

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19390310

研究課題名（和文）

遺伝子発現解析による新規睡眠障害関連遺伝子の同定と、新しい過眠症診断法の開発

研究課題名（英文）

Search for novel hypersomnia related genes and their application trial as a new diagnostic biomarker

研究代表者

本多 真 (HONDA MAKOTO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・副参事研究員

研究者番号：50370979

研究成果の概要：

網羅的発現解析・differential display・全ゲノム関連解析から選択されたナルコレプシー(過眠症)関連遺伝子、および既知の候補遺伝子について、白血球中での発現定量比較を行い、疾患特異的変動を示すものを探索した。当初疾患特異的変化を示すと同定された遺伝子(MX2など)は、実際はHLA遺伝子型によって発現変化をきたすことが判明した。HLA遺伝子型がナルコレプシーと関連し疾患脆弱性を示す根拠の一つと考えられた。HLA遺伝子自体の発現変化を検討したが、疾患特異性は見られなかった。全ゲノム関連解析から同定されたCPT1B遺伝子はSNP遺伝子型によって大きく発現変化をするが、多変量解析で疾患特異性も示すことが明らかとなった。CPT1Bが触媒する反応産物であるアシルカルニチンを血中で定量したところ、疾患特異的に異常低値を示すことを発見し、さらにアシルカルニチン低値は診断のみと関連してSNP遺伝子型や年齢性別BMI眠気と関連しないことを見出した。今後新たな研究分野を拓く内容で、診断指標としての臨床応用を念頭において検討を継続中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2008年度	5,700,000	1,710,000	7,410,000
年度			
年度			
年度			
総計	12,900,000	3,870,000	16,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：精神生理学・睡眠

## 1. 研究開始当初の背景

年間3兆円と推定される睡眠障害の社会的損失の大半は眠気に伴う認知機能障害と生産性の低下とされる。眠気の評価には主観的な自記式眠気尺度とポリグラフを用いた客観的な睡眠潜時反復検査があるが、眠気を訴える人の増加に対して診断評価の体制は不十

分なのが現状である。また眠気の生じるメカニズムも未解明であるため、過眠症状および過眠症の診断を簡便・正確に行える新しい診断検査法の開発が待たれていた。これは過眠症の早期治療により個人の社会的不利益を軽減するとともに、社会の安全や生産性の向上に役立つものである。

ここ10年余りで睡眠覚醒制御の神経機構に関わる新たな分子が同定され、睡眠科学は長足の進歩をとげた。しかし睡眠障害の分子レベルでの病態研究は、疾患関連遺伝子の同定が少しずつ進んではいるが、睡眠覚醒制御における機能的な役割と病態との関連については、方法論的な困難からほとんどわかっていない。睡眠物質の探索から、炎症性サイトカインを初めとする多数の生理活性物質(IL6, TNF $\alpha$ など)が睡眠制御に関わることが明らかにされてきた。しかし過眠症および過眠症状の分子病態指標として特異的な知見は示すものは見出されていない。

典型的過眠症であるナルコレプシーは、遺伝因子の関与が確定しており、過眠症分子指標の探索に適したモデルとなる。本研究は、ナルコレプシーの研究を通じて新規の過眠症および過眠症状関連遺伝子を探索同定し、その臨床応用を試みるという計画である。

## 2. 研究の目的

ナルコレプシーは特定の HLA 遺伝子型と密接な関連をもちその他の遺伝素因も発症に関わることが知られる。過眠症関連遺伝子を探索的アプローチ(遺伝子発現解析・differential display・全ゲノム関連解析)により同定すること、新規過眠症関連遺伝子と既知の過眠症関連候補遺伝子について、その末梢白血球中での遺伝子発現定量および産物定量を多数検体で行い、過眠症の診断指標や過眠状態の状態像指標を血中に見出すこと、さらにそれを診断法開発につなげることを目的とする。

## 3. 研究の方法

遺伝子探索には以下の3方法を用いる。死後脳(視床下部)を用いた網羅的な遺伝子発現解析、血球中の mRNA 発現量を群間比較する differential display 法、そして全ゲノム遺伝子多型関連解析である。探索的研究で同定された過眠症(ナルコレプシー)関連遺伝子と、既知の過眠症関連候補遺伝子(HLA, オレキシン, 免疫関連など)とともに、多数症例から収集された白血球中での mRNA 発現比較を行い、また血中での成分比較を含めて、疾患特異的あるいは状態像特異的な分子指標を同定して検証を行う。具体的には、以下の手順によって研究をすすめた。

(1) 血液検体の収集と RNA, cDNA の作成  
神経研究所附属の診療施設において研究協力者を募り、過眠症症例から血液検体の収集および臨床検査所見、睡眠に関わる生活習慣等の情報を収集し個人情報保護の安全対策を備えたシステムでデータベース化する。血液検体は4時間以内に血清・血漿・buffy coat を分離し-80°Cで保存する。RNA は PAXgene

のシステムを用いて採血と抽出を行い、DNaseI 処理後に逆転写酵素(Superscript RT III)と random hexamer を用いて cDNA を合成し、RT-PCR での定量比較に用いる。(2) 視床下部における網羅的な遺伝子発現解析に基づく、過眠症関連遺伝子の同定  
ナルコレプシー6例対照群8例の後部視床下部組織(死後脳)の網羅的な遺伝子発現解析 (affymetrix HG-133A, B GeneChip による)と引き続き定量的 RT-PCR 法での確認の結果、ナルコレプシー関連の9遺伝子が同定された。同様に前部視床下部の遺伝子発現比較からナルコレプシー関連の8遺伝子も同定された。計17個の新規疾患関連遺伝子を候補とした。

(3) differential display 法による血中過眠症関連遺伝子の探索  
ナルコレプシー群と対照群から抽出した total RNA をプールし、GeneFishing DEG キット(Seegene 社)を用いて疾患特異的な発現変化を示す血球中遺伝子の探索を行う。このシステムは primer に特異な構造をもたせ、偽陽性を抑えて特異的に二種類の試料間で発現量が異なる遺伝子(Differentially Expressed Genes)をスクリーニングできるシステムである。検体をプールすることによって、個体差を減らし疾患特異性をもって発現変化を起こす疾患関連候補遺伝子の探索を可能とする。産物の発現比較を20種の primer pair を用いて行う(理論的には600-1000個程度の遺伝子を増幅して比較できることとなる)。発現量に変化のある PCR 産物(バンドの濃さが異なる産物)をアガロースゲルから切り出し、TA クローニングの上、遺伝子配列を確認し、ヒト遺伝子発現データベースと照合して、遺伝子の同定を行う。次に同定された遺伝子特異的 primer を設計しナルコレプシー群と対照群で発現量の差があるかどうか半定量比較を行う。疾患特異性が確認された遺伝子については、遺伝子特異的 primer を用い、プールに用いた検体と異なる症例・対照20例ずつについて、定量的 RT-PCR による正確な遺伝子発現定量を行う。ここで疾患特異性の確認を行う。(4) 全ゲノム関連解析(東京大学医学部人類遺伝学教室との共同研究)疾患群222,対照群389例について affymetrix Human Mapping 500K array を行い、25万 SNP の data を解析して30の候補 SNP が同定された。さらに159疾患群と190対照群を用いて追試をおこない1SNPのみについて再現性が確認された。この SNP(rs5770917)と同じ連鎖不平衡ブロック内にある2つの遺伝子 CHKB, CPT1B が同定され、血中での発現解析に用いた。(5) 定量的 RT-PCR による過眠症関連遺伝子の血球中発現検討

上記(2)-(4)の探索研究で同定された新規過眠症関連遺伝子と、既知の過眠症・睡眠覚醒関

連遺伝子(HLA や COMT など)を選択し、その白血球中での mRNA 発現量が、疾患特異的な変化を示すかどうか、定量的 RT-PCR 法で検討する。検出法は Taqman プローブあるいは exon boundary に設計した prime を用いた SYBR 法によって検出した。遺伝子発現量の比較のために内因性コントロールによる補正が必要である。健常者 60 例を用いた予備検討で beta actin, GAPDH (PPIB) の相乗平均が最も安定していることを確認し (geNorm 法)、これを標準化に用いた。

サンプルははじめナルコレプシー群 20 例、対照群 20 例としたが、検討中に HLA 遺伝子型によって発現変化が生じるものが発見され、最終的にはナルコレプシー 44 例、年齢性別 HLA 一致対照群 34 例、年齢性別一致 HLA 不一致対照群 24 例を検討に用いた。これらのサンプルの眠気尺度や BMI などの臨床情報を解析に用いた。

(6) 解析結果で CPT1B 遺伝子の発現量が、SNP 型特異的な発現変化を示すだけでなく、疾患特異的な変化も示すことが判明したため、CPT1B の産物( $\beta$ 酸化の律速酵素)によって生成されるアシルカルニチンについて、カイノス社の酵素サイクリング法を用いて血清中で定量を行い、疾患特異性について検討を行った。

(7) 過眠症診断法の開発

(5)(6)までで得られたデータのうち、疾患特異的な変化があると判明したもの (CPT1B とアシルカルニチン分画)について、鑑別診断のほか、眠気重症度(ESS 得点)、遺伝子の発現量、年齢、性別などを説明変数とした多変量解析を行った。

#### 4. 研究成果

死後脳の後部視床下部を用いた網羅的遺伝子発現解析から選択された新規疾患関連遺伝子 9 つのうちナルコレプシーの病態に関わるオレキシン神経細胞に共存し、オレキシンの転写を抑制的に制御するナルコレプシー関連遺伝子として IGFBP3 が同定された。また死後脳前部視床下部から選ばれた疾患関連遺伝子を含めた合計 17 遺伝子のうち、8 遺伝子が定量的 RT-PCR 法を用いて安定して白血球中での定量可能であることが示された。さらに differential display 法による検討から新規ナルコレプシー関連遺伝子として MX2 が同定された。全ゲノム遺伝子関連解析から選択された CPT1B, CHKB とともに新規疾患関連遺伝子として血中での発現定量に用いた。また既知の睡眠覚醒関連遺伝子として COMT, ORX 受容体などの白血球中での発現も確認され、末梢の分子指標としての検討に用いた。

当初ナルコレプシー群と HLA を一致させていない対照群を用いた比較を行った。いく

つかの過眠症特異的な変化が見出されたが、研究の経過中に Differential display 法で行って同定された MX2 について、HLA 遺伝子型一致群を用いて追加検討を行ったところ、MX2 遺伝子型の発現変化が HLA 遺伝子型によって規定されていることが判明した。そこで予備検討結果を検討しなおすと、疾患特異的に増加すると考えられた COMT 等についても、HLA 遺伝子型を一致させた対照群との比較では有意差は見られなかった。すなわち HLA 遺伝子型が様々な遺伝子発現変化を規定する可能性が考えられた。そこで HLA 遺伝子自体の発現変化をまず詰めることとした。HLA classII は多様性が大きく、DRB1 は約 330 種、DQB1 は約 30 種の遺伝子多型が知られる。そのため HLA 発現の指標として遺伝子多型がない HLA-DRA と HLA-DRB1 全体量を定量できる primer を設計して定量系を確立し、一方でナルコレプシー特異的アレルである HLA-DQB1\*0602 については既報に従い Taqman 法による発現定量を行った。結果、HLA-DRA, DQB1 全体ともに HLA 遺伝子型によって発現変化を示し DQB1\*0602 アレル陽性例で発現が増加するが、HLA 遺伝子型を合わせた対照群と野比較では疾患特異的発現変化はないことが判明した。これは HLA 遺伝子型自体がナルコレプシー脆弱性の基盤を形成することを説明するものである。(なお BMI, 年齢, 性別, 眠気尺度などについても解析を行ったが、単一で HLA 発現変化に有意に寄与する因子は見出せなかった) さらに HLA-DRA と DRB1 全体の発現量の相関を調べると、対照群では  $r=0.49$  程度の相関が見られるのに対し、疾患群では  $r=0.21$  と HLA 分子( $\alpha$ 鎖と  $\beta$ 鎖の二量体)の構成がアンバランスになっていることが示唆された。網羅的遺伝子発現解析によって選択された IGFBP3 の発現量には大きなばらつきがあるが、U 検定を用いると疾患特異性は見られず、その血清中あるいは髄液中の定量でも疾患特異性は見られなかった。

全ゲノム関連解析から同定された CPT1B 遺伝子の発現量は、SNP の遺伝子型によって大きく変化し、リスクアレルがない場合と比べてヘテロで持つと約 1/2、ホモでもつと 1/4 に減少することが判明した。さらに多変量解析を行うと、CPT1B 発現量に影響する因子として SNP 遺伝子型が  $p=10^{-9}$ 、診断が  $p=10^{-2}$  と説明変数として有意な寄与を示したが、年齢、性別、BMI、主観的眠気尺度には関連しないことが明らかになった。そこで CPT1B という酵素の産物であるアシルカルニチンに注目し、血清中のカルニチン分画を測定したところ、ナルコレプシー群 38 例中 8 例でアシルカルニチンの異常低値があり、対照群 32 例はすべて正常範囲であることが判明した。この異常低値は、CPT1B の活性を変化

させる SNP の遺伝子型や、CPT1B の mRNA 発現量と関連せず、さらに年齢・性別・BMI・採血時刻とは関連せず、診断のみと関連することも見出された。全ゲノム関連解析から同定された疾患関連遺伝子によって、多因子遺伝を呈する過眠症の病態に関わる新たな生物学的経路を見出した結果と考えられた。当初の予測と異なる形ではあったが、今後の過眠症研究の生物指標として新たな分野を拓く成果をあげられたと考える。(この研究成果については、現在報告中) 今後多数例で詳細な検討をすすめ、過眠症の診断指標としての臨床応用を試みる予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

① Honda M, Arai T, Fukazawa M, Honda Y, Tsuchiya K, Salehi A, Akiyama H, Mignot E. Absence of ubiquitinated inclusions in hypocretin neurons of narcolepsy patients. *Neurology* (in press) (査読有)

② Tanaka S, Kawashima M, Honda M. Absence of anti-aquaporin-4 antibody in narcolepsy. *Sleep Biol Rhythms* (in press) (査読有)

③ Honda M, Eriksson K, Zhang S, Tanaka S, Lin L, Salehi A, Hesla PE, Maehlen J, Gaus SE, Yanagisawa M, Sakurai T, Taheri S, Tsuchiya K, Honda Y, Mignot E. IGFBP3 colocalizes with and regulates hypocretin(orexin) *PLoS ONE* 4:e4254 (1-14), 2009 (査読有)

④ Tanaka S, Honda Y, Honda M. MX2 Gene Expression Tends to be Downregulated in Subjects with HLA-DQB1\*0602. *Sleep* 31:749-751, 2008 (査読有)

⑤ 本多真 ナルコレプシーの病院遺伝子研究 脳 21 11:413-417, 2008 (査読無)

⑥ Tanaka S, Honda Y, Honda M Identification of differentially expressed genes in blood cells of narcolepsy patients. *Sleep* 30:974-979, 2007 (査読有)

⑦ 本多真 ナルコレプシー(居眠り病)の原因遺伝子研究: 睡眠障害の分子生物学 実験医学 25 増刊号 193-198, 2007 (査読無)

[学会発表] (計 6 件)

① Honda M, Tanaka S, Honda Y. HLA gene expression in white blood cells of narcolepsy. The 23<sup>rd</sup> annual meeting of the Associated Professional Sleep Societies, Seattle, USA 2009/06/10

② 本多真, 田中進, 本多裕 ナルコレプシーにおけるHLA分子の発現検討第4回関東睡眠

懇話会 東京 2009/01/25

③ 本多真 ナルコレプシー研究の進歩 第38回日本臨床神経生理学会学術大会 神戸 2008/11/12

④ 本多真, 本多裕 ナルコレプシーにおけるHLAの発現変化 日本睡眠学会第33回定期学術集会 郡山 2008/06/25

⑤ Honda M, Tanaka S, Honda Y Identification of differentially expressed genes in blood cells of narcolepsy patients. The 5th International Congress of the World Federation of Sleep Research and Sleep Medicine Societies Cairns, Australia 2007/09/03

⑥ 田中進, 本多裕, 本多真 ナルコレプシーリンパ球で発現変化を示す遺伝子の同定. 日本睡眠学会第32回定期学術集会 東京 2007/11/09

[図書] (計 2 件)

① 本多真(分担執筆) ナルコレプシーの分子生物学 In睡眠学(日本睡眠学会編) 朝倉書店 pp120-125, 2009

② 本多真(分担執筆) ナルコレプシーと睡眠制御機構 In シリーズ脳科学6 精神の脳科学(甘利俊一監修、加藤忠史編) 東京大学出版会 pp221-261 2008

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

特記することなし。

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 真 (HONDA MAKOTO)

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・副参事研究員

研究者番号: 50370979

(2) 研究分担者

田中 進 (TANAKA SUSUMU)

財団法人東京都医学研究機構・東京都精神医学総合研究所・研究員

研究者番号: 30399472

(3) 連携研究者

本多 裕 (HONDA YUTAKA)

財団法人神経研究所・名誉所長

研究者番号: 90010305