

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：32622

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26293415

研究課題名(和文) 疾患特異的iPS細胞を用いた睡眠時ブラキシズムの発症メカニズム解明と治療薬の探索

研究課題名(英文) Development of disease-modifying drugs for sleep bruxism using iPS cell

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) 12,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、睡眠時ブラキシズム特異的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、疾患由来神経系細胞の表現型の検証を行うことである。睡眠時ブラキシズム群と、コントロール群より、末梢静脈血を採取し、iPS細胞を樹立した。さらに、領域特異的な神経細胞分化誘導が可能な誘導方法を用いてHTR2A発現神経細胞の誘導に成功した。また、サブタイプの神経幹細胞が混在している状態から、5-HT_{2A}受容体発現神経細胞を濃縮するために、5-HT_{2A}受容体のプロモーター配列を挿入したレポーターレンチウイルスを作成し、5-HT_{2A}受容体発現神経細胞の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to establish SB disease model using the serotonin 2A(5-HT_{2A}) receptor expressing neurons derived from patient-specific pluripotent stem cells (iPSCs) in order to reveal the pathogenic mechanism of SB. iPSCs were generated from monocytes in peripheral blood samples of two SB patients with C/C genotype of rs6313 and two controls with T/T genotype by transducing episomal plasmids encoding transcription factors and three iPSC clones were isolated from each individual. The established iPSCs were differentiated into serotonergic neurons using the neurosphere culture system. Successful differentiations of these iPSC lines to serotonergic neurons were confirmed by immunostaining. In addition, expression levels of HTR2A gene of these neurons, as evaluated by qPCR, were much higher than those of T cells raised from the original peripheral mononuclear cells. To identify neurons expressing 5-HT_{2A} receptor, we used venus labelled lentivirus vector.

研究分野：歯科補綴学

キーワード：疾患特異的iPS細胞 睡眠時ブラキシズム セロトニン2A受容体 遺伝子多型

1. 研究開始当初の背景

睡眠時ブラキシズム(SB)は睡眠中に行われる歯ぎしりとくいしばりの総称で、咀嚼筋活動を主体とした非機能的運動である。歯科補綴学領域ではSBに起因するメカニカルストレスが治療予後を左右する重要なリスクファクターであると明確に位置づけられているが、その発症メカニズムはいまだ明らかではなく、効率的な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SBリスク因子の探索的研究により、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SB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。SB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る。

近年、急速に進展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る。

2. 研究の目的

本研究の目的は、新たな試みとして睡眠時ブラキシズム特異的 iPS 細胞を樹立してセロトニン受容体発現神経細胞へと誘導し、疾患由来神経細胞の表現型の検証を行い、新規治療薬のスクリーニングを行うための基盤を形成することである。

本研究により、神経細胞レベルでの睡眠時ブラキシズム発症メカニズムが解明され、創薬の基盤となるデータが得られることは確実である。本研究結果は予知性の高い新たな歯科診療体系の構築に多大な貢献をすると考えられる。

3. 研究の方法

1) 被験者の選定

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SB群とControl群を対象とし、血液を採取してrs6313(T102C)の遺伝子型を同定した。SB群からrs6313のCアレル保因者2名(SB-1, SB-2: C/C homozygous)、Control群からSB群とCアレル非保因者2名(Control-1, Control-2: T/T homozygous)を被験者として動員した。

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)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。

2) iPS細胞の作製

4名の被験者のiPS細胞を、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とドミナ

ント・ネガティブp53をコード化したエピゾーマルベクターを遺伝子導入して樹立した。樹立したiPS細胞からそれぞれ3つのセルラインを選択し、品質チェック(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の遺伝子型を同定し、遺伝子型の保存を確認した。

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の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方法を用いた。5-HT_{2A}受容体は脳内に広く分布しているが、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している腹側後脳における縫線核領域への誘導を試みた。

誘導した神経細胞に対して、免疫染色を行いセロトニン作動性神経細胞を確認し、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大脳皮質の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) レポーターレンチウイルスの作製

睡眠時ブラキシズム患者由来のiPS細胞から分化誘導したセロトニン_{2A}受容体を発現する神経細胞に対して、電気生理学的解析を行っていくことを前提として、誘導した神経細胞中から目的細胞をピックアップするための手法を検討し、目的細胞に特異的に反応するレポーターレンチウイルスを作成することとした。レンチウイルスプラスミドベクターの構造としては、HTR2A promoter(1060bp)とVenus(719bp)、選別のためのAmp耐性遺伝子を、遺伝子組み換えにより組み込んだ。5-HT_{2A}陽性細胞の評価を行うにあたり、SK-N-SHにおいて、RT-PCRによる5-HT_{2A}発現解析を行った。さらに、フローサイトメトリーによるGFP陽性細胞の検出と、レポーターウイルスの機能評価を行った。これにより完成したレポーターウイルスを、Neural Stem Cellの接着培養3日目に感染させ、蛍光顕微鏡にて観察した。

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)、SMA(中胚葉)、 α -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 1)

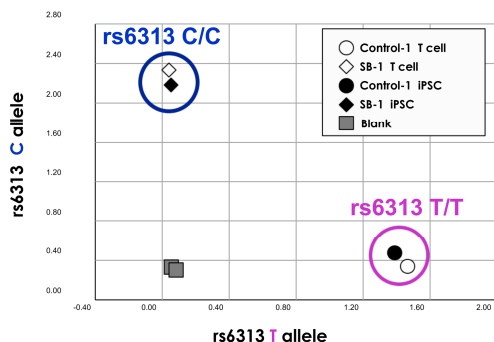


図 1 SNP rs6313 遺伝子型の確認

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

本研究では、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、誘導された神経細胞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 2)

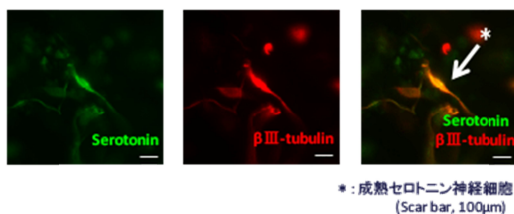


図 2 セロトニン神経細胞の免疫染色

さらに、これらの神経細胞における 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(図 3)。

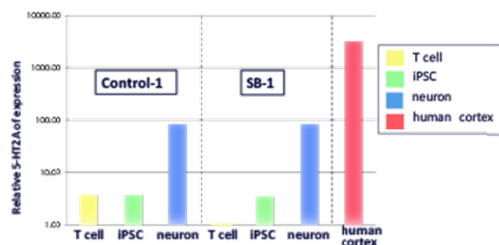


図 3 HTR2A の発現確認

3) レポーターレンチウイルスの作製(図 4)

SK-N-SH において、RT-PCR による 5-HT2A 発現解析の結果、ネガティブコントロール細胞 [293T] では発現を認めず、ポジティブコントロール細胞 [SK-N-SH: ヒト神経芽細胞腫] では 5-HT2A の発現を認めた。

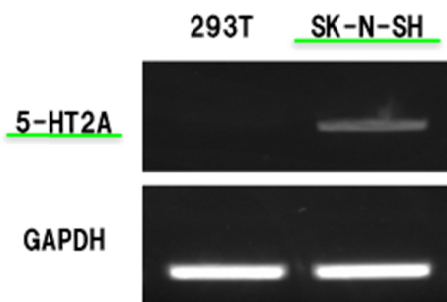


図 4 SK-N-SH における 5-HT2A の発現確認

また、フローサイトメトリーによる GFP 陽性細胞の検出では、ウイルス濃度に依存し、蛍光強度が高まっていることから、ウイルスが適切に機能することを確認した。

完成したレポーターウイルスを、Neural Stem Cell の接着培養 3 日目に感染させ、蛍光顕微鏡にて観察した。その結果、Positive-Control 細胞 (SK-N-SH) と Negative-Control 細胞 (293T) へのレポーターウイルス感染 4 日目の状態で、明視野ではそれぞれ細胞の存在を確認でき、293T では蛍光反応が確認されなかった一方で SK-N-SH では蛍光反応が確認され、レポーターウイルスが機能していることを確認し、目的細胞が選別できることが示された。(図 5)



図 5 iPS 細胞由来神経細胞での機能確認 (A) 分化誘導された神経細胞 (B) 一部の神経細胞に蛍光反応を認めた (C) 重ね合わせ像

4) 今後の展望

iPS 細胞から誘導される神経細胞の背腹軸前後軸に沿った領域特異性を利用し、SB 群ならびに Control 群から樹立した iPS 細胞を腹側後脳領域へと誘導することにより、5-HT2A 受容体を高発現するセロトニン作動性神経細胞に誘導することに成功した。さらに 5-HT2A 発現神経細胞を選別可能なレポーターレンチウイルスを作製することに成功し、睡眠時ブラキシズムに関連した遺伝子型を有する神経細胞の表現型を in vitro で検証可能な SB 疾患モデルを確立することができた。本モデルは今後電気生理学的な機能解析を行うことで、睡眠時ブラキシズムの病因論、発症メカニズムの解明、さらには化合物ライブラリーを用いた薬剤スクリーニングが可能となり、創薬へ向けた大きな一歩となると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6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

Sakai T, Kato T, Yoshizawa S, Suganuma T, Takaba M, Ono Y, Yoshida Y, Yoshizawa A, Kurihara T, Ishii M, Kawana F, Kiuchi Y, Baba K. Effect of clonazepam and clonidine on primary sleep bruxism: a double-blind, crossover, placebo-controlled trial. J Sleep Res, 査読有, 26, 2017, pp78-83, DOI:10.1111/jsr.12442

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

Ikawa Y, Mochizuki A, Katayama K, Kato T, Ikeda M, Abe Y, Nakamura S, Nakayama K, Wakabayashi N, Baba K, Inoue T. Effects of citalopram on jaw-closing muscle activity during sleep and wakefulness in mice. Neurosci Res, 査読有, 113, 2016, pp48-55,

DOI:10.1016/j.neures.2016.07.004

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, 馬場一美, 大倉一夫, 大川周治, 藤澤政紀, 櫻井薫, 小川匠, 矢谷博文, 窪木拓男, 松香芳三, ブラキシズムに対する診断と対策に関するプロジェクト研究 睡眠時ブラキシズムの簡便な診断法の確立と対処法の検討. 日本歯科医学会誌, 査読有, 34巻, 2015年, pp79-83

〔学会発表〕(計11件)

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(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, iPSC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, 加藤隆史, 葎澤秀一郎, 酒井拓郎, 菅沼岳史, 高場雅之, 小野康寛, 吉澤亜矢子, 石井正和, 栗原竜也, 川名ふさ江, 木内祐二, 馬場一美, 二重盲検ランダム化比較試験によるクロナゼパムとクロニジンの睡眠時ブラキシズムへの薬剤効果の検証, 日本臨床睡眠医学会, 兵庫, 2015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(招待講演), 大宮, 2015年

馬場一美, 山内基雄, 加藤隆史, 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, 日本補綴歯科学会第124回学術大会(招待講演), 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

Baba K, Evidence Based Management of Sleep Bruxism. Evidence Based Management of Sleep Bruxism.(招待講演)(国際学会), Manila, 2015年

馬場一美. 最新エビデンスに基づく睡眠時ブラキシズムの合理的診断と対応, 川崎市歯科医師会学術講演会(招待講演), 神奈川, 2014年

馬場一美. 睡眠時ブラキシズムを理解する -その合理的診断と対応-, 佐久歯科医師会学術講演会(招待講演), 長野, 2014年

酒井拓郎, 加藤隆史, 菅沼岳史, 高場雅之, 小野康寛, 葎澤秀一郎, 吉澤亜矢子, 吉田裕哉, 石井正和, 栗原竜也,

川名ふさ江, 木内祐二, 馬場一美, クロナゼパム、クロニジンを用いた睡眠時ブラキシズムに対する薬剤効果について, 日本睡眠学会第 39 回定期学術集会, 徳島, 2014 年

〔図書〕(計 1 件)

古谷野潔、玉置勝司、馬場一美、矢谷博文、和嶋浩一, クインテッセンス出版, 別冊 the Quintessence TMD YEAR BOOK 2014 アゴの痛みに対処する, 2014 年, 総ページ 156

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)
該当なし

取得状況 (計 0 件)
該当なし

〔その他〕

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

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

赤松 和土 (AKAMATSU, Wado)
順天堂大学・医学研究科・特任教授
研究者番号: 60338184

美島 健二 (MISHIMA, Kenji)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号: 50275343

菅沼 岳史 (SUGANUMA, Takeshi)
昭和大学・歯学部・教授
研究者番号: 10196694

田中 準一 (TANAKA, Junichi)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号: 40710166

松本 貴志 (MATSUMOTO, Takashi)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号: 00635039

(3) 連携研究者

高場 雅之 (TAKABA, Masayuki)
昭和大学・歯学部・講師
研究者番号: 30384192

安部 友佳 (ABE, Yuka)
昭和大学・歯学部・講師

研究者番号: 80614156

吉田 裕哉 (YOSHIDA, Yuya)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号: 60783298
(平成 28 年度より連携研究者)

戸澤 有理恵 (TOZAWA, Yurie)
昭和大学・歯学部・助教
研究者番号: 70783356
(平成 28 年度より連携研究者)

(4) 研究協力者

中村 浩崇 (NAKAMURA, Hirotaka)
中里 友香理 (NAKAZATO, Yukari)
中井 健人 (NAKAI, Kento)