

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24年 6月19日現在

機関番号：82611

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22791161

研究課題名（和文） 躁うつ病における Wnt シグナル系と生物時計システム

研究課題名（英文） Circadian cycle and Wnt signaling in bipolar disorder

研究代表者

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 精神生理研究部 室長

研究者番号：20333354

研究成果の概要（和文）：

躁うつ病患者では気分調整の異常に加えて生物時計の調節障害が併存しており、気分調節と生物時計の両システム機能障害に共通したシグナル系が関わっていると考えられている。培養細胞系での薬理実験により Wnt シグナル系が概日リズム調節に深く関わっていること、また、個人の末梢細胞中の時計遺伝子発現リズムを測定することで生物時計機能特性を評価できることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

Bipolar disorder is characterized by biological rhythm disturbances as well as mood swings. Emerging evidence indicates that there is a signaling pathway modulating both circadian cycles and mood. The results of this study suggest that Wnt signaling mediates circadian rhythms in cultured fibroblast cells and that fibroblast rhythms predict individual circadian rhythm traits.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度	0	0	0
年度	0	0	0
年度	0	0	0
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：Wnt シグナル、生物時計、末梢リズム、生体組織

1. 研究開始当初の背景

躁うつ病では病相の周期性のみならず、早朝覚醒や睡眠覚醒サイクルの異常、数多くの生理機能リズムの位相異常が高頻度に認められる。逆に、生物時計をドライブする時計遺伝子の一つ *Clock* の変異動物

(*Clock*^{Δ19/Δ19}) は、過活動、睡眠時間の減少といった躁病様の行動異常を呈する。このほか数多くの先行研究により、躁うつ病患者では気分調整の異常に加えて、生物時計の調節障害が併存していることが明らかにされている。

Wnt シグナルは、胚発生とガン化に関わる非常に重要なシグナル伝達経路であることはよく知られているが、最近になって、胚性幹細胞 (ES 細胞) や神経幹細胞から神経へ分化する上でも必要なシグナルであることが示唆されている。次頁のシエーマに示すように Wnt シグナル系は WNT が FRIZZLED と結合することで開始し、リン酸化酵素である GSK3 β を不活性化して β カテニンのリン酸化を妨げ、 β カテニンを細胞質内に蓄積させる。その後、 β カテニンは核内へ移行して転写因子やコアクチベーターと複合体を形成し、さまざまな遺伝子の発現を制御する。コアクチベーターは非常によく似た構造であるにもかかわらずまったく異なる機能をもつことがわかっており、その使い分けは、さまざまな遺伝子発現また生理現象を制御する上で重要な役割を果たすことが明らかにされつつある。

躁うつ病の代表的な治療薬である気分安定薬・リチウムは、ラットやマウスの脳内で、GSK3 を阻害すること、 β カテニン量を増すこと、Wnt シグナル・ β カテニン経路を介する遺伝子発現を活発にすることが知られている。さらに、GSK3 β を過剰発現させたトランスジェニック (Tg) 動物では躁病様の行動異常を示すこと、 β カテニンを過剰発現させた Tg 動物では抑うつ行動や不安様行動が減少することが報告されている。これらの知見から、リチウムの作用機序の少なくとも一部に Wnt シグナル系が介在している可能性が示唆されている。一方、Wnt シグナル系の調節異常が気分調節のみならず、躁うつ病で高率に認められる生物時計の機能異常の発現にも関与していると考えている。

睡眠覚醒、自律神経系、代謝系活動にみ

られる概日リズムは、生体内に存在する内因性の生物時計により駆動されている。哺乳類では、脳視床下部・視交叉上核 (SCN) に存在する中枢時計が、他の組織・器官の細胞に備わっている時計 (末梢時計) に階層的に作用し、末梢時計リズムを統合している。生物時計システムに関わるほとんどの遺伝子は、中枢時計 SCN において約 24 時間の転写日周リズムを示し、この時計遺伝子群の転写・翻訳制御のフィードバックループが生物時計発振機構の中核をなす。時計遺伝子である CLOCK と BMAL1 はヘテロダイマーを形成、E-box 配列を介して DNA に結合し、E-box をプロモーター上にもつ時計遺伝子群、*Per (Period) 1*, *Per Per3*, *Cry (Cryptochrome) 1*, *Cry2* などの転写を活性化する。そして、PER:CRY 複合体は、CLOCK:BMAL1 により活性化された自らの転写を抑制する負のフィードバックを形成する。

先に述べたリチウムや GSK3 ベータ阻害剤は、これら時計遺伝子発現リズムや行動リズムの周期を変化させることが明らかにされている。これらの知見は、躁うつ病での気分調節および生物時計システムの両者に Wnt シグナル系が深く関与している可能性を強く示唆している。しかしながら、Wnt シグナル系を介した両システムの間連性に着目した研究は国内外を問わず行われていない。

2. 研究の目的

躁うつ病には生体リズム異常が高頻度に併存する。本研究は、気分調節と生物時計の両システムの機能障害に Wnt シグナル系が介在するか検証する。健常被験者の生体組織由来の初代培養細胞系で、細胞内時計遺伝子発現リズムをリアルタイム測定

するシステムを構築し、躁うつ病に特徴的な生物時計の障害特性を同定する。同システムを用いて、気分および生物リズム調節の両作用を持つリチウムがヒト生物時計システムに及ぼす影響を明らかにする。ついで、Wntシグナル系の阻害が時計遺伝子転写サイクルに及ぼすリチウムの効果を修飾するか検証する。これらの課題を通じて、Wntシグナル系がリチウムの細胞作用パスウェイと時計遺伝子群の転写制御にどのように関わっているか明らかにする。

3. 研究の方法

生物時計リポーター遺伝子 *Bmal1::Luc* (時計遺伝子 *Bmal1* プロモーター-ルシフェラーゼ遺伝子) を安定に発現する NIH3T3 不死化線維芽細胞株の細胞内ルシフェラーゼ発光量を微弱発光装置を用いて経時的に測定した。溶媒また薬物存在下での細胞内 *Bmal1::Luc* 発光リズム特性を比較・検証した。

対象者：健常男性成人被験者 18 名。睡眠障害、精神疾患もしくは重篤な身体疾患に罹患していない者、交替制勤務に従事していない者、過去半年間に海外旅行などで 6 時間以上の睡眠時間の変更のなかった者。

被験者の背部から局所麻酔下で皮膚切片 (直径 2mm×深さ 5mm) を採取し、皮膚生検から初代線維芽培養細胞を樹立した。健常被験者由来の初代線維芽培養細胞に生物時計リポーター遺伝子 *Bmal1::Luc* を導入し、微弱発光測定装置を用いて発光リズムをリアルタイムに測定し、得られた発光リズム特性を解析した。被験者の初代培養細胞内における時計遺伝子発現リズムの特性とクロノタイプ (日周指向性) との関連性を検討した。

4. 研究成果

生物時計リポーター *Bmal1::Luc* NIH3T3 細胞株に Wnt シグナル系の働きを調整する 2 種類の薬物を加え、発光リズムに与える影響を調べた。Wnt シグナル系を介してガン化を抑制する薬物存在下では、*Bmal1::Luc* 発光リズム振幅の増大、周期の延長が認められた (図 1)。一方、ガン化を誘導する薬物存在下では、振幅の減少、周期の短縮、リズムの乱れが認められた (図 2)。これらの結果から、Wnt シグナル系が概日リズム調節に深く関わっていることが明らかとなった。

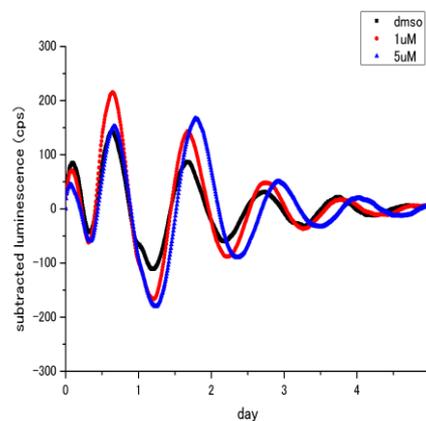


図 1: ガン化を抑制する薬物 1uM もしくは 5uM 存在下の *Bmal1::Luc* リズム

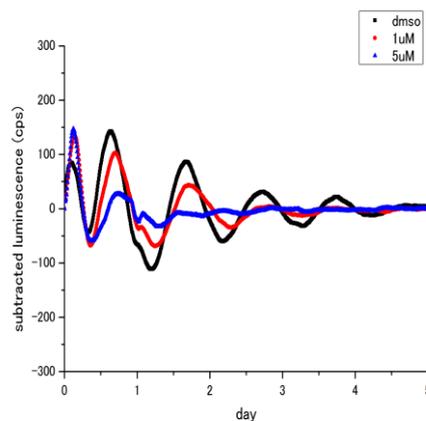


図 2: ガン化を誘導する薬物 1uM もしくは 5uM 存在下の *Bmal1::Luc* リズム

被験者から採取した皮膚由来初代線維芽培養細胞において *Bmal1::Luc* は非常に安定した顕著な概日リズムを示した (図 3)。そこで、末梢培養細胞中の *Bmal1::Luc* 発現リズム周期と新たなクロノタイプ定量指標として利用されている睡眠負債調整済み睡眠中点時刻の比較を行った。その結果、末梢リズム周期とクロノタイプに有意な相関性が認められた (図 4)。このことは、末梢リズムを測定することで、個人の生物時計機能特性を評価できることを示唆している。

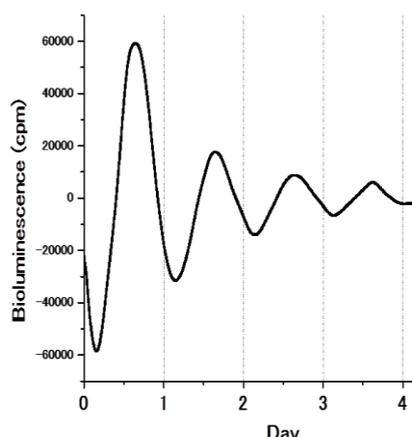


図 3: 初代線維芽培養における *Bmal1::Luc* の顕著な日周リズム

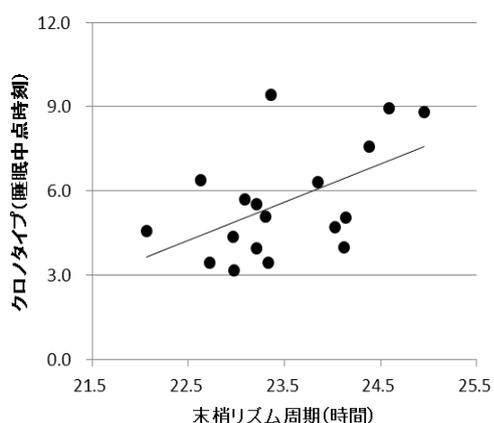


図 4: 末梢リズム周期とクロノタイプ (睡眠中点時刻) の相関性

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件) 査読有

1. [Hida, A.](#), Kitamura, S. & Mishima, K. (2012) Pathophysiology and pathogenesis of circadian rhythm sleep disorders, *Journal of Physiological Anthropology*. 31. doi:10.1186/1880-6805-31-7
2. [Hida, A.](#), Kitamura, S., Enomoto, M., Nozaki, K., Moriguchi, Y., Echizenya, M., Kusanagi, H. & Mishima, K. (2012) Individual traits and environmental factors influencing sleep timing: a study of 225 Japanese couples, *Chronobiology international*. 29, 220-6. doi:10.3109/07420528.2011.641045
3. Gamble, K. L., Motesinger-Reif, A. A., [Hida, A.](#), Borsetti, H. M., Servick, S. V., Ciarleglio, C. M., Robbins, S., Hicks, J., Carver, K., Hamilton, N., Wells, N., Summar, M. L., McMahon, D. G. & Johnson, C. H. (2011) Shift work in nurses: contribution of phenotypes and genotypes to adaptation, *PloS one*. 6, e18395. doi:10.1371/journal.pone.0018395
4. Soshi, T., Kuriyama, K., Aritake, S., Enomoto, M., [Hida, A.](#), Tamura, M., Kim, Y. & Mishima, K. (2010) Sleep deprivation influences diurnal variation of human time perception with prefrontal activity change: a functional near-infrared spectroscopy study, *PloS one*. 5, e8395. doi:10.1371/journal.pone.0008395
5. Shi, S., [Hida, A.](#), McGuinness, O. P., Wasserman, D. H., Yamazaki, S. & Johnson, C. H. (2010) Circadian clock gene *Bmal1* is not essential; functional replacement with its paralog, *Bmal2*, *Curr Biol*. 20, 316-21. doi:10.1016/j.cub.2009.12.034
6. Kitamura, S., [Hida, A.](#), Watanabe, M., Enomoto, M., Aritake-Okada, S., Moriguchi, Y., Kamei, Y. & Mishima, K. (2010) Evening preference is related to the incidence of depressive states independent of sleep-wake conditions, *Chronobiology international*. 27, 1797-812.

doi:10.3109/07420528.2010.516705

7. Enomoto, M., Tsutsui, T., Higashino, S., Otaga, M., Higuchi, S., Aritake, S., Hida, A., Tamura, M., Matsuura, M., Kaneita, Y., Takahashi, K. & Mishima, K. (2010) Sleep-related problems and use of hypnotics in inpatients of acute hospital wards, Gen Hosp Psychiatry. 32, 276-83. doi:10.1016/j.genhosppsy.2010.01.015
8. Aritake-Okada, S., Higuchi, S., Suzuki, H., Kuriyama, K., Enomoto, M., Soshi, T., Kitamura, S., Watanabe, M., Hida, A., Matsuura, M., Uchiyama, M. & Mishima, K. (2010) Diurnal fluctuations in subjective sleep time in humans, Neurosci Res. 68, 225-31. doi:10.1016/j.neures.2010.07.2040

[学会発表] (計 10 件)

1. Hida A., Kitamura S, Watanabe M, Enomoto M, Katayose Y, Aritake S, Higuchi S, Kato M, Moriguchi Y, Ikeda M, Mishima K. 【Oral】 Assessment of individual circadian phenotypes using biopsy samples. Neuroscience 2011. Washington, DC, 2011.11.12-16.
2. 肥田昌子, 大澤要介, 北村真吾, 榎本みのり, 片寄泰子, 野崎健太郎, 守口善也, 亀井雄一, 池田正明, 三島和夫. 【口頭・ポスター発表】生体組織を利用した生物時計機能評価—概日リズム睡眠障害者への応用—. 第 18 回日本時間生物学会学術大会. 愛知 名古屋大学 東山キャンパス, 2011.11.24-25.
3. Hida A. 【Plenary Symposia】 Genetic and physiological phenotyping of circadian rhythm sleep disorders. Worldsleepp2011. Kyoto Kyoto International Conference Center, 2011.10.16-20.
4. 肥田昌子, 北村真吾, 榎本みのり, 野崎健太郎, 片寄泰子, 加藤美恵, 渡邊真紀子, 有竹清夏, 樋口重和, 守口善也, 池田正明, 三島和夫. 【ポスター発表】末梢組織を利用した生物時計機能評価法. 第 34 回日本神経科学大会 —こころの脳科学—. 神奈川 パシフィコ横浜, 2011.9.23-24.
5. Hida A., Kitamura S, Watanabe M,

Enomoto M, Aritake S, Higuchi S, Nozaki K, Kato M, Moriguchi Y, Mishima K. 【Poster】 Evaluation of Individual's Circadian Clock Properties at Physiological and Molecular Levels. SLEEP 2011, 25th Anniversary Meeting of the Associated Professional Sleep Societies, LLC (APSS). Minneapolis, MN, USA, 2011.6.11-15.

6. 肥田昌子, 北村真吾, 渡邊真紀子, 榎本みのり, 片寄泰子, 野崎健太郎, 有竹清夏, 樋口重和, 加藤美恵, 守口善也, 池田正明, 三島和夫. 【ポスター発表】個人の生物時計機能の生理・分子レベルでの評価. 第 33 回日本生物学的精神医学会. 東京 ホテルグランパシフィック LE DAIBA, 2011.5.21-22.
7. 肥田昌子, 三島和夫. 【シンポジウム】概日リズム睡眠障害の診断法の確立に向けて. 第 17 回日本時間生物学会学術大会. 東京, 2010.11.20-21.
8. Hida A., Mishima K. 【Symposium】 Evaluation of individual's circadian rhythms at physiological and molecular levels. Neuro2010. Kobe, Japan, 2010.9.2-4.
9. 肥田昌子, 渡邊真紀子, 加藤美恵, 北村真吾, 榎本みのり, 有竹清夏, 守口善也, 亀井雄一, 角谷寛, 内山真, 井上雄一, 海老澤尚, 高橋清久, 三島和夫. 【ポスター発表】概日リズム睡眠障害と時計遺伝子多型の関連解析. 日本睡眠学会第 35 回定期学術集会, 2010.7.1-2.
10. Hida A., Watanabe M, Kitamura S, Kato M, Aritake S, Enomoto M, Moriguchi Y, Mishima K. 【Poster】 Association of circadian gene polymorphisms with sleep characteristics in Japanese population. Sleep2010, 24th Annual Meeting of Associated Professional Sleep Societies. SanAntonio, TX, USA, 2010.6.5-9.

[図書] (計 4 件)

1. 肥田昌子, 三島和夫: 気分障害と生物時計システム—リズム異常をもたらす生物時計機能障害評価法. 医学のあゆみ 239(9) : 907-11, 2011.

2. 肥田昌子, 三島和夫: 概日リズム睡眠障害の病態生理研究の動向. 日本生物学的精神医学会誌 22(3) : 165-70, 2011.
3. 肥田昌子, 三島和夫: 認知症患者の概日リズムの乱れに対するメラトニン治療の効果—せん妄に対しても効果はあるか?. Cognition and Dementia 10(2) : 62-3, 2011.
4. 肥田昌子: 概日リズム睡眠障害の病態生理. 睡眠医療 5:11-15, 2011.

〔産業財産権〕

なし

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncnp.go.jp/nimh/division/seiri.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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 精神生理研究部 室長
研究者番号 : 20333354

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし