

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 2 4 年 5 月 1 7 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22657063

研究課題名（和文） ヒト網膜のメラノプシンの遺伝子多型およびその機能的役割の解明

研究課題名（英文） Study on functional role of melanopsin gene polymorphism in human retina

研究代表者

樋口 重和 (HIGUCHI SHIGEKAZU)

九州大学・芸術工学研究院・教授

研究者番号：00292376

研究成果の概要（和文）：

網膜にあるメラノプシンを含む神経節細胞（mRGC）は、錐体や桿体以外に発見された新たな視細胞として、光の非視覚的作用（概日リズムの光同調、瞳孔の対光反応など）に関連している。現在、ヒトのメラノプシンにはいくつかの一塩基多型が存在するが、光の非視覚的作用との関係はよくわかっていない。本研究で、アミノ酸置換を引き起こす領域 rs1079610 (T394I) の一塩基多型が瞳孔の対光反応と関連していた。1 lx 以下の低照度条件では C+群（C/C と C/T）の瞳孔径は T/T 群に比べて有意に大きく、3000lx と 6000lx の高照度条件では C+群の瞳孔径は T/T 群に比べて有意に小さいことがあきらかとなった。

研究成果の概要（英文）：

Melanopsin-containing retinal ganglion cells (mRGCs) play an important role in non-visual response to light, such as circadian photoentrainment, light-induced melatonin suppression and pupillary light reflex. We examined the association between melanopsin gene polymorphism and pupillary light response. Pupil diameter in the C/C + C/T genotype (n=38) of rs1079610 (T394I) under low illuminance light (< 1 lx) was significantly larger than that in the T/T genotype (n=58). On the other hand, pupil diameters in the C/C + C/T genotype of rs1079610 (T394I) under high illuminance light (3000 lx and 6000 lx) were significantly smaller than those in the T/T genotype.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	0	1,700,000
2011年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	420,000	3,520,000

研究分野：人類学

科研費の分科・細目：応用人類学

キーワード：生理的多型、環境適応

1. 研究開始当初の背景

ヒト概日リズムおよびその光感受性には個体差がある。現在、概日リズムの個体差（朝型/夜型など）の遺伝的な要因として、いくつかの時計遺伝子の多型が特定されている。しかし、概日リズムの光感受性の個体差に関す

る遺伝子多型の存在はよく知られていない。2000年代に入ってメラノプシンという光感受性のあるタンパク質がヒトを含む哺乳類網膜の神経節細胞（melanopsin containing retinal ganglion cell: mRGC）に存在することが発見された。

目から入った光の情報は、脳の中で二通りの方法で処理されている。ひとつは、ものの形や色、動きの知覚に関するもので、脳の視覚野で処理されることで可能となる。もうひとつは、網膜視床下部路を通して、瞳孔の対光反応に関連する視蓋前野や、体内時計の中核である視交叉上核 (SCN) に伝えられる。これらの作用は視覚的な知覚を必要としないことから光の非視覚的作用 (Non-visual effect) と呼ぶ。光の非視覚的作用には、概日リズムの光同調、メラトニンの分泌抑制、覚醒作用、瞳孔の対光反射などがある。

これらの光の非視覚的作用に mRGC が強く関与していることが知られている。mRGC の機能は、メラノプシン遺伝子 (OPN4) をノックアウトした動物などを使うことで明らかにされている。一方、ヒト網膜にも mRGC が存在し、概日リズムの光同調に重要な役割を担っていると考えられている。先行研究でメラノプシンの一塩基多型が季節性感情障害と関係しているという報告がなされた。これは、メラノプシンの遺伝子多型が光感受性の個体差に影響を及ぼしていることを示唆するが、それを示す実験的エビデンスはまだ存在しない。

2. 研究の目的

ヒトのメラノプシン遺伝子と光の非視覚的作用の関係はほとんど知られていない。そこで本研究ではアミノ酸置換を引き起こす二つの領域一塩基多型 (SNP) に着目し、光の非視覚的作用の個体差との関係を明らかにするために以下の3つの目的のために実験を実施した。(1) メラノプシン遺伝子多型と瞳孔の対光反応の関連を明らかにすること。(2) メラノプシン遺伝子多型と光によるメラトニン抑制の関連を明らかにすること。(3) メラノプシン遺伝子多型と朝型・夜型指向性や睡眠習慣の関連を明らかにすることである。

3. 研究の方法

被験者は石原式色覚検査により色覚異常でないことを確認した健康な大学生 193 名 (平均年齢 21.1±1.8 歳) を対象とした。本実験は九州大学の研究倫理審査委員会の承認を経て行われた。

被験者の毛根細胞から DNA の抽出を行い、アミノ酸置換を引き起こすふたつの領域 exon1 の rs2675703 (P10L) と exon9 の rs1079610 (T394I) の SNP について遺伝子型のタイピングを行った (TaqMan SNP Genotyping Assay System)。

それぞれの遺伝子型の被験者数の内訳について、rs2675703 (P10L) の一塩基多型に関しては C/C 型 151 名、C/T 型 16 名、T/T 型 10 名であった。rs1079610 (T394I) の一塩基

多型については T/T 型 130 名、T/C 型 52 名、C/C 型 7 名であった。それぞれの遺伝子型の間で年齢及び性別に有意な差は認められなかった。

(1) 瞳孔の対光反応

全被験者 193 名を対象に、目の位置での鉛直面照度 15 lx と 1000 lx の 2 条件で瞳孔面積の測定を行った。光源は天井に設置した昼白色蛍光灯 (5000K) を用いた。それぞれの照度条件で 20 分の順応時間を設けた後に瞳孔径を測定した。瞳孔径の測定には、電子瞳孔計 (FP-10000、テイエムアイ社) を使用し、被検眼開放下で 5 秒間×3 回の測定を行い、平均瞳孔径を算出した。また、15 lx 時の瞳孔径に対する 1000 lx 時の瞳孔径の相対縮瞳率を算出した。

次に、先行実験に参加した被験者の中から 93 名 (平均年齢 21.3±1.8 歳) を対象に、照度と瞳孔径の量・反応関係を調べるための実験を行った。照明条件は 6 条件 (1 lx 以下、10 lx、100 lx、1000 lx、3000 lx、6000 lx) とした。光源や測定機器などは前回の測定と同じであった。

(2) メラトニンの光抑制試験

夜間の光によるメラトニンの抑制試験を行った。照度条件は 1000 lx と 4000 lx の 2 条件であった。被験者数は、瞳孔実験で遺伝子型との関連があった領域 rs1079610 の一塩基多型によって 2 群に分類された (T/T 型と T/C 型)。被験者数は 1000lx 条件と 4000lx 条件でそれぞれ 39 名 (T/T 群 23 名、T/C 群 16 名) と 32 名 (T/T 群 16 名、T/C 群 16 名) であった。被験者は実験 1 週間前から習慣的な起床と就寝時刻で過ごすように指示が与えられた。睡眠日誌により起床時刻と就寝時刻を記録した。

実験当日は Dim light (15 lx 以下) の部屋で 4 時間過ごし、その後 3 時間の光曝露を行った。光曝露の光源には天井に設置した白色蛍光灯 (5000 K) を用いた。光曝露の開始時刻は、睡眠中点 (就寝時刻と起床時刻の中間の時刻) の 3 時間～3 時間半前とした。

実験中はコットン製のサリベットを用いて 1 時間ごとに唾液採取を行った。唾液中メラトニン濃度の分析は RIA 法で行った (RK-DSM, Buhmann)。メラトニン抑制率は、光曝露直前のメラトニン濃度を基準として算出した。

(3) 質問紙調査

被験者の睡眠習慣などの特徴はピッツバーグ睡眠質問票 (PSQI)、朝型夜型質問紙 (MEQ)、季節性感情障害質問紙 (SPAQ) によって調べた。統計処理は、被験者内要因を光条件、被験者間要因を遺伝子型とした分散分析、下位検定として Bonferroni 法または対応のある t 検定を用いた。

4. 研究成果

(1) 瞳孔の対光反応

瞳孔径について、一元配置の分散分析の結果、rs1079610 (T394I)では15 lx時の瞳孔面積、相対縮瞳率に主効果が認められた。下位検定の結果、15 lx時では、C/C群の瞳孔計がT/Tの瞳孔径に比べて有意に大きかった。相対縮瞳率は、C/C群でT/T群に比べて有意に高かった。rs2675703 (P10L)に関しては、1000 lx時の瞳孔面積にのみ遺伝子型間で有意な差が認められたが(p<0.05)、下位検定の結果では、C/C群でT/T群に比べて瞳孔径が大きい傾向が認められた(P=0.07)。

光の照度と瞳孔の量反応関係を調べた実験では、C/C型とC/T型をまとめてC+群とし、2群間(T/T群とC+群)の比較を行った。瞳孔径のデータについて分散分析を行った結果、遺伝子型の主効果は認められず、照度の主効果(p<0.01)と交互作用が認められた(p<0.01)。照度の上昇にしたがって瞳孔径は有意に減少していた。それぞれの照度での遺伝子型の比較では、1lx条件ではT/T群に比べてC+群で有意に瞳孔径が大きかった(p<0.05)。反対に、3000lxと6000lxでの条件では、T/T群に比べてC+群で有意に瞳孔径が小さかった(p<0.01)(図1)。1lx時の瞳孔径を基準とした縮瞳率の結果について。分散分析の結果、照度の主効果(p<0.01)と遺伝子型の主効果(p<0.01)の両方が認められた。また照度と遺伝子型の交互作用も認められた(p<0.05)。照度の上昇にしたがって、縮瞳率は有意に増加していた。それぞれの照度での遺伝子型間の比較では、100lx以上のすべての条件でT/T群に比べてC+群の縮瞳率が有意に高かった。rs2675703 (P10L)に関しては、照度の主効果は認められたが、遺伝子型の主効果、および照度と遺伝子型の交互作用は認められなかった。

以上の結果から、アミノ酸置換を伴う領域rs1079610 (T394I)の一塩基多型が瞳孔の対光反応に影響を及ぼしている可能性が示された。

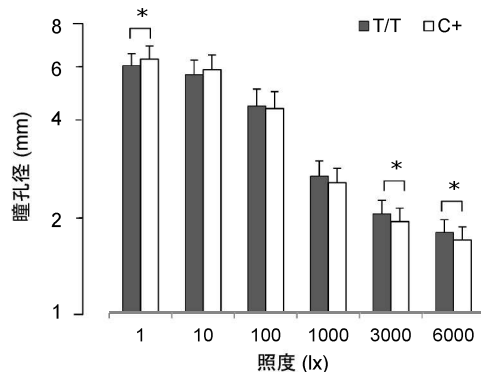


図1. rs1079610 (T394I)のSNPと各照度での瞳孔径の関係

(2) 光によるメラトニン抑制

メラトニン抑制率について、遺伝子型(T/T, T/C)、照度(1000 lx, 4000 lx)、時間(曝露1時間後, 2時間後, 3時間後)を要因とした3元配置の分散分析を行った。その結果、照度の主効果(p<0.001)と時刻の主効果(p<0.001)が認められたが、遺伝子型の主効果は認められなかった。また、どの交互作用もなかった。照度の影響として、メラトニン抑制率は1000 lx条件より4000 lx条件で大きかった。時間の影響としては、曝露3時間後で最もメラトニン抑制率が大きかった。

以上の結果から、瞳孔径で認められた遺伝子型の違いは、光によるメラトニン抑制では認められないことが分かった。

(3) 質問紙調査の結果

rs1079610 (T394I)のSNPについて、朝型夜型スコア、SPAQのスコアに遺伝子型の有意な差は認められなかった。睡眠に関しては、遺伝子型の主効果が就寝時刻(p<0.05)と起床時刻(p<0.05)に認められた。C/C型の就寝時刻がT/T型とT/C型に比べて有意に遅かった。起床時刻も同様にC/C型でC/T型およびT/T型に比べて有意に遅かった。

rs2675703 (P10L)のSNPについて、睡眠習慣、朝型夜型スコアおよびSPAQのスコアに遺伝子型の有意な差は認められなかった。

以上の結果より、瞳孔径と関連していたrs1079610 (T394I)領域の多型が、何らかの形で睡眠に影響を与えている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① Higuchi S, Fukuda T, Kozaki T, Takahashi M, and Miura N. Effectiveness of a Red-visor Cap for Preventing Light-induced Melatonin Suppression during Simulated Night Work. *Journal of physiological anthropology* 30: 251-258, 2011 (査読有)
- ② 樋口重和. 光の非視覚作用-光環境への適応-. *日本生理人類学会誌* 15(1), 21-26. 2011 (査読有)
- ③ Nagafuchi Y, Fukuda T, Harada T, Higuchi S. Effect of exposure to light at night on melatonin suppression in children. *Proceedings of the Fourth International Conference on Human-Environment System*. 2011 (査読有)
- ④ Fukuda Y, Tsujimura S, Higuchi S, Yasukouchi A, and Morita T. The ERG responses to light stimuli of melanopsin-expressing retinal ganglion cells that are independent of rods and cones. *Neurosci Lett* 479: 282-286, 2010. (査読有)

[学会発表] (計 10 件)

- ① 樋口重和, 宮平学, 福田知美, 肥田昌子.
メラノプシン遺伝子多型と瞳孔の対光反応の関係. 日本生理人類学会第 65 回大会.
2011 年 11 月 26 日. 大阪
- ② 福田知美, 原田和樹, 肥田昌子, 樋口重和.
メラノプシン遺伝子多型と光によるメラトニン抑制の関係. 日本生理人類学会第 65 回大会. 2011 年 11 月 26 日. 大阪
- ③ Higuchi S. Non-visual effect of light and sleep: new findings from the studies in children and melanopsin gene polymorphism. Worldsleee2011. 2011 年 10 月 16 日. 京都
- ④ Higuchi S. Association between melanopsin gene polymorphism and pupillary light response in a Japanese young population. Society for Light Treatment and Biological Rhythms Meeting. 2011 年 7 月 12 日. Montréal.
- ⑤ Higuchi S, Aritake S, Enomoto M, Hida A, Mishima K. Study on physiological factors related to delay of circadian rhythms in Japanese university students. The 10th International Congress of Physiological Anthropology. 2010 年 9 月 11 日. Fremantle
- ⑥ 樋口重和. Chronotype による朝の光曝露とその影響の比較. 日本睡眠学会第 35 回定期学術集会シンポジウム. 2010 年 7 月 2 日. 名古屋

[図書] (計 1 件)

- ① Higuchi S (2010) Human adaptation to natural and artificial light -variation in circadian photosensitivity-. In Mascie-taylor N, Yasukouchi A, Ulijaszek S eds. Human Variation: From the Laboratory to the Field. CRC Press, pp 69-84

6. 研究組織

(1)研究代表者

樋口 重和 (HIGUCHI SHIGEKAZU)
九州大学・芸術工学研究科・教授
研究者番号 : 00292376

(2)研究分担者

肥田 昌子 (HIDA AKIKO)
独立行政法人国立精神・神経医療研究センター・精神保健研究所・室長
研究者番号 : 20333354
辻村 誠一 (TSUJIMURA SEI-ICHI)
鹿児島大学・理工学研究科・准教授
研究者番号 : 10381154