

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20H03882

研究課題名(和文) リポジトリとiPS細胞バンクを基盤とした睡眠時ブラキシズム発症機序の解明

研究課題名(英文) Repository of sleep bruxism and elucidation of its mechanism based on disease-specific iPS cells

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) 13,500,000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(SB)に関連する一塩基多型による神経細胞の機能的差異の解析を目標に、SBのリポジトリの構築を試み、また、SB患者由来ニューロンに共通する機能異常をゲノムレベルで検出、表現型の分類を目指すものであった。対象者より臨床所見、睡眠中の筋活動レベルの記録を行い、データベースとしてのリポジトリへの登録を行った。さらに、SB患者およびコントロールのiPS細胞を樹立、神経細胞へと誘導した。神経細胞を用いてトランスクリプトーム解析による発現変動遺伝子の探索を行い、その結果、両群間の遺伝子発現パターンには系統的な差異が存在することが示唆された。

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(睡眠中の歯ぎしり)は様々な歯科的問題の原因となり得るが、メカニズムはまだ不明な点も多い。この研究によって構築された睡眠時ブラキシズムのリポジトリを発展させ、さらにiPS細胞由来神経細胞での解析がより詳細に行われることで、発症メカニズムの解明が進むことが期待でき、この成果は、個々人の病態に応じて歯科医療を提供する、オーダーメイド医療に寄与できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The present study aimed to establish a repository of sleep bruxism (SB) with a goal of analysing functional differences in neurons due to single nucleotide polymorphisms associated with sleep bruxism (SB) found in a previous study, and to detect and phenotypically classify functional abnormalities across neurons derived from SB patients at the genomic level. Clinical examination findings and muscle activity levels during sleep were recorded from the subjects and entered into a repository as a database. In addition, iPS cells from SB patients and controls were established and induced into neurons. Neurons were used to search for differentially expressed genes by transcriptome analysis, and the results suggested that there were systematic differences in gene expression patterns between the SB patient and control groups.

研究分野：補綴歯科学

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

睡眠時ブラキシズムによる顎口腔系への為害作用

睡眠時ブラキシズム (SB: Sleep Bruxism) は、睡眠中の歯の grinding と clenching を特徴とする不随意閉口筋活動を主体とした睡眠関連運動障害として、国際睡眠障害分類 (ICSD-3) の第 3 版に分類されている。SB は顎関節障害、歯周病の増悪因子であるばかりでなく (図 1)、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付けられているが、その病態および詳細な発生機序は明らかでない。

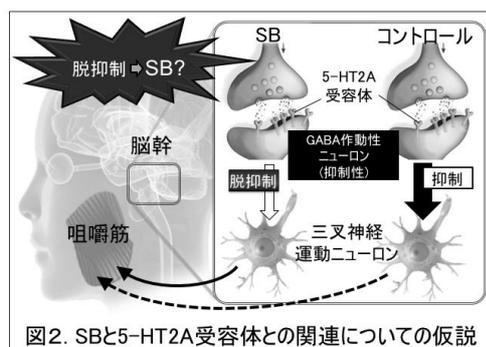


HTR2A の遺伝子多型は SB の発症リスクに関与する

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。

睡眠中の脱抑制状態が、SB 発症機序に関わる可能性

睡眠中、咀嚼筋の活動を調節する三叉神経運動ニューロンの活動は、通常、GABA 作動性ニューロンなどの抑制性ニューロンによって抑制され、これらの筋肉の筋活動はほとんど発生しない。SB は睡眠中に観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ることが知られているが、睡眠が覚醒に向かうことにより、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)。セロトニン 2A 受容体 (5-HT2A 受容体) はこれらの GABA 作動性ニューロンの細胞体にも存在する。また、コントロール群では微小覚醒が生じても SB は観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。



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、HTR2A 陽性ニューロンを含む神経細胞集団を領域特異的に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。

標的ニューロン特異的な異常パラメーターを電気生理学的解析によって検出

上記モニタリングシステムを応用し、SB 特異的な表現系の検証のため、分化神経細胞に対し電気生理学的解析（ホールセルパッチクランプ法）を行った。その結果、健常者に比べ SB 患者由来の神経細胞で興奮性の上昇を認めた[Sarkar AK. Stem Cell Res, 2022] (図 3)。

しかし、異常表現型を誘発している責任細胞分画は不明であり、疾患モデルへの応用には制約が残っている。また SNP の違いでこの表現系の差が生じているのか、もしくは他の要因が存在するのかも不明である。そこで我々はこの表現型の差を生む要因、更には新規 SB 発症機序を同定するために網羅的遺伝子発現解析が有用であると、本研究を立案した。

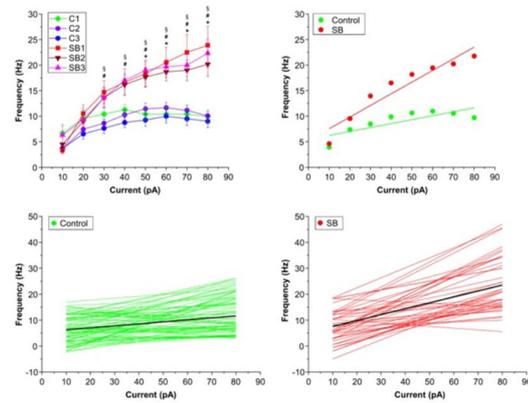


図3. 活動電位関連パラメーターの比較

2. 研究の目的

本研究では、SB 筋活動測定装置を用いて、睡眠時ブラキシズム患者・コントロールの被験者から臨床データを収集して、睡眠時ブラキシズムのリポジトリ（データベース）を構築する。さらに、先行研究にて樹立された SB 特異的 iPS 細胞を使用し、標的ニューロンを含む神経細胞集団を領域特異的に分化誘導する。分化誘導された神経細胞集団に対して、それらの遺伝子発現を網羅的に解析することで、SB に特異的な表現型をゲノムレベルで検証し、SB 発症機序の解明を目指す。

3. 研究の方法

データベース構築

対象者には、臨床検査、問診と、携帯型筋電計もしくは携帯型 PSG 装置を用いて夜間咬筋筋活動データの記録を行う。昭和大学歯科病院で過去に登録された被験者と併せて、SB 患者 100 名、コントロール 100 名を目指し、昭和大学ならびに東京医科歯科大学にて被験者の動員を行った。なお、登録する臨床データとして、睡眠時の咬筋筋電図（EMG）に基づくものとして、単位時間あたりのエピソード数、単位時間あたりのバースト数、エピソード持続時間、臨床検査および問診に基づくものとして、歯ざしり音の指摘、起床時の咀嚼筋痛、咬耗の程度、顎関節症、過去のブラキシズム治療歴、睡眠障害、現在の疾患と服用薬、ストレスの程度、カフェインの摂取、アルコールの摂取を挙げた。

これらの得られたデータをデータベース化し、クラウド上に SB リポジトリを構築し情報登録を行った。

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

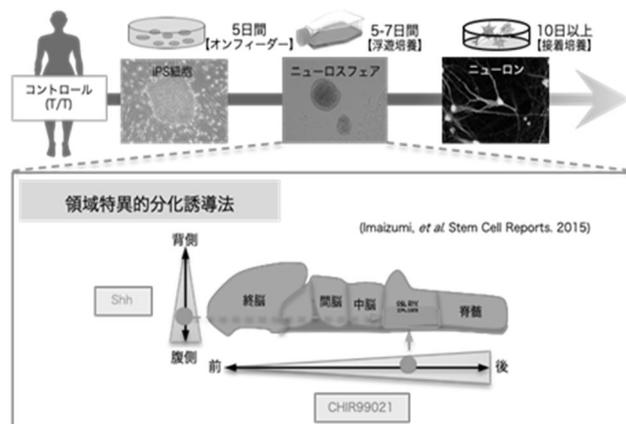


図 4. 分化誘導プロトコール

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 4)。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。

トランスクリプトーム解析による発現変動遺伝子の探索

樹立した 3 名の SB 患者由来の iPS 細胞 (SB-1, SB-2, SB-3) 及び 3 名の健常対照由来の iPS 細胞 (CTRL-1, CTRL-2, CTRL-3) を使用した。領域特異的誘導法を用いて脳幹領域の神経細胞へと分化・成熟させ、RNA を抽出・精製し Bulk RNA-seq (n=3) を行なった。発現変動遺伝子解析 (DEG 解析: DESeq2) および KEGG パスウェイ解析により SB 特異的な発現変動遺伝子群を抽出した。

4. 研究成果

リポジトリの構築

本研究により、二つの医療機関により共有可能な睡眠時ブラキシズムのデータベースとしてのリポジトリがクラウド上に構築可能であることが示唆され、持続的な運用を行っている。今後は、複数の医療機関による運用を目指し、さらにこれらのデータを用いて SB の症型分類を行うことを目指す。

発現変動遺伝子解析

Bulk RNA-seq 解析の結果、PCA プロットおよび階層クラスタリングにより両群間の遺伝子発現パターンには系統的な差異が存在することが示唆された(図 5)。

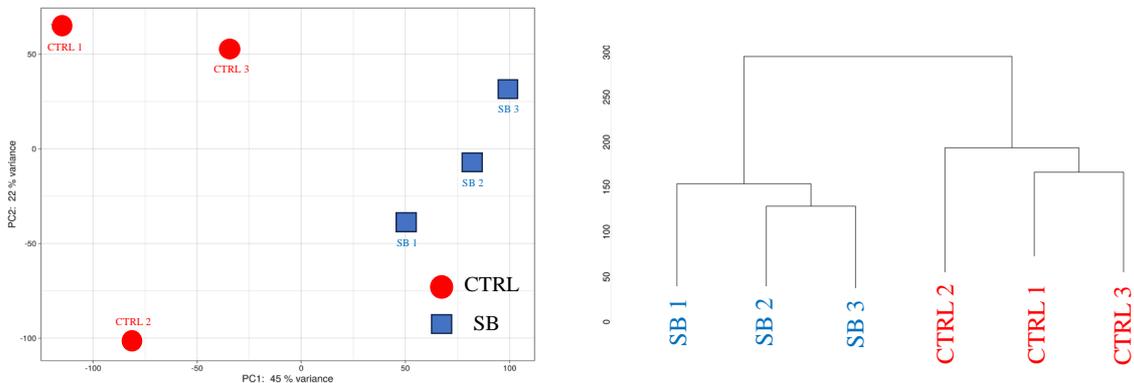


図5. PCAプロットおよび階層クラスタリング

KEGG パスウェイ解析

KEGG パスウェイによるエンリッチメント解析ではカルシウムシグナリングに関連した発現変動遺伝子が SB 群で上昇していた(図 6)。

カルシウムシグナリングのパスウェイマップに DEG 解析の結果を反映させると、特に神経伝達物質がリガンドとなる受容体として知られる G タンパク質共役型受容体 (GPCR) やカルシウム感受性受容体 (ROC) を構成する遺伝子が SB で有意に高発現していた(図 7)。

今後は上記受容体の構成遺伝子について、実際に高発現している遺伝子を抽出し、さらには分化誘導した神経細胞集団に対し Single cell RNA-seq を行い Bulk 解析にて変動していた遺

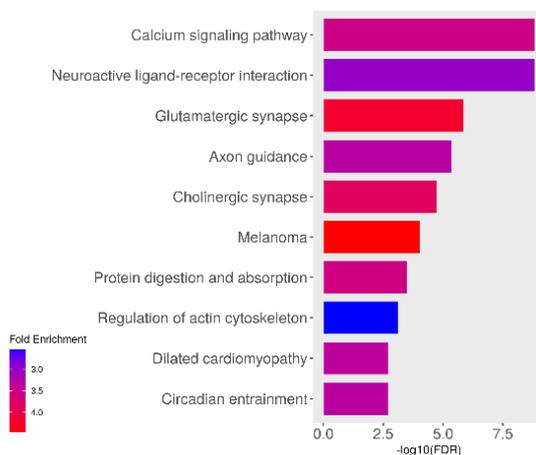


図6. Keggパスウェイによるエンリッチメント解析

伝子がどのニューラルポピュレーションに存在するか調査する予定である。
 SB 特異的な発現変動遺伝子とその遺伝子が存在するポピュレーションが特定されれば、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。

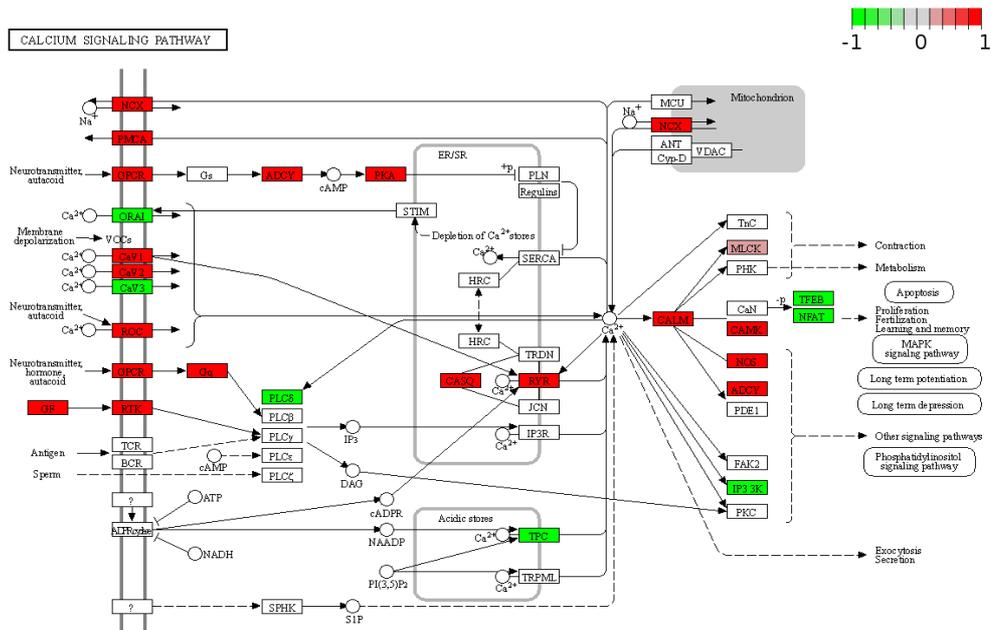


図7. カルシウムシグナリングパスウェイマップ

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Abe Yuka, Nakazato Yukari, Takaba Masayuki, Kawana Fusae, Baba Kazuyoshi, Kato Takafumi	4. 巻 19
2. 論文標題 Diagnostic accuracy of ambulatory polysomnography with electroencephalogram for detection of sleep bruxism-related masticatory muscle activity	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Sleep Medicine	6. 最初と最後の頁 379 ~ 392
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5664/jcsm.10344	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 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 -
1. 著者名 Nakazato Yukari, Takaba Masayuki, Abe Yuka, Nakamura Hiroataka, Ohara Hironobu, Suganuma Takeshi, Clark Glenn T., Baba Kazuyoshi	4. 巻 48
2. 論文標題 Effect of contingent vibratory stimulus via an oral appliance on sleep bruxism after the splint adaptation period	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Rehabilitation	6. 最初と最後の頁 901 ~ 908
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/joor.13182	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 Aoki Risa, Takaba Masayuki, Abe Yuka, Nakazato Yukari, Ohara Hironobu, Maejima Kohei, Baba Kazuyoshi	4. 巻 64
2. 論文標題 A pilot study to test the validity of a piezoelectric intra-splint force detector for monitoring of sleep bruxism in comparison to portable polysomnography	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Oral Science	6. 最初と最後の頁 63 ~ 68
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2334/josnusd.21-0421	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 -

1. 著者名 Lavigne Gilles, Kato Takafumi, Herrero Babiloni Alberto, Huynh Nelly, Dal Fabbro Cibele, Svensson Peter, Aarab Ghizlane, Ahlberg Jari, Baba Kazuyoshi, Carra Maria Clotilde, Cunha Thays Crosara A., Gon?alves Daniela A. G., Manfredini Daniele, Stuginski Barbosa Juliana, Wieckiewicz Mieszko, Lobbezoo Frank	4. 巻 30
2. 論文標題 Research routes on improved sleep bruxism metrics: Toward a standardised approach	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Sleep Research	6. 最初と最後の頁 e13320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jsr.13320	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 Thymi Magdalini, Lobbezoo Frank, Aarab Ghizlane, Ahlberg Jari, Baba Kazuyoshi, Carra Maria Clotilde, Gallo Luigi M., De Laat Antoon, Manfredini Daniele, Lavigne Gilles, Svensson Peter	4. 巻 48
2. 論文標題 Signal acquisition and analysis of ambulatory electromyographic recordings for the assessment of sleep bruxism: A scoping review	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Oral Rehabilitation	6. 最初と最後の頁 846 ~ 871
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/joor.13170	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 Sarkar Avijite Kumer, Nakamura Shiro, Nakai Kento, Sato Taro, Shiga Takahiro, Abe Yuka, Hoashi Yurie, Inoue Tomio, Akamatsu Wado, Baba Kazuyoshi	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 Research	6. 最初と最後の頁 102658
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 -
1. 著者名 Ohara Hironobu, Takaba Masayuki, Abe Yuka, Nakazato Yukari, Aoki Risa, Yoshida Yuya, Suganuma Takeshi, Baba Kazuyoshi	4. 巻 26
2. 論文標題 Effects of vibratory feedback stimuli through an oral appliance on sleep bruxism: a 6-week intervention trial	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sleep and Breathing	6. 最初と最後の頁 949 ~ 957
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11325-021-02460-7	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11件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 佐藤太朗, 中井健人, Avijite Sarkar, 安部友佳, 志賀孝宏, 安原理佳, 中村史朗, 帆足有理恵, 辰本将司, 石川裕恵, 郷 康宏, 美島健二, 井上富雄, 赤松和土, 馬場一美
2. 発表標題 睡眠時ブラキシズム患者特異的iPS細胞から分化誘導した神経細胞の電気生理学的特性
3. 学会等名 公益社団法人日本補綴歯科学会 第131回学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 馬場一美
2. 発表標題 歯科医療の近未来 - データベース基盤型歯科医療とレジストリーの構築 -
3. 学会等名 一般社団法人日本デジタル歯科学会 第13回学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 馬場一美
2. 発表標題 睡眠時ブラキシズム：その為害作用を知り対応を考える
3. 学会等名 令和4年度公益社団法人日本補綴歯科学会 中国・四国支部学術大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小原大宜, 高場雅之, 安部友佳, 中里友香理, 青木理紗, 吉田裕哉, 菅沼岳史, 馬場一美
2. 発表標題 オクルーザルスプリントを介した振動刺激による睡眠時ブラキシズム抑制効果
3. 学会等名 第24回日本歯科医学会学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 青木理紗, 高場雅之, 安部友佳, 中里友香理, 小原大宜, 前嶋康平, 大野育代, 馬場一美
2. 発表標題 ピエゾセンサーを用いた睡眠時ブラキシズム検出の収束的妥当性の検討
3. 学会等名 日本補綴歯科学会 東京支部第25回学術大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sarkar AK, Nakamura S, Abe Y, Nakai K, Yasuhara R, Shiga T, Hoashi Y, Kotani K, Inoue T, Mishima K, Akamatsu W, Baba K
2. 発表標題 Electrophysiological characterization of sleep bruxism patient-specific induced pluripotent stem cell-derived neurons
3. 学会等名 日本顎口腔機能学会第64回学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sarkar AK, Nakamura S, Nakai K, Yasuhara R, Shiga T, Abe Y, Hoashi Y, Kotani K, Inoue T, Mishima K, Akamatsu W, Baba K
2. 発表標題 Electrophysiological characterization of sleep bruxism patient-specific hiPSC-derived neurons
3. 学会等名 7th Biennial Joint Congress of JPS-CPS-KAP (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 馬場一美
2. 発表標題 歯科・口腔領域における最新トピックスとテクノロジー：睡眠時ブラキシズムUpdate, From bench to clinic
3. 学会等名 第20回日本抗加齢医学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Baba K
2. 発表標題 Strategies for management of sleep bruxism - clinical implication of basic findings
3. 学会等名 FDI World Dental Congress 2023 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 前嶋康平, 高場雅之, 安部友佳, 小原大宜, 青木理紗, 奥原志織, 松山萌美, 馬場一美
2. 発表標題 振動型スプリントによる長期的な睡眠時ブラキシズム抑制効果に関する予備的研究
3. 学会等名 日本補綴歯科学会第132回学術大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Maejima K, Takaba M, Abe Y, Ohara H, Aoki R, Matsuyama M, Okuhara S, Iizumi A, Baba K
2. 発表標題 Contingent vibration feedback stimulation to inhibit sleep bruxism
3. 学会等名 International College of Prosthodontists London Symposium Satellite Meeting (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究 分担者	赤松 和土 (Akamatsu Wado) (60338184)	順天堂大学・大学院医学研究科・教授 (32620)	

6. 研究組織（つづき）

	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	美島 健二 (Mishima Kenji) (50275343)	昭和大学・歯学部・教授 (32622)	
研究分担者	中村 史朗 (Nakamura Shiro) (60384187)	昭和大学・歯学部・教授 (32622)	
研究分担者	西山 暁 (Nishiyama Akira) (40359675)	東京医科歯科大学・大学院医歯学総合研究科・准教授 (12602)	
研究分担者	高場 雅之 (Takaba Masayuki) (30384192)	昭和大学・歯学部・講師 (32622)	
研究分担者	井上 富雄 (Inoue Tomio) (70184760)	昭和大学・歯学部・教授 (32622)	

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