

令和元年6月14日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K20454

研究課題名(和文) 睡眠時ブラキシズムiPS細胞由来神経細胞におけるセロトニン神経伝達機構の検討

研究課題名(英文) Investigation of neurotransmission mechanism related to serotonin in neurons derived from sleep bruxism induced pluripotent stem cells

研究代表者

安部 友佳 (Abe, Yuka)

昭和大学・歯学部・講師

研究者番号：80614156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：睡眠時ブラキシズム(SB)により生じる力は顎口腔系に破壊的作用をもたらす患者のQOLを著しく低下させるが、その発生メカニズムは明らかでない。本研究の目的は、SB特異的iPS細胞を樹立してセロトニン(5-HT)2A受容体発現神経細胞へと誘導し、電気生理学的解析により疾患由来神経系細胞機能的差異を検討することである。SB群とControl群よりiPSCを樹立し5-HT2A受容体発現神経細胞を誘導した。電気生理学的解析にはパッチクランプ法を用い、5-HT2A受容体発現が確認されたニューロンに対し、過分極性の電気刺激を与えたところ過分極を生じ、さらに脱分極性の電気刺激を与えると連続発火が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

睡眠中の歯ぎしりが生じると、歯や顎に様々なトラブルが生じますが、現在のところ、歯ぎしりの発生するメカニズムはわかっていません。メカニズムが解明できれば、現在あるものよりも有効な治療法を考えることができ、歯科治療の選択肢が広がります。この研究は、iPS細胞技術を用いて歯ぎしりに関連する遺伝的な要因をもった神経細胞を作って調べたもので、その神経細胞が一定の活動電位を発生することが確認されました。この研究が将来さらに進めば、新たな治療法開発に繋がると考えています。

研究成果の概要(英文)：Mechanical stress of sleep bruxism (SB) is known to be responsible for poor prognosis of dental treatment and seriously compromises patients' quality of life, although the etiology of SB remains incompletely understood. The aim of this study is to elucidate the functional difference of 5-HT 2A receptor positive neurons between C and T allele carriers using electrophysiological recording of iPSC-derived neurons. Human iPSCs from SB and healthy controls were differentiated into neurons with the characteristics of the ventral hindbrain, where 5-HT2A positive neurons are enriched. By using qRT-PCR and immunostaining, we confirmed that iPSCs were successfully differentiated into 5-HT 2A receptor positive neurons. In the whole-cell patch-clamp recordings, the differentiated neurons generated repetitive action potentials in response to inward currents. These functional observations suggested that neurons differentiated from patient-specific iPSCs contained 5-HT 2A receptor positive neurons.

研究分野：補綴歯科学

キーワード：睡眠時ブラキシズム iPSC セロトニン

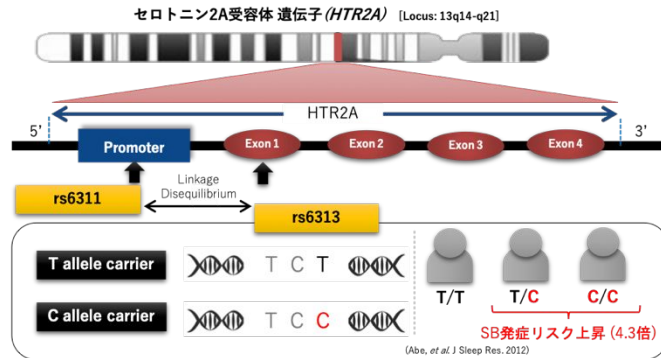
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

睡眠時ブラキシズム (SB) は咀嚼筋活動を主体とした非機能的運動で、睡眠中に行われる歯ぎしりとくいしばりの総称である。近年では、SB に起因するメカニカルストレスは補綴歯科治療の予後を左右する重要なリスクファクターとして位置づけられているが、その発症メカニズムは明らかではなく、効率的で高精度な臨床診断法や有効な原因療法は確立されていない。

先行研究により我々は環境要因と遺伝的要因を包括した睡眠時ブラキシズムリスク因子の探索的研究により、セロトニン (5-HT) 2A 受容体遺伝子 (*HTR2A*) の一塩基多型 (SNP: Single Nucleotide Polymorphism) である rs6313 が睡眠時ブラキシズムと有意に関連しており、rs6313 の C アレル保因者の SB 発症リスクが約 4 倍であったことを報告した (Abe *et al.* J Sleep Res. 2012, 図 1)。この SNP そのものはコードするアミノ酸

図1. 睡眠時ブラキシズム (SB) と *HTR2A*



変異を伴わないが、遺伝子発現に影響を与えるプロモーター領域に存在する SNP rs6311 と連鎖不平衡にあって、すなわち、睡眠時ブラキシズム患者ではセロトニン 2A 受容体遺伝子の発現が局所的に影響を受けている可能性が考えられた。ここで、SB は末梢性ではなく中枢性に生じることが示されており (Lobbezoo and Naeije. J Oral Rehabil. 2001)、睡眠時ブラキシズムと rs6313 の関連性を生理学的に追究するためには生体脳での検証が求められるが、技術的、倫理的問題により困難であった。そこで、人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 技術に着目した。近年、急速に進化した人工多能性幹細胞 (iPS 細胞) 技術は、再生医学領域のみならず精神神経医学的な疾患の発症メカニズムを明らかにする上で大きな役割を担いつつあり、疾患特異的 iPS 細胞を用いれば、セロトニン 2A 受容体の機能を検証可能である。

2. 研究の目的

本研究の目的は、睡眠時ブラキシズムに関連するセロトニン 2A 受容体遺伝子の一塩基多型 (SNP) の表現型を有する疾患特異的 iPS 細胞を樹立し、誘導したセロトニン 2A 受容体発現神経系細胞の *in vitro* での神経生理学的検討を行うことである。これにより、Ca²⁺情報伝達の関連する睡眠時ブラキシズム発症メカニズムの解明を目指すことである。

3. 研究の方法

(1) 被験者の選定

対象者に対して、本研究参加についての同意を得たのち、臨床兆候 (歯ぎしり音の指摘、歯の咬耗の程度と範囲、起床時の筋痛) に基づいた睡眠時ブラキシズムについてのスクリーニングを行った上で、睡眠ポリグラフ (PSG) 検査による確定診断を実施した。確定診断のついた SB 群と Control 群を対象に、末梢静脈血を採取して *HTR2A* gene SNP rs6313 (T102C) の遺伝子型 [T/T, T/C, C/C] を同定した。SB 群から rs6313 の C アレル保因者 (SB: C/C homozygous)、Control 群から rs6313 の C アレル非保因者 (Control: T/T homozygous) を選定し、被験者とした。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) の承認を得た。

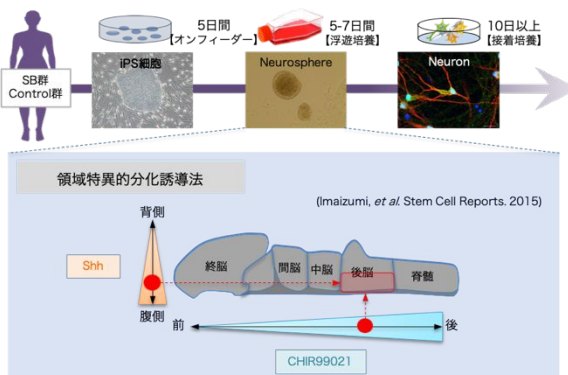
(2) iPS 細胞の作製

被験者の末梢静脈血から単離した末梢血単核球に、転写因子である OCT3/4, SOX2, KLF4, LIN28, L-MYC と Dominant-negative p53 をコード化した Episomal Reprogramming Vectors を遺伝子導入して iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞からそれぞれ 3 つの Cell Lines を選択し、クオリティチェック (未分化マーカー発現, 核型解析, 三胚葉分化の確認) を行った。さらに、樹立した iPS 細胞から DNA を抽出し、rs6313 の遺伝子型の解析を行なって、遺伝子型が保存されていることを確認した。

(3) *HTR2A* 発現神経細胞の作製と解析

iPS 細胞から神経細胞への誘導は、Wnt, RA, Shh シグナルを調節する薬剤濃度を変化させることで、中枢神経の前後軸、背腹軸に沿った領域特異的な神経細胞を誘導する今泉らの領域特異的分化誘導法 (Imaizumi K, *et al.* Stem Cell Reports. 2015) を用いた Shh にて背腹軸を、CHIR99021 にて前後軸を調整し、セロトニン作動性神経細胞や 5-HT_{2A} 受容体発現神経細胞が多く発現するとされる後脳腹側へと誘導領域を調整した (図 2)。

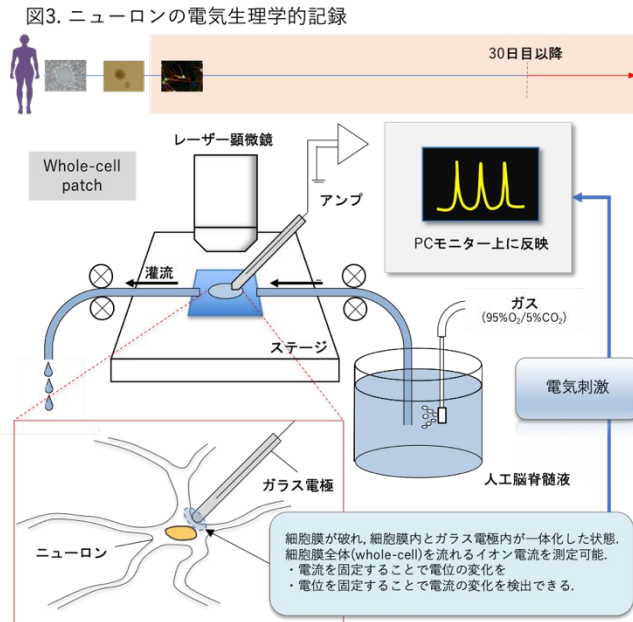
図2. ニューロンへの分化誘導



誘導したニューロンに対して、接着培養後 12 日目のニューロンを 4%PFA で固定し、5%FBS / 0.3% Triton (0.01% N2N) にてブロッキング・透過処理したのち、1 次抗体として抗 5-HT2A 受容体抗体マーカー (1:200, millipore) を用い、免疫染色を行ってターゲットニューロンの誘導効率を確認し、さらに、セロトニン作動性神経細胞が含まれることを確認するため、リアルタイム PCR を用いて HTR2A の発現について解析した。ポジティブコントロールにはヒトの脳皮質の cDNA を使用し、qRT-PCR 反応は triplicate で行い、比較 Ct 法を用いて解析した。HTR2A の発現レベルを、被験者の末梢静脈血より単離した末梢血単核球を IL-2 や抗 CD3 抗体によって増やした T 細胞、樹立した iPS 細胞、誘導した神経細胞で調べた。

(4) 神経細胞の電気生理学的記録

Whole-cell patch clamp 法を用いて、接着培養後 38 日目のニューロンに対して、電気刺激への応答をそれぞれ観察した (図 3)。

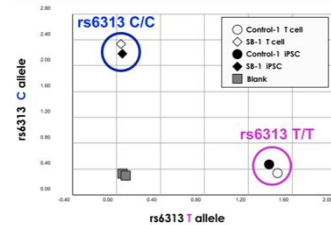


4. 研究成果

(1) iPS 細胞の作製

樹立した iPS 細胞クローンは、定型的なヒト ES 細胞と同様な形態をしており、未分化マーカー (OCT3/4, TRA1-81, SSEA-4) の発現が確認された。SB 群と Control 群の iPS 細胞における核型解析で、異常は認められなかった。AFP (内胚葉), α SMA (中胚葉), β -tubulin (成熟神経細胞) マーカーを用いて三胚葉分化が in vitro で確認された。これらより SB 群と Control 群の末梢血単核球から樹立した iPS 細胞は、未分化状態、多分化能を持つ iPS 細胞としての性質が確認された。SNP 解析では、初期化した iPS 細胞においても、SB 群、Control 群ともに SNP rs6313 遺伝子型が保存されていることが確認された (図 4)。

図4. iPS細胞の遺伝子型保存の確認



(2) 分化誘導されたセロトニン作動性神経細胞の確認と HTR2A の発現の確認

SB 特異的 iPS 細胞から縫線核領域に特有の神経細胞を誘導したところ、誘導されたニューロンにセロトニン作動性神経細胞が含まれることが免疫染色より確認できた (図 5)。さらに、これらのニューロンにおける HTR2A の発現レベルは、T 細胞、樹立した iPS 細胞と比較し、はるかに高い数値を示していた。また、リアルタイム PCR により、経時的には、ニューロンは接着培養後 30 日目に、5-HT2A 遺伝子の有意な増加を認めた (図 6)。

図5. 免疫染色による Serotonergic neuron の確認

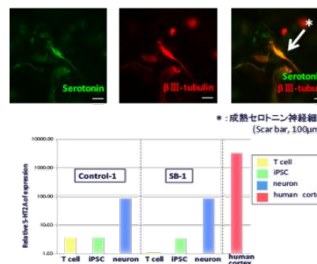
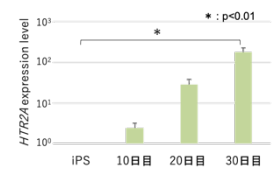


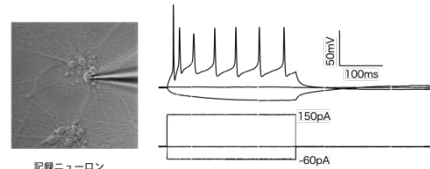
図6. リアルタイムPCRによるHTR2A発現の経時変化 (n=3, mean \pm SEM)



(3) Whole-cell patch による電気刺激に対するニューロンの電気生理学的応答の確認

Whole-cell patch により、Control 群の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、さらに、脱分極性の電気刺激(150pA)を与えると、連続発火が確認された (図 7)。

図7. Whole-cell patch における電気生理学的応答



(4) 今後の展望

本研究において iPS 細胞から 5-HT2A 受容体発現ニューロンを含むニューロン集団への分化誘導に成功し、電気生理学的活動を記録することができた。SNP による機能差異を検証するモデルとして、今回用いた実験系が有用であることが示唆された。しかし誘導されたニューロンには 5-HT2A 受容体を発現しないものや、ターゲット以外のニューロンも多く含まれるため、レポーターレンチウイルスを用い、標的ニューロンを同定して SB 株とコントロール株で比較検討することで、異常パラメーターの検出を試み、発症メカニズムにアプローチしたいと考えている。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3件)

Hoashi Y, Okamoto S, Abe Y, Matsumoto T, Tanaka J, Yoshida Y, Imaizumi K, Mishima K, Akamatsu W, Okano H, Baba K. Generation of neural cells using iPSCs from sleep bruxism patients with 5-HT2A polymorphism. J Prosthodont Res, 査読有, 61, 2017, pp242-250.

DOI: 10.1016/j.jpor.2016.11.003

Yoshida Y, Yoshizawa S, Sakai T, Suganuma T, Takaba M, Ono Y, Abe Y, Yoshizawa A, Nakamura H, Kawana F, Baba K. Association between patterns of jaw motor activity during sleep and clinical signs and symptoms of sleep bruxism, J Sleep Res, 査読有, 26, 2017, pp415-421.

DOI: 10.1111/jsr.12481

馬場一美, 安部友佳. チェアサイドとベッドサイドをつなぐ睡眠時ブラキシズムの診断と治療 睡眠時ブラキシズム臨床診断の現状と展望. 日本補綴歯科学会誌, 査読無, 8巻, 2016, pp153-158.

〔学会発表〕(計 7件)

中里友香理, 高場雅之, 吉田裕哉, 安部友佳, 葎澤秀一郎, 中村浩崇, 川名ふさ江, 菅沼岳史, 加藤隆史, 矢谷博文, 馬場一美, 携帯型睡眠検査装置による睡眠時ブラキシズム記録の妥当性検証. 日本顎口腔機能学会 第60回学術大会, 神奈川, 2018年

Nakazato Y, Takaba M, Yoshida Y, Abe Y, Ono Y, Yoshizawa S, Nakamura H, Kawana F, Suganuma T, Kato T, Baba K. Accuracy of newly developed portable PSG device for detection of sleep bruxism-related masseter EMG muscle activity. 14th WORLD SLEEP 2017, a joint congress of World Association of Sleep Medicine and World Sleep Federation (国際学会), Prague, Czech Republic, 2017年

Tozawa Y, Okamoto S, Abe Y, Matsumoto T, Tanaka J, Yoshida Y, Imaizumi K, Mishima K, Akamatsu W, Okano H, Baba K, Establishment of human sleep bruxism model by induced pluripotent stem cells. 94th General Session & Exhibition of the IADR (International Association of Dental Research) (国際学会), Korea, 2016年

帆足有理恵, 岡本理史, 安部友佳, 松本貴志, 田中準一, 吉田裕哉, 今泉研人, 美島健二, 赤松和土, 岡野栄之, 馬場一美, iPS細胞を用いた5-HT2A遺伝子多型をもつ睡眠時ブラキシズムモデルの確立, 公益社団法人日本補綴歯科学会第125回学術大会, 金沢, 2016年
吉田裕哉, 葎澤秀一郎, 酒井拓郎, 菅沼岳史, 高場雅之, 小野康寛, 安部友佳, 吉澤亜矢子, 中村浩崇, 川名ふさ江, 馬場一美, 睡眠時ブラキシズム臨床診断基準の検証-筋活動パターンと臨床徴候の関連-, 日本補綴歯科学会第124回学術大会, 大宮, 2015年

Abe Y, Hoashi Y, Yoshida Y, Yoshizawa S, Sakai T, Suganuma T, Takaba M, Ono Y, Yoshizawa A, Nakamura H, Kawana F, Baba K, Serotonin receptor gene polymorphism in sleep bruxism: a polysomnographic study. 16th Biennial Meeting of the International College of Prosthodontists(国際学会), Seoul, South Korea, 2015年

Hoashi Y, Okamoto S, Matsumoto T, Yoshida Y, Tanaka J, Imaizumi K, Abe Y, Akamatsu W, Okano H, Mishima K, Baba K, Establishment of human sleep bruxism model by induced pluripotent stem cells (iPSCs). 4th Asian Academic Congress for Temporomandibular Joint (国際学会), Manila, 2015年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

- 出願状況(計 0件)
- 取得状況(計 0件)

〔その他〕

昭和大学学術業績リポジトリ
<https://meta.lilitory.showa-u.ac.jp>

6 . 研究組織

(1)研究分担者: 該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 中井健人

ローマ字氏名: NAKAI, Kento

研究協力者氏名: 中里友香理

ローマ字氏名: NAKAZATO, Yukari

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、研究者個人に帰属されます。