

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591147

研究課題名(和文) 睡眠時無呼吸症候群による時計遺伝子を介した分子生物学的影響に関する研究

研究課題名(英文) Molecular biological influence of sleep apnea syndrome on circadian clock system

## 研究代表者

鯨岡 直人 (Burioka, Naoto)

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：50252854

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：睡眠時無呼吸症候群(SAS)は睡眠中に無呼吸と低呼吸を繰り返し、生体に多彩な生理学的影響を及ぼす重要な疾患である。我々は、SASが時計遺伝子で構成された分子生物学的な概日時計(circadian clock)に影響を及ぼすことを明らかにしてきた。本研究で遺伝子上流に cis-element として E-box, D-box, RREなどの塩基配列をもつ遺伝子を複数同定した。これらの遺伝子は時計遺伝子群で構成された概日時計に支配される時計被制御遺伝子と推測される。概日時計と時計被制御遺伝子群を包括したシステムにより、臨床疾患の増悪メカニズムの新しい機序を検討することが可能になるかもしれない。

研究成果の概要(英文)：Sleep apnea syndrome is one of the important diseases, which causes many physiological impacts to human. Obstructive sleep apnea causes the repeated apnea and hypopnea during sleep, which affects the circadian clock that is composed of clock genes and molecular biological mechanism. We found several clock-controlled genes with cis-elements of E-box, D-box or RRE (REV-ERB /ROR response element). Further studies are needed to reveal the relationship between dysfunction of circadian clock and sleep apnea syndrome.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：睡眠時無呼吸症候群 時計遺伝子 概日時計 時計被制御遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

閉塞性睡眠時無呼吸症候群 (obstructive sleep apnea syndrome: OSAS) は、ヒトに対して間歇的低酸素血症, 交感神経機能亢進, 胸腔内陰圧変動など, 明確な生理学的影響を与える疾患である。結果, 全身性炎症, 過眠症, うつ状態, 高血圧, 動脈硬化, 耐糖能障害, 夜間頻尿などが生じる。

哺乳類の視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus: SCN) に約 24 時間を刻む体内時計の存在が確認されている。体内時計は形を持っているものではなく, 入力 (同調), 振動, 出力を統合的に考え, 総体として体内時計とした方がよいと思われる (図 1)。振動の分子生物学的機序を概日時計 (circadian clock) と呼称することが多くなってきている。

概日時計を駆動するための遺伝子群は, 時計遺伝子 (clock gene) と呼ばれる。時計遺伝子は生体活動を規定する重要な遺伝子群である。SCN に発現する時計遺伝子は中枢時計遺伝子, その他の細胞, 臓器に発現する時計遺伝子は末梢時計遺伝子と定義される。

時計遺伝子の発現変化は遺伝子上流に特定の cis-element を持つ多くの時計被制御遺伝子 (clock controlled gene: CCG) 群に影響を及ぼす。哺乳類の遺伝子の約 2 - 10% 程度は日内変動を認め, 時計遺伝子が何らかの関与することが示唆されている (Storch KF, et al. Nature 417(6884):78-83, 2002.; Panda S, et al. Cell. 109(3): 307-20, 2002. )。

我々は, これまで OSAS が末梢時計遺伝子に影響を及ぼすことを報告している。複数の時計遺伝子が形成する分子生物学的な概日時計が支配する CCG が末梢臓器の概日リズムを管理し, OSAS が CCG を介して病態に影響を及ぼす可能性がある。

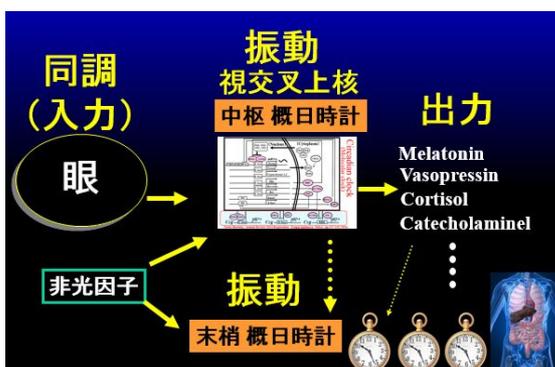


図 1. 新しい体内時計の概念

## 2. 研究の目的

睡眠時無呼吸の病態が, 時計遺伝子群により構成された概日時計に対して分子生物学的影響を及ぼす可能性を統合的に明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

(1) ヒト臓器における時計遺伝子の発現解析

末梢時計遺伝子の mRNA 発現変化を末梢血単核球や末梢血の白血球を用いて調べる方法は確立されている (Takata M, Burioka N, et al. Chronobiol Int. 22: 777-783, 2005.; Burioka N, et al. Eur Respir J 32, 105-112, 2008. )。一方, 組織における解析法はヒトでは難しかった。肺手術を受けた患者の切除肺の正常部分を用いて, 末梢時計遺伝子の mRNA 発現変化を調べた。

OSAS が生体の臓器における末梢時計遺伝子に分子生物学的影響を直接及ぼす可能性を調べるため, 基礎検討として切除された臓器の時刻の違いによる末梢時計遺伝子の mRNA 発現の日内変動を検討した。

対象者は肺疾患の手術を受け, 同意が得られた 15 例である。切除された肺非癌組織から total RNA を抽出して Real-time PCR 法でヒト末梢時計遺伝子, *PERIOD1*, *PERIOD2*, *BMAL1*, *CLOCK* の mRNA の発現を調べた。内部コントロールとして  $\beta$ -ACTIN を用いた。

(2) ヒト気道平滑筋に関連した時計被制御遺伝子の探索 (モチーフ検索)

時計遺伝子は複数あり, *Period1* (*Per1*), *Period2* (*Per2*), *Bmal1* (*Brain and muscle ARNT-like 1*) は概日リズムをもって周期的に発現している。この周期的発現メカニズムは, 複数の時計遺伝子と遺伝子産物によるネガティブフィードバックおよびポジティブフィードバック機構が主体である。

図 2 のように古典的コアループは BMAL1:CLOCK ヘテロダイマーが E-box (CACGTG) と呼ばれる DNA 上の特定の塩基配列に結合し転写促進因子として働き, 遺伝子上流領域に E-box をもつ時計遺伝子群の概日変動を生じさせるメカニズムである。最近になり D-box, RRE (REV-ERB $\alpha$ /ROR response element) などの cis-element を介したサブグループが報告されている (Okamura H, et al. Adv Drug Deliv Rev. 62(9-10): 876-84, 2010 )。サブグループの転写・翻訳の周期も約 24 時間であり全体として概日時計の概日リズムを規定する (図 2)。すなわち, 各時計遺伝子の上流には特定の塩基配列が存在し, E-box 以外に

D-box (TTA[C/T]GTAA),

RRE ([A/T]A[A/T]nT[A/G]GGTCA)

のいずれかを認め, 転写・翻訳がループの中に組み込まれている。

上記の概日時計のループ外で時計遺伝子によって直接発現制御を受ける遺伝子群は CCG (時計被制御遺伝子) と呼ばれ, 狭義には CCG 上流に E-box, D-box, RRE のいずれかが存在するため概日時計の影響を受ける。

この仕組みによって各臓器の機能維持に，“中枢時計遺伝子による体内時計” - “中枢概日時計(SCN)” - “末梢時計遺伝子による体内時計” - “各臓器の末梢概日時計” - “CCG”の連鎖が形成される。CCGは限定した塩基配列を用いることでコアループによって規定された概日リズムの影響を受け日内変動し、生体を細部まで概日時計の管理に置ける(図2)(齋岡直人・体内時計と睡眠時無呼吸症候群・呼吸と循環 61(8): 746-754, 2013.; 齋岡直人, 高田美也子. 時間医学と睡眠関連呼吸障害. Annual Review 呼吸器 2014, 中外医学社, 東京, 127-133, 2014.)。

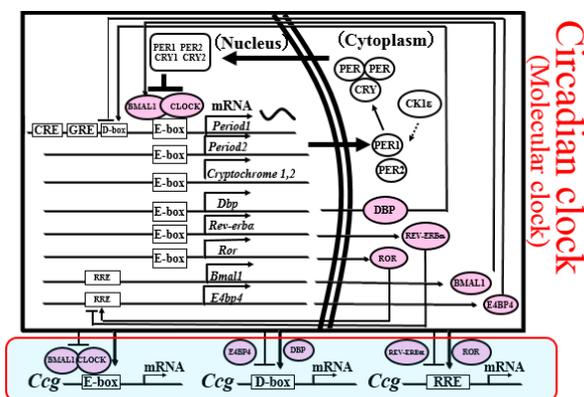
OSAS が他の疾患に悪影響を及ぼすことが知られている。例えば、気管支喘息に OSAS が合併すると症状が増悪し、持続気道陽圧 (CPAP) 療法で改善することが報告されている(Alkhalil M, et al. J Clin Sleep Med. 5(1):71-8, 2009.)。自験例でも CPAP 療法併用で喘息の症状が著明改善した症例を経験した。OSAS による病態シグナルが直接的または間接的に気道平滑筋に影響を及ぼしていると仮説をたてた。

今回、仮説を検証するため、ヒト気道平滑筋に関連する遺伝子を網羅的に検索して、遺伝子上流に cis-element として E-box, D-box, RRE の塩基配列を認める遺伝子を CCG の候補として特定した。

データベースは、  
gff  
( ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/H\_sapiens/GFF/ ) を使って上流領域を抽出した。

鋳型配列に対し、転写因子の配列が 5' 3'方向で一致、あるいは 3' 5'方向で一致している場合とした。

転写開始点から 5,000 bp 上流までを検索した。



**図2. 概日時計の分子生物学的構造**  
複数の時計遺伝子群の転写・翻訳ループが概日時計を構成する。狭義の時計被制御遺伝子は CCG 上流に E-box, D-box, RRE のいずれ

かが存在し概日時計の影響を受け生体機能を維持する。(齋岡直人, 高田美也子. 時間医学と睡眠関連呼吸障害. Annual Review 呼吸器 2014, 中外医学社, 東京, 127-133, 2014. より引用)

#### 4. 研究成果

(1) ヒト臓器における時計遺伝子の発現解析

肺を午前に切除した症例は6例、午後切除した症例は9例であった。

結果として、各々 *PERIOD1*, *PERIOD2*, *BMALI*, *CLOCK* の mRNA の発現には午前、午後間に有意差を認めなかった。さらに切除時刻と mRNA 発現量に相関関係を認めなかった。例数が少ないこともあるが、麻酔など前処置の影響も大きいと考えられた。今回の準備的研究では OSAS 患者は含まれていないが、切除肺組織を用いての日内変動解析は難しいと思われた。

一方、mRNA 発現は明確に調べることが可能であるので、日内変動以外で概日時計の機序解析に有用であると考えられた。

(2) ヒト気道平滑筋に関連した時計被制御遺伝子の探索 (モチーフ検索)

ヒト気道平滑筋遺伝子の抽出

NCBI GENE より "bronchial smooth muscle", "human" などをキーワードとして 23 個の候補遺伝子を選出した。

上流領域の特定塩基配列抽出

第1項で選出した 23 遺伝子について、GFF(General Feature Format) 情報を基に ORF (open reading frame) から上流 5,000 bp 領域を抽出した。

モチーフ検索

E-box, D-box および RRE エlement配列を基に、抽出した上流 5,000 bp 領域についてエlement配列と完全に一致する領域を検索した。

複数の CCG 候補を同定した。  
(未発表データのため記載せず)

今後、同定した遺伝子群の詳細な解析を行う予定である。

臨床疾患によって概日時計がどの程度影響を受けるかは今後の検討課題である。しかし、影響を考慮することは今後の疾患概念を考える上で重要である。

疾患を時計遺伝子が構成する概日時計の面から俯瞰すると疾患を新しい観点から見通せる。すなわち、時計遺伝子が疾患に関わる機序として、

特定の時計遺伝子の変異によって疾患が直接生じる場合、時計遺伝子群で構成された概日時計に問題が生じて特定の CCG を介して疾患を発症する場合、環境あるいは臨床疾患の病態が時計遺伝子群で構成された概日時計に長期間影響を及ぼして間接的に疾患、合併症を生じる場合などが想定される。

これら、SCN、BMAL1、PER2 の病態には重複があると考えられる。概日時計に問題を生じさせるの病態は、SCN が直接関与する以外に SCN が管理する液性因子、神経分泌因子などの間接的影響が関与する場合も予想される。の病態は CCG のさらに下流の多くの遺伝子群に対する長期間の影響も含まれるため概日時計関与の度合いの評価が難しい(鯉岡直人、高田美也子。時間医学と睡眠関連呼吸障害。Annual Review 呼吸器 2014, 中外医学社, 東京, 127-133, 2014)。

今回の研究を通して上記の新規概念を図書、総説で発表し、時間生物学会のシンポジウムでも発表した。今後も研究を継続して、より明確なメカニズムを検証したい。

### (3) 関連事項の特許出願

関連した医療機器の特許出願を4件行った。

## 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 6件)

1. 鯉岡直人, 清水英治. 時計被制御遺伝子。コンセンサス癌治療 13: 169, 2014. 査読無し

2. 鯉岡直人. 概日リズムと気管支喘息。日本臨床 71: 2146-2152, 2013. 査読無し

3. 鯉岡直人. 時計遺伝子と睡眠関連呼吸障害。呼吸 32: 285-292, 2013. 査読あり

4. 鯉岡直人. 体内時計と睡眠時無呼吸症候群。呼吸と循環 61: 746-754, 2013. 査読無し

5. 鯉岡直人, 安達康裕, 石指健一, 森本美智子. 在宅酸素療法の展望。呼吸と循環 60: 759-768, 2012. 査読無し

6. 鯉岡直人, 服岡泰司. 時計遺伝子と呼吸器疾患。BIO Clinica 27: 547-550, 2012. 査読無し

〔学会発表〕(計 1件)

2014年11月9日

九州大学 医学部 百年講堂(福岡市)  
第21回 日本時間生物学会 シンポジウム  
鯉岡直人.

概日時計を活用した疾患の予防・診断・治療。

〔図書〕(計 2件)

1. 鯉岡直人, 高田美也子. 時間医学と睡眠関連呼吸障害。Annual Review 呼吸器 2014, 中外医学社, 東京, pp.127-133, 2014.

2. 鯉岡直人. 体内時計の分子機構と気管支喘息。時間薬理学による最新の治療戦略, 大戸茂弘編, 医薬ジャーナル, 東京, pp.268-275, 2013.

〔産業財産権〕

○出願状況(計4件)

名称: パルスオキシメータ表示システム

発明者: 鯉岡直人 他

権利者: 国立大学法人鳥取大学, フクダ電子

種類: 特許

番号: 特願 2014-77867

出願年月日: 2014年4月4日

国内外の別: 国内

名称: 酸素供給装置

発明者: 鯉岡直人 他

権利者: 国立大学法人鳥取大学, フクダ電子

種類: 特許

番号: 特願 2012-183158

出願年月日: 2012年8月22日

国内外の別: 国内

名称: 酸素供給装置

発明者: 鯉岡直人 他

権利者: 国立大学法人鳥取大学, フクダ電子

種類: 特許

番号: 特願 2012-183159

出願年月日: 2012年8月22日

国内外の別: 国内

名称: 状況を記録するパルスオキシメータ

発明者: 鯉岡直人, 森本美智子

権利者: 国立大学法人鳥取大学

種類: 特許

番号: 特願 2011-259629

出願年月日: 2011年11月28日

国内外の別: 国内

○取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

研究内容

<http://ww7.enjoy.ne.jp/~nburioka/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

鰐岡 直人 ( BURIOKA NAOTO )

鳥取大学・医学部・教授

研究者番号：50252854

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

千酌 浩樹 ( CHIKUMI HIROKI )

鳥取大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：90283994