

令和 5 年 6 月 11 日現在

機関番号：32622

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2022

課題番号：20K23092

研究課題名（和文）iPS細胞を用いた睡眠時ブラキシズム発症機序に関する神経機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the neural mechanisms underlying sleep bruxism using iPS cells

研究代表者

中井 健人（Nakai, Kento）

昭和大学・歯学部・兼任講師

研究者番号：00880444

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：睡眠時ブラキシズム(SB)の発症機序は未だ明らかではない。先行研究において、セロトニン2A受容体遺伝子(HTR2A)の一塩基多型がSBの発症リスクに關与することを報告した。本研究は、SB特異的iPS細胞由来HTR2A陽性ニューロンの定量的、定性的解析を行った。HTR2A陽性ニューロンは全細胞中の約24%で、これら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であることが明らかとなった。さらに、ホールセルパッチクランプ法を用いた解析を行い、能動的膜特性の一部パラメーターに有意差を認め、リスクアレルを有するiPS細胞(SB株)由来のニューロンの興奮性の増加が示唆された。

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る。そのため、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。本研究成果は、リスクアレルを有するSB患者の一部ニューロンの興奮性の変化を示唆するものであった。今後これらの異常パラメーターが細胞間ネットワークに及ぼす影響を検証、再現することができれば、治療薬開発など将来的な臨床応用にも寄与できると考える。また、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 pathogenesis of sleep bruxism (SB) is still unclear. Our previous studies reported that a single nucleotide polymorphism in the serotonin 2A receptor gene (HTR2A) is involved in the risk of developing SB. In this study, we performed quantitative and qualitative analysis of HTR2A-positive neurons derived from SB-specific iPS cells. About 24% of all HTR2A-positive neurons were found to be glutamatergic, GABAergic, and cholinergic neurons. Significant differences were observed in some parameters of active membrane properties, suggesting increased excitability of neurons derived from iPS cells of SB patient with risk alleles.

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

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の対処は患者の QOL 維持と向上に重要な検討課題である**

睡眠時ブラキシズム(SB: Sleep Bruxism)は、睡眠中の不随意閉口筋活動を主体とした睡眠運動障害の 1 つであり、これらは顎口腔系に破壊的に作用する(図 1)。歯科領域においては治療予後を左右する重要なリスクファクターとして明確に位置づけられているが、詳細な発症機序は明らかでない。



図 1. SB 患者の磨耗した歯列

**HTR2A の遺伝子多型は SB の発症リスクに關与する**

申請者の研究チームは過去に、**セロトニン 2A 受容体遺伝子(HTR2A)の一塩基多型** (SNP: Single Nucleotide Polymorphisms) である rs6313 C アレルと SB との関連を発見し、**リスクアレルを有するものは、SB の発症リスクが約 4.3 倍増加する**ことを報告した [Abe. J Sleep Res, 2012]. この SNP はタンパク質の変化を伴わない Silent SNP であるが、プロモーター領域の SNP rs6311 と完全連鎖不平衡の関係にある [Saiz. Psychiatr Genet, 2008]. そのため、リスクアレルの存在により、**HTR2A の発現が局所的に影響を受けている**可能性がある。

**脱抑制状態の発生が、SB 発症機序に關わる可能性がある**

**SB は睡眠中に觀察される微小覚醒とよばれる短時間の覚醒反応に伴って生じ**、セロトニン 2A 受容体(5-HT2A 受容体)はノンレム睡眠期に活性が増加する **GABA 作動性ニューロンの細胞体に存在する**。閉口筋運動を司る主体的存在である三叉神経運動ニューロンは、睡眠時は基本的に、GABA 作動性ニューロンからシナプス前性にその活動が抑制されている。よって、微小覚醒により GABA ニューロンの抑制機能が減弱し、**脱抑制状態が生まれることで SB が生じる**と考えられる(図 2)。実際に近年、SB 患者における GABA 作動性ニューロンの活動性低下を示唆する研究結果も報告されている [Fan. J Oral Rehabil, 2017]。また、コントロール群では微小覚醒が生じても SB は觀察されないことから、**HTR2A の SNP のアレル差が脱抑制のメカニズムに影響**している可能性は高い。しかしこれらの標的は脳内に存在することから、直接的な検証は困難とされてきた。

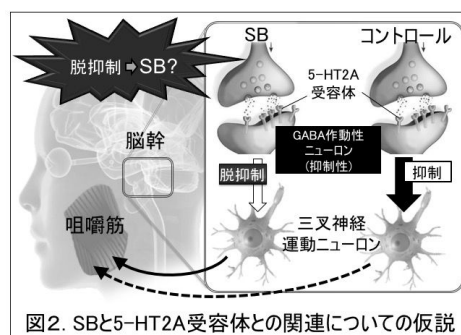


図2. SBと5-HT2A受容体との関連についての仮説

**ヒト iPS 細胞由来 HTR2A 陽性ニューロンのモニタリングシステムの構築**

上記課題に対応する為、申請者の研究チームは、**SB リスク因子である rs6313 C アレルを有する SB 患者、有さないコントロール各 3 名から iPS 細胞を樹立**し、それらを **HTR2A 陽性ニューロンへと分化誘導することに成功**した [Hoashi. J Prosthodont Res, 2017]. また申請者は、HTR2A プロモーター領域下流に ZsGreen(蛍光タンパク質)を挿入したレポーターレンチウイルスを作製し、様々なサブタイプが混在する状態から **HTR2A 陽性ニューロンを蛍光標識することに成功**した。さらにホールセルパッチクランプ法により、これらを **電気生理学的に機能解析することが可能なモニタリングシステ**

**ムの確立に成功**した。これらの技術を応用し、**標的ニューロンを特異的に調査し、SB 特異的な異常パラメーターを発見することができれば、SB 発症機序の解明に繋がる**と考え、本研究を立案した。

## 2. 研究の目的

本研究では、先行研究にて樹立された SB 特異的 iPS 細胞と、HTR2A 陽性ニューロンのモニタリングシステムを応用し、標的ニューロンに特異的な異常パラメーターを遺伝子発現解析・電気生理学的解析によって検出し、SB 発症機序の解明を目指す。

## 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 アレル非保因者 (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。**HTR2A** 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。

### 電気生理学的解析

コントロール株 iPS 細胞由来ニューロン(C-1, C-2, C-3), SB 株 iPS 細胞由来ニューロン(SB-1, SB-2, SB-3)を用い、ホールセルパッチクランプ法(図 4)を用いて、受動的膜特性と能動的膜特性をそれぞれ観察した。

## 4. 研究成果

図 3. 分化誘導プロトコール

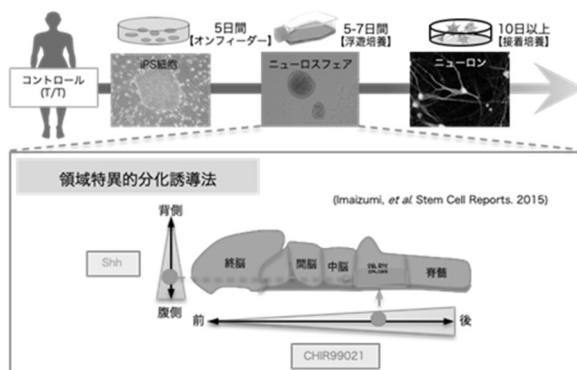
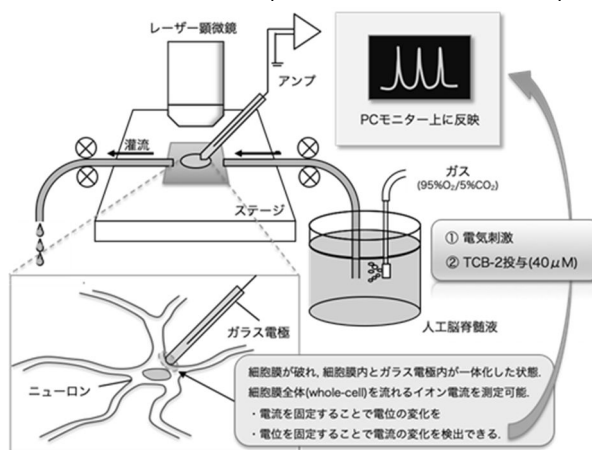


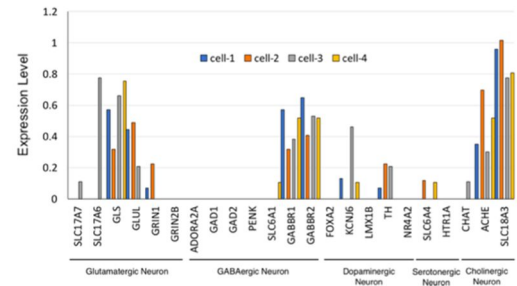
図 4. 電気生理学的記録(ホールセルパッチクランプ法)



## 誘導した神経細胞の性質

シングルセル RNA-seq の結果, レポーターレノ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 5).

図 5. 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

受動的膜特性の解析を行なった結果, 全ての細胞株において, RMP は経時的な過分極がみられ, また  $R_m$  と  $\tau_m$  は減少傾向がみられた, 一方  $C_m$  は増加傾向が認められた. これらの傾向は一般的なニューロンの成熟過程として報告されているものと同様であり, これらのパラメーターについて, SB とコントロール間での有意差は認められなかった(図 6). 続いて能動的膜特性と, 活動電位に関するパラメーターの評価を行った. その結果, SB 株のニューロンは, コントロール株のものに比較し, AP frequency の有意な増加, AP half duration の有意な減少が認められ, 興奮性が増していると示唆された(図 7, 8).

図 6. 受動的膜特性の比較

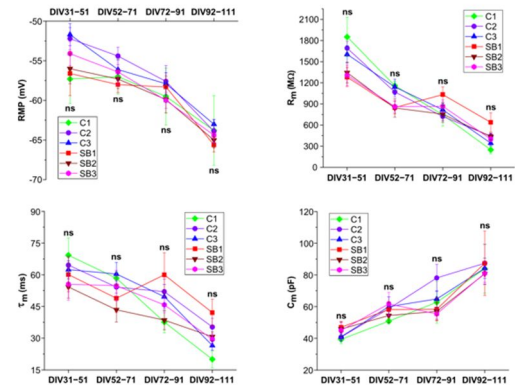


図 7. 活動電位関連パラメーターの比較

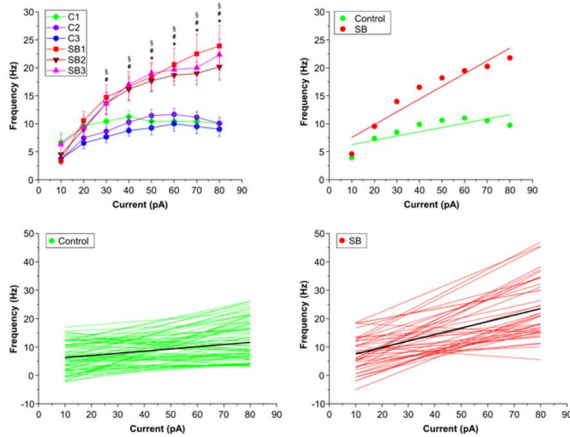
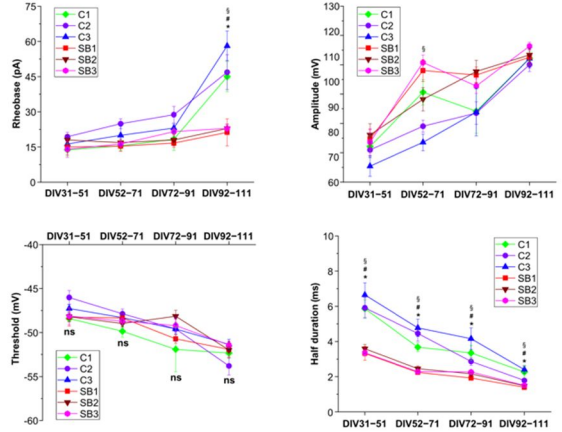


図 8. 能動的膜特性の比較



今後, これらの異常を示唆するパラメーターについて, ポピュレーションごとの検証を行い, また細胞間ネットワークに及ぼす影響を解明できれば疾患モデルの確立のみならず, 治療薬の開発などの臨床応用にも寄与できると考える.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1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 Avijite Kumer Sarkar, Shiro Nakamura, Kento Nakai, Taro Sato, Takahiro Shiga, Yuka Abe, Yurie Hoashi, Tomio Inoue, Wado Akamatsu, Kazuyoshi Baba	4. 巻 59
2. 論文標題 Increased excitability of human iPSC-derived neurons in HTR2A variant-related sleep bruxism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Stem Cell Res	6. 最初と最後の頁 Online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.scr.2022.102658	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0件

〔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
---------	---------