

令和 2 年 6 月 6 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04395

研究課題名(和文)ハイスループット化疾患iPS病態解析による睡眠時ブラキシズムの発症メカニズム解明

研究課題名(英文)Elucidation of mechanism of sleep bruxism: a high-throughput assay to detect electrophysiological dysfunction using patient-specific iPSCs

研究代表者

馬場 一美 (Baba, Kazuyoshi)

昭和大学・歯学部・教授

研究者番号：80251536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、先行研究で見出した睡眠時ブラキシズムに関連する一塩基多型(SNP)による神経細胞の機能的差異の解析を自標として、iPS細胞技術をもとにハイスループットアッセイに拡張することを目指すものであった。睡眠時ブラキシズム患者およびコントロールのiPS細胞を樹立し、神経細胞へ誘導した。レポーターレンチウイルスを用いて蛍光標識されたターゲットニューロンに対して、電気刺激応答を記録したところ、神経細胞からの連続発火を認め、ターゲットニューロンの機能を電気生理学的に解析可能なモニタリングシステムを確立した。

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(睡眠中の歯ぎしり)は様々な歯科的問題の原因となり得ますが、メカニズムはまだ不明な点も多く、現在、対症療法のみで対処するのが一般的です。この研究によって確立された解析システムを発展させることで、細胞レベルでの発症メカニズム解明が期待できます。また、この解明が進んで新たな治療法が開発されれば、個々人の状態に合った治療法を選択できるようになると考えられます。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the mechanism of sleep bruxism and to improve the analytical infrastructure based on the technology of patient-specific induced pluripotent stem cells (iPSCs) that a high-throughput assay can be applied to an electrophysiological analysis of SNP-related neural dysfunction. We established iPSCs from both patients with sleep bruxism and healthy controls, and then differentiated to neural cells. Immunostaining was performed with anti-5-HT2A receptor and anti-GABA antibodies. Then electrophysiological recordings were performed on these neurons to record responses following current injection and the bath application of TCB-2. Repetitive action potentials were generated in response to current injection. Inward current was generated by administration of TCB-2, that induced depolarizing response via 5-HT2A receptor. We successfully established the monitoring system to examine the effect of SB-associated genetic variant.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：睡眠時ブラキシズム iPS細胞

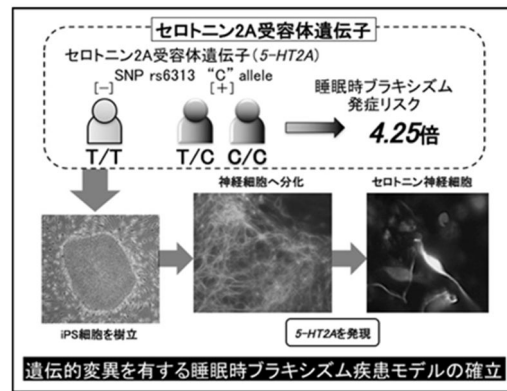
様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) SBとセロトニン受容体遺伝子多型

睡眠運動障害である睡眠時ブラキシズム(SB)は、顎関節障害、歯周病の増悪因子であるばかりでなく、補綴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おり、その診断・治療法の確立は急務である。我々はゲノムDNAの変異である遺伝子多型に着目し、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 (文献 Abe et al. J Sleep Res, 2012・図1)。SNP rs6313 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 と完全連鎖不平衡にあるため、SB 患者では 5-HT2A 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ある。ここで、SB は睡眠中の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深いノンレム睡眠期において活発に活動する抑制性 GABA 作動性ニューロンの細胞体に局在する。SB 関連の SNP が 5-HT2A 受容体の発現量や機能を低下させ、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、結果として睡眠中の咀嚼筋活動を引き起こす可能性がある(図2)。事実、GABA と SB との関連性も報告されているが (文献 Dharmadhikari, et al. Arch Oral Biol, 2015)、実証はされていない。つまり、5-HT2A 受容体の機能解析を行うことで、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。

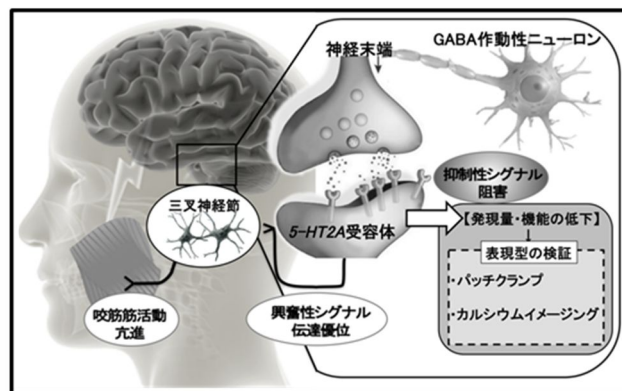
図1 iPS細胞を用いたSB疾患モデル



(2) 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、我々は疾患特異的 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 細胞を領域特異的誘導法 (文献 Imaizumi et al. Stem Cell Reports, 2015) を応用し、セロトニン神経細胞が高発現している縫線核領域へと誘導した。さらに誘導された神経細胞が 5-HT2A 受容体遺伝子を発現していることを確認しており、特定の歯科疾患に関連する iPS 細胞樹立に世界で初めて成功している (文献 Hoashi et al. J Prosthodont Res, 2017)。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-HT2A 発現神経細胞を濃縮する技術を開発した。

図2 睡眠時ブラキシズム発生と中枢神経系との関連



(3) ハイスループットな iPS 細胞樹立・解析システム

従来の疾患 iPS 細胞を用いた研究は、単一遺伝子病を主な研究対象としており症例数も平均して約 3 例である。SB のような多因子性の疾患の解析においては、iPS 細胞で再現される Genetic, Epigenetic な変化の寄与率を考慮すると、SNP の差異による変化を検出するためには相当数の症例が必要である。実際の患者検体からの iPS 細胞の作製と解析にはきわめて多くの作業が必要であり、これまで単一の研究グループの研究で 10 症例以上の解析をすることは事実上不可能であった。赤松ら (順天堂大) は、患者検体から iPS 細胞の樹立と神経分化誘導を 96well 上で効率よく行うことのできるハイスループットな疾患 iPS 細胞の樹立・解析システムを開発しており、多検体を対象とした解析が可能となった。

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-HT2A 受容体遺伝子発現 GABA 作動性神経細胞における 5-HT2A 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

(1) 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。

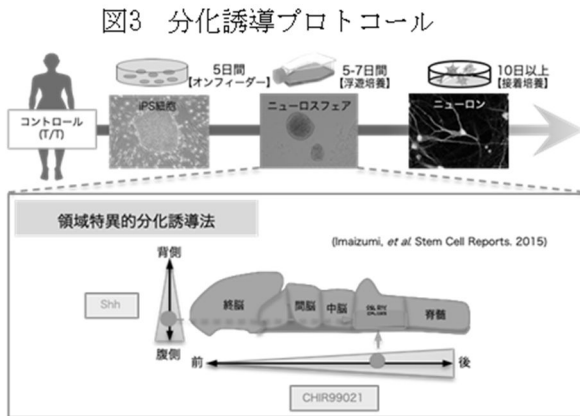
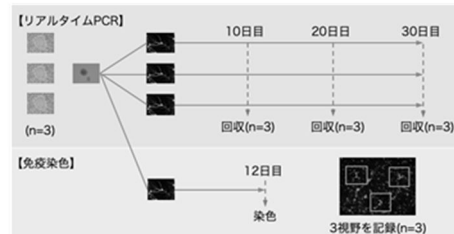


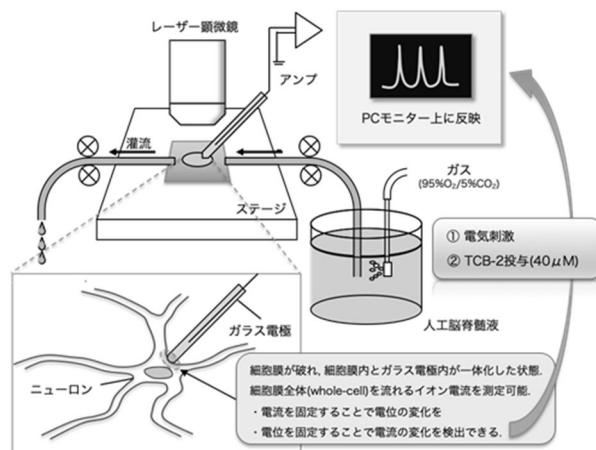
図4 各種マーカーの発現確認



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。

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 (図 4)。リアルタイム PCR はニューロンの接着培養後 10・20・30 日目にサンプルを回収し、解析を行った。そして 5-HT2A 遺伝子、VGAT 遺伝子 (GABA 作動性ニューロンマーカー) の分化過程における発現量を、one-way ANOVA および Dunnett 検定により統計学的に比較した ($p < 0.05$)。免疫染色は接着培養後 12 日目のニューロンを 4% PFA で固定し、5% FBS / 0.3% Triton (0.01% N_2N) 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 (1:200, millipore) と抗 GABA 抗体 (1:400, Sigma)、抗 MAP2 抗体 (ニューロンマーカー, 1:5000, Abcam) を用い、染色を行った。それらをソフトウェア Fiji にて画像処理し、各種ニューロンの誘導効率を算出した。

図5 電気生理学的記録 (ホールセルパッチクランプ)



(2) 電気生理学的解析

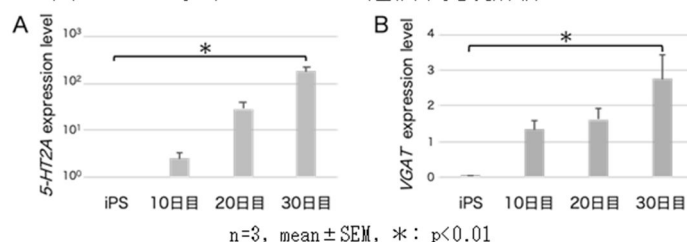
ホールセルパッチクランプ法 (図 5) を用いて、接着培養後 38 日目のニューロンに対し電気刺激への応答、TCB-2 (5-HT2A 受容体選択的アゴニスト) 投与時の応答をそれぞれ観察した。

4. 研究成果

(1) 誘導した神経細胞の性質と形態

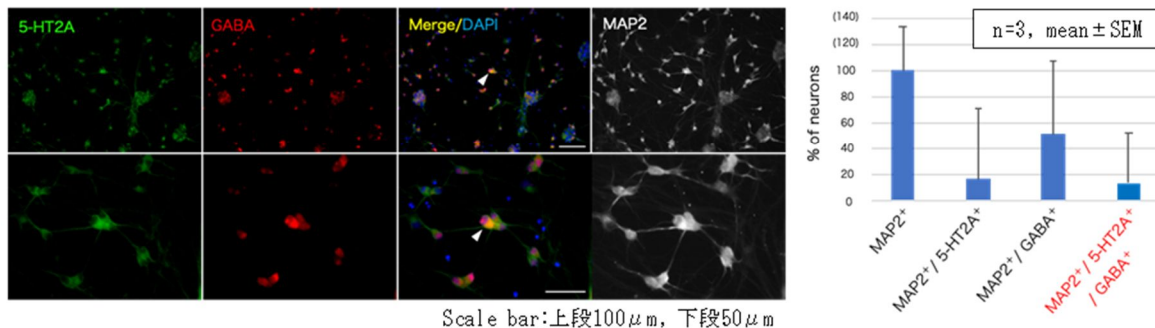
リアルタイム PCR によりニューロンの接着培養後 10・20・30 日目の遺伝子発現を解析した結果、ニューロンは接着培養後 30 日目に、5-HT2A 遺伝子の有意な増加を認めた (図 6A)。同様に、接着培養後 30 日目において、VGAT 遺伝子の有意な増加を認めた (図 6B)。

図6 リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析



免疫染色による結果を図7に示す(抗5-HT2A抗体, 抗GABA抗体, これらと核の重ね合わせ像, 抗MAP2抗体による染色画像)。これにより5-HT2A受容体発現GABA作動性ニューロンの存在を認めた(重ね合わせ像, 矢印)。またこれ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13%であった。

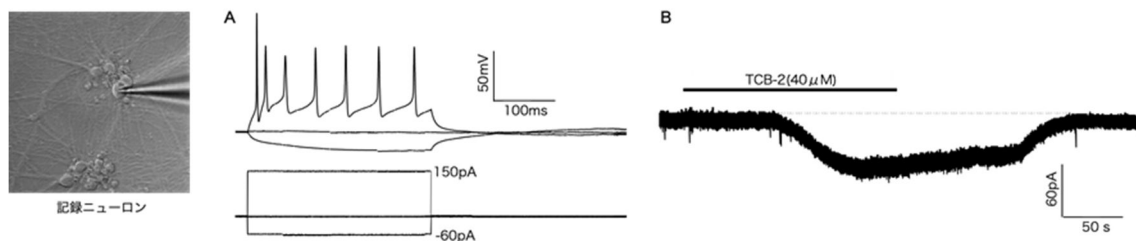
図7 免疫染色による各種マーカーの発現解析



(2) 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, ニューロンに対してTCB-2(40 μM)を投与したその電流変化を記録したところ, 内向き電流の発生を認め, 5-HT2A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



本研究により iPS 細胞から5-HT2A受容体発現GABA作動性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, またこれらから電気生理学的活動の記録を行って, 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。

<引用文献>

- Abe Y, Suganuma T, Ishii M, Yamamoto G, Gunji T, Clark GT, Tachikawa T, Kiuchi Y, Igarashi Y, Baba K, Association of genetic, psychological and behavioral factors with sleep bruxism in a Japanese population. *J Sleep Res.* 21(3), 2012, 289-296
- Dharmadhikari S, Romito LM, Dziedzic M, Dydak U, Xu J, Bodkin CL, Manchanda S, Byrd KE. GABA and glutamate levels in occlusal splint-wearing males with possible bruxism. *Arch Oral Biol.* 60(7), 2015, 1021-9
- Imaizumi K, Sone T, Iyata K, Fujimori K, Yuzaki M, Akamatsu W, Okano H, Controlling the Regional Identity of hPSC-Derived Neurons to Uncover Neuronal Subtype Specificity of Neurological Disease Phenotypes. *Stem Cell Reports.* 5(6), 2015, 1010-1022.
- 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.* 61(3), 2017 242-250.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakamura Hirota, Takaba Masayuki, Abe Yuka, Yoshizawa Shuichiro, Sugauma Takeshi, Yoshida Yuya, Nakazato Yukari, Ono Yasuhiro, Clark Glenn T., Baba Kazuyoshi	4. 巻 23
2. 論文標題 Effects of a contingent vibratory stimulus delivered by an intra-oral device on sleep bruxism: a pilot study	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sleep and Breathing	6. 最初と最後の頁 363 ~ 372
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11325-019-01782-x	査読の有無 有
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 該当する
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 61
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 242 ~ 250
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 有
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 Yoshida Yuya, Sugauma Takeshi, Takaba Masayuki, Ono Yasuhiro, Abe Yuka, Yoshizawa Shuichiro, Sakai Takuro, Yoshizawa Ayako, Nakamura Hirota, Kawana Fusae, Baba Kazuyoshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Association between patterns of jaw motor activity during sleep and clinical signs and symptoms of sleep bruxism	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Sleep 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) 10.1111/jsr.12481	査読の有無 有
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 馬場一美、安部友佳	4. 巻 13
2. 論文標題 歯ぎしりにボツリヌス治療は有効か？ ボツリヌス治療は歯ぎしりへの新たな一手となり得るか？ その問題点を探る	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 アンチ・エイジング医学	6. 最初と最後の頁 399 ~ 404
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
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 馬場一美, 吉田裕哉	4. 巻 2019
2. 論文標題 睡眠時ブラキシズム - 治療予後向上のための理論と実践 -	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Innovative Zahnmedizin	6. 最初と最後の頁 6~17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計17件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 馬場一美
2. 発表標題 睡眠時ブラキシズムへの合理的かつ現実的対応
3. 学会等名 Innovative Zahnmedizin 2018年総会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬場一美
2. 発表標題 卒後に学ぶブラキシズム
3. 学会等名 特定非営利活動法人ユニバーサルインプラント研究所平成30年度認定講習会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 馬場一美
2. 発表標題 睡眠歯科, 新たな歯科医療の展開
3. 学会等名 平成30年度愛媛県歯科医師会学術講演 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kazuyoshi Baba
2. 発表標題 Building a world class research program
3. 学会等名 Future Leaders in Prosthodontics 8 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本顎口腔機能学会 第60回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tozawa Yurie, Nakai Kento, Yoneima Kazuaki, Tanaka Junichi, Matsumoto Takashi, Abe Yuka, Imaizumi Kento, Mishima Kenji, Akamatsu Wado, Okano Hideyuki, Baba Kazuyoshi
2. 発表標題 In vitro disease modeling for sleep bruxism using induced pluripotent stem cells
3. 学会等名 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Nakazato Yukari, Takaba Masayuki, Yoshida Yuya, Abe Yuka, Ono Yasuhiro, Yoshizawa Shuichiro, Nakamura Hirotaka, Kawana Fusae, Suganuma Takeshi, Kato Takafumi, Baba Kazuyoshi
2. 発表標題 Accuracy of newly developed portable PSG device for detection of sleep bruxism-related masseter EMG muscle activity
3. 学会等名 14th World Sleep 2017, Joint Congress of World Association of Sleep Medicine and World Sleep Federation (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中里友香理, 高場雅之, 吉田裕哉, 安部友佳, 小野康寛, 葺澤秀一郎, 中村浩崇, 菅沼岳史, 馬場一美
2. 発表標題 簡易睡眠検査装置による睡眠時ブラキシズムの測定
3. 学会等名 第30回日本顎関節学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 黄地健仁, 帆足有理恵, 新部邦透, 大川博子
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学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 馬場一美
2. 発表標題 睡眠時ブラキシズムの診療体系 検査からの治療まで
3. 学会等名 日本睡眠総合検診協会 睡眠歯科技術講座 (招待講演)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Baba Kazuyoshi
2. 発表標題 Disease modeling for sleep bruxism using patient-specific iPS cells
3. 学会等名 65th Annual Meeting of Japanese Association for Dental Research (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017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 iPSC
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, 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 Nakazato Y, Nakamura H, Ohara H, Takaba M, Abe Y, Suganuma T, Baba K
2. 発表標題 Inhibitory effects of vibratory stimulus via an occlusal splint on sleep bruxism
3. 学会等名 18th Biennial Meeting of the International College of Prosthodontists (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中里友香理, 中村浩崇, 小原大宜, 高場雅之, 安部友佳, 菅沼岳史, 馬場一美
2. 発表標題 振動フィードバック刺激を用いた睡眠時ブラキシズムの抑制
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 小原大宜, 中里友香理, 青木理紗, 吉田裕哉, 高場雅之, 安部友佳, 菅沼岳史, 馬場一美
2. 発表標題 睡眠時ブラキシズムに対する振動刺激を用いた長期的抑制効果の予備的検証
3. 学会等名 日本顎口腔機能学会第63回学術大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Baba K, Abe Y, Khoury S, Lobbezoo F / Lavigne GJ, Cistulli PA, Smith MT.	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Quintessence Publishing USA	5. 総ページ数 240
3. 書名 28. Genetic and environmental factors in SB. / Sleep Medicine for Dentists: An Evidence-Based Overview, Second Edition	

〔産業財産権〕

〔その他〕

昭和大学研究者情報・業績集 https://researchers-achievements.showa-u.ac.jp/
--

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
研究分担者	赤松 和土 (Akamatsu Wado) (60338184)	順天堂大学・医学(系)研究科(研究院)・特任教授 (32620)	
研究分担者	美島 健二 (Mishima Kenji) (50275343)	昭和大学・歯学部・教授 (32622)	
研究分担者	安部 友佳 (Abe Yuka) (80614156)	昭和大学・歯学部・講師 (32622)	
研究分担者	松本 貴志 (Matsumoto Takashi) (00635039)	昭和大学・歯学部・助教 (32622)	
研究分担者	田中 準一 (Tanaka Junichi) (40710166)	昭和大学・歯学部・助教 (32622)	
研究分担者	戸澤 有理恵 (Tozawa Yurie) (70783356)	昭和大学・歯学部・兼任講師 (32622)	
研究分担者	菅沼 岳史 (Suganuma Takeshi) (10196694)	昭和大学・歯学部・教授 (32622)	
研究協力者	中井 健人 (Nakai Kento)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小溪 啓介 (Kotani Keisuke)		
研究協力者	中里 友香理 (Nakazato Yukari)		
研究協力者	小原 大宜 (Ohara Hironobu)		
研究協力者	中村 浩崇 (Nakamura Hirotaka)		