

令和 4 年 6 月 28 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K17191

研究課題名(和文) iPS細胞由来5-HT受容体発現神経細胞による睡眠時咀嚼筋活動の発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of sleep masticatory muscle activity using iPS cell-derived 5-HT receptor-expressing neurons.

研究代表者

戸澤 有理恵 (Tozawa, Yurie)

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：70783356

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：SB(睡眠時ブラキシズム)の発症機序は未だに明らかでない。先行研究においてSBとセロトニン2A受容体遺伝子(HTR2A)の遺伝子多型(SNP)との関係を明らかにした。本研究ではそれらが受容体機能に及ぼす影響について神経生理学的解析を行うため、ヒトiPS細胞由来HTR2A陽性神経細胞に特異的な機能解析システムを構築することに成功した。今後、この解析システムを応用し、SB特異的な電気生理学的パラメーターを検出することができれば、発症機序の解明と治療薬の開発に繋がると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠時ブラキシズム(SB)は睡眠関連運動障害の一種であり、その過大な咬合力は患者のQOLを著しく損なう可能性があり、歯科治療の予後を考える上でSBのマネジメントは非常に重要であると言える。本研究にて構築された解析システムは、ヒトiPS細胞の技術を応用することで、これまで直接的な検証は困難とされていた、脳内に存在するターゲットに対するアプローチを可能とした。また、研究のターゲットとしているセロトニン2A受容体は様々な神経系疾患との関連も報告されていることから、本研究成果は歯科領域のみならず、医科領域への波及効果も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The pathogenic mechanism of SB (sleep bruxism) is still unclear. Our previous studies have clarified the relationship between SB and the single nucleotide polymorphism (SNP) of the serotonin 2A receptor gene (HTR2A). In this study, we successfully constructed a functional analysis system specific to human iPS cell-derived HTR2A-positive neurons in order to perform neurophysiological analysis. In the future, if this analysis system can be applied to detect SB-specific electrophysiological parameters, it is expected to lead to the elucidation of the pathogenic mechanism and the development of therapeutic agents.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：睡眠時ブラキシズム ヒトiPS細胞 セロトニン2A受容体 rs6313 レポーターレンチウイルス ホールセルパッチクランプ解析 一塩基多型

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

睡眠時ブラキシズム(SB)の為害作用

睡眠中の過剰な咀嚼筋運動を示すSBの影響は顎口腔系に破壊的に作用する可能性がある。特に補綴歯科領域においては治療予後や患者 QOL を左右する重要なファクターで、その臨床診断の精度改善と新規治療法の提案が求められている。

セロトニン受容体遺伝子と咀嚼筋活動の上昇

申請者らはゲノム DNA の変異に着目し、セロトニン 2A (5-HT2A) 受容体遺伝子の一塩基多型 (SNP: Single Nucleotide

Polymorphisms) である rs6313 C アレルと SB との関連を報告した (Abe *et al.* J Sleep Res, 2012・図 1)。SNP rs6313 はアミノ酸変化を生じないが遺伝子発現に影響し得るプロモーター領域の SNP rs6311 と完全連鎖不平衡にあるため、夜間咀嚼筋活動の上昇には 5-HT2A 受容体遺伝子発現の局所的影響が考えられる。

SB は交感神経活動に伴う短時間の覚醒反応(微小覚醒)に伴って生じるが、5-HT2A 受容体は脳幹背側縫線核領域の抑制性 GABA 作動性ニューロンの細胞体に局在し、GABA 作動性ニューロンは深いノンレム睡眠期において活発に活動する。申請者は、SB 発症仮説として SB 関連 SNP が 5-HT2A 受容体の発現量もしくは機能の低下を招き、細胞内からのカルシウム放出を減じ、GABA 作動性ニューロンのシナプス伝達が低下することで、微小覚醒の頻度を高め、脳幹に存在する三叉神経節を介した興奮性のシナプス伝達が優位となり、睡眠中の咀嚼筋活動を引き起こす可能性を考えている。事実、GABA と SB との関連性も報告されているが (Dharmadhikari, *et al.* Arch Oral Biol, 2015) 実証はされていない (図 2)。つまり 5-HT2A 受容体の機能解析で、これまで不明であった SB 発症のメカニズムの一端を細胞レベルで解明できる可能性がある。しかし、中枢神経系に存在する神経伝達物質の伝達経路を検討することは技術的に困難であった。

SB 特異的 iPS 細胞の樹立と 5-HT2A 発現神経細胞の誘導法の確立

そこで、申請者等は疾患特異的 iPS 細胞を用いて SB 発症メカニズムを細胞レベルで解明することを目的とした研究に着手し、2016 年に SB リスク因子である rs6313 遺伝子型を有する SB 患者、有さないコントロール各 3 名の末梢静脈血から iPS 細胞を樹立し、これらの iPS 細胞をセロトニン神経細胞が高発現している縫線核領域へと領域特異的に誘導することにより、5-HT2A 受容体遺伝子を発現する神経細胞を誘導することに成功している (Hoashi, *et al.* J Prosthodont Res, 2017)。この技術は共同研究機関である慶應義塾大学生理学教室にて開発され (Imaizumi *et al.* Stem Cell. 2015)、申請者等によって初めてセロトニン神経領域へと応用されたものである。

また、5-HT2A 受容体遺伝子のプロモーター領域下流に GFP を挿入したレポーターレンチウ

図 1 iPS 細胞を用いた SB 疾患モデル

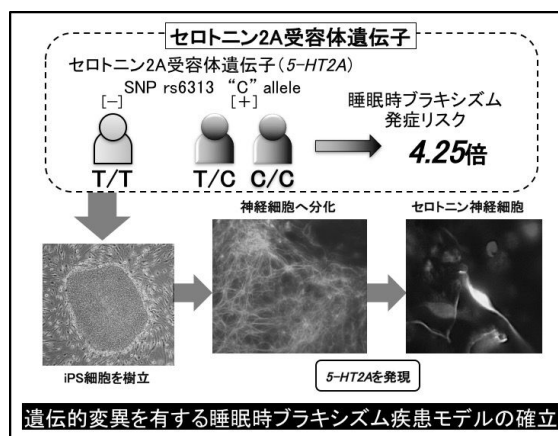
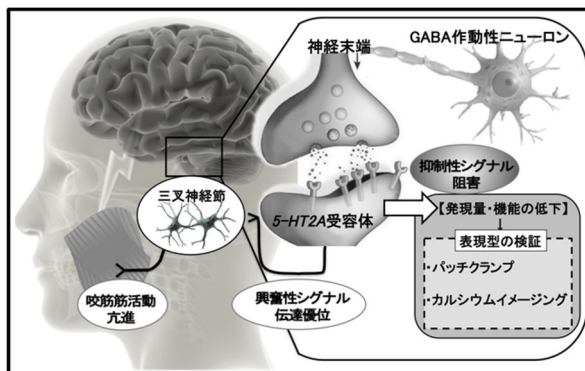


図 2. 中枢神経系と睡眠時ブラキシズム発生との関連性



ウイルスを作製し、iPS 細胞に導入することで、神経細胞分化誘導後に様々なサブタイプの神経細胞が混在している状態から、5-HT_{2A} 発現神経細胞を濃縮する技術を開発した。作製に成功した、睡眠時ブラキシズム特異的 iPS 細胞から分化誘導した *5-HT_{2A}* 受容体発現神経細胞の表現型定量化のために微小電極測定やパッチクランプ法により電気生理学的な異常を検出することができ、さらに既存の公的化合物ライブラリを利用して疾患特異的 iPS 細胞誘導細胞の表現型を回復可能な化合物のスクリーニングを行い、創薬のための基盤を整備することが可能となると考える。

以上の背景から、申請者らが明らかにした、睡眠時ブラキシズムに関連する SNP の研究成果を基に、**睡眠時ブラキシズムの疾患特異的 iPS 細胞由来、5-HT_{2A} 受容体発現神経系細胞の電気生理学的検討を行って、*in vitro* での表現型の検証とその睡眠時ブラキシズム発症メカニズムの解明を目指す**研究計画を立案した。

2. 研究の目的

本研究では、SB 群、コントロール群それぞれの iPS 細胞を樹立し、樹立した iPS 細胞から誘導した 5-HT_{2A} 受容体遺伝子発現 GABA 作動性神経細胞における 5-HT_{2A} 受容体遺伝子の発現量を確認すると共に、形態ならびに電気生理学的機能解析を行い、SNP の違いによる表現型の違いを検出することで、ハイスループットな解析システムを行なうための基盤を整備することを目的とした。

3. 研究の方法

神経細胞の分化誘導

被験者は先行研究で用いたコントロール株の iPS 細胞を用いた。このコントロールとなった被験者は、SB の臨床診断を行ったのち、睡眠ポリグラフ検査(PSG)によって確定診断のついた非 SB の健康成人(Control)で、rs6313(T102C)の遺伝子型同定により rs6313 の C アレル非保有者 (T/T homozygous)が確認された者である。なお、本研究実施にあたり昭和大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会 (179 号) 及び慶應義塾大学医学部倫理審査委員会 (2008016 号) の承認を得た。

このコントロール株の iPS 細胞を用い、ニューロスフェアからニューロンへと分化誘導を行なった(図 3)。分化誘導に際しては領域特異的分化誘導法を用い、Sonic hedgehog(Shh)にて背腹軸を、CHIR99021 にて前後軸を調整し、仮説のターゲットが存在するとされる後脳腹側へと誘導領域を調整した。分化誘導したニューロンにおけるマーカー発現を確認するため、リアルタイム PCR と免疫染色を行った。また、*5-HT_{2A}* 受容体遺伝子特異的なレポーターレンチウイルスで濃縮したニューロンのサンプルを用いて、シングルセル RNA-seq を行い、ニューロンのポピュレーション解析を行った。

図 3. 分化誘導プロトコール

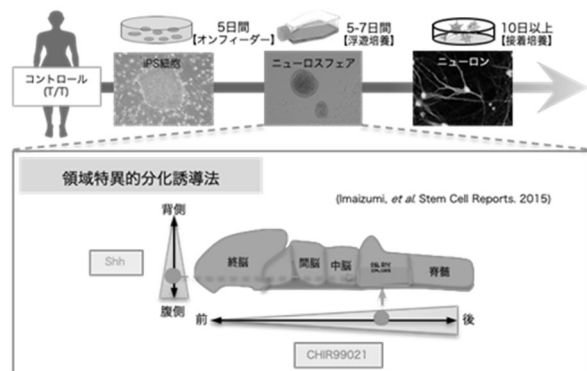
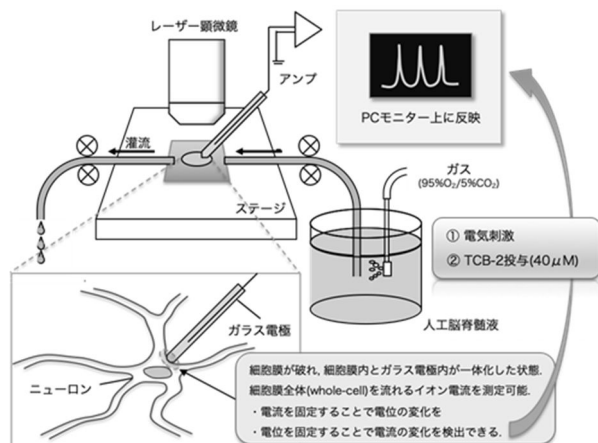


図 4. 電気生理学的記録(ホールセルパッチクランプ法)



電気生理学的解析

ホールセルパッチクランプ法(図4)を用いて、5-HT_{2A} 受容体遺伝子特異的なレポーターレンチウイルスにて標識した、標的ニューロンに対し電気刺激と、TCB-2(5-HT_{2A} 受容体選択的アゴニスト)の投与を行い、応答をそれぞれ観察した。

4. 研究成果

誘導した神経細胞の性質

リアルタイム PCR により、ニューロスフェアへの誘導後 31・41・51 日目の遺伝子発現を解析した結果、ニューロンは接着培養後 51 日目に、5-HT_{2A} 遺伝子の有意な増加を認めた(図5)。免疫染色による結果を図6に示す(抗 5-HT_{2A} 抗体、抗 MAP2 抗体、これらと核の重ね合わせ像)。これにより 5-HT_{2A} 受容体発現ニューロンの存在を認めた。またこの結果をもとにターゲットニューロンの誘導効率を算出したところ、約 32%であった。

図5. リアルタイム PCR による遺伝子発現解析

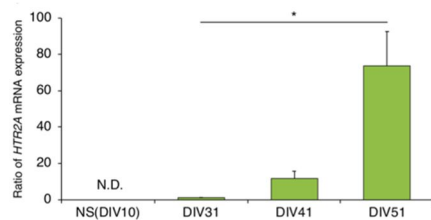
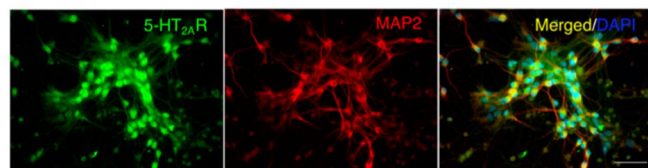
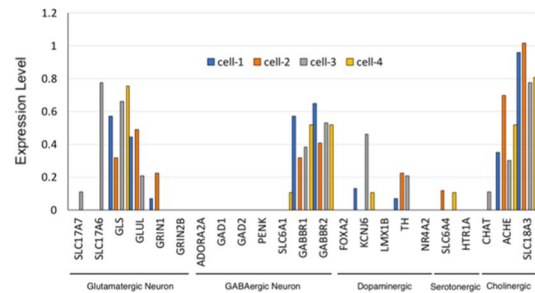


図6. 免疫染色による各種マーカーの発現解析



またシングルセル RNA-seq の結果、レポーターレンチウイルスにより濃縮された標的ニューロン集団はグルタミン酸作動性、GABA 作動性、コリン作動性ニューロンマーカーを高発現していることが明らかになった(図7)。

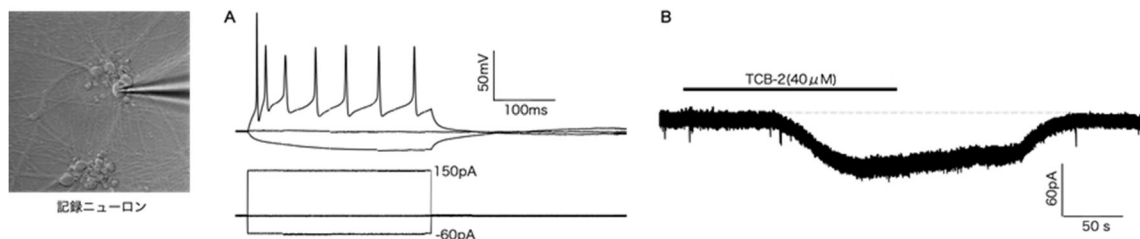
図7. シングルセル RNA-seq による遺伝子発現解析



電気生理学的解析

ホールセルパッチクランプ法により、ターゲットニューロンに過分極性の電気刺激(-60pA)を与えたところ、過分極を生じた。さらに、脱分極性の電気刺激(150pA)を与えたところ、連続発火を認めた(図8A)。次に、TCB-2(40 μM)を投与し、電流変化を記録したところ、内向き電流の発生を認め、5-HT_{2A} 受容体を介した、脱分極性の応答が示唆された(図8B)。

図8. 電気刺激, TCB-2 に対するニューロンの電気生理学的応答



本研究では、iPS 細胞から 5-HT_{2A} 受容体発現ニューロン集団への分化誘導に成功した。また 5-HT_{2A} 受容体遺伝子特異的なレポーターレンチウイルスを応用し、ホールセルパッチクランプ法を用いることで電気生理学的活動記録を行い、SNP による機能差異を検証するためのモニタリングシステムを構築した。

5. 主な発表論文等

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

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Hoashi Yurie, Okamoto Satoshi, Abe Yuka, Matsumoto Takashi, Tanaka Junichi, Yoshida Yuya, Imaizumi Kent, Mishima Kenji, Akamatsu Wado, Okano Hideyuki, Baba Kazuyoshi | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Generation of neural cells using iPSCs from sleep bruxism patients with 5-HT2A polymorphism | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Prosthodontic Research | 6. 最初と最後の頁 415 ~ 421 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jpjor.2016.11.003 | 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 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Nakai Kento, Shiga Takahiro, Yasuhara Rika, Sarkar Avijite Kumer, Abe Yuka, Nakamura Shiro, Hoashi Yurie, Kotani Keisuke, Tatsumoto Shoji, Ishikawa Hiroe, Go Yasuhiro, Inoue Tomio, Mishima Kenji, Akamatsu Wado, Baba Kazuyoshi | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 In vitro monitoring of HTR2A-positive neurons derived from human-induced pluripotent stem cells | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 15437 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-95041-3 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 中井健人, 安部友佳, 帆足有理恵, Avijite Kumer Sarkar, 小溪啓介, 松本貴志, 安原理佳, 美島健二, 中村史朗, 井上富雄, 志賀孝宏, 赤松和土, 馬場一美 |
| 2. 発表標題 睡眠時ブラキシズム特異的iPS細胞由来GABA作動性神経細胞の電気生理学的評価 |
| 3. 学会等名 日本補綴歯科学会 第128回学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Nakai K, Abe Y, Hoashi Y, Nakamura S, Shiga T, Avijite K S, Yasuhara R, Matsumoto T, Kotani K, Inoue T, Mishima K, Akamatsu W, Baba K |
| 2. 発表標題 Patch-clamp recordings of neurons induced from sleep bruxism patient-specific iPSCs |
| 3. 学会等名 97th General Session & Exhibition of the IADR (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Nakai K, Abe Y, Shiga T, Hoashi Y, Nakamura S, Avijite K S, Yasuhara R, Matsumoto T, Kotani K, Inoue T, Mishima K, Akamatsu W, Baba K |
| 2. 発表標題 ELECTROPHYSIOLOGICAL RECORDINGS OF NEURONS DERIVED FROM SLEEP BRUXISM PATIENT-SPECIFIC IPSCS |
| 3. 学会等名 ISSCR 2019 Annual Meeting (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 中井健人, 安部友佳, 帆足有理恵, 小溪啓介, 松本貴志, 安原理佳, 美島健二, 中村史朗, 井上富雄, 馬場一美 |
| 2. 発表標題 iPS細胞を用いた睡眠時ブラキシズム病態解析モデルの確立 |
| 3. 学会等名 第66回昭和大学学士会総会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 中井健人, 小溪啓介, Avijite K S, 帆足有理恵, 安部友佳, 松本貴志, 安原理佳, 美島健二, 中村史朗, 井上富雄, 赤松和土, 馬場一美 |
| 2. 発表標題 iPS細胞を用いた睡眠時ブラキシズムの病態解明と創薬に向けて |
| 3. 学会等名 第8回 補綴若手研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 帆足有理恵 |
| 2. 発表標題 iPS細胞研究は歯科補綴学にどのようにいかされるのか? |
| 3. 学会等名 第126回日本補綴歯科学会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Tozawa Y, Nakai K, Yoneima K, Tanaka J, Matsumoto T, Abe Y, Imaizumi K, Mishima K, AKamatsu W, Okano H, Baba K |
| 2. 発表標題 In vitro disease modeling for sleep bruxism using induced pluripotent stem cells |
| 3. 学会等名 The 65 th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research |
| 4. 発表年 2018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 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

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 |
|---------|---------|
| | |