

令和 3 年 5 月 26 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K17187

研究課題名(和文)セロトニン受容体高発現iPS細胞を用いた睡眠時ブラキシズム治療薬開発への基盤研究

研究課題名(英文)Development of therapeutic agent for sleep bruxism used serotonin receptor 5-HT2a highly expressed iPSCs

研究代表者

松本 貴志(Matsumoto, Takashi)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：00635039

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)：本研究は、睡眠時ブラキシズム(SB)における疾患特異的iPS細胞を用いてセロトニン受容体(5-HT2A)のSNP変異による影響を調査し発生機序を解明することである。

5-HT2A遺伝子のSNP変異を有するSB群および変異の伴わない健常者群の血液サンプルよりiPS細胞を樹立した。樹立したiPS細胞は部位特異的な誘導により5-HT2Aを高発現する効率的な分化誘導法を検討した。機能解析のため、標的遺伝子プロモーター領域を標識したウイルスベクターの作製・導入し、生細胞での標的遺伝子発現細胞の同定が可能となった。これにより電気生理学的アプローチ(パッチクランプ法)の実施が可能となり、一定の結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

iPSを利用したアプローチにより、倫理的・技術的観点より困難であった睡眠時ブラキシズムの疾患特異モデルが確立される。それにより、睡眠時ブラキシズムの原因究明につながる可能性が示唆され、ひいては睡眠時ブラキシズムの治療薬開発の基盤となり得る研究である。

また、研究過程における産物として、iPS細胞より樹立したセロトニン神経細胞への効率的な分化誘導法がある。脳内のセロトニンの役割として、情動のコントロールの他、睡眠と覚醒、摂食行動など様々である。本研究における恩恵は、ブラキシズム発症メカニズムの解明による歯科領域に留まらず、睡眠・神経系領域の研究に対してこそ大いに貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study were investigate mechanism of SB using patient-specific induced-pluripotent stem cells(iPSCs).

iPSCs were generated from monocytes in blood samples of SB patient, which have SNP rs6313 in 5-HT2A gene, and control patient. Neuronal differentiation from iPSCs was conducted according to a previously reported protocol with slight modification. The expression of 5-HT2A mRNA increased in a time-dependent manner during neuronal differentiation from iPSCs. To distinguish 5-HT2A-positive neurons from negative ones, we generated a lentiviral fluorescent protein-expressing-reporter construct dependent on 5-HT2A promoter activity site for live cell labelling of neurons. To investigate the electrophysiological properties and the responsiveness of 5-HT2A-positive neurons, whole-cell patch-clamp recordings were performed. According to whole-cell patch-clamp, 5-HT2A-positive neurons derived from iPSCs are electrophysiologically active and functionally express 5-HT2A.

研究分野：歯学

キーワード：睡眠時ブラキシズム 5-HTR2a

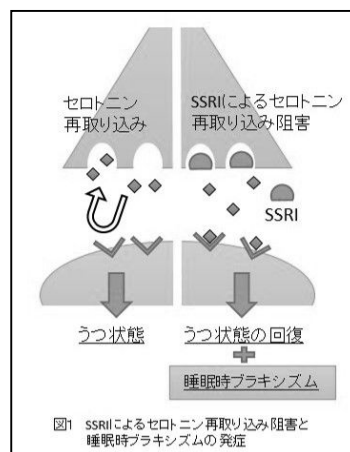
1. 研究開始当初の背景

(1)睡眠時ブラキシズム

睡眠時ブラキシズムは、睡眠中に行われる歯ぎしりや噛みしめの総称であり、咀嚼筋活動を主体とした運動障害と定義される。睡眠時ブラキシズムは覚醒時の最大咬合力を優位に凌駕する力を伴い、また持続時間も数分に及ぶこともあると報告されており、顎口腔系に破壊的な作用を生じる可能性がある。歯科治療においては、歯の著しい咬耗や歯の破折、補綴装置の破損、顎関節への影響などを誘起し、その予後を大きく左右する因子であり、患者の QoL を著しく侵害する。しかし、睡眠時ブラキシズムの病因については未だ明らかにされておらず、治療法・予防法の確立が大いに望まれている。

(2) iPS 細胞技術の躍進と疾患特異モデル

近年、医学研究の進展は目を見張るものがあり、困難とされた疾病の治療法・治療薬の開発が数多く報告されているが、依然として治療困難・治療不能な疾患は存在する。治療法の開発で最も有効であるのは、疾病患者自身の組織を用い、疾患特異モデルを構築し、その原因を究明し治療法開発に利用することであるが、倫理的・技術的制約により困難な場合が多い。その折、本邦にて ES 細胞に匹敵する多分化能を有する iPS 細胞 (induced pluripotent stem cell) の樹立が確立された (Yamaknaka S et al. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. Cell. 2006 126(4):663-7690)。iPS 細胞は比較的採取が容易な細胞より樹立することが可能であり、また分化誘導により種々の細胞へと分化させる方法も多岐にわたり報告されている。iPS 細胞により再生医療分野は大幅に進展し、今後は、iPS 細胞による様々な疾患特異モデルの確立が期待される。



2. 研究の目的

睡眠時ブラキシズムは、中枢的に引き起こされる睡眠中の非機能的運動であり、顎口腔系に破壊的な障害を生じる。現在行われている治療は、マウスピース等による対症療法であり、根治的治療法はまだ確立されていない。我々研究チームは、因子解析の結果、神経伝達物質であるセロトニンの受容体の一つ 5-Hydroxytryptamine receptor 2A (5-HT_{2A}) の SNP 変異と睡眠時ブラキシズムとの関連性を示し、5-HT_{2A} 変異 iPS 細胞による疾患モデルの確立を進めている。本研究では、効果的な 5-HT_{2A} 高発現 iPS 細胞分化誘導法の確立、5-HT_{2A} 高発現 iPS 細胞を用いたセロトニン受容体の SNP 変異による受容体機能解析を礎とし、セロトニン受容体関連疾患治療薬を探索することを目的とする。

3. 研究の方法

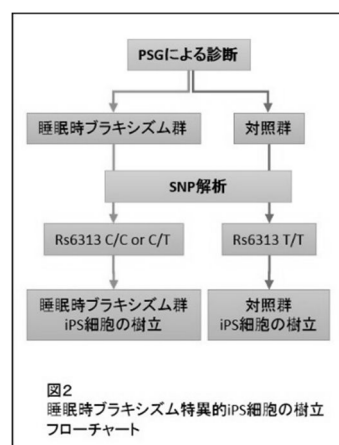
(1)5-HT_{2A} 高発現 iPS 細胞の分化誘導法の確立

(a)ブラキシズムおよび対象患者の iPS 細胞の樹立

5-HT_{2A} 遺伝子上の Rs6313 変異が認められたブラキシズム群および変異を認めない対象群より血液を採取し iPS 細胞の樹立を行う。採取した血液試料よりゲノム DNA を抽出、TaqMan プローブを用いて 5-HT_{2A} の SNP 多型である Rs6313 の遺伝子型を同定する。iPS 細胞の樹立は Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、p53DN、Lin28 をレトロウイルスベクターもしくはセンダイウイルスベクターを用いて遺伝子導入して行う。樹立された iPS 細胞は品質管理のため、遺伝子挿入領域の同定およびゲノム構造の評価を行う。

(b) iPS 細胞のセロトニン分化誘導法の検討

神経分化誘導において、セロトニン系細胞への分化は一定ではないため、安定した分化誘導法を確立する必要がある。(a)で樹立した iPS 細胞は各種神経分化誘導法により神経細胞へと分



化させる。5-HT2A の発現量は定量的 PCR 法により測定し、効率的な神経分化誘導法を探索する。

(c) 効率的な 5-HT2A 高発現細胞の選択的培養法の検討

5-HT2A 高発現細胞を利用するため、生細胞での 5-HT2A 発現レベルをモニタリングする方法が必要である。() 標的遺伝子のプロモーター領域を応用した蛍光標識によるモニタリング法: 5-HT2A のプロモーター領域を挿入した GFP 標識ウイルスベクターを作製し、iPS 細胞へ感染させる。蛍光顕微鏡により発光強度の高いコロニー群を選別し抽出する。() ソーティングによる分取法: 神経へ分化誘導した iPS 細胞を 5-HT2A 抗体により蛍光標識し、フローサイトメトリーを用いて選別・培養する。効率性および細胞への影響について、適切な選別培養方法についてこれら 2 つの方法について検討する。

(2) 5-HT2A 高発現 iPS 細胞を用いた睡眠時ブラキシズム治療薬の探索

(a) 5-HT2A SNP 変異による機能解析 (図 3)

5-HT2A の SNP 変異による構成アミノ酸は変わらないため、タンパク質の構造的差異はないと考えられる。したがって、SNP 変異は機能的影響を生じている可能性が示唆される。SNP 変異による機能解析として () 分子生物学的アプローチおよび神経細胞機能評価としての () 電気生理学的アプローチにより解析を行う。

() 分子生物学的解析: 5-HT2A はセロトニンの受容体であり、セロトニンをはじめ、アゴニストやアンタゴニストなど複数のリガンドを有している。リガンドの結合能における機能変化については、クロマチン免疫沈降法 (CHIP) により直接的なリガンドと受容体の結合についての解析を行う (図 3 A)。また、5-HT2A は低分子 G タンパク質と共役して下流シグナルを活性化することが知られている。G タンパクとの共役機能についてはリガンド同様に CHIP 解析を行い (図 3 B)、下流シグナルについては、各種阻害剤を用いた解析により検討する (図 3 C)。

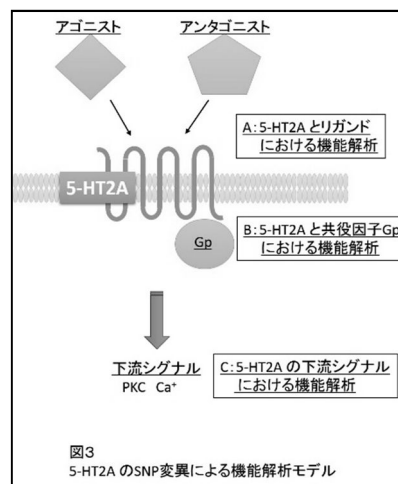


図3 5-HT2A のSNP変異による機能解析モデル

() 電気生理学的解析: 神経細胞は情報伝達経路として多数のイオンチャネルやトランスポーターを有するため、SNP 変異によるこれらの作用への影響についてはパッチクランプ法による解析を行う。

(b) 5-HT2A 変異による機能変化に影響する因子の探索

5-HT2A の SNP 変異による機能変化が、睡眠時ブラキシズムを誘発する原因である可能性が考えられる。(a)の研究により SNP 変異による機能変化の原因が解明された場合、その事象に関連した因子について探索を行う。候補因子による 5-HT2A の SNP 変異に起因した機能変化への影響について、スクリーニングを行い、睡眠時ブラキシズム治療への創薬への応用を検討する。

4. 研究成果

(1) ブラキシズムおよび対象患者の iPS 細胞の樹立

5-HT2A 遺伝子上の Rs6313 変異が認められたブラキシズム群より採取した血液試料より単核球を単離、Oct3/4、Sox2、Klf4、c-Myc、p53DN、Lin28 をレトロウイルスベクターにより遺伝子導入して iPS 細胞を樹立した。樹立した iPS 細胞は Rs6313 変異を有し、また、幹細胞マーカー遺伝子の発現を認めたことから、iPS 細胞としての品質が確保された。SNP 変異を有しないコントロール群 Rs6313 もブラキシズム群同様に血液試料より iPS 細胞を樹立した。

(2) iPS 細胞のセロトニン分化誘導法の検討

神経分化誘導において、セロトニン系細胞への分化は一定ではないため、安定した分化誘導法を確立する必要がある。研究のターゲットである HTR2A は、後脳腹側領域に多く発現していることから、Shh と CHIR99021 の濃度勾配による領域特異的分化誘導法 (図 4) を検討した。標的領域へ分化誘導した神経細胞における各種神経細胞マーカー遺伝子 (Nestin、Map2) および 5-HT2A の発現量をリアルタイム PCR にて確認したところ、神経細胞分化に伴い、経時的な 5-HT2A 発現量の増加が認められた。(図 5)

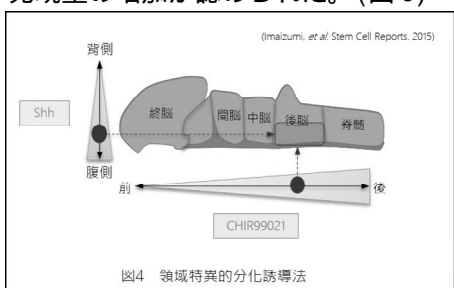


図4 領域特異的分化誘導法

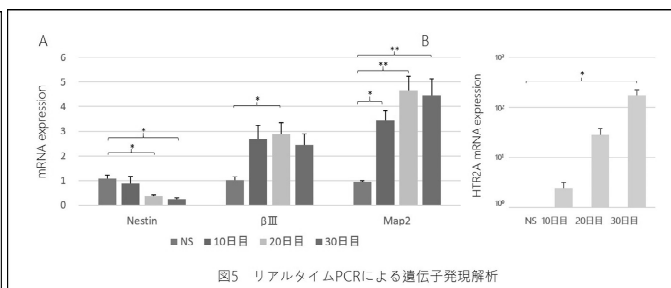


図5 リアルタイムPCRによる遺伝子発現解析

(3) 効率的な 5-HT2A 高発現細胞の選択的培養法の検討

5-HT2A 高発現細胞を利用するため、生細胞での 5-HT2A 発現レベルをモニタリングする方法が必要であり、標的遺伝子のプロモーター領域を応用した蛍光標識によるモニタリング法を検討した。5-HT2A のプロモーター領域および下流に蛍光標識タンパク質 (ZsGreen) を挿入したレンチウイルスベクターを作製し、神経細胞分化誘導中の iPS 細胞へ感染させた。分化誘導後、蛍光顕微鏡下にて蛍光陽性細胞の存在が確認された。フローサイトメトリーにより、蛍光反応陽性・陰性によりソーティングを行い、各サンプルでの 5-HT2A の発現量をリアルタイム PCR にて評価した。その結果、蛍光標識陽性細胞では有意に 5-HT2A の発現量が高く、作製したプロモーター領域を挿入したレンチウイルスベクターの作動性が確認された。(図 6)

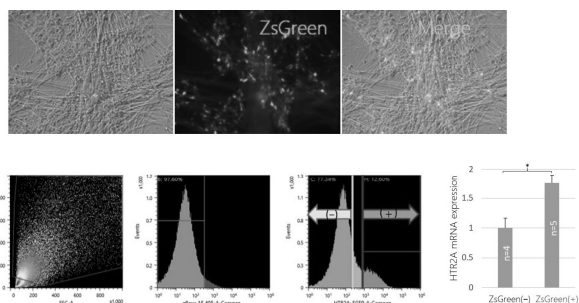


図6 フローサイトメトリーとリアルタイムPCRによるレンチウイルスの機能評価

(4) 5-HT2A SNP 変異による機能解析

5-HT2A の SNP 変異による機能解析として Whole-cell パッチクランプ法による電気生理学的記録による解析を行った。記録ニューロンとして 5-HT2A プロモーター蛍光陽性細胞へ電極を刺入し、電気刺激による電位変化をモニタリングした。過分極性の電気刺激を与えると記録ニューロンは過分極を生じ、また、脱分極性の電気刺激によりスパイクを示し連続発火を認めた。これにより、記録ニューロンは正常な電気応答を示していることが確認された。同様の記録ニューロンへ 5-HT2A 選択的アゴニストである TCB-2 を投与したところ、内向き電流を生じたことから、5-HT2A を介した脱分極性の応答であることが確認された。(図 7)

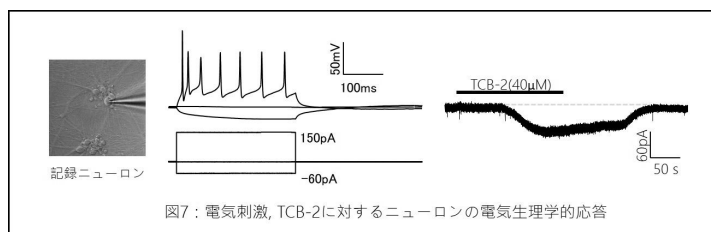


図7：電気刺激、TCB-2に対するニューロンの電気生理学的応答

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------