

機関番号：74415

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20406006

研究課題名（和文）

不眠バイオマーカーの探索

研究課題名（英文）

Exploration of biological marker of insomnia

研究代表者

有竹 浩介 (ARITAKE KOSUKE)

財団法人大阪バイオサイエンス研究所・研究員

研究者番号：70390804

研究成果の概要（和文）：

チューリッヒ大学睡眠研究グループと共同で、睡眠障害患者の脳脊髄液および血液中の睡眠覚醒調節に関与する物質を分析し、健常人と比較した。ナルコレプシー患者では脳脊髄液中のリポカリン型 PGD 合成酵素濃度が有意に減少していること、パーキンソン病患者では有意に増加していることが判明した。更に、ヒスタミンやアデシンの濃度を調べたところ、脳脊髄液中のヒスタミン濃度は、多発性硬化症患者で増加し、イノシン濃度は、全ての睡眠障害患者で高い値を示した。これらの結果から、脳脊髄液中の L-PGDS、ヒスタミン、イノシン濃度の測定と比較が睡眠障害の新たな診断マーカーになることを見出した。

研究成果の概要（英文）：

We evaluated the changes of sleep-wake promoting substances in the cerebrospinal fluid (CSF) and serum of patients with sleep disorders carry out with the sleep research group at Zurich University. Lipocalin-type prostaglandin D synthase (L-PGDS) levels in CSF of narcoleptic patients were significantly lower than those of the control, while those from patients with Parkinson's disease were significantly higher as compared with those of the control. As compared with the CSF of the controls, histamine levels in CSF of patients with multiple sclerosis were significantly higher and so as the inosine level in CSF of patients with sleep disorders. These results indicated that L-PGDS, histamine and inosine are new biological marker of sleep disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
20 年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
21 年度	3,000,000	900,000	3,900,000
22 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
年度			
年度			
総計	10,600,000	3,180,000	13,780,000

研究分野：薬理学、睡眠学、生化学

科研費の分科・細目：医薬薬学 B・環境系薬学

キーワード：

1. 研究開始当初の背景

日本国民の 5 人に 1 人が睡眠に何らかの

問題を抱え、10 人に 1 人が日常生活に支障をきたす睡眠障害を発症している。最近、生活

習慣病に伴う睡眠障害（睡眠時無呼吸症候群など）や睡眠不足が原因の産業事故、交通事故、医療事故が増えており、その日本経済に及ぼす損失額は年間2兆円以上と試算されている。

この原因としては、睡眠や覚醒が最も身近な生理現象の一つでありながら、最も解明が遅れていたことに起因する。睡眠の必要性は誰もが生まれながら経験的に知っているが、その意義さえも未だに不明である。

申請者の所属する睡眠研究グループは生理活性脂質のプロスタグランジン（PG） D_2 が睡眠を、その構造異性体 PGE_2 が覚醒を調節する内在性の作用物質であることを証明し、更にその情報伝達機構を分子生物学的、分子遺伝学的、薬理学的、生理学的に研究を行ってきた。

すなわち、脳膜やオリゴデンドログリアに局在するリポカリン型 PGD 合成酵素（L-PGDS）の触媒反応で産生される PGD_2 が、前脳基底部の脳膜に局在する PGD_2 受容体（DPR）と結合し、局所の細胞外アデノシン濃度の上昇を促し、前脳基底部に分布するアデノシン A_{2A} 受容体（ $A_{2A}R$ ）発現神経細胞を刺激して、VLPO（腹側外側視索前野）

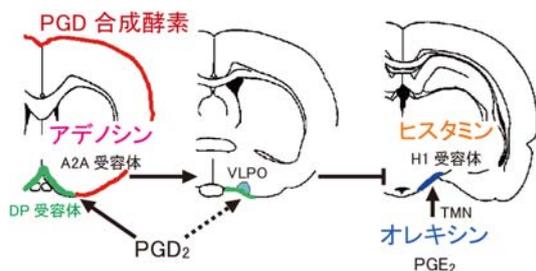


図1 睡眠の液性調節機構（マウス）

の睡眠ニューロンを活性化し、同時に GABA またはガラニン系の抑制性投射を通じて後部視床下部の TMN（結節乳頭核）のヒスタミン系覚醒ニューロンの活動を抑制し、リップフロップメカニズムによって睡眠覚醒が調節されることを明らかにした（図1）。すなわち、睡眠が液性因子（睡眠物質）によって調節されていることを動物実験レベルで基礎的に証明した。

ヒトの睡眠と覚醒においても同様に液性調節が行われていると考えられるが、臨床において睡眠の質や量を客観的に評価する方法は、現在のところ脳波解析以外にない。

2. 研究の目的

ヒト睡眠覚醒障害において、睡眠覚醒の調節に関与する、 PGD_2 、アデノシンやヒスタミンの産生量或いは、 PGD_2 の産生を触媒する L-PGDS の量が変動し、脳内、脳脊髄液中あるいは血中でこれら睡眠・覚醒調節物質の量あるいは質に反されると考えられる。

本研究では、ナルコレプシーをはじめとした睡眠障害研究で著名なスイス チューリッヒ大学およびハーバード大学の協力の下に、臨床試料（脳脊髄液および血液）中の PGD_2 、アデノシンやヒスタミンおよび或いは L-PGDS の質的、量的変化を詳細に調べ、睡眠と覚醒の生化学マーカーを同定し、睡眠障害の診断方法を確立することを目的とする。

研究成果は、科学的根拠に基づいた新たな睡眠障害の診断方法と治療法の確立に貢献する。更には、自然な覚醒や睡眠を誘う副作用のない医薬品、例えば時差ぼけを改善したり、眠気を防止する医薬品や夜間に熟睡するための睡眠薬の開発に繋がり、国民生活に多大な恩恵をもたらす。

3. 研究の方法

試料収集

チューリッヒ大学神経内科に所属する研究協力者（Dr. Claudio Bassetti 教授、Christian Baumann 医師、Ulf Kallweit 医師）が睡眠障害患者および対照者（非睡眠障害患者）の脳脊髄液および血清を採取した。試料の採取および本研究への使用当っては、予めチューリッヒ大学倫理委員会の許可および患者への説明と同意を得た。

チューリッヒ大学神経内科で採取された脳脊髄液および血清は、分析まで-80度冷凍保存した。

各試料の一部を冷凍便にて、日本に搬送した。

L-PGDS 定量

脳脊髄液あるいは血清中の L-PGDS タンパク質量は、特異的抗体を用いたサンドイッチ ELISA 法（Oda H et al., *Clin Chem* 48(9):1445-53(2002).）にて測定した。

L-PGDS の機能解析

睡眠障害に伴う脳脊髄液中の L-PGDS タンパク質の質的変化の解析を目的として、等電点電気泳動を行い、L-PGDS に対する特異的抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

CSF 中のヒスタミン定量

ヒスタミンは、試料を HPLC にて分離後、ポストカラム法で α -フルタルアルデヒドにて蛍光誘導体化して検出、定量した（Yamatodani A et al., *J Chromatogr.* 344: 115-123 (1985)。

各 CSF 試料は過塩素酸処理と遠心分離にて除タンパクし、これを HPLC（カラム：TSKgel SP2SW 陽イオン交換カラム 250x4.6mm i. d.、

移動相: 0.25 M KH₂PO₄、流速 0.6 mL/min) で分離し、分離・溶出されたヒスタミンをアルカリ条件下に *o*-フタルアルデヒドで誘導体化し、蛍光検出機で励起波長 360 nm、蛍光波長 450 nm の条件で検出した。

CSF 中のアデノシン定量

アデノシンの測定には、その安定代謝物であるイノシンを対象として、液体クロマトグラフィータンデムマススペクトル(LC-MS/MS)法によって検出、定量した。
各 CSF 試料はアセトニトリル処理と遠心分離にて除タンパクし、これを HPLC(カラム: Cadenza CD-C18, 150x2 mm i.d. 移動相: A) 100 mM 酢酸アンモニウム, B) アセトニトリルのグラジエント) で分離し、これをエレクトロスプレーイオン化 (ESI) 法の負イオン検出モードでイオン化し、MRM (Multiple Reaction Monitoring) 法で、イノシンに特異的な 267.06 Da と 135.10 Da のイオンを検出した。

統計検討

各群の比較には、Bartlett の多重比較検定を用い、p 値が 0.05 以下を有意性ありとした。

4. 研究成果

試料の構成

チューリッヒ大学神経内科で採取された睡眠障害あるいは、睡眠障害を伴う神経変性疾患患者および対照の非睡眠障害患者の脳脊髄液および血清試料の構成を表-1 に示す。また、患者の内訳を表-2 に示す。

表-1

総サンプル数 184 (うち慢性不眠患者 34)

	平均	±標準偏差
年齢	50.95	16.7
採取時間	12 時	7 時-23 時
¹⁾ ESS	8.6	4.9
²⁾ FSS	3.7	1.6

1) Epworth Sleepiness Scale

(ESS、エプワース眠気尺度)

以下の状況で、眠気が起きる確率を、なし (0)、少し (1)、中程度 (2)、高い (3) で自己評価する。一般的にスコア 10 以上は、異常な日中の眠気を示唆する。

- ・ 座って読書している
- ・ テレビを見ている
- ・ 公共の場所でじっと座っている
- ・ 車に乘客として 1 時間継続して乗っている
- ・ 午後、横になって休息している
- ・ 座って人と話している
- ・ 昼食 (アルコールなし) の後、静かに座

っている

- ・ 渋滞で数分間動かない車に乗っている

2) Fatigue Severity Scale

(疲労重症度スケール)

表-2 診断結果

	サンプル数	%
対照(非睡眠障害)	20	11
多発性硬化症	43	23
パーキンソン病	13	7
ナルコレプシー (脱力発作あり)	10	5.4
Excessive daytime sleepiness ※	26	14
複合的な神経疾患	69	37

※ 日中の過剰な眠気を示す過睡眠症

以上の背景を持つ患者あるいは対照から採取した脳脊髄液中の睡眠関連物質である L-PGDS タンパク質、ヒスタミン、アデノシン (安定代謝物としてイノシン) を定量した。

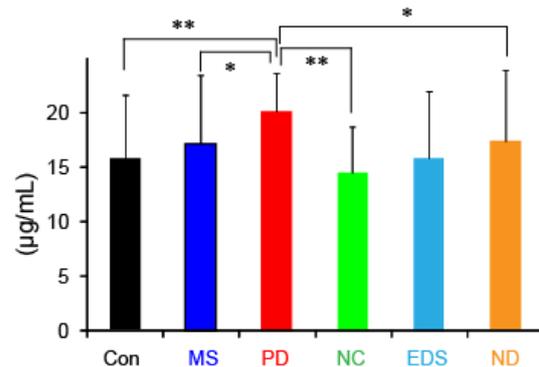


図 2 睡眠障害患者および対照群の脳脊髄液中の L-PGDS の比較

平均値±標準偏差、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ v.s. PD 群

Con: 対照、 MS: 多発性硬化症、 PD: パーキンソン病、 NS: ナルコレプシー、 EDS: Excessive daytime sleepiness ND: 複合的な神経疾患

(1) パーキンソン患者における脳脊髄液中 L-PGDS の増加

脱力発作を伴うナルコレプシー、日中の過剰な眠気を呈する過睡眠症等の睡眠障害患者、過眠等の睡眠に異常を示す多発性硬化症やパーキンソン病などの神経変性疾患患者および対照の非睡眠障害と診断された患者の脳脊髄液中の L-PGDS の濃度を調べたところ、パーキンソン病患者では、EDS を除く全ての試験群に比べて統計的に有意に L-PGDS の濃度が高かった。ナルコレプシー患者では対照群に比べて、脳脊髄液中の L-PGDS 濃度は減少する傾向にあった。

一方、血漿中の L-PGDS を各群で比較したところ、いずれの群においても有意な差は認

められなかった。

(2) 睡眠障害、神経変性疾患における脳脊髄液中イノシンの増加

続いて、脳脊髄液中のイノシンの定量を行った。

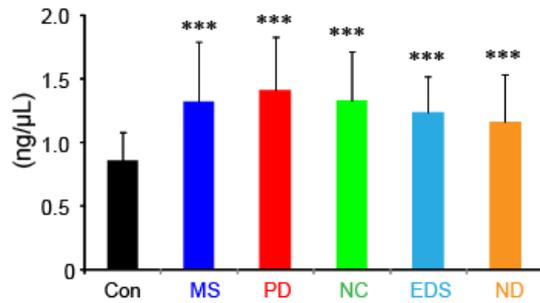


図 2 睡眠障害患者および対照群の脳脊髄液中のイノシンの比較

平均値±標準偏差、*** $p < 0.001$ v.s. Con 群

Con: 対照、MS: 多発性硬化症、PD: パーキンソン病、NS: ナルコレプシー、EDS: Excessive daytime sleepiness
ND: 複合的な神経疾患

対照（非睡眠障害）群に比べて、多発性硬化症、パーキンソン病、ナルコレプシー、日中の過剰な眠気を示す過睡眠症患者および複合的な神経疾患と診断された患者の脳脊髄液中ではイノシンの濃度が高かった。

(3) 多発性硬化症患者における脳脊髄液中ヒスタミンの増加

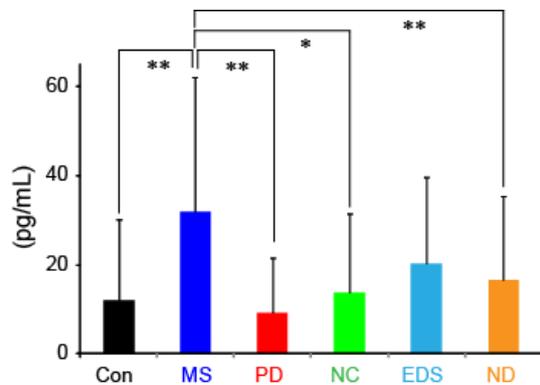


図 3 睡眠障害患者および対照群の脳脊髄液中のヒスタミンの比較

平均値±標準偏差、* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ v.s. MS 群

Con: 対照、MS: 多発性硬化症、PD: パーキンソン病、NS: ナルコレプシー、EDS: Excessive daytime sleepiness
ND: 複合的な神経疾患

脳脊髄液中に検出され、中枢神経系では覚醒の調節に関与するヒスタミンの濃度を測定したところ、多発性硬化症患者では、EDS を除く全ての試験群に比べて、統計的有意にヒスタミンの濃度が高かった。

チューリッヒ大学で採取された睡眠障害患者あるいは睡眠障害を伴う神経変性疾患の脳脊髄液を用いて、睡眠・覚醒に関与する L-PGDS タンパク質、アデノシン（イノシン）およびヒスタミンを対象として解析を行い、

- 1) L-PGDS は、パーキンソン病患者で有意に増加する。
- 2) イノシンは神経変性疾患患者で増加する。
- 3) ヒスタミンは、多発性硬化症で増加することを見出した。

(4) L-PGDS の機能解析

ヒト脳脊髄液を用いて等電点泳動を行い、L-PGDS に対する特異的抗体を用いてウエスタンブロッティング法で分析すると、いずれの脳脊髄液においても等電点の異なる 6-8 つのバンドが検出されることが判明した。その一部を図 4 に示す。

これら複数のバンドの濃度（存在比）あるいは等電点を指標に各群間で比較を行ったが、有意な差は認められなかった。

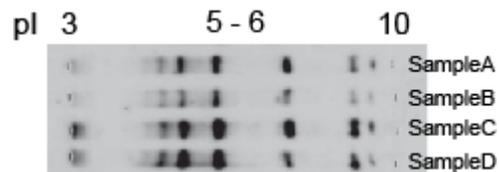


図 4 脳脊髄液中 L-PGDS の等電点電気泳動とウエスタンブロッティング解析

これまで、睡眠と覚醒の生化学マーカーは同定されていなかった。

今回の結果から、ナルコレプシーや日中の過剰な眠気を示す過睡眠症等の睡眠障害、多発性硬化症 (MS) やパーキンソン病などの眠気を伴う神経変性疾患で脳脊髄液中の L-PGDS、イノシン、ヒスタミンを調べそれぞれの濃度は、以下に示すように病態特異的な変化を示すことが判明し、これらの睡眠物質を測定が、睡眠障害の診断方法になりうることを考えられた。

表-3 睡眠障害患者の脳脊髄液中の睡眠関連物質の変動

	L-PGDS	イノシン	ヒスタミン
対照	+	+	+
多発性硬化症	+	++	+++
パーキンソン病	++	++	+
ナルコレプシー (脱力発作あり)	+	++	+
EDS	+	++	++
その他神経疾患	+	++	+

今後、各病態の病状あるいは治療前後での脳脊髄液中の L-PGDS、イノシン、ヒスタミンの濃度を測

定し、詳細な診断基準を確立する予定である。

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 9 件)

- 1) Inaka K, Takahashi S, Aritake K, Tsurumura T, Furubayashi N, Yan B, Hirota E, Sano S, Sato M, Kobayashi T, Yoshimura Y, Tanaka H, Urade *Cryst Growth Des.* Jun 1;11(6):2107-2111. (2011)
- 2) Fujitani Y, Aritake K, Kanaoka Y, Goto T, Takahashi N, Fujimori K, Kawada T. Pronounced adipogenesis and increased insulin sensitivity caused by overproduction of prostaglandin D₂ *in vivo*. *FEBS J.* **277(6)**, 1410-9. (2010)
- 3) Tanaka H, Tsurumura T, Aritake K, et al. Improvement in the quality of hematopoietic prostaglandin D synthase crystals in a microgravity environment. *J Synchrotron Radiat* 18(1), G401-408 (2011)
- 4) Fujimori K, Ueno T, Nagata N, Kashiwagi K, Aritake K, Amano F, Urade Y. Suppression of Adipocyte differentiation by aldo-keto reductase 1B3 acting as prostaglandin F_{2α} synthase. *J Biol Chem.* **285(12)**, 8880-6. (2010)
- 5) Kumasaka T, Aritake K, Ago H, Irikura D, Tsurumura T, Yamamoto M, Miyano M, Urade Y, Hayaishi O. Structural basis of the catalytic mechanism operating in open-closed conformers of lipocalin type prostaglandin D synthase. *J Biol Chem.* **284(33)**, 22344-52. (2009)
- 6) Moniot B, Declosmenil F, Barrionuevo F, Scherer G, Aritake K, Malki S, Marzi L, Cohen-Solal A, Georg I, Klattig J, Englert C, Kim Y, Capel B, Eguchi N, Urade Y, Boizet-Bonhoure B, Poulat F. The PGD₂ pathway, independently of FGF9, amplifies SOX9 activity in Sertoli cells during male sexual differentiation. *Development.* **136(11)**, 1813-21. (2009)
- 7) Irikura D, Aritake K, Nagata N, Maruyama T, Shimamoto S, Urade Y. Biochemical, functional and pharmacological characterization of AT-56, an orally active and selective inhibitor of lipocalin-type prostaglandin d synthase. *J Biol Chem.* **284(12)**, 7623-30 (2009)
- 8) Murata, T, Lin, MI, Aritake K, Matsumoto, S, Narumiya, S, Ozaki, H, Urade, Y, Hori, M, Sessa, WC. R Role of prostaglandin D₂ receptor DP as a suppressor of tumor hyperpermeability and angiogenesis *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**, 20009-20014 (2008)

- 9) Fujimori, K, Aritake, K, Urade, Y. Enhancement of prostaglandin D₂ production through cyclooxygenase-2 and lipocalin-type prostaglandin D synthase by upstream stimulatory factor 1 in human brain-derived TE671 cells under serum starvation. *Gene* **426**, 72-80 (2008)

[学会発表] (計 4 件)

- 1) Kosuke Aritake Endogenous Sleep-promoting Substances 2010 Beijing Sleep Medicine Forum、2010年4月18日、北京(中国)
- 2) Kosuke Aritake Lipocalin-type prostaglandin D synthase: a transporter of prostaglandin D₂ and scavenger of prostaglandin D₂-degraded products、34th FEBS Congress、2009年7月6日、プラハ(チェコ)
- 3) 有竹 浩介 リポカリン型 PGD 合成酵素の PGD₂ の輸送と結合に関する解析 第 81 回日本生化学会大会 2008 年 12 月 12 日、神戸国際会議場
- 4) Kosuke Aritake Lipocalin-type prostaglandin D synthase is a transporter and a scavenger of prostaglandin D₂ 33rd FEBS Congress&11th IUBMB Conference 2008 年 7 月 3 日、アテネ(ギリシャ)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計◇件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有竹 浩介 (ARITAKE KOSUKE)

財団法人大阪バイオサイエンス研究所・分子

行動生物学部門・研究員

研究者番号：70390804

(2)研究分担者

鎌内 慎也 (KAMAUCHI SHINYA)
財団法人大阪バイオサイエンス研究所・分子
行動生物学部門・研究員

研究者番号：00397564

丸山 敏彦 (MARUYAMA TOSHIHIKO)

財団法人大阪バイオサイエンス研究所・分子
行動生物学部門・研究員

研究者番号：70414133

星川 有美子 (HOSHIKAWA YUMIKO)

財団法人大阪バイオサイエンス研究所・分子
行動生物学部門・研究員

研究者番号：10390808

早石 修 (HAYAISHI OSAMU)

財団法人大阪バイオサイエンス研究所・分子
行動生物学部門・研究員

研究者番号：40025507

永田 奈々恵 (NAGATA NANAE)

財団法人大阪バイオサイエンス研究所・分子
行動生物学部門・研究員

研究者番号：80390805

(3)連携研究者

なし