

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：32689

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18345

研究課題名(和文)うつ病の診断バイオマーカーとしての時計遺伝子の有用性

研究課題名(英文)Usefulness of clock gene in the depression biomarker

研究代表者

武藤 亜矢(MUTOU, AYA)

早稲田大学・理工学術院総合研究所(理工学研究所)・その他(招聘研究員)

研究者番号：00631045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトはサーカディアンリズムと呼ばれる24時間周期のリズムを自律的に示している。サーカディアンリズムは時計遺伝子に制御されており、時計遺伝子を測定することでサーカディアンリズムが測定できる。本研究は、うつ病と関連があるといわれる時計遺伝子に着目し、簡易的に採取でき、侵襲性のないヒトの唾液で時計遺伝子の発現を測定できるかを検討した。その結果、ヒトの唾液で時計遺伝子が測定できることが明らかとなった。またうつ病動物モデルを用いて、時計遺伝子を測定した結果、ストレスホルモンであるコルチコステロンや抗うつに寄与するとされるテアニンは時計遺伝子に影響を与える可能性が低いことが分かった。

研究成果の概要(英文)：Circadian rhythm is a biological process that shows an oscillation of about 24 hours and is controlled by clock genes. Clock genes are said to be related to depression. In this study, we found the expression of clock genes can be measured by human saliva which is not invasive. Also we measured clock genes of mice using a depression animal model and found that external environmental factors such as light have a greater influence on clock genes than corticosterone which is a stress hormone and theanine which is supposed to antidepressant.

研究分野：精神栄養学

キーワード：時計遺伝子 うつ病

1. 研究開始当初の背景

生物はサーカディアンリズムと呼ばれる24時間周期のリズムを自律的に示している。1997年に哺乳類に生態リズム制御因子(clock)があることが発見された。時計遺伝子(*Clock*, *Bmal1*, *Per1*, *Per2*, *Per3* 遺伝子)は遺伝子の発現の活性化や抑制により体内でサーカディアンリズムを刻んでいる。時計遺伝子の発見のあと、体内時計の研究は急速に進み、体内時計の異常はさまざまな疾患を引き起こすことが分かってきた。うつ病患者では気分の日内変動、REM潜時の短縮などのサーカディアンリズムに関連した症状が認められている。また日照時間の少ない国ではうつ病の発症率が高いことも明らかになっている(Shibata S et al, 2010, Casta G et al, 2010)。マウスの光変調ストレスモデル(3.5h-LDstress)で時計遺伝子の発現の位相のずれおよび振幅が海馬で有意に低下することが報告されており、ストレスホルモンであるコルチコステロンが高値になる光変調ストレスモデルは強制水泳試験およびショ糖嗜好性試験においてうつ症状を示すことが分かっている(Tara AL et al, 2012)。近年、うつ病と時計遺伝子の関連が示唆される研究がいくつも報告されていることから、本研究ではうつ病のバイオマーカーとして時計遺伝子の有用性について研究を行った。

うつ病は精神疾患の一つであり、生活の質(Quality of Life)を大きく低下させる疾患である。ストレスを起因として発症することは分かっているものの、その発症メカニズムはいまだ明らかになっていない。

そこで、本研究ではマウスを用いてうつ病モデルでの時計遺伝子の発現と抗うつ効果が報告されているテアニンを投与したマウスの時計遺伝子の発現を調べ、うつ病の発症及び改善への時計遺伝子のかかわりを調べた。また現在、ヒトの時計遺伝子を測定する方法として血液をサンプルとした方法が一般的ではあるが、侵襲性のないヒトの唾液による時計遺伝子の測定について検討を行った。

2. 研究の目的

本研究は、うつ病診断のバイオマーカーとして時計遺伝子の有用性についての検討を行う。うつ病はサーカディアンリズムの異常を伴う疾患であることがいくつかの報告によって明らかになりつつある。現在、うつ病は専門医による問診が主であり、複雑なうつ病の診断は医師の経験に頼らざるおえないのが現状である。本研究は時計遺伝子を使用した適切なバイオマーカーを見つけることで、専門医でなくてもうつ病をより簡易で的確な診断ができる可能性を持ち、大変社会的にも重要性の高い課題である。

これまでの研究により、時計遺伝子の乱れを引き起こしたマウスでのうつ病様行動が

確認されており、うつ病の発症と時計遺伝子の関連が示唆されている。そこで、本研究ではマウスのうつモデルを用いて時計遺伝子の発現を検討し、うつ病の悪化や改善に時計遺伝子がどのように寄与するのかを明らかにすることを目的に研究を行った。

臨床的なサーカディアンリズムの研究では、時計遺伝子を血液や毛包細胞などを時間ごとに採取し、測定することによってそのリズムの解析が行われている。しかし、血液は専門の機関でないと難しく、また長時間の待機を強い測定は被験者の大きな負担となっている。そこで本研究では新しい手法として、簡易かつ被験者のストレスの少ない方法で時計遺伝子の発現を測定することを目的とし、ヒトの唾液で測定できるかを検討した。この方法は侵襲性をもたず、外来での診断が可能であり、患者への負担は大きく軽減される。唾液で時計遺伝子を測定することにより、将来的にうつ病バイオマーカーとしての時計遺伝子の有用性を検討する。

3. 研究の方法

実験 1-1 「コルチコステロン投与うつモデルの時計遺伝子の変化」

ICR mice の雄マウスを1週間順化させたのち、コントロール群には水道水、コルチコステロン投与群には Corticosterone 20mg/L を3週間自由飲水させた。その後、ZT0、ZT6、ZT12、ZT18のタイミングで解剖を行い、時計遺伝子(*Per2*, *Bmal1*)及び*BDNF*、*NGF*を測定した。

実験 1-2 「抗うつ効果の報告されているテアニン投与による時計遺伝子の変化」

ICR mice の雄マウスを1週間順化させたのち、コントロール群には水道水、テアニン投与群には0.3% Theanine 水を3週間自由飲水させた。その後、ZT0、ZT4、ZT8、ZT12、ZT16、ZT20のタイミングで解剖を行い、時計遺伝子(*Per2*, *Bmal1*)及び*BDNF*、*NGF*を測定した。

実験 2-1 「ヒトの唾液による時計遺伝子の測定(1ポイント)」

男性4名(20代後半から30代前半)の唾液を14時に採取し、時計遺伝子の*Bmal1*、*Per2*、*Cry2*、*Nrd1*を測定した。被験者には前日に十分な睡眠を有していることを確認している。ただし、当日の食事の制限などは行っていない。唾液採取は Rneasy Micro Kit(Qiagen)を使用し、SYBR Green を利用したPCRで測定した。

実験 2-2 「ヒトの唾液による時計遺伝子の測定(6ポイント)」

男性3名(20代後半から30代前半)の唾液を2時、6時、10時、14時、18時の6ポイント、4時間ごとに採取し、時計遺伝子の*Nrd1*、*Ned2*、*Per3*を測定した。被験者には

前日に十分な睡眠を有していることを確認している。ただし、当日の食事の制限などは行っていない。唾液採取は Rneasy Micro Kit(Qiagen)を使用し、Taqman を利用し PCR で測定、18rRNA で補正を行った。

4. 研究成果

実験 1-1. 「うつ病モデル(コルチコステロン投与モデル)の時計遺伝子の変化」

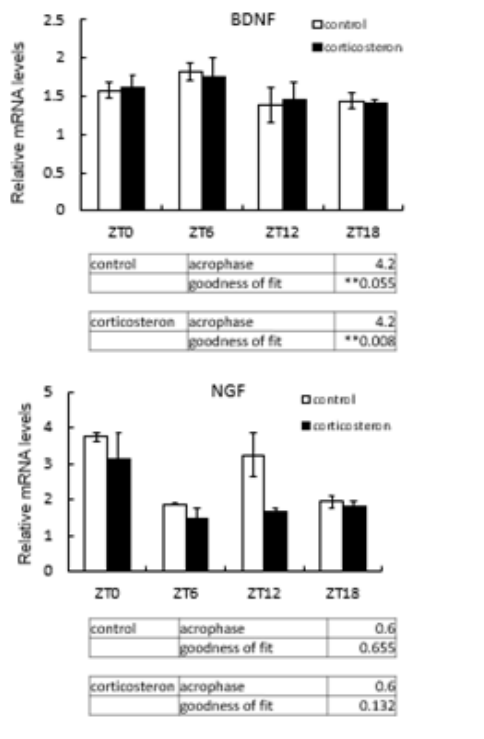


図 1-1-1. マウス海馬の BDNF、NGF の mRNA 発現量

BDNF、NGF の mRNA 発現量をマウスの海馬で測定した。BDNF 遺伝子はコントロール群およびコルチコステロン群でリズムが確認できたものの、発現の増加や減少に差は見られなかった。NGF 遺伝子についてはコントロール群、コルチコステロン群ともに発現のリズムは確認できなかった。

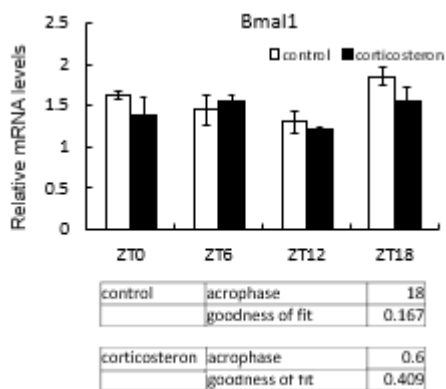


図 1-1-2. マウス海馬の Bmal1 の mRNA 発現量

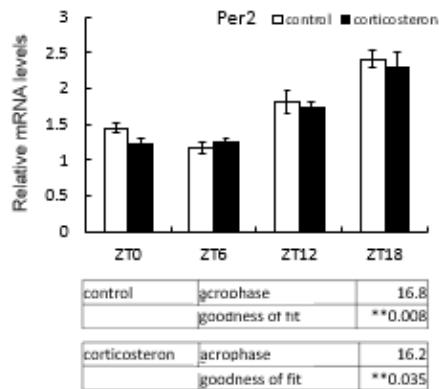


図 1-1-3. マウス海馬の Per2 の mRNA 発現量

時計遺伝子 (*Per2*、*Bmal1*) を海馬で測定した結果、*Bmal1* 遺伝子のコントロール群及びコルチコステロン群でリズムが確認できなかった。またコントロール群及びコルチコステロン群での発現の差も見られなかった。*Per2* 遺伝子発現のリズムはコントロール群及びコルチコステロン群で確認できた。しかし、コントロール群及びコルチコステロン群で *Per2* 遺伝子発現の発現差は見られなかった。

うつモデルであるコルチコステロン投与群を用い、BDNF、NGF および時計遺伝子である *Per2*、*Bmal1* を測定したところ、リズムや発現量にコントロール群との差は見られなかった。このことからうつ病の発症要因として BDNF のリズムの乱れや *Per2* のリズムの乱れが必ずしも存在するわけではないことが明らかとなった。

実験 1-2. 「抗うつ効果の報告されている食品成分テアニン投与による時計遺伝子の変化」

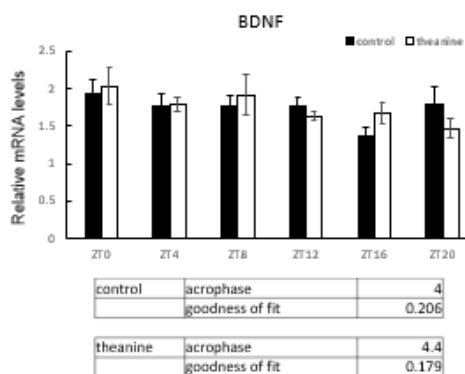


図 1-2-1. マウス海馬の BDNF の mRNA 発現量

うつ病症状の改善が報告されている食品成分のテアニンを投与し、BDNF 遺伝子を測定した。その結果、コントロール群およびテアニン群で発現量の差やリズムは確認でき

なかった。

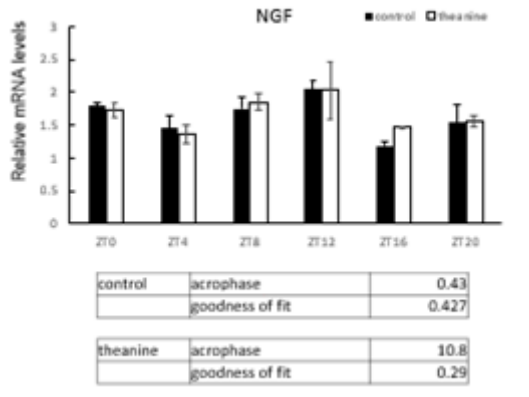


図 1-2-2 .
マウス海馬の NGF の mRNA 発現量

NGF のコントロール群およびテアニン群でリズムおよび発現量の差異は確認できなかった。これまでにテアニンの投与によって BDNF タンパク量が増加するとの報告があったが、本研究で測定した BDNF の mRNA レベルでは大きな発現差は見られなかった。

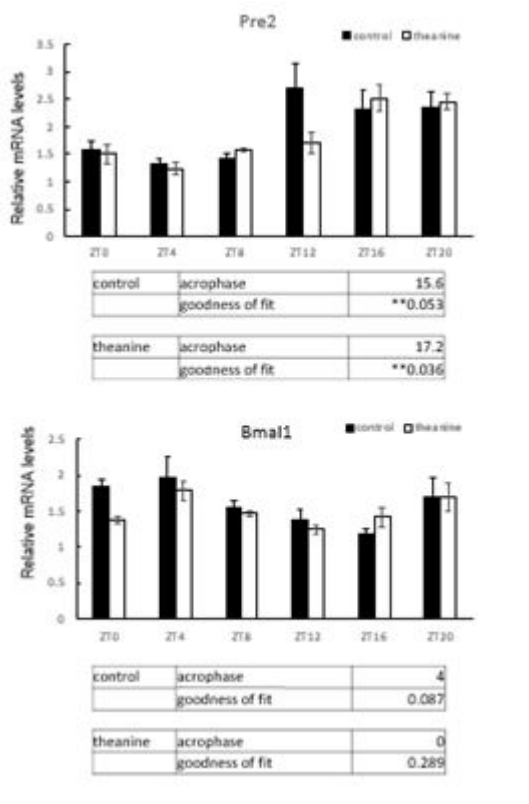


図 1-2-3 .
マウス海馬の *Per2*, *Bmal1* の mRNA 発現量

コントロール群で *Per2* 遺伝子発現にリズムが見られ、テアニン群でも同様にリズムが確認できた。しかし mRNA 発現量に差は見られなかった。また、*Bmal1* ではコントロール群およびテアニン群でリズムおよび発現

量に差は見られなかった。

これらの結果により、うつ病の発症起因の一つとされるストレスホルモンであるコルチコステロンは時計遺伝子の発現に影響を与えていないことが明らかとなった。これまでの研究では、マウスの光変調ストレスモデルでコルチコステロンが増加し、時計遺伝子の振幅が低下することが報告されている。これらの結果から、うつ病モデルマウスにおける時計遺伝子の変化はコルチコステロンの影響よりも光の変調の影響が大きいと考えられた。つまり、うつ病の病態に関連する誘因因子であっても必ずしも時計遺伝子の発現に影響を与えているわけではないことがマウスの試験によって示唆された。また抗うつ効果の報告があるテアニンを投与したマウスでも時計遺伝子発現の変化が見られなかった。このことからテアニンのうつ病の改善についても時計遺伝子の発現が関わっている可能性が低いと考えられた。

実験 2-1 .「ヒトの唾液による時計遺伝子の測定 (1 ポイント)」

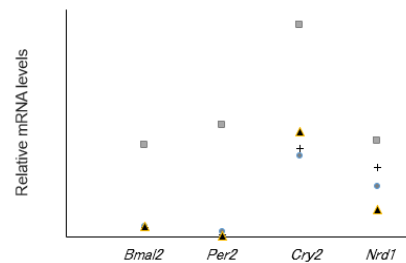
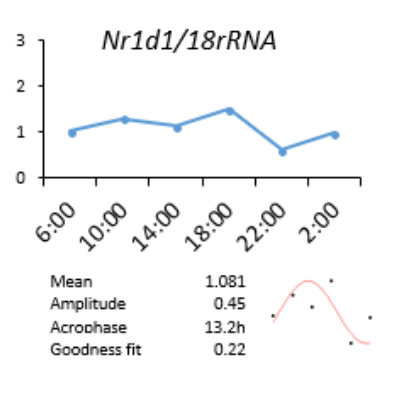


図 2-1-1 .
ヒト唾液での時計遺伝子の測定

4 名のサンプルを測定した結果、十分な mRNA 量が収容でき、唾液中から精製した mRNA で時計遺伝子の存在を確認できた。このことから、唾液によって時計遺伝子を測定できる可能性が示唆された。

実験 2-2 .「ヒトの唾液による時計遺伝子の測定 (6 ポイント)」



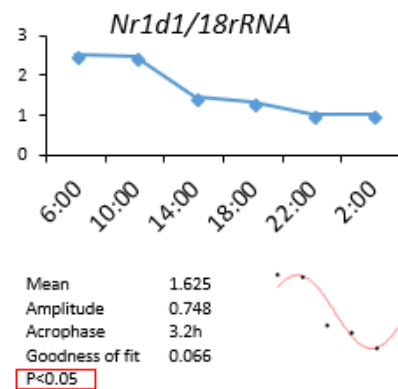
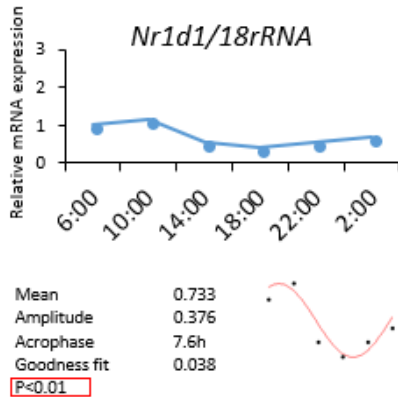


図 2-1-2
ヒトの唾液での時計遺伝子のリズム測定

1 週間以内に薬の服用があった 1 名の男性を除いた、3 名の男性の唾液サンプルより時計遺伝子 (*Nr1d1*, *Nr1d2*, *Per3*) を測定した。その結果、*Nr1d1* 遺伝子で 3 名のサンプル中 2 名でリズムが見られた。他の先行研究では、ヒトの血液によって時計遺伝子の測定されており、その際には *Nr1d1*, *Nr1d2*, *Per3* が利用されている。ヒトの唾液によって時計遺伝子の一つである *Nr1d1* 遺伝子が測定できる可能性が本研究によって示唆された。唾液での時計遺伝子の測定はこれまでの血液や毛包細胞採取での時計遺伝子の測定とは異なり、侵襲性がないことから、被験者への負担が少ない。そのため、本研究での成果は次世代の時計遺伝子の測定の可能性を示した大きな成果と言える。しかし、一方で課題もあり、先行研究で報告のある他の *Nr1d2* や *Per3* 遺伝子はリズムが測定できなかったことから、より唾液での測定に適した安定性のある時計遺伝子の探求が必要である。またリズムが測定できなかった 1 名については、mRNA の分解が進んでいたため、リズムの測定が不可能だったと考えられ、mRNA 分解を防ぐための採取方法、保存方法、精製方法についても更なる検討が必要である。他にも数名から唾液の採取を行ったが、測定に必要な mRNA 量に足りないものも存在し、唾液中の

mRNA 量を増やす工夫や効率的な精製方法についても更なる検討が必要である。これらについて本課題期間中においても、検討を行ったが根本的な解決には至らなかったため、今後の検討課題としたい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Tahara Y, Takatsu Y, Shiraishi T, Kikuchi Y, Yamazaki M, Motohashi H, Muto A, Sasaki H, Haraguchi A, Kuriki D, Nakamura TJ, Shibata S. Age-related circadian disorganization caused by sympathetic dysfunction in peripheral clock regulation.

NPJ Aging Mech Dis. 3, 16030 (2017)

doi: 10.1038/npjamd.2016.30. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1. A. Muto, T. Sakai, Y. Tahara, Y. Kikuchi, T. Shiraishi, M. Yamasaki, H. Motohashi, S. Shibata, Chrono-nutrition effect of theanine intake on the learning memory and anxiety in mice. Neuroscience (2016)

2. 武藤亜矢、酒井智子、田原優、菊池耀介、白石卓也、山崎まゆ、柴田重信「テアニン摂取時刻によるマウス脳の生理活性変化の検討」第 70 回日本栄養・食糧学会大会 (2016)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

武藤亜矢 (MUTO, AYA)

早稲田大学・理工学術院総合研究所 (理工学研究所)・その他 (招聘研究員)

研究者番号 : 00631045