とし、解析には IBM SPSS statistics ver. 19 (IBM, Armonk, NY, USA)を使用した。

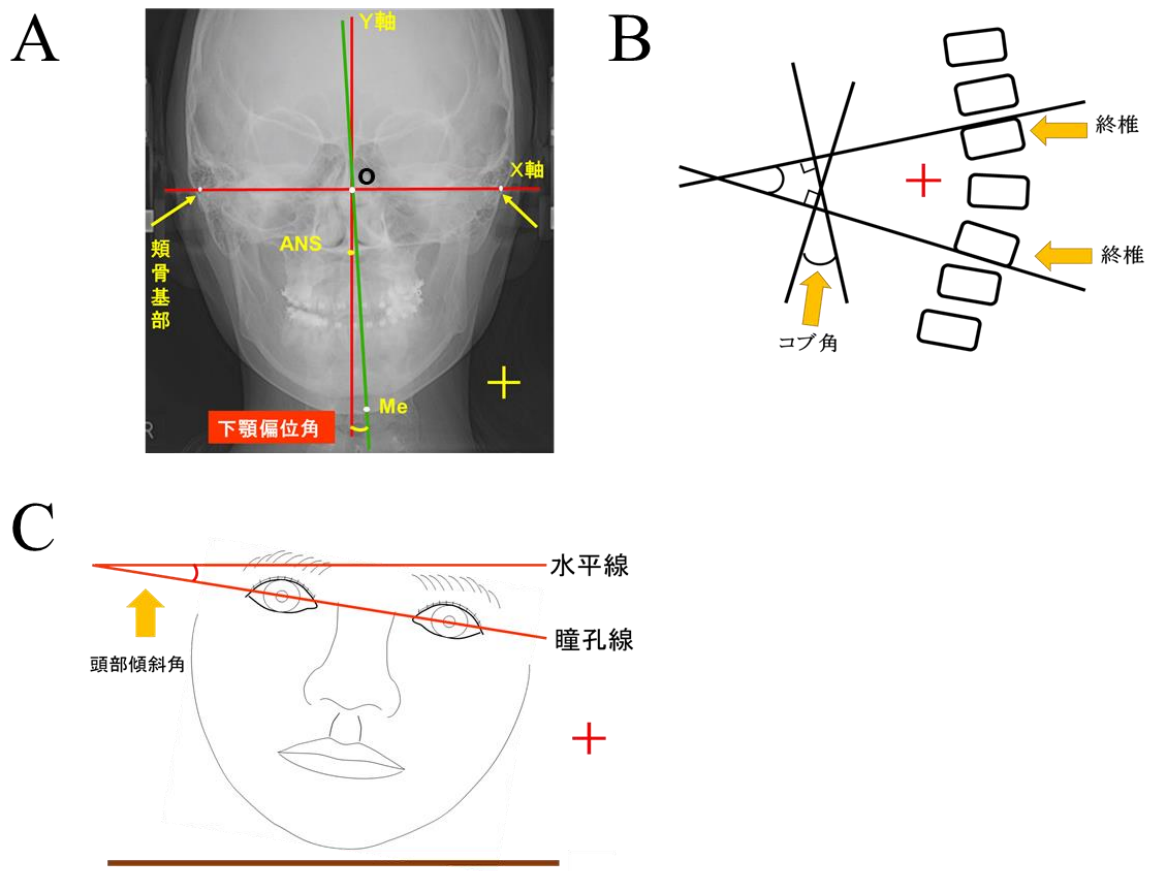


図 1 : 下顎の偏位と脊柱および頭部の傾斜に関する検討

**A:** 下顎の側方偏位の評価

頭部正面 X 線規格写真を用いて下顎偏位角で評価した。  
Me の左側への偏位を正の値とした。

**B:** 脊柱側弯の評価

胸部 X 線写真を用いてコブ角で評価した。  
脊柱が右側に弯曲しているものを正の値とした。

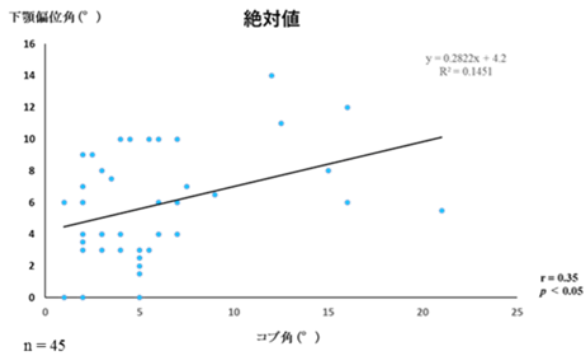
**C:** 頭部傾斜の評価

安静時の正面写真を用いて頭部傾斜角で評価した。  
瞳孔線が時計回りに傾いているものを正の方向とした。

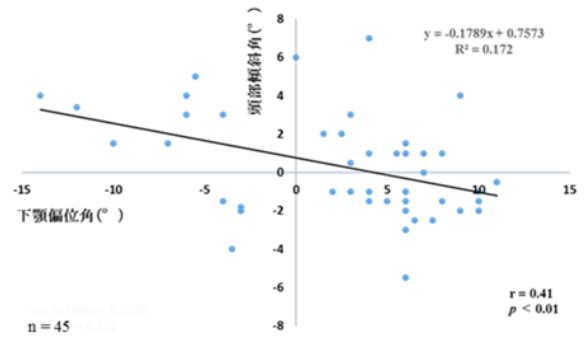
## 結 果

下顎の偏位量とコブ角の間には相関が認められなかったが、絶対値で検討したところ弱い正の相関を認めた（図 2 A）。下顎の偏位と頭部傾斜角の相関に関しては、右側への偏位量が多いほど頭部傾斜角が大きい負の相関が認められた（図 2 B）。頭部傾斜角の術前後の変化について検討したところ、術前の頭部傾斜角は平均 2.2° であったのに対して、術後は平均 2.25° であり、明らかな差は認められなかった（図 2 C）。しかしながら、健常人の頭部傾斜角の平均が約 1° だったため、傾斜角が 2° 以上の症例に限定して検討を行ったところ、2° 以下では術前後で有意な変化は認められなかったのに対し、2° 以上の症例では術後に傾斜角が減少する傾向が認められた（図 2 D）。また、術前後における脊柱側弯の変化については、術前 5.6°、術後 4.6° と有意な変化はなかった（図 2 E）ものの、コブ角が 10° 以上の症例では、術後に減少する傾向があった（図 2 F）。

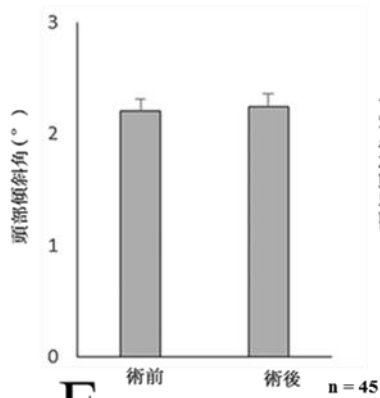
A



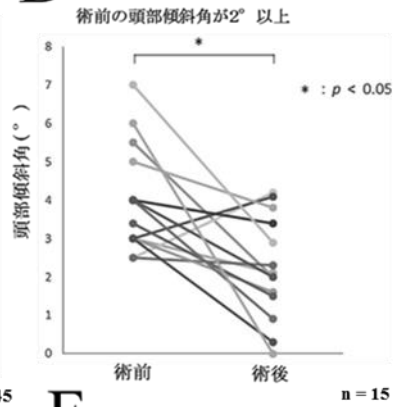
B



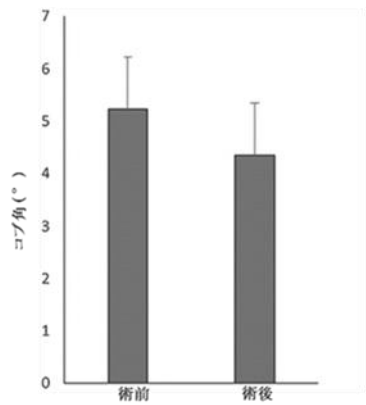
C



D



E



F

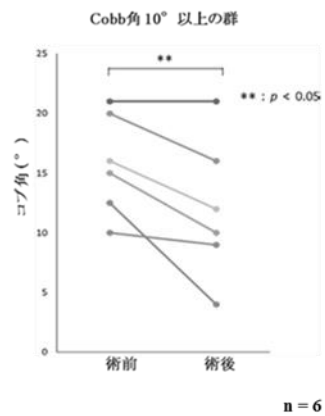


図 2 : 下顎偏位角とコブ角および頭部傾斜角の相関と術前後の比較

- A : 下顎偏位角とコブ角の相関
- B : 下顎偏位角と頭部傾斜角の相関
- C : 頭部傾斜角の術前後の比較
- D : 2° 以上の頭部傾斜角の患者の術前後の比較
- E : 術前後のコブ角の比較
- F : 10° 以上のコブ角の患者の術前後の変化

## 小 括

下顎の偏位と頭部傾斜ならびに脊柱側弯との関係について解析を行い、以下の結果を得た。

- (1) 下顎の偏位量と脊柱側弯には有意な相関があった。しかし、下顎の偏位方向と脊柱の彎曲の方向には相関は認められなかった。
- (2) 下顎の偏位量と頭部傾斜角には有意な相関があった。さらに、下顎の偏位方向と頭部の傾斜方向にも相関が認められた。
- (3) 外科矯正手術の頭部傾斜および脊柱側弯は全症例を対象とすると変化はなかったものの、傾斜や彎曲の強い症例に限定すると術後に改善が認められた。

## 研究 II：下顎非対称患者の咬筋特性の左右差に関する研究

### 対象と方法

#### 1. 対象

対象は、2015年7月から2018年3月までに、九州大学病院で下顎非対称を伴う骨格性下顎前突症に対し下顎枝矢状分割術を施行した女性21名と男性6名である。年齢は16歳から51歳で平均23.5歳であった。Meが3mm以上側方偏位した症例を下顎骨非対称症例として、ANBが0°以下の骨格性Ⅲ級症例を患者群とした(表1)。口唇口蓋裂、鰓弓症候群などの先天異常疾患を有する症例は除外した。対照群は口腔顎顔面領域に原疾患以外に異常が認められない個性正常咬合を有する症例で、下顎骨骨折や顎骨嚢胞性病変などで、手術野に咬筋の露出が想定される場合に同意の得られた症例とした。

		患者	対照群
	n	27	11
性別	(男性 / 女性)	6/21	5/6
年齢		23.4 ± 7.5	32.0 ± 15.9
skeletal 分類			
	class I	0	11
	class III	27	0
垂直的分類			
	short face	5	0
	average	8	11
	long face	14	0
オトガイ (Me) 偏位量 (mm)		3.6 ± 0.8	0.5 ± 0.3
下顎後退量 (mm)			
	偏位側	8.9 ± 2.9	-
	非偏位側	6.5 ± 2.8	-

表 1 : 患者背景

## 2. CT での咬筋形態の解析

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調べる目的で、外科矯正手術前に撮影した CT 画像より、下顎小舌直下の高さで咬筋の厚みと断面積を計測した。CT 撮影は九州大学病院放射線撮影室内に設置している Aquilion (キャノンメディカルシステムズ、大田原) を使用した。撮影は患者を仰臥位で閉口させ、管電圧 120 kV、管電流 100 mA の条件で行った。撮影範囲は、眼窩上孔から舌骨までの範囲で、眼窩中央より下 3 cm の範囲では、スライス厚 2 mm、テーブル移動速度 3 mm/sec で撮影した。顎関節部ではスライス厚 1 mm、テーブル移動速度 1.5 mm/sec、オトガイ付近ではスライス厚 2 mm、テーブル移動速度 3 mm/sec で撮影した。基準平面は フランクフルト (FH) 平面を用い、それに平行な断面で計測した。硬組織モードで下顎小舌直下の位置で FH 平面と平行な断面を設定し、軟組織モードで咬筋の厚みと断面積を計測した。統計学的処理は F 検定で当分散と仮定し、Student-t 検定を用いた。

## 3. 咬筋の採取

外科矯正手術時に、咬筋浅層前縁から約 0.5 cm<sup>3</sup> の筋組織を採取し、RNA later (Life Technologies, Carlsbad, CA) に浸漬し、-80 °C の超低温冷凍室で凍結保存した。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った。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 27-21)。

#### 4. 免疫組織化学 (IHC) 染色

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 抗体で 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。凍結切片作製のために、 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  の超低温冷凍室で凍結保存した咬筋組織をリン酸緩衝食塩水 (PBS) で洗浄後、直ちに凍結組織切片作製用 (OCT) コンパウンドを含んだ凍結切片用トレー (クリオディッシュ No2、硝英製作所、東京) に入れ、液体窒素で冷却したイソペンタン中で急速凍結し、組織切片をクライオスタットで作製した。使用した抗 MyHC 1 抗体、抗 MyHC 2x 抗体は九州大学大学院農学研究院資源生物科学部門 動物・海洋生物科学講座畜産化学研究室が作製したラットモノクローナル抗体であり、抗原の設計はマウス MyHC のアミノ酸配列を基に調整しているが (17)、ヒトでも交叉性があることを確認している (データ未発表)。作製した組織切片を含むスライドガラスを PBS で洗浄後、ブロッキングバッファー (1% ウシ血清アルブミン (BSA)、0.1%ゼラチン、0.1% Triton X-100、0.05% Tween 20、0.05% NaN<sub>3</sub>、10 mM PBS、100 mM Glycine) でブロッキングした。抗体溶液は 2 次抗体を含む 2 つのコンジュゲート抗体溶液を調製し、 $14\text{ }^{\circ}\text{C}$  で一晩インキュベートした。また、ネガティブコントロールには一次抗体なしで自己蛍光のレベルをチェックし、結合した抗体に由来する蛍光より自己蛍光がはるかに弱いことを確認した。蛍光顕微鏡 (BZ-800, KEYENCE, 大阪) を用いて 1 検体 3 箇所ずつ観察を行い、画像解析ソフト BZ-X Analyzer (KEYENCE) を用いて type 2 線維に対する type 1 線維の相対線維数と相対面積を算出し、さらに各筋線維の直径を計測した。統計学的処理は F 検定で当分散と

仮定し、Student-t 検定を用いた。

## 5. 定量的 RT-PCR 法による mRNA 発現の解析

偏位側と非偏位側の咬筋の組織染色より、type 1 線維と type 2 線維の組成に違いが認められたため、筋線維内に発現する遺伝子との関連性を検討した。ヒト咬筋の type 1 線維で発現する *MYH 7*、type 2 線維で発現する *MYH 1*、*MYH 2*、胎児期骨格筋で発現する *MYH 8* の 4 つの遺伝子に対して、メッセンジャーリボ核酸 (mRNA) 発現量を解析した。まず、咬筋検体から RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) を用いて総 RNA を抽出、Light Cycler Fast Start DNA Master SYBER Green 1 kit (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) を用いた定量的逆転写ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) 法を行った。反応条件は、熱変性を 95 °C で 1 サイクル 10 分間行い、2 サイクル以降 10 秒間行った。アニーリング／伸長反応は 60 °C で 10 秒間、72 °C で 10 秒間とし、すべて 47 サイクルの増幅を行った。定量的 RT-PCR 法の解析は Light Cycler Software Version 3.5 (Roche Diagnostics) を使用した。glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase の mRNA 発現量と比較し、相対的発現量を算出した。使用したプライマーは Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) より入手した (18)。プライマーの塩基配列を表 2 に示す。

表2：プライマー塩基配列

<i>MYH 7</i>	(F) 5'-AGACGGAGGAGGACAGGAAA -3'
	(R) 5'-AGATCAAGATGTGGCAAAGCTACT-3'
<i>MYH 1</i>	(F) 5'-CTGCAAGCAAAGGTGAAATCCTA -3'
	(R) 5'-AGATCAAGATGTGGCAAAGCTACT-3'
<i>MYH 2</i>	(F) 5'-AAGGTCTCCATTTACAAGCTCACG-3'
	(R) 5'-TTGGACACCTGTTCTACAGTCTGG-3'
<i>MYH 8</i>	(F) 5'-GAAACATGACCGACGAGTAAAAG-3'
	(R) 5'-CAGGTGTGTTTACTCTGCACTGAT-3'

## 6. ウェスタンブロッティング (WB) 法によるタンパク質発現量の検討

筋組織を PBS で洗浄した後、プロテアーゼ阻害剤を含むドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶解緩衝溶液 (50 mM Tris-HCl、pH 6.8、2% SDS、10% グリセロール、6% メルカプトエタノール) を用いて超音波破碎により溶解した。溶解液のタンパク濃度を Bio-Rad protein assay kit (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) を用いて分光光度計により決定した。その後、Laemmli sample buffer (Bio-Rad Laboratories) と 2-メルカプトエタノール (富士フイルム和光純薬、大阪) を添加し、70 °C、30 分加熱し変性させ、-30 °C で保存した。同濃度のタンパクを含む 30 µL のサンプルを 10% SDS-ポリアクリルアミドゲル上で電気泳動した。電気泳動後、タンパクをニトロセルロース膜 (Bio-Rad Laboratories) に転写した。セルロース膜を Tween-20 含有トリス緩衝液 (TBS-T :25 mM Tris-HCl、pH 8.2、144 mM NaCl、0.1 % Tween 20) で洗浄した後、常温で 1 時間、5% スキムミルク/TBST でブロッキングを行い、TBS-T による洗浄後、特異的一次抗体で常温下 1 時間処理した。TBS-T による洗浄後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合二次抗体と常温で 1 時間反応さ

せて、TBS-T により洗浄した。化学発光試薬として ECL キット (GE Healthcare/Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) を使用した。特異的二次抗体にはウサギ抗ヒト MyHC 1 抗体、ウサギ抗ヒト MyHC 2a 抗体およびウサギ抗ヒト MyHC 2x 抗体 (Proteintech Group, Rosemont, IL) を使用した。

得られたデータは画像解析ソフトウェア (Image J, NIH, <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>) により、バンドの濃さを定量化しグラフ化された。検出したバンドの定量は computer-assisted densitometry (MultiImager II Mi-II 600 CB, バイオツールズ株式会社、群馬) を用いて行った。統計学的処理は F 検定で分散と仮定し、Student-t 検定を用いて解析した。

## 結 果

### 1. 下顎非対称患者の偏位側と非偏位側における咬筋形態の比較検討

偏位側と非偏位側と対照群の咬筋の厚みと横断面積を比較したところ、咬筋の厚みでは偏位側と非偏位側間では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 3 A)。咬筋の横断面積でも同様に偏位側と非偏位側間では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 3 B)。

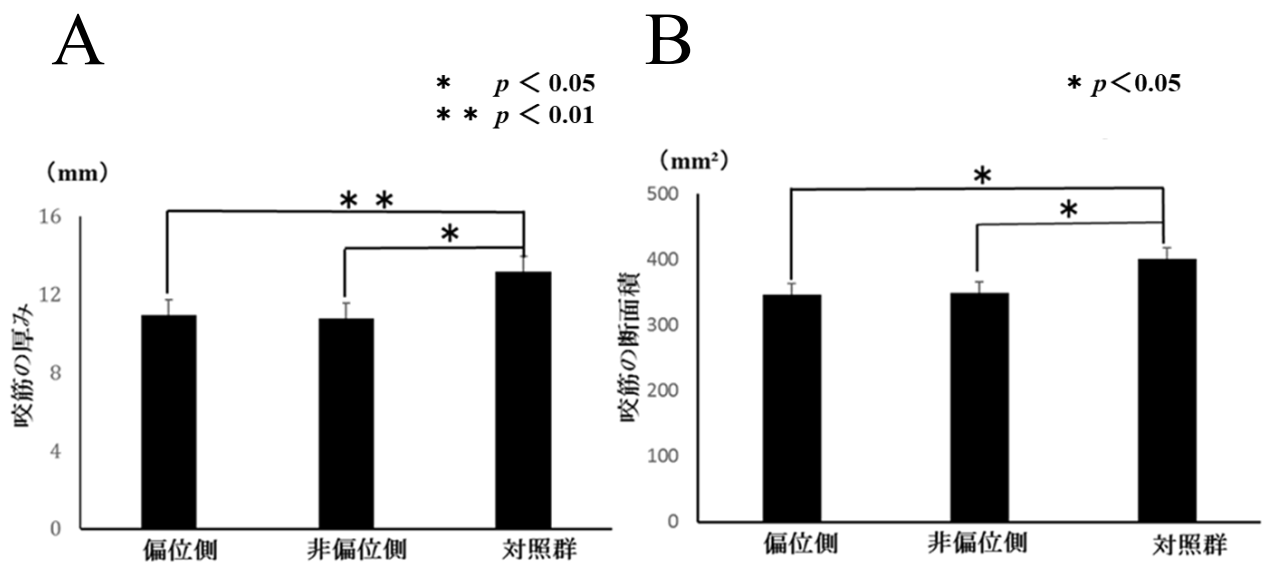


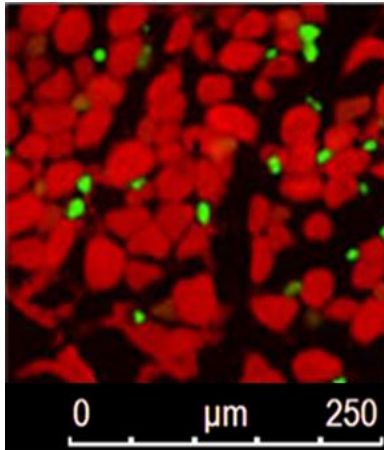
図 3 :咬筋の厚みと断面積

術前に撮影した CT 画像より得られたデータを用いて、軸位断の下顎小舌直下の高さで、咬筋の厚さ (A) および咬筋の断面積 (B) を測定した。

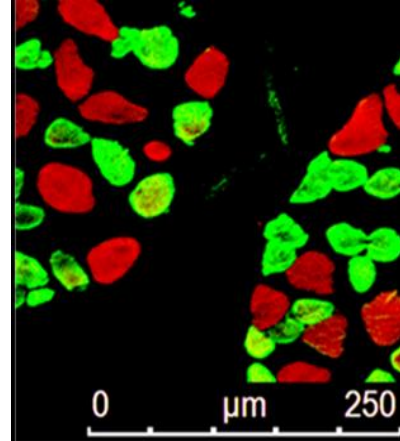
## 2. 下顎非対称患者の筋線維成分の比較検討

骨格性下顎前突症患者、対象群ともに咬筋線維の分布には個人差があったが、type 1 優位の症例や type 2 の割合が比較的高い症例が認められた (図 4 A, 4 B)。type 1 (遅筋) 線維と type 2 (速筋) 線維の数の割合と面積の割合、筋線維の直径を検討したところ、筋線維の数では type 2 線維が偏位側において有意に多く認められた (図 4 C)。一方、筋線維の面積では、type 1 線維、type 2 線維ともに有意差は認められなかった (図 4 D)。同様に筋線維の厚みにおいても type 1 線維、type 2 線維には有意差は認められなかった (図 4 E)

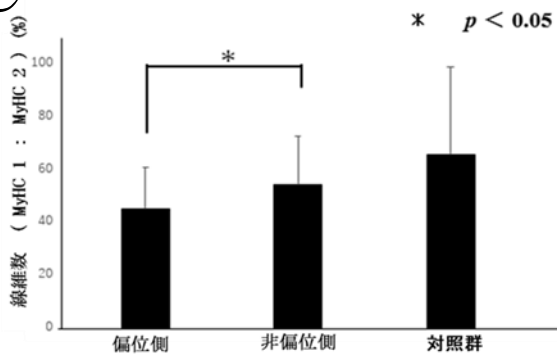
A



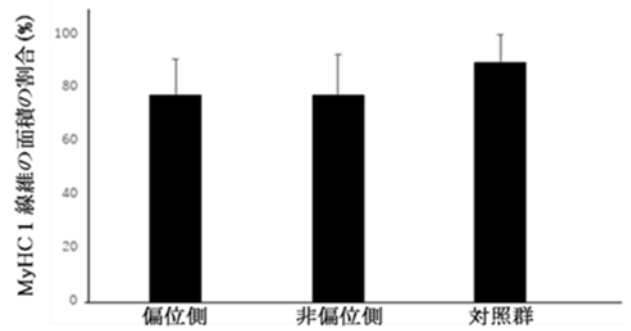
B



C



D



E

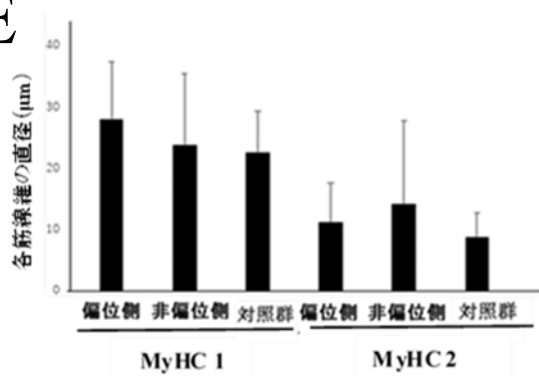


図 4 : 下顎非対称患者の筋線維成分の比較検討

下顎非対称を伴う骨格性下顎前突症患者の咬筋検体に対して抗 MyHC 1 抗体と抗 MyHC 2x 抗体を用いて type 1 (遅筋) 線維と type 2 (速筋) 線維の IHC を行った。赤 : MyHC 1 (遅筋)、緑 : MyHC 2a + x (速筋)

A : type 1 (MyHC 1) 優位である骨格性下顎前突症患者の偏位側の1例

B : type 1 と type 2 (MyHC 2a + x) の割合が同程度の対照群患者の1例

C : MyHC 1 線維の相対数 (%)

D : MyHC 1 線維の相対断面積 (%)

E : 各線維の直径 (μm)

### 3. *MYH* 遺伝子群の mRNA 発現量に対する検討

4 つの遺伝子 (*MYH 1*、*MYH 2*、*MYH 7*、*MYH 8*) の mRNA 発現量を偏位側と非偏位側の咬筋を用いて定量的 RT-PCR 法により解析した。この結果、type 2 (速筋) 線維の中でも type 2x に発現される *MYH 1* 遺伝子は、偏位側と非偏位側で発現量に有意差は認められなかった (図 5 A)。一方で、type 2a に発現される *MYH 2* 遺伝子の発現量は対照群と比べて偏位側において有意に増加していた (図 5 B)。type 1 (遅筋) に発現される *MYH 7* 遺伝子では、偏位側、非偏位側ともに発現量に有意差は認められなかった (図 5 C)。また、胎児期骨格筋に発現される *MYH8* 遺伝子の発現量は対照群と比べて患者群の偏位側で有意に減少していた (図 5 D)。

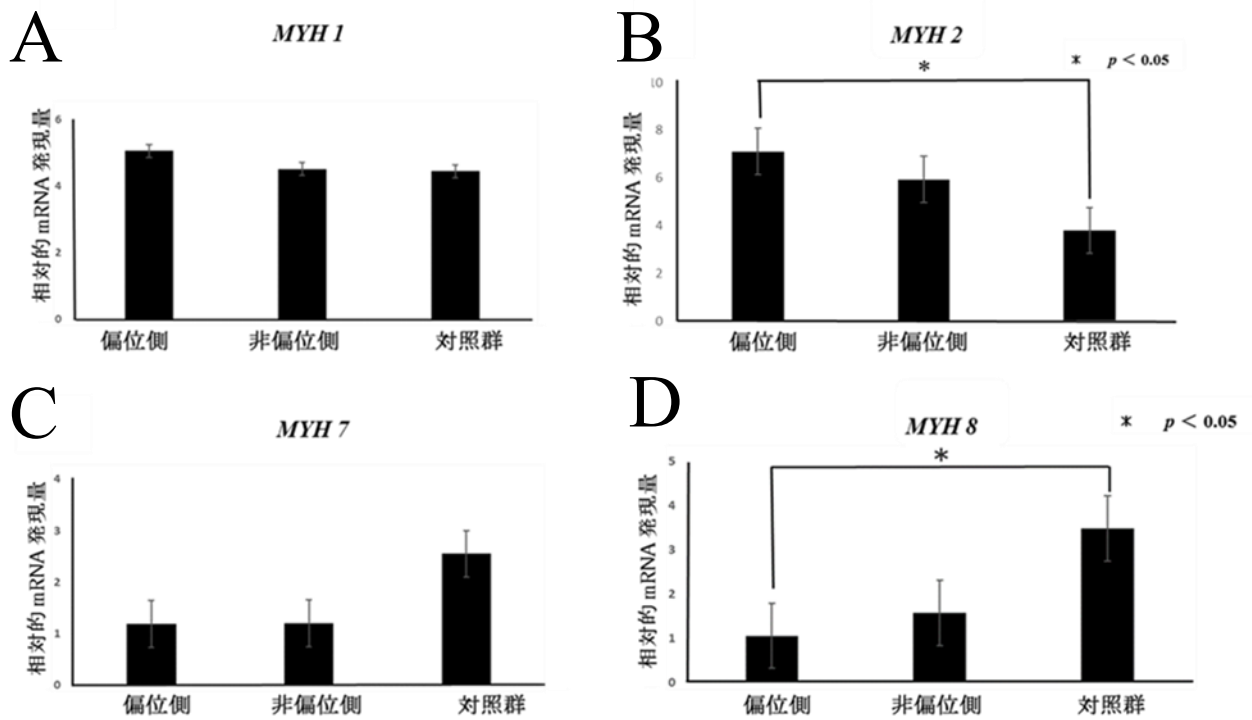


図 5 : *MYH* 遺伝子群の mRNA 発現量に対する検討

下顎非対称を伴う骨格下顎前突症患者と対照群の咬筋から細胞碎細液を調整し総 RNA を抽出した。逆転写反応により得られた相補的 DNA を合成し *MYH 1* (type 2x) (A)、*MYH 2* (type 2a) (B)、*MYH 7* (type 1) (C)、*MYH 8* (胎児期骨格筋) (D) のプライマーを用いて定量的 RT - PCR 法を行った。

#### 4. MyHC タンパク質の発現量に対する検討

抗 MyHC 1 抗体、抗 MyHC 2x 抗体、抗 MyHC 2a 抗体を用いた WB 法を行うことにより、これらのタンパク質の発現量を検討したところ、type 1 線維に発現する MyHC 1 は非偏位側に比べて偏位側で発現量が有意に多かった (図 6 A)。一方、type 2x 線維に発現する MyHC 2x は非偏位側に比べて偏位側で発現量が多い傾向にあったが、有意差は認められなかった (図 7 B)。なお、抗 MyHC 2a 抗体による WB 法では、type 2a 線維で発現する MyHC 2a は確認することができなかった。

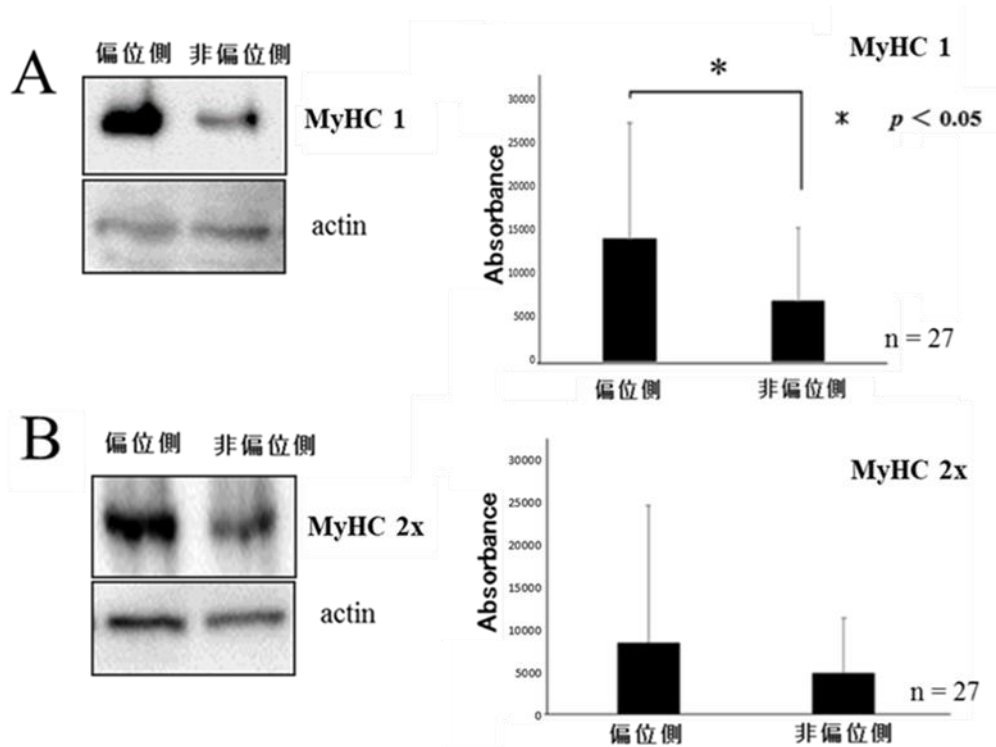


図 6 :MyHC タンパク質の発現量に対する検討

偏位側と非偏位側の咬筋に対して、細胞破碎液を調整し、図に示すタンパク質に対する抗体を用いて WB 法を行った。抗 MyHC 1 抗体 (A) および抗 MyHC 2x 抗体 (B) により発現しているタンパク質を抽出した。また、それぞれのバンドに対して画像解析ソフト (Image J) により定量的解析を行った。

## 小 括

下顎非対称を伴う骨格性下顎前突症患者咬筋の形態的ならびに分子生物学的性状について解析を行い、以下の結果を得た。

- (1) CT 画像での咬筋形態は対照群に比べ薄い傾向が認められたが、偏位側と非偏位側では有意な差は認められなかった
- (2) IHC 染色における筋線維 type の検討では type 1 線維数の割合は非偏位側に比べて偏位側で低かった。
- (3) 定量的 RT-PCR 法における mRNA の発現解析では、偏位側で *MYH 2* (type 2a 線維) の発現量の上昇、対照群で *MYH 8* (胎児期骨格筋線維) の発現量の上昇が認められた。
- (4) WB 法による MyHC 1 と MyHC 2 の発現解析では、非偏位側に比べ MyHC 1 の発現量が偏位側の方で多かった。

## 考 察

顎変形症に対する外科治療は 1849 年に HULLIHEN が下顎前歯部歯槽骨切り術を行ったことに始まり (19)、それ以来多くの手術法が発表されるようになった。しかし 1957 年に Obwegeser 法が報告され (20)、改良法である Obwegeser-Dal Pont 法が 1961 年に報告 (21) されて以来、基本術式や治療法には大きな変化はない。すなわち、顎変形症の治療は生じ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療法的な治療が主体であり、原因療法は行えないのが現状である。多くの疾患がそうであるように、顎変形症においても遺伝的要因と環境的要因が病態の形成に関与すると考えられるが、下顎前突症は比較的遺伝的素因の関与が高いと言われており (22,23)、さらに特定の人種に多い顎変形も報告されている (24-26)。近年、顎変形症の遺伝子型を検討した報告が散見され、特に筋の重要な構成成分であるミオシンの一部をコードする ミオシン1H (*MYO1H*) の 1 塩基多型と下顎前突症の関連が示唆されている (27-30)。また、そのほかに線維芽細胞増殖因子 (FGF) / 線維芽細胞増殖因子受容体 (FGFR) や 成長ホルモン放出ホルモン (GHR) と下顎前突の関連も示唆されている (31)。下顎後退や顔面非対称に関する報告数は少ないものの、骨格性 III 級とは異なる遺伝子の関連性が示唆されている (32,33)。また、責任遺伝子が同定されているいくつかの遺伝子疾患においても、顎骨の形態的異常を生じることは広く知られるところである。例えば、Runt 関連転写因子 (*RUNX 2*) 遺伝子の変異により生じる鎖骨頭蓋異骨症は、鎖骨の形成不全や頭蓋骨の異常だけでなく、多数歯の埋伏や中顔面の劣成長と反対咬合を生じるため、特徴的な顔貌や咀嚼障害、歯列不全などの機能障害を来す (34)。

一方で、顎変形症患者では、両親や兄弟、親族などに同様の症状がない症例も多く、一卵性双生児においても顎骨形態の表現型に違いが認められることがある。このことから、遺伝的要因のみならず環境的要因に起因する顎変形症も存在すると思われ、特に下顎の非対称が生じる原因としては周囲に付着する筋組織の性状や、神経筋機構による筋のバランスが関与している可能性を考えた。筋に対する作用として生理的な神経筋機能の影響が考えられるが (35)、本研究では左右の筋バランスの違いが姿勢などの全身的な状態に影響する可能性を考え、まず下顎非対称症例における下顎の偏位と脊柱側弯や頭部傾斜の関連性を調べた (36,37)。その結果、下顎非対称患者では下顎の偏位と脊柱側弯、下顎の偏位と頭部傾斜の間に相関があり、下顎が右方に偏位すると、瞳孔線は時計廻りに回転し、下顎の偏位と同方向に頭部が傾斜する傾向が認められた。興味深いことに、外科矯正手術後では、この傾きが改善する傾向が認められた。形態的な不均衡を緩和することにより、本来機能すべき周囲の咀嚼筋が活性化され、頭蓋を支える頸部周囲組織のバランスを改善させたことにつながったのではないかと推察した。

一方、下顎非対称患者の咬筋性状の左右差について、筋力は筋の断面積に比例する (38) ことから形態的な不均衡があると予測したが、CT 画像を用いた本研究では、偏位側と非偏位側間には有意な差は認められなかった。しかしながら、いずれも対照群よりは小さいことが明らかになった。下顎非対称患者において咬筋の体積に左右差はないとの報告もあり (39)、形態的ではなく機能的あるいは質的な左右差があることが考えられた。骨格性 III 級症例の咬合状態は、下顎が前方に誘導されることから垂直的な咬合力が分散され、咬合力が低下する (40) とされており、本研究結果

でも患者群で両側とも咬筋が薄い傾向が認められた原因と考えられた。

形態的な左右差がなかったことから、本研究では質的な咬筋の左右差を検討するため、いくつかの分子生物学的手法を用いて解析を行った。すなわち、手術により採取した咬筋組織に対して、速筋と遅筋の存在を意味する抗 MyHC 抗体を用いた IHC 染色法と、定量的 RT-PCR 法を用いた mRNA 発現量や WB 法を用いたタンパク質発現量の検討を行った。

IHC 法による解析では、偏位側で type 2 (速筋) 線維の有意な増加が認められ、またこの染色に基づいた筋線維面積の比較検討では、type 1 線維、type 2 線維で有意差はなかった。筋力は断面積に相関するものの個人差が大きく、筋線維の組成をはじめ様々な因子が関与していると考えられる (41)。元々偏位側で type 2 が多く、そのために筋力も強くショートフェイスの傾向があり、非偏位側でロングフェイスかつ骨格性 III 級傾向が強いことが考えられた。しかしながら、mRNA の発現量においては、*MYH 7* (type 1 線維) の発現量には各群間に差はなかった。*MYH 1* (type 2x 線維) でも各群間に差はなく、*MYH 2* (type 2a 線維) では、対照群と比べて偏位側で発現量が多かった。筋線維は持続的な負荷やトレーニングにより、筋肥大とともに type 2x から type 2a、あるいは type 1 へ変化する遅筋化と呼ばれる現象がおこる (42)。このことから、偏位側では type 2x から type 2a へ組織性状の変化が生じ、遅筋化が進行している可能性が考えられた。これは偏位側での偏咀嚼があり咬合力が左右で均等に負担できていないことが要因の一つかもしれない。本研究では、*MYH 8* 遺伝子は対照群に比べて偏位側、非偏位側ともに発現量が少ない傾向があった。*MYH 8* は他の骨格筋では成人にはほとんど発現が認められないタンパク質であり、咀嚼筋に特有の現象と

されている (43)。MYH8 は周産期型の MyHC をコードしており、筋の損傷や環境の変化に適応するための再生力の一部を反映している可能性がある。骨格性 III 級の顎変形症患者では筋の再生力が健常人に比べて劣っている。すなわち環境の変化に対する適応力に乏しい可能性が考えられた。この様な筋の性状変化は、咀嚼筋のみに生じ、非対称性であることから、遺伝子配列で規定される制御機構で決定されているというよりは、後天的な環境や生活習慣によるところも大きいと考えられる。近年、デオキシリボ核酸 (DNA) の塩基配列には変化を伴わず、遺伝子発現を制御するエピジェネティック制御機構による新たな遺伝子発現の制御機構が明らかになりつつある (44)。これは、DNA のメチル化やヒストンの化学的修飾、非翻訳性リボ核酸 (RNA) などで遺伝子発現を制御する機構である。また、タンパク質の発現過程における翻訳後修飾と呼ばれる化学的修飾により、タンパク質の生合成が変化する反応もある。こうした修飾は遺伝子配列に依存せず、悪習癖などにより持続的な作用を受けている局所環境において生じる可能性が考えられる。

顎骨の変形が咀嚼筋へ影響をおよぼすのか、咀嚼筋の性状変化が骨格形態へ影響するのか、本研究結果のみでは結論づけることはできない。しかし本研究を発展させることで顎変形症の原因解明や新たな治療戦略の立案が可能になることが期待される。

## 結 語

下顎非対称を伴う顎変形症患者では、頭部傾斜や脊柱側弯など、姿勢の非対称も惹起することが示唆された。また、下顎非対称を伴う下顎前突症患者では、咬筋の形態には左右差はないものの、偏位側では非偏位側と比較して遅筋型の type 1 線維数の減少や関連タンパク合成の変化がみられることが明らかとなった。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、御校閲を頂きました 森 悦秀 教授に謝意を表します。また、本研究の課題を与え、実験方法や研究に対する姿勢など、直接指導頂きました 山田 朋弘 准教授、杉山 悟郎 博士に深謝致します。また、研究材料や手技に関するご支援、ご指導頂きました 麻布大学 獣医学部 動物応用科学科 水野谷 航 准教授に深謝致します。そして、様々な御助言頂きました 九州大学大学院 歯学研究院 口腔保健推進学講座 歯科矯正学分野 高橋 一郎 教授、九州大学大学院 歯学研究院 口腔顎顔面病態学講座 口腔顎顔面外科学分野の教官各位、研究室の皆様、研  
究生活を支えてくださった全ての皆様方に、心から深く感謝致します。

## 参 考 文 献

1. Posnick JC, Hereditary, developmental, and environmental influences on the formation of dentofacial deformities. *Orthognathic Surg-E-BOOK Principles and Practice* 1e. Saunders:3344-4376, 2013
2. Harris EF, Johnson MG, Heritability of craniometric and occlusal variables:a longitudinal sib analysis. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 99:258-268, 1991
3. Litton SF, Ackerman LV, Issacson RJ, Shapiro BL, A genetic study of Class III malocclusion. *Am J Orthod* 58:565-577, 1970
4. Fraenkel R, The treatment of Class II, Division 1 malocclusion with functional correctors. *Am J Orthod* 55(3):265-275, 1969
5. Morel C, Botteron S, Kiliaridis S, Dentofacial characteristics of growing patients with duchenne muscular dystrophy. a morphological study *Euro J Orthod* 29:500–507,2007
6. Akihiko S, Skeletal Muscle Structure. *Rigakuryoho Kagaku* 18(1):49-53, 2003
7. Sohn, R. L, Vikstrom, K. L, Strauss, M, Cohen, C, Szent-Györgyi, A. G and Leinwand, L. A, *J. Mol. Biol.* 266:317-330, 1997
8. Smerdu V, Karsch-Mizrachi I, Campione M, Leinwand L, Schiaffino S, Type IIx myosin heavy chain transcripts are expressed in type IIb fibers of human skeletal muscle. *Am J Physiol* 267:C1723-8, 1994
9. Sano R, Tanaka E, Korfage JA, Langenbach GE, Kawai N, Eijden TM, Tanne K, Heterogeneity of fiber characteristics in the rat masseter and digastric muscles. *J Anat* 211: 464-470, 2007
10. Tanaka E, Sano R, Kawai N, Korfage JA, Nakamura S, Izawa T, Langenbach GE, Tanne K, Regional differences in fiber characteristics in the rat temporalis muscle. *J Anat* 213: 743-748, 2008
11. Kawai N, Sano R, Korfage JA, Nakamura S, Tanaka E, van Wessel T, Langenbach GE, Tanne K. Functional characteristics of the rat jaw muscles: daily muscle activity and fiber type composition. *J Anat* 215:656-662, 2009
12. Sciote JJ, Rowleron AM, Hopper C, Hunt NP, Fibre type classification and myosin isoforms in the human masseter muscle. *J Neurol Sci* 126(1):15-24, 1994
13. Korfage JA, Koolstra JH, Langenbach GE, van Eijden TM, Fiber-type composition of the

- human jaw muscles - (part 1) origin and functional significance of fiber-type diversity. *J Dent Res* 84:774-783, 2005
14. Korfage JA, Helmers R, Matignon Mde G, van Wessel T, Langenbach GE, van Eijden TM, Postnatal development of fiber type composition in rabbit jaw and leg muscles. *Cells Tissues Organs* 190(1):42-52, 2009
  15. Rowlerson A, Raoul G, Daniel Y, Close J, Maurage CA, Ferri J, Fiber-type differences in masseter muscle associated with different facial morphologies. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 127 (1):37-46, 2005
  16. Van Spronsen P.H, Long-Face Craniofacial Morphology Cause or Effect of Weak Masticatory Musculature? *Semin Orthod* 16(2):91-162, 2010
  17. Sawano S, Komiya Y, Ichitsubo R, Ohkawa Y, Nakamura M, Tatsumi R, A One Step Immunostaining Method to Visualize Rodent Muscle Fiber type within a Single Specimen. *PLOS ONE* 11(11):e0166080, 2016
  18. James O. Marx, William J. Kraemer, Lars Larsson, Effects of Aging on Human Skeletal Muscle Myosin Heavy-Chain mRNA Content and Protein. *J Gerontology BIOLOGICAL SCIENCES* 57(6): B232–B238, 2002
  19. Hullihen SP, Case of elongation of the under jaw and distortion of the face and neck, caused by a burn, successfully treated. *Am J Dent Sci* 9:157-165, 1849.
  20. Trauner R, Obwegeser H, The surgical correction of mandibular prognathism and retrognathia with consideration of genioplasty. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 10(7):677-89, 1957
  21. Dol Pont G, Retromolar osteotomy for the correction of prognathism, *J Oral Surg Anesth Hosp Dent Service* 19:42-47, 1961.
  22. Harris EF, Johnson MG, Heritability of craniometric and occlusal variables:a longitudinal sib analysis. *Am J Orthod Dentofac Orthop* 99:258-268, 1991
  23. Doraczynska-Kowalik A, Nelke KH, Pawlak W, Sasiadek MM, Gerber H, Genetic Factors Involved in Mandibular Prognathism. *J Craniofac Surg* 28(5):e422-431, 2017
  24. Yamaguchi, T, Park, SB, Narita, A, et al, Genome-wide linkage analysis of mandibular prognathism in Korean and Japanese patients. *J Dent Res* 84:255-259, 2005
  25. Williams MD, Sarver DM, Sadowsky PL, Bradley E, Combined rapid maxillary expansion and protraction facemask in the treatment of Class III malocclusion in growing children: a prospective long-term study. *Semin Orthod* 3:265-274, 1997

26. Lew KK, Foong WC, Loh E, Malocclusion prevalence in an ethnic Chinese population. *Aust Dent J* 38:442-449, 1993
27. He S, Hartsfield JK, Guo Y, Cao Y, Wang S, Chen S, Association between CYP19A1 genotype and pubertal sagittal jaw growth. *Am Journal Orthod Dentofacial Orthop* 42(5):662-670, 2012
28. Tassopoulou-Fishell M, Deeley K, Harvey E, Sciote J, Vieira AR, Sciote Genetic variation in Myosin 1H contributes to mandibular prognathism. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 141(1):51-59, 2012
29. Cruz CV, Mattos CT, Maia JC, Granjeiro JM, Reis MF, Mucha JN, Vilella B, Ruellas AC, Luiz RR, Costa MC, Vieira AR, Genetic polymorphisms underlying the skeletal Class III phenotype. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 151(4):700-707, 2017
30. Cunha A, Nelson-Filho P, Marañón -Vásquez GA, Ramos AGC, Dantas B, Sebastiani AM, Silvério F, et al, Genetic variants in ACTN3 and MYO1H are associated with sagittal and vertical craniofacial skeletal patterns. *Arch Oral Biol* 97:85-90, 2019
31. Xiong X, Li S, Cai Y, Chen F, Targeted sequencing in FGF/FGFR genes and association analysis of variants for mandibular prognathism. *Medicine (Baltimore)* 96(25):e7240, 2017
32. Balkhande PB, Lakkakula BVKS, Chitharanjan AB, Relationship between matrilin-1 gene polymorphisms and mandibular retrognathism. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 153(2):255-261, 2018
33. Nicot R, Hottenstein M, Raoul G, Ferri J, Horton M, Tobias JW, Barton E, Gelé P, Sciote JJ. Nodal pathway genes are down-regulated in facial asymmetry. *J Craniofac Surg* 25(6): e548-555, 2014
34. Takehiko S, Missense Mutation in the RUNX 2 Gene in A Patient with Cleidocranial Dysplasia. *Pediatric Dent J* 43(5):583-590, 2005
35. Paya-Argoud M, Tardieu C, Cheynet F, Raskin A, Borel L, Impact of orthognathic surgery on the body posture. *Gait Posture* 67:25-30, 2019
36. Nakashima A, Nakano H, Yamada T, Inoue K, Sugiyama G, Kumamaru W, Nakajima Y, Sumida T, Yokoyama T, Mishima K, Mori Y, The relationship between lateral displacement of the mandible and scoliosis. *Oral Maxillofac Surg* 21(1):59-63, 2017
37. Nakashima A, Yamada T, Nakano H, Sugiyama G, Sugi T, Kamata YU, Sumida T, Mori Y, Jaw asymmetry may cause bad posture of the head and the spine-a preliminary study. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine and Patho* 30(3):242-246, 2018

38. Ryuhei T, Tetsuo F, Influence of muscle fiber composition and muscle cross sectional area on maximal isometric strength. *J Phys Fit Sports Med* 35 (3) :168-174, 1986
39. Takanori W, Kooji H , Takafumi H , Isao S, Volum measurement of masseter muscle using volume rendering technician jaw deformity patients with mandibular deviation. *Niigata Dent J* 36(2):25-30, 2006
40. Nagai I, Suyama T, Tanaka N, Ide T, MiyazakiA, Takemura K, Kohama G, Use of a pressure-sensitive sheet to evaluate occlusal status in patients with mandibular prognathism. Comparison between normal occlusion and malocclusion, and changes after orthognathic surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 46:9-15, 2000
41. Sciote JJ, Rowleron AM, Hopper C, Hunt NP, Sciote Fibre type classification and myosin isoforms in the human masseter muscle. *J Neurol Sci* 126(1):15-24, 1994
42. Pette D, Staron RS, Cellular and molecular diversities of mammalian skeletal muscle fibers. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol* 116:1–76, 1990
43. Oukhai K, Maricic N ,Schneider M, Harzer W, Tausche E, Developmental myosin heavy chain mRNA in masseter after orthognathic surgery:a preliminary study.*J Craniomaxillofac Surg* 39:401-406, 2011
44. Huh A, Horton MJ, Cuenco KT, Raoul G, Rowleron AM, Ferri J, Sciote JJ, Sciote Epigenetic influence of KAT6B and HDAC4 in the development of skeletal malocclusion. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 144(4):568-576, 2013