

平成30年6月27日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15562

研究課題名（和文）時計遺伝子発現測定に基づいた神経変性疾患患者の概日時計機能評価

研究課題名（英文）Functional assessment of the circadian clock of patients with neurodegenerative disorders based on clock gene expression

研究代表者

明石 真（Akashi, Makoto）

山口大学・時間学研究所・教授

研究者番号：30398119

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,700,000円

研究成果の概要（和文）：動物実験によって加齢が概日時計機能に異常をもたらすことが詳細に示されてきた。今回私たちは、行動の概日リズムにおいて重篤な異常が検出される高度認知症の後期高齢者を対象として、時計遺伝子発現に基づいた概日時計の機能評価を行った。具体的には、外因的概日時計調節因子が視交叉上核を介して末梢時計の制御に至る経路が正常に機能していることを調べるために、末梢の時計遺伝子発現リズム位相を確認した。すると、患者全てにおいて正常な概日位相が検出され、入力から末梢時計までの経路は正常に機能していることが示唆された。高度認知症の後期高齢者においても、入力から末梢時計までの経路は正常に機能している可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Extensive studies based on animal experiments have demonstrated that aging results in circadian dysfunction. Here, we performed functional assessment of the clock machinery based on circadian clock gene expression in elderly patients aged 83 to 94 with severe dementia who showed abnormal circadian behavior. Specifically, to investigate whether or not the systemic pathway from the circadian input to peripheral clocks via the suprachiasmatic nucleus (SCN) functioned normally, the circadian phase in peripheral clock gene expression rhythms was evaluated using plucked hair tissues. Unexpectedly, the phase in all volunteer patients was within a range similar to that of healthy subjects, indicating that the systemic circadian pathway is robust against aging and dementia. Taken together, these findings indicate that the circadian pathway from external inputs to peripheral clocks via the SCN may function normally, even in the old-old with severe dementia.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日時計 時計遺伝子 認知症

## 1. 研究開始当初の背景

加齢によって概日時計システムに多様な変化が生じることが、マウスを用いた詳細な研究によって示唆されてきた。これによると、加齢は行動生理の概日リズムにおける振幅低下・位相異常・断片化などの原因になるが、これは視交叉上核における神経発火の振幅低下と神経ネットワークの脆弱化による出力異常が原因であることが示唆されている。一方、ヒトにおいても加齢による概日時計の機能異常が示唆されてきた。特に、睡眠覚醒の概日リズムにおいて位相前進・断片化・平坦化が報告されている。マウスの研究とは異なり、ヒトの研究報告は多くはない。まず、高齢者では、概日時計の位相調節には、比較的高照度の光が必要であることが報告されている。また、松果体からのメラトニン分泌量および視交叉上核におけるメラトニン受容体発現量の低下が報告されている。加えて、加齢にともなう視交叉上核における解剖学的な変化についても報告がある。これらの報告は、加齢は入力経路と視交叉上核の両方において機能低下を起こすことを強く示唆しており、これが概日リズムの位相異常・断片化・平坦化の原因になっていると考えられている。しかしながら、概日時計の分子的本体である「時計遺伝子」における加齢にともなう発現変化については、これまでのところ報告されていない。

## 2. 研究の目的

私たちは、重度の認知症を患う後期高齢者の中から行動や睡眠リズムにおいて顕著な異常を示す患者を対象として、末梢組織を利用した時計遺伝子発現に基づいて概日時計の機能評価を実施した。

## 3. 研究の方法

末梢の時計遺伝子発現リズム位相を測定して環境位相と比較することで、入力から視交叉上核を介して末梢時計に至る経路が正常に機能しているか評価した。私たちが改良を重ねてきた毛根を利用した簡便な時計遺伝子発現測定システムは、被験者に対する負担が小さいために後期高齢者の実験に適しており、また測定誤差が小さいために個々人の位相評価が可能である。

本研究は獨協医科大学との共同研究として行われており、同大学内において研究計画の倫理審査が実施された。体毛の採取などは同大学の医師が主導で実施しており、山口大学ではデータ解析を担当している。また、被験者の家族に対しインフォームドコンセントを実施した。

## 4. 研究成果

加齢や認知症が概日時計に与える影響を明らかにするために、行動リズムの異常が著しい高度認知症を患う後期高齢者を対象として実験を実施した。患者は自力歩行ができず、一日のほとんどを施設内で生活しており、自然光を浴びる機会が少ない。加齢に伴って光受容能の低下が起こることから考えて、このような生活環境では概日時計機能障害が起きていることが予想される。また、本研究では光照射による認知症状や行動リズムの改善効果についても検討した。患者は男性1名と女性4名であり、年齢は83から94歳の範囲である。MMSEのスコアは4名で2点以下であり、さらにFASTによる調査では全ての患者がステージ7に分類される。

患者の毎日の生活スケジュールは規則正しいことから、環境要因において患者間で大きな違いは存在しない。しかし、患者の一日の行動パターンには大きな個人差が存在した。全ての患者において行動リズムのメリハリは乏しく、位相異常や断片化が見られる。眼鏡型 LED 装置を用いて、起床後 1 時間 2 回の光照射を毎日実施した。すると、患者 2 名では振幅の増大、患者 1 名では夜間の活動量の明確な減少が検出された。他の 2 名では、ほとんど何も変化が検出されなかった。

次に、光照射が患者の認知機能および非認知機能に及ぼす影響を、質問紙によるスコアによって判定した。まず、MMSE および FAST においてスコアの改善は全く検出されなかった。非認知機能の調査は NPI-Q によって行った。重症度の改善が患者 1 名で顕著であり、患者 2 名についても僅かだが改善された。介護者の負担については、全ての被験者において改善された。

高齢者の行動リズム異常は、光受容・網膜神経伝達経路・中枢時計機構・末梢時計への情報伝達経路・末梢時計機構など、概日時計システムのさまざまな段階の機能不全に起因する可能性がある。いずれかの段階で異常が起きた場合、末梢時計の位相に異常が生じるはずである。そこで、私たちは、引き抜いた毛根に付着する細胞集団の時計遺伝子発現リズムを調べることで、末梢時計の位相を評価することにした。

患者の頭髪を約 6 時間おきに数本から最大 10 本を採取して凍結保存した。全サンプルが集まったら RNA 精製と逆転写を行った後、リアルタイム PCR 法によって *Per3*, *Nr1d1* (*Rev-erb*) および *Nr1d2* (*Rev-erb*) の発現量を測定した。データは、細胞種や時間によらず発現量が一定である *18S-rRNA* によって補正された。どの被験者でも、光照射の前後とも、3 つの時

計遺伝子発現において明確な概日リズムが確認できた。

位相を正確に評価するために、数学的に位相推定を実施した。以前私たちが報告したように、3 つの時計遺伝子の位相間隔は個体によらず一定に保持される。この性質を利用して、*Per3* の位相を基準として、*Nr1d1* の位相を「-4 時間」、*Nr1d2* の位相を「-2 時間」と定義した。このような位相の固定化は、データ誤差による推定精度の脆弱性を低減することができる。過去の私たちの報告によると、健常者の場合、社会的起床時刻の 1 から 4 時間前に *Per3* の発現ピークが検出された。今回の推定結果では、患者の *Per3* の発現リズム位相は、光照射の有無にかかわらず、2 時から 7 時の間をピークとした発現リズムを示していた。したがって、患者の起床時刻が 6 から 7 時であることを考えると、ほぼ正常であると考えられる。患者の概日位相が正常であることから予想されるように、一ヶ月以上にわたる青色光照射を行っても、大きな位相の変化は検出されなかった。ただし、光照射前において被験者間では最大で 4 時間程度の位相の差異が存在していたが、光照射後は約 2 時間程度にまで縮まっていることから、若干の概日位相の修正効果があったのかもしれない。

以上のように、高度認知症の後期高齢者においても、入力から末梢時計までの経路は正常に機能していることが示唆された。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] ( 計 1 件 )

A simple method using ex vivo culture of hair follicle tissue to investigate intrinsic circadian characteristics in humans  
Yamaguchi A, Matsumura R, Matsuzaki T, Nakamura W, Node K, Akashi M  
Sci. Rep (査読あり). 2017; 7(1): 6824  
doi: 10.1038/s41598-017-07268-8.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

明石 真 (AKASHI, Makoto)  
山口大学・時間学研究所・教授  
研究者番号: 30398119

### (2)研究分担者

### (3)連携研究者

### (4)研究協力者

辰元 宗人 (TATSUMOTO, Muneto)  
山口 藍 (YAMAGUCHI, Ai)  
松村 律子 (MATSUMURA, Ritsuko)  
隅野 純子 (SUMINO, Junko)