

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：32622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861833

研究課題名(和文)セロトニン関連遺伝子多型および遺伝子メチル化と睡眠時ブラキシズムの関連性の解明

研究課題名(英文)The association between primary sleep bruxism and polymorphisms or epigenetical regulations

研究代表者

安部 友佳 (Abe, Yuka)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：80614156

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：多因子疾患とされる睡眠時ブラキシズムの遺伝子多型とDNA修飾との関連を明らかにすることを目的に、睡眠時ブラキシズム患者群とコントロール群のゲノムDNA試料から遺伝子解析を行った。その結果、セロトニン2A受容体遺伝子のプロモーター領域に存在するrs6311(-1438A/G)のG alleleと単位時間当たりのTonic burstイベントに有意な関連を認めた(P=0.029)。また、後天的な遺伝的修飾の検討のため、セロトニン神経系に影響を与える薬剤(SSRIs)の慢性投与下における睡眠時の咬筋筋活動をマウスにて検討した。その結果、筋活動を誘発する閾値に変化を生じる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：The aim of study was to investigate the association between multifactorial primary sleep bruxism and polymorphisms or epigenetical regulations. A total of 29 individuals (F/M=16/13, mean age 26.4 ±2.8 y) participated after signing the university-approved consent form. Polysomnography and genotyping were conducted with these participants. The result showed that the individuals with rs6311 (-1438A/G) G allele in the promoter region of 5-HT 2A gene exhibited significantly more frequent tonic bursts during sleep (median: 1.43 times/hr, range 0-4.12, p=0.029). In order to approach serotonergic epigenetic regulation in the etiology of sleep bruxism, the animal study was performed. The experiment on mice suggested that selective serotonin uptake inhibitors (SSRIs) might affect the induced threshold level of masseter muscle activity during sleep.

研究分野：補綴歯科学、睡眠時ブラキシズム

キーワード：睡眠時ブラキシズム SNP 遺伝子多型 セロトニン神経系

1. 研究開始当初の背景

(1) 睡眠時ブラキシズムの為害作用

睡眠中の運動障害と定義される睡眠時ブラキシズムには、重篤な場合、覚醒時最大咬合力を超える力が数分間持続することがあり、その影響は顎口腔系に破壊的に作用する。睡眠時ブラキシズムは、補綴歯科領域において予後を左右する重要なリスクファクターであるだけに止まらず、睡眠時ブラキシズムによりもたらされる歯周組織の増悪や顎関節症の増悪、咬合高径の変化などの不可逆性変化は、患者 QOL を著しく侵害し、その病因論および治療法の確立は急務である。

(2) 臨床診断の現状と問題点、発症機序

睡眠研究施設におけるポリグラフを用いた終夜咀嚼筋活動測定を行えば正確な診断は可能であるが、日々変動の大きいブラキシズムレベルを評価するためには多数夜測定が必要であり歯科患者への日常的な応用は困難である。睡眠時ブラキシズムに対し、臨床的パラメータとして遺伝、ストレス、アルコール、性格特性などの関与が報告されており (Ohayon, Li and Guilleminault 2001)、また、睡眠時ブラキシズムイベント発生までの生体内動態についての報告 (Kato et al. 2001) もなされているが、その発症機序はいまだ明らかにされていない。近年では、発症機序解明・治療法確立を目的に薬物投与の比較試験もなされているが、多様な神経化学物質が修飾して制御される睡眠機構を鑑みると、副作用を伴う薬物投与からの機序解明は困難を極める。そこで、遺伝的因子に着目し、疾患関連遺伝子から導かれる病態生理を分析することによって、機序解明に貢献し得ると考えた。

(3) 多変量分析による寄与因子の検討

睡眠時ブラキシズムに関連した遺伝的要因について、質問票結果や双生児に関する報告がなされているが、これまでに遺伝子を対象に含めて調査を行った報告はないことから、先行研究において一塩基多型 (SNPs: Single Nucleotide Polymorphisms) に着目し、疾患関連遺伝子の調査を試みた。SNPs とは、遺伝子多型の一つであり、“病気のかかりやすさ” や “薬の効きやすさ”、遺伝的要因を含む多因子疾患の発症要因として注目されている。SNPs を含めて従来報告されているリスク要因を調査し、統計的手法としてロジスティック回帰分析を用いて多因子の検討を行い、その結果、先行研究ではセロトニン 2A 受容体遺伝子の特定の SNP (HTR2A SNP rs6313) の関連を示した (Abe Y, et al. J Sleep Res. 2012)。さらに、共分散構造分析によって、睡眠時ブラキシズムの疾患構造を検討し、SNPs を含めた疾患構造を可視化した。

(4) 寄与因子としての遺伝子

前述のように、睡眠時ブラキシズムの発生メカニズムに関しては、ドパミンやセロトニンなどの神経伝達物質の関連をはじめとして様々な推論がなされてきた。先行研究では、

選択的セロトニン再取り込み阻害薬による睡眠時ブラキシズム増加についての多数の臨床報告 (Ellison, et al. J Clin Psychiatry. 1993., Rahmadi, et al., Synapse., 2011., Kuloglu, et al., J Psychopharmacol., 2010., Lobbezoo, et al., 2001) をもとに、セロトニン受容体遺伝子を対象として調査を行った。

しかしながら、睡眠時無呼吸症候群や Restless Legs Syndrome など、睡眠障害の研究を鑑みると、多因子疾患は、単一の遺伝子ではなく複数の遺伝子が関与し得る。一方で、遺伝子の発現には、SNP のような先天的変異に加えて、後天的エピジェネティック変異である DNA メチル化やヒストンの修飾などの影響を加味する必要がある。研究代表者の一連の研究業績とこれらの科学的根拠から、睡眠時ブラキシズム発症メカニズムの追究には、更なる疾患関連遺伝子多型の探索に加え、エピジェネティックな探索も必須である。そのためには、ヒトのブラキシズムモデルも検討しつつも、薬剤投与などの介入を比較的行いやすい動物モデルの構築が非常に有用と考えられる。セロトニン調節に関与する遺伝子の先天的変異・後天的修飾と、睡眠時ブラキシズムとの関連が明らかになることにより、遺伝子発現の変化が、睡眠時ブラキシズム発症への寄与因子である可能性が考えられる。勿論、多因子疾患として位置づけられる睡眠時ブラキシズムに対し遺伝的因子のみですべてを説明しようとするものではなく、関連付けられた遺伝的因子は環境因子と併せて検証がなされるべきである。しかしながら、本研究の手法を用いて、疾患関連遺伝子を明らかにすることは、睡眠時ブラキシズムのメカニズムの解明に確実にアプローチできると考えられる。メカニズムが解明されれば、睡眠時ブラキシズムの臨床診断の精度を飛躍的に向上させ、治療の選択肢を拡張し得る。

2. 研究の目的

セロトニン調節に関与する遺伝子を対象に、睡眠時ブラキシズムの疾患関連遺伝子多型を明らかにする。また、睡眠時ブラキシズムと遺伝子プロモーター領域の後天的なエピジェネティック変異が関連する機能的影響を検討する。

3. 研究の方法

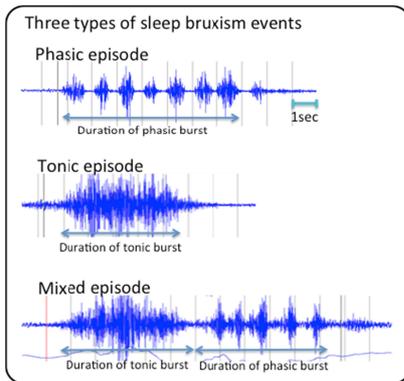
(1) 睡眠時ブラキシズムに関連する遺伝子多型の検討

昭和大学歯科病院における来院患者と医療従事者を対象に募集を行い、研究への参加の同意が得られ、顎口腔系に機能異常を認めず、両側臼歯部に咬合接触を有する成人 29 名 (男性 13 名、女性 16 名、平均年齢 26.4

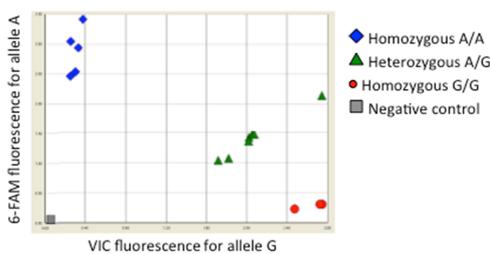
±2.8 歳) を被験者とした。なお、本研究は実施にあたり、昭和大学ヒトゲノム・遺伝子解析倫理審査委員会の承認を得た。(承認番号 207号)

臨床的診断基準(Dube et al. 2004)を用いて一次スクリーニングを行ったのち、睡眠検査室での終夜睡眠ポリグラフ検査(PSG 検査)を2晩実施した。1晩目は睡眠検査室の環境への適応とし、2晩目のデータを採用した。PSG 検査は通法に従い、脳波(EEG)、心電図(ECG)、眼電図(EOG)、筋電図(EMG)を記録し、さらに咬筋筋電図を採取した。睡眠構築は AASM (American Association of Sleep Medicine) のガイドラインに沿って睡眠検査技師がスコアリングを行った。

睡眠時ブラキシズムイベントはビデオ記録と合わせて判定を行った。起床時の最大噛み締め の 10%MVC を睡眠時ブラキシズムイベントとし、Lavigne らの診断基準(Lavigne, Rompré and Montplaisir 1996)を用いて、それぞれ Phasic, Tonic, Mixed のイベントに分けた。



さらに、被験者より末梢静脈血を採取してゲノム DNA を抽出し、一塩基多型(SNP)の解析を行った。SNP の解析は、リアルタイムPCR システムによる TaqMan Probe を用いて行った。



(2)動物モデルにおける後天的要因によるセロトニン神経系の機能的影響の検討

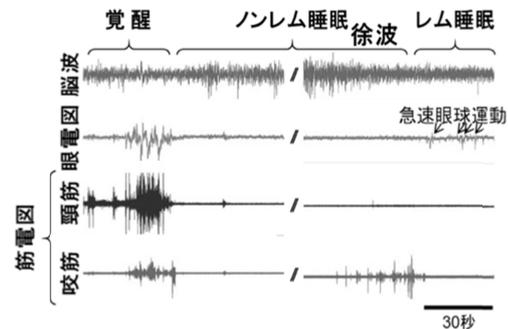
これまで、選択的セロトニン再取り込み阻害薬(SSRI)を投与することによりブラキシズムが生じたという症例報告が複数ある。SSRI はシナプス間隙でシナプスに存在するセロトニン受容体に作用して再取り込みを阻害して、シナプス間隙のセロトニンを増加させることによって、うつ病患者における抗うつ効果を示すと言われている。しかし、ヒトにおいて薬剤投与効果を判定するのは倫理的に問題がある。

そこで、マウスに SSRI の一つである

Citalopram を慢性的に投与し、咬筋筋活動を記録した。マウスは脳波、眼電図、頸筋・咬筋筋電図データを24時間取得できるように頭頂部に電極を留置し、



また、浸透圧ポンプを腹腔内に至るよう設置し、明期12時間および暗期12時間の24時間の咬筋筋活動計測(ベースライン)を行った。浸透圧ポンプにより6日間の慢性投与を行ったのち、再度咬筋筋活動を記録した。マウスは Saline, Citalopram 10(10mg/kg/day) および Citalopram 100(100mg/kg/day) を投与する3群を設定し、合計24匹のデータを比較した。



睡眠学的パラメータより、マウスのREM睡眠・Non-REM睡眠を含む睡眠ステージの判定を行い、各睡眠ステージにおける咬筋の活動に与える影響を検討した。

4. 研究成果

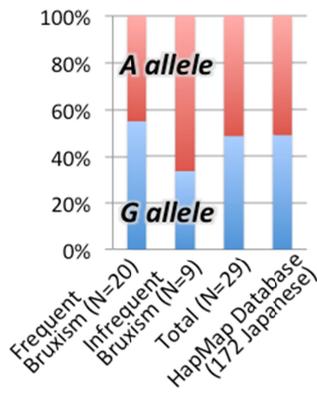
(1)睡眠時ブラキシズムに関連する遺伝子多型の検討

被験者よりにおける睡眠構築には問題を認めなかった。セロトニン 2A 受容体遺伝子の SNP rs6311(-1438A/G)について、5人の被験者に G/G genotype を認め、18人の被験者に A/G genotype を、6人の被験者に A/A genotype を認め、全被験者での G allele のアレル頻度は0.483であった。(なお、Hapmap データによる日本人のアレル頻度は0.488である。)

Serotonin Receptor 2A gene -1438A/G SNP	Genotype			Risk allele G		Allelic Frequency (G/A)
	G/G	A/G	A/A	Positive	Negative	
Severe Sleep bruxer (N=20)	5	12	3	17	3	0.550 / 0.450
Individuals with infrequent sleep bruxism (N=9)	0	6	3	6	3	0.333 / 0.667
Total (N=29)	5	18	6	23	6	0.483 / 0.517

PSG 検査に基づいた重度ブラキサーの G アレル頻度は0.550であった。Rs6311による睡眠時ブラキシズム診断の感度は85.0%であり、特異度は33.0であった。

睡眠時ブラキシズムイベントの頻度は、アレルに関わらず、有意差は認めなかった。しかし、Phasic episodes と Mixed episodes における Tonic bursts の頻度は、G allele positive では 1.43 回/時であり、G allele negative では 0.49 回/時で Mann-Whitney's U test で $P=0.029$ であり、有意に高い値を示した。



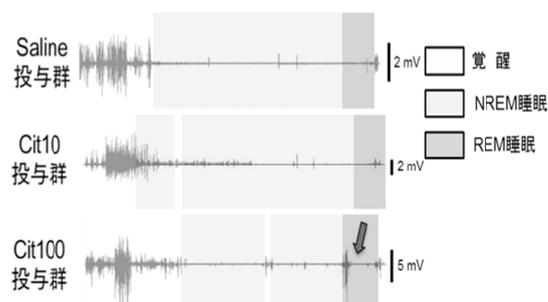
このことから、セロトニン 2A 受容体遺伝子のプロモーター領域に存在する一塩基多型である rs6311 は、セロトニン 2A 受容体の活性に影響を与える可能性があるが、その影響は、特定の睡眠時ブラキシズム筋活動パターンと関連する可能性が示唆された。

従来、睡眠時ブラキシズムの診断にあたっては Grinding を反映すると考えられる Phasic エピソードと Clenching を反映すると考えられる Tonic エピソードは、一括りにされて考えられていたが、遺伝子の多様性によって、その活動パターンが影響を受ける可能性があると考えられる。この部位が、後天的修飾、例えばメチル化等のエピジェネティックな影響を受けることにより、後天的に睡眠時ブラキシズムの一定のパターンが出現する可能性がある。

以上より、睡眠時ブラキシズムが特定の筋活動パターンによりその病態が異なると考えられ、将来、睡眠時ブラキシズムの治療を個別化し、個々人に対応したオーダーメイド医療を提供するために有用である。

(2) 動物モデルにおける後天的要因によるセロトニン神経系の機能的影響の検討

Saline 投与群、Citalopram 10 投与群、Citalopram 100 投与群の 3 群のデータを比較したところ、SSRI の投与は睡眠/覚醒サイクルの日間変動の制御には影響を与えないが、暗期/明期に関連した顎運動の活性の制御には影響を与えることが示唆された。また、SSRI の慢性的投与は、運動の発生を増加させるのではなく、運動を起動するための閾値に影響する可能性が示唆された。



以上より、セロトニン神経系を刺激し得る薬剤によって、睡眠中の筋活動の閾値が変化し、覚醒時には起こりえない不随意運動が睡眠中に出現するという睡眠時ブラキシズムの病態が裏付けられ、また、それにはセロトニン神経系に関わる制御機能が働いていると考えられる。

本研究により、セロトニン神経系に関わる遺伝的要因が、ジェネティックにもエピジェネティックにも作用し得ることが示唆された。この結果は、今後の補綴歯科領域における睡眠時ブラキシズムの診断精度の向上と、治療法の開発に寄与し得る。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

馬場 一美, 安部 友佳, 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, 査読有, 8 巻, 2016, pp.153-158
https://www.jstage.jst.go.jp/browse/ajps/8/2/_contents/-char/ja/

〔学会発表〕(計 11 件)

Abe Y, Hoashi Y, et al., Serotonin receptor gene polymorphism in sleep bruxism: a polysomnographic study. 16th Biennial Meeting of the International College of Prosthodontists, Sep 17-20, 2015, Seoul (South Korea)
 Nogawa Y, Mochizuki A, Abe Y, et al., The effect of citalopram on masseter and neck muscle activities in mice, Society of Neuroscience 2015 Annual Meeting, Oct 17-21, 2015, Chicago (USA)
 Hoashi Y, Okamoto S, Abe Y, et al., Establishment of human sleep bruxism model by induced pluripotent stem cells (iPSCs), 4th Asian Academic Congress for Temporomandibular Joint, Nov 16-18, 2015, Manila (Philippine)
 Yoshida Y, Yoshizawa S, Abe Y, et al., PSG Evaluation of Clinical Diagnosis Criteria for Sleep Bruxism, 4th Asian Academic Congress for Temporomandibular Joint, Nov 16-18, 2015, Manila (Philippine)
 野川 泰葉, 望月 文子, 安部 友佳, 他, シタロプラムがマウス咬筋および顎筋筋活動に及ぼす影響, 日本補綴歯科学会第 124 回学術大会, 2015 年 5 月 30-31 日, 大宮ソニックシティ (埼玉県さいたま市)
 吉田 裕哉, 葎澤 秀一郎, 安部 友佳, 他, 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釣行の関連,

日本補綴歯科学会第 124 回学術大会，
2015 年 5 月 30-31 日，大宮ソニックシ
ティ（埼玉県 さいたま市）
野川 泰葉，望月 文子，安部 友佳，他，
マウス咬筋の筋活動に対するシタロプ
ラムの影響，第 57 回 歯科基礎医学会，
2015 年 9 月 12 日，朱鷺メッセ 新潟コ
ンベンションセンター（新潟県 新潟市）
吉田 裕哉，葭澤 秀一郎，安部 友佳，
他，PSG による睡眠時ブラキシズム臨床
診断法の検証，第 7 回 ISMSJ
（Integrated Sleep Medicine Society
Japan）学術集会，2015 年 7 月 31 日-8
月 2 日，梅田スカイビルタワーウェス
ト（大阪府 大阪市）
吉田 裕哉，葭澤 秀一郎，安部 友佳，
他，睡眠ポリグラフによる睡眠時ブラキ
シズム臨床診断基準の検証，Source: 日
本睡眠学会第 40 回定期学術集会，2015
年 7 月 2-3 日，宇都宮東武ホテルグラ
ンデ（栃木県 宇都宮市）
小海 暁，犬飼 周佑，安部 友佳，他，
閉塞性睡眠時無呼吸症候群患者におけ
る口腔内装置装着に伴う顎顔面・上部気
道形態の変化が治療結果に与える影響，
日本睡眠学会第 39 回定期学術集会，
2014 年 7 月 3-4 日，あわぎんホール（徳
島県 徳島市）
安部 友佳，睡眠時ブラキシズムのリス
ク因子を再考する 個別化医療へ向け
て 睡眠時ブラキシズムに関連する遺伝
子多型，日本睡眠学会第 39 回定期学術
集会，2014 年 7 月 3-4 日，あわぎんホ
ール（徳島県 徳島市）

〔図書〕(計 3 件)

馬場 一美，安部 友佳，医歯薬出版，な
ぜ壊れ，どう直すのか DENTURE REPAIR
部分床義歯・全部床義歯・インプラント
オーバーデンチャー 総論・理論編 義
歯破折の原因と対策 患者サイドの条
件，2015 年，pp. 26-33

安部 友佳，馬場 一美，医歯薬出版，な
ぜ壊れ，どう直すのか DENTURE REPAIR
部分床義歯・全部床義歯・インプラント
オーバーデンチャー 総論・理論編 再
製となるケース，2015 年，pp.52-57

安部 友佳，馬場 一美，医歯薬出版，な
ぜ壊れ，どう直すのか DENTURE REPAIR
部分床義歯・全部床義歯・インプラント
オーバーデンチャー 実践編 インブ
ラントオーバーデンチャーの修理 マ
グネット，2015 年，pp.118-124

〔その他〕

ホームページ等
昭和大学学術業績リポジトリ
<http://meta.lilitory.showa-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安部 友佳 (ABE, Yuka)

昭和大学・歯学部・助教

研究者番号：80614156