

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：若手研究(スタートアップ)

研究期間：2007～2008

課題番号：19890003

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子発現解析法を用いた新規睡眠遺伝子の検索と同定

研究課題名(英文) Identification of sleep genes by cDNA array.

研究代表者

寺尾 晶 (TERAO AKIRA)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授

研究者番号：10451402

研究成果の概要：

プロスタグランジン (PG)  $D_2$  およびアデノシン  $A_{2A}$  受容体選択的作動薬誘発性睡眠時と断眠処置後の反跳性睡眠時における脳内遺伝子発現状態を cDNA アレイを用いて網羅的に比較した。前述した全ての睡眠条件において共通に発現変化を認めた遺伝子が睡眠調節機構に重要であるという観点から検索を行った。その結果、大脳皮質では *mt1*、視床下部では *bok*、*bzrp*、*mt1*、前脳基底部では *ceacam10*、*cic-2* を新規睡眠関連遺伝子として見出した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,320,000	0	1,320,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,670,000	405,000	3,075,000

研究分野：睡眠科学

科研費の分科・細目：環境生理学 (含体力医学・栄養生理学)

キーワード：プロスタグランジン  $D_2$ 、アデノシン  $A_{2A}$  受容体、cDNA アレイ

網羅的遺伝子発現解析、反跳性睡眠、ノンレム睡眠、レム睡眠

1. 研究開始当初の背景

(1) 日本人全体では 5 人に 1 人が不眠症であり、働く世代に限定すると 4 人に 1 人、また深夜労働者に限定すると 3 人に 1 人という統計がある。24 時間社会化に伴う生活の変化、交代勤務労働者の増加、高齢化社会の進行が要因となり、不眠症患者は増加の一途をたどっていることから、不眠症は身近な現代病になってきた。

(2) 不眠症状が慢性化するとうつ病になるリスクが高まるが、北海道などの高緯度地方で

多い季節性感情障害 (SAD) 患者も冬季の日照時間の減少による概日リズム性不眠症が原因と考えられ、不眠症の早期治療は重要である。

(3) 不眠症は睡眠・覚醒調節機構の破綻と考えられるが、現在知られている調節因子のみでは十分説明できない事もあり、その分子基盤を明らかにすることが重要である。

2. 研究の目的

(1) プロスタグランジン (PG)  $D_2$  は脳内で最も

存在量の多い PG であり、多様な生理作用を示す。PGD<sub>2</sub> の睡眠作用に関する報告は多数あるが、中でも、(a) 微量の PGD<sub>2</sub> で強力な睡眠が誘発されること。(b) PGD<sub>2</sub> による睡眠は、脳波、脳温、心拍数、一般行動から見る限り、生理的睡眠と区別がつかないこと。(c) 脳脊髄液中の PGD<sub>2</sub> 濃度は睡眠・覚醒サイクルと同調し、睡眠時に高く、覚醒時に低いサーカディアンリズムを示すことから、PGD<sub>2</sub> は生理的睡眠物質としての条件を満たしていると考えられた。

(2) 本研究ではアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体シグナルが PGD<sub>2</sub> による睡眠促進作用において重要である点を考慮し、PGD<sub>2</sub> およびアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体選択的作動薬 (CGS21680) 投与時に誘起される睡眠において共通して発現変化する遺伝子を網羅的に解析し、睡眠・覚醒調節機構の分子基盤の一端を明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 睡眠測定実験：実験には Wistar 系雄性ラット (10 週齢) を用い、午前 8 時から午後 8 時を明期とする 12 時間明暗交替照明条件下で飼育した。睡眠測定に先がけ、ラットに脳波・筋電図測定用電極および前脳基底部腹側脳表領域のクモ膜下腔に慢性カニューレの埋め込み手術を行った。術後十分な回復期間を経た後、PGD<sub>2</sub> および CGS21680 は、それぞれ 200 pmol, 20pmol/min にて消灯直後から持続投与を行ない、注入 2 時間後となる睡眠量のピーク時に動物を安楽殺し、脳サンプルを得た。採取した脳は大脳皮質、視床下部、前脳基底部に細切し、全 RNA 抽出まで -80℃ で保存した。

(2) 断眠実験：動物の睡眠・覚醒状態を脳波的に観察しながら、睡眠状態に入った時のみ睡眠を妨げ断眠実験を行った。断眠後観察される反跳性睡眠のピーク時となる 2 時間目に動物を安楽殺し、脳サンプルを得た。採取した脳は大脳皮質、視床下部、前脳基底部に細切し、全 RNA 抽出まで -80℃ で保存した。

(3) 遺伝子発現解析実験：大脳皮質、前脳基底部、視床下部から全 RNA を抽出後、マニュアルに従い、断片化 cRNA プローブを作成し、GeneChip® (Affymetrix) にハイブリダイズさせることにより、神経系に特異的に発現する 1322 個の遺伝子を網羅的に調べた。遺伝子発現プロファイルは GeneSpring を用いて解析した。GeneChip® 解析結果から、発現量に変化が認められた遺伝子については RT-PCR 法にて確認後、リアルタイム PCR 法にて発現量を定量化した。

### 4. 研究成果

(1) 「PGD<sub>2</sub>-感受性睡眠促進領域」として知られる、前脳基底部腹側脳表領域に慢性カニューレを通じて PGD<sub>2</sub> (200 pmol/min) および CGS21680 (20 pmol/min) を 2 時間持続投与したところ、両薬物とも生食投与時と比較してノンレム睡眠量 (図 1A) およびレム睡眠量 (図 1B) をそれぞれ有意に増加させた。ベンゾジアゼピン系睡眠薬はノンレム睡眠量を増加させるものの、レム睡眠量を抑制することが知られているが、今回用いた薬物にはこのような問題はなく、「生理的睡眠」を引き起こしたと考えられる。

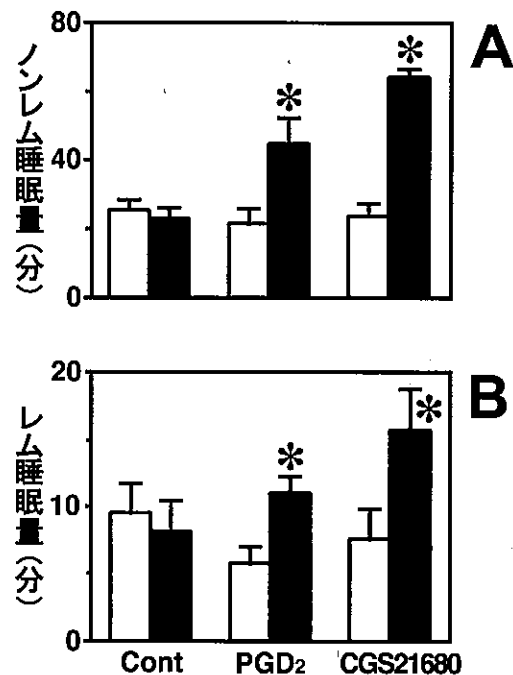


図 1 PGD<sub>2</sub> または CGS21680 を 2 時間持続投与した時のノンレム睡眠量 (A)、レム睡眠量 (B) に与える影響。薬物投与は消灯直後から 2 時間行った (Zeitgeber time 12-14)。白カラム: 基準日、黒カラム: 薬物投与日。\*p<0.05 by paired t-test.

(2) 上記睡眠状態において採取した視床下部、大脳皮質、前脳基底部における遺伝子発現プロファイルを GeneChip® を用いて網羅的に解析した。図 2 に PGD<sub>2</sub> 誘発性睡眠時 (A) および CGS21680 誘発性睡眠時 (B) において、視床下部、大脳皮質、前脳基底部で発現量が 50% 以上変化した遺伝子の数をベン図にまとめた。三部位間で共通に発現量が変化した遺伝子は PGD<sub>2</sub> 誘発性睡眠時には 11 個、CGS21680 誘発性睡眠時には 16 個認められた。二部位間で比較すると、脳機能上の関連性が高い視床下部と前脳基底部では共通に変化した遺伝子が多く認められた。

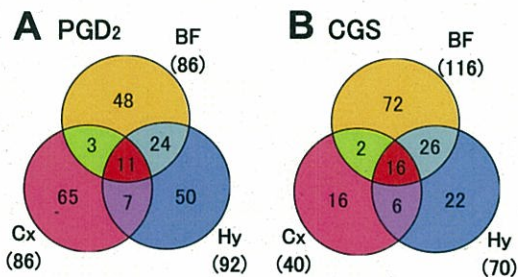


図2  
 PGD<sub>2</sub>(A)あるいはCGS21680(B)誘発性睡眠時に発現量が50%以上増加した遺伝子の数をベン図にまとめた。Cx:大脳皮質、BF:前脳基底部、Hy:視床下部

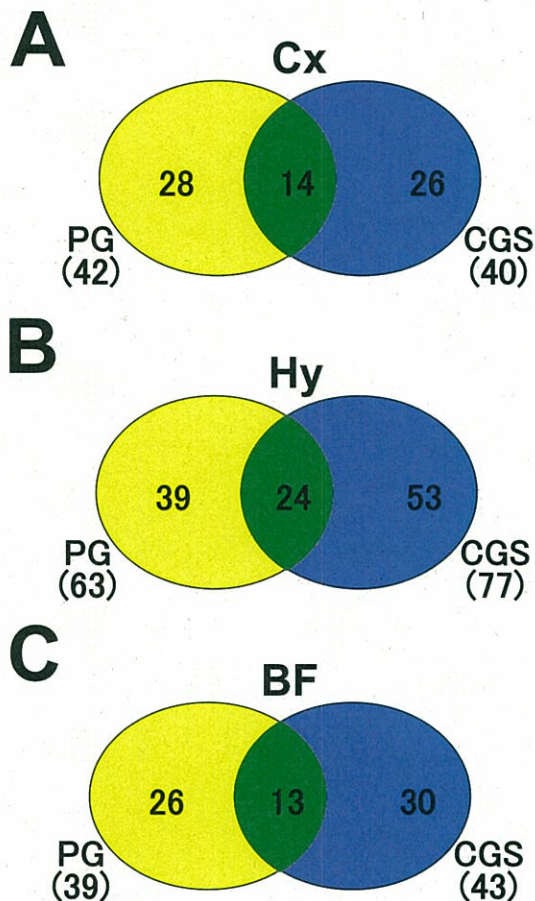


図3  
 PGD<sub>2</sub>およびCGS21680誘発性睡眠時に共通して発現量が50%以上増加した遺伝子の数をベン図にまとめた。(A)Cx:大脳皮質、(B)Hy:視床下部、(C)BF:前脳基底部

(3) PGD<sub>2</sub>誘発性睡眠時およびCGS21680誘発性睡眠時に発現量が50%以上増加した遺伝子の数を視床下部、大脳皮質、前脳基底部で比較した結果を図3にまとめた。どの脳部位においてもPGD<sub>2</sub>誘発性睡眠および

CGS21680誘発性睡眠時に共通して発現変動する遺伝子が30%程度認められたが、これはPGD<sub>2</sub>による睡眠作用がアデノシンA<sub>2A</sub>受容体を介したものであることを遺伝子発現パターンの相同性からも裏付けることが出来たと考えられる。

(4) PGD<sub>2</sub>およびCGS21680誘発性睡眠時に共通して発現変動した遺伝子のうち、末梢型ベンゾジアゼピン受容体 (*pbr*)、インスリン様成長因子-2 (*igf-II*)、GABAA受容体α5サブユニット (*gabara5*)について発現量をリアルタイムPCRにて定量化した結果を図4にまとめたが、いずれもGeneChip®の結果を良く再現している。

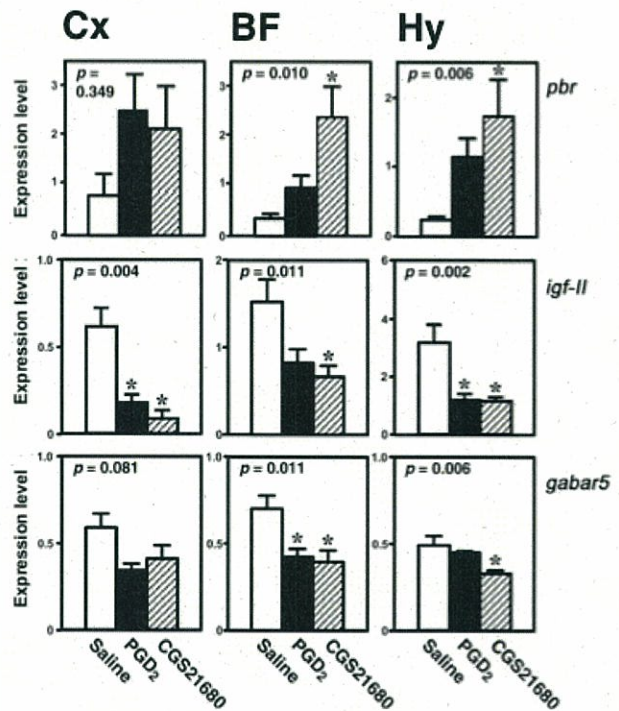


図4  
 PGD<sub>2</sub>(A)あるいはCGS21680(B)誘発性睡眠時における、末梢型ベンゾジアゼピン受容体 (*pbr*)、インスリン様成長因子-2 (*igf-II*)、GABAA受容体α5サブユニット (*gabara5*)の遺伝子発現量をリアルタイムPCRにて定量化した。Cx:大脳皮質、BF:前脳基底部、Hy:視床下部 \*p<0.05 by Tukey-Kramer post hoc test.

(5) 複数のアプローチにより実験的に誘発した睡眠状態、即ち、PGD<sub>2</sub>誘発性睡眠、CGS21680誘発性睡眠、断眠処置後の反跳性睡眠において共通に活性化される遺伝子群が睡眠調節機構に重要であるという観点から睡眠遺伝子候補の絞り込みを行った。その結果、大脳皮質では *mtl*、視床下部では *bok*, *bzrp*, *mtl*、前脳基底部では *ceacam10*, *cic-2* を新規睡眠関連遺伝子として見出した(表1)。

これら遺伝子は各実験条件におけるデータ解釈上の問題点が相殺され、本質的に睡眠に直結していると考えられる。

Brain Region	Gene Name	Genbank#
BF	CEA-related cell adhesion molecule 10 ( <i>ceacam10</i> )	U23056
	CIC-2Sa; Rattus norvegicus chloride channel ( <i>cic-2</i> )	AF005720
Cx	metallothionein-1 ( <i>mt1</i> )	M11794
Hy	Bcl-2-related ovarian killer protein ( <i>bok</i> )	AF027954
	Benzodiazepin receptor, peripheral-type ( <i>bzrp</i> )	J05122

表 1

PGD<sub>2</sub> 誘発性睡眠、CGS21680 誘発性睡眠、断眠処置後の反跳性睡眠において共通に活性化される遺伝子とその Genbank accession number と共に脳部位毎にリストアップした。(A)Cx:大脳皮質、(B)Hy:視床下部、(C)BF:前脳基底部

(6) 各種生物の全遺伝子情報が明らかになるにつれ、遺伝子の挙動を一度に解析する事が求められている。睡眠と関連の高い生体リズム分野においては時計遺伝子の発見により、体内時計の分子機構が急速に進んだ経緯があるので、今回得られた結果は睡眠分野にも十分応用できたと考えられる。

#### 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 8 件)

- ① Terao, A., Huang, Z.-L., Wisor, J.P., Mochizuki, T., Gerashchenko, D., Urade, Y., and Kilduff, T. S. Gene expression in the rat brain during prostaglandin D<sub>2</sub>- and adenosically-induced sleep. *J. Neurochem.* 105 (4): 1480-1498 (2008) 査読有り
- ② Terao, A., Haruyama, T., and Kimura, K. Roles of the hypocretin/orexins in the regulation of sleep and wakefulness. *Jpn. J. Vet. Res.* 55 (2-3): 75-83 (2008) 査読有り
- ③ 寺尾 晶, 春山貴志, 木村和弘: 睡眠・覚醒調節における脳内オレキシン系の役割 獣医生化学 44 巻 p11-14 (2007) 査読有り

[学会発表] (計 6 件)

- ① 寺尾 晶, Huang, Z.-L., Wisor, J. P., Mochizuki, T., Gerashchenko, D., Urade, Y., 木村和弘, Kilduff, T. S. プロスタグランジン D<sub>2</sub> およびアデノシン A<sub>2A</sub> 受容体作動薬 CGS21680 誘発性睡眠時に活性化される遺伝子の網羅的発現解析 第 146 回 日本獣医学会 平成 20 年 9 月 (ワールドコンベンションセンターサミット・シーガイア、宮崎市)
- ② Terao, A., Huang, Z.-L., Wisor, J. P., Mochizuki, T., Gerashchenko, D., Urade, Y.,

and Kilduff, T. S. Gene Expression in the Rat Brain During Prostaglandin D<sub>2</sub>- and Adenosinergically-Induced Sleep. 第 22 回米国睡眠学会 平成 20 年 6 月 (ボルチモア国際会議場、米国ボルチモア市)

- ③ 寺尾 晶, Wisor, J.P., Peyron C., Apte-Deshpande, A., Wurts, S., Edgar, D., 木村和弘, Kilduff, T. S. 断眠モデル動物の大脳皮質における網羅的遺伝子発現解析 第 144 回 日本獣医学会 平成 19 年 9 月 (酪農学園大学、江別市)

[図書] (計 1 件)

- ① 寺尾 晶  
時計とノンレム睡眠  
時間生物学辞典 (石田直理雄・本間研一編)  
朝倉書店, 東京, p72-73 (2008)

[その他]

ホームページ

<http://www.vetmed.hokudai.ac.jp/biochemistry01.html>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺尾 晶 (TERAO AKIRA)

北海道大学・大学院獣医学研究科・准教授  
研究者番号: 10451402

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし