

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23617040

研究課題名(和文) ストレス性睡眠障害モデルを用いた不眠症改善物質スクリーニング系開発とその応用

研究課題名(英文) Screening of substances for insomnia treatments using stress-induced sleep disorder model mice.

研究代表者

宮崎 歴 (Miyazaki, Koyomi)

独立行政法人産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：70358125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：我々は睡眠リズムのパターンを乱すようなこれまでの断眠ストレスとは異なる新規のストレス負荷方法(PAWWストレス: Perpetual Avoidance from Water on a Wheel)を見いだした。PAWWストレスをマウスに負荷すると睡眠覚醒の日内リズムが乱れ、入眠障害や活動期の眠気、休息期の頻繁な覚醒などを示す。このモデルマウスに対し、食品成分の投与を行い、その睡眠に対する影響評価を行った。また、睡眠障害モデルマウスのから血液を採取し、NMRによるメタボローム解析を行い、睡眠障害のバイオマーカーになるような代謝物の差異が認められるかどうかを検証した。

研究成果の概要(英文)：Psychological stressors prominently affect diurnal rhythms including locomotor activity, sleep, blood pressure and body temperature in humans. We found that the novel continuous stress imposed by perpetual avoidance of water on a wheel (PAWW) affected several physiological diurnal rhythms in mice. PAWW stress decayed robust circadian locomotor rhythmicity in the mice and locomotor activity was evident even during the light period when mice are normally asleep. Daytime activity was significantly upregulated, whereas night-time activity was downregulated, resulting in a low amplitude of activity. Total daily activity gradually decreased with increasing exposure to PAWW stress. Continuous PAWW stress reduced the duration of daytime sleep, especially during the first half of the light period, and increased night-time sleepiness. These sleep architecture phenotypes under stress were similar to those of patients with insomnia.

研究分野：時限

科研費の分科・細目：統合栄養科学

キーワード：睡眠障害 日内リズム 体温 モデル動物 ストレス 活動リズム

1. 研究開始当初の背景

現代では24時間型生活習慣と慢性的精神ストレスにさらされ、睡眠障害を伴う体調不良だけでなく、メンタルシンドロームへとつながる深刻な社会問題が生じている。厚生労働省の調査によれば、日本では5人に1人が何らかの睡眠に関する悩みを抱えていることが報告されている。特に20～40歳代の働き盛り世代の23%が睡眠時間短縮やストレスによる睡眠障害を訴えている他、思春期の子供の睡眠時間短縮も成長に与える影響が危惧されている。さらに睡眠障害やリズム異常とリンクしての過食も健康悪化の原因として顕在化している。このような状況に対し、睡眠障害改善薬やストレス軽減のためのサプリメント等の探索および開発が盛んにすすめられているが、その効用については動物モデルで検証された十分な科学的根拠を伴わないものも多い。その理由として適切なストレス性睡眠障害、リズム障害モデル動物が存在していないことあげられる。

これまでの睡眠障害モデル動物は、物理的に動物を覚醒させ完全に睡眠剥奪をしたり、睡眠のなかでもレム睡眠だけを妨害したりするようなものがほとんどであった。また、ストレス性睡眠障害モデルとしては一過性の物理的ショック(拘束、水浸、金網上飼育法)を与えて得られるモデル動物や睡眠障害を伴うパーキンソン病やハンチントン病モデル動物などがある。また、リズム障害モデル動物は根本的に体内時計遺伝子の改変等で得られる遺伝的モデル動物のみである。しかし、我々に睡眠障害やリズム障害が生ずる場合、持続的なストレスを感じて後天的に障害が誘発される事を考慮すれば、より現実に近い睡眠障害モデルマウスを創出する事が研究用ツールとしては重要なポイントであった。

そこで、我々は「ストレス性睡眠障害には

体内時計遺伝子が関与する」という仮説を立て、昨年度、非侵襲かつ慢性的なストレス負荷により正常動物(遺伝子改変していない動物)において睡眠障害を惹起する方法を検討した。サーカディアンリズムの観察には、ストレス負荷時刻(毎日決まった時刻に負荷する等)による時刻情報を与えてはならないため、ストレス負荷は継続的かつ長期可能な軽度ストレス条件が必要であった。そして、様々な検討を重ねた結果、特殊な飼育装置を用いた慢性不安負荷ストレスにより日内リズム障害を引き起こす事の出来るストレス性睡眠障害モデルマウス創出法を確立した。

2. 研究の目的

我々が独自で見いだしたストレスにより生ずるリズム障害および睡眠障害の研究用ツールとしてストレス性睡眠障害モデルマウスを活用し、ストレス性睡眠障害を改善する物質のスクリーニング系を確立し、新規改善物質を探索する事を目的とした。また、ストレス性睡眠障害の新規バイオマーカーの同定を目指す研究も進めることとした。

3. 研究の方法

マウスでの睡眠脳波の測定方法

マウス(C3H)12匹に麻酔下で睡眠脳波測定用送信器(DSI、TA10M2-F20-EET)の留置手術を行った。具体的には、マウスの頭蓋の2カ所に脳波測定用電極、頸部筋肉2カ所に筋電位測定用電極をそれぞれ留置するとともに、背部皮下に送信器を格納した。術後1～2日間は通常ケージ内にて、その後12～13日間は回転輪つきケージ内にて1匹ずつ術後回復を行った。送信器を格納したマウスの入ったケージを受信ボード(DSI、R

PC-1)上に載置して測定を開始した。また、検出データはデータ解析ソフト(DSII、Dataquest A.R.T.)を用いてPC上に取得した。

睡眠障害モデルマウスの作成

マウスはC3H-HeN(日本SLC)から購入した。マウスは22℃、湿度50%、照明サイクルは8:00~20:00点灯の明期:暗期12:12で飼育した。餌としては通常飼料(CE-2、日本クリア)を自由摂食で与えた。睡眠障害モデルマウスの作成に当たっては、回転輸付けケージ(メルクエスト、SW-15S)にて一匹飼いで10日ほど馴化した後、ケージの床敷きを水に交換して1週間飼育する事で作成する。作成時の給餌給水とも馴化時と同じであり、自由摂食及び飲水で行った。

食品成分の投与による行動および睡眠への影響

食品成分としてD-リボースを一例として検証を行った。D-リボース投与は飲水にて行い、3.5mg/mlの濃度でマウスに与えた。20g体重マウスの1日当たりの飲水量は約6mlであり、飲水ボトルに入れた水道水を自由飲水にて摂取させた。1日当たりの摂取量は平均6mlであり、D-リボース群のマウスについては、1日当たり1000mg/kg体重のD-リボースを摂取した換算となった。ストレス負荷による睡眠障害モデルマウスでの検証の際には、ケージに入れる水にも3.5mg/mlの濃度になる様にD-リボースを溶解させて飼育した。D-リボースを投与する前の脳波を3日間測定した後、D-リボース水溶液(3.5mg/ml)を飲水にて投与した。1日当たりの摂取量は平均6mlであり、1日当たり1000mg/kg体重のD-リボースを摂取した換算となった。投与してから1日経過後に脳波を3日間測定し、正常時のD-リボース投与の睡眠脳波測定データとした。データ解析ソフトで取得した各3日ずつの

データを睡眠解析ソフト(キッセイコムテック、Sleep Sign)により解析し、覚醒、ノンレム(NREM)睡眠、及びレム(REM)睡眠のステージ判定を行った。また、NREM睡眠については脳波周波数解析を行い、デルタ波睡眠の程度を評価した。

睡眠障害モデルマウスの採血とNMRメタボローム解析

上記の方法でストレス負荷を2週間おこない睡眠障害を誘発したマウスから継続的に血液のサンプリングを行い、その血液のNMRメタボローム解析を行った。NMRメタボローム解析は血液や尿などをNMRによりプロファイリングする事により構成成分の変化によりスペクトルの変化が生ずる事を利用した既存のメタボローム解析の方法である。NMRスペクトルデータを専用のソフトウェアにて多変量解析をおこない、睡眠障害モデルマウスと正常マウスでの分布傾向を比較した。

4. 研究成果

睡眠障害モデルマウスの睡眠に及ぼすD-リボース投与の効果

通常飼育下での覚醒時間及びNREM睡眠時間については、D-リボースを投与した影響がほとんど認められなかった。なお、日内変動についてもほとんど影響がなかった。正常時のD-リボース投与の睡眠脳波測定データを得た後、すべてのマウスの飲水を水道水とし、体内に残存するD-リボースが代謝されるまでそのまま3日間飼育した。マウスを6匹ずつの2群に分け、一方の群(D-リボース群)のマウスについては、ケージの床敷きをD-リボース水溶液に変更するとともに、飲水ボトルに入れたD-リボース水溶液(3.5mg/ml)を自

由飲水にて摂取させた。また、他方の群（コントロール群）のマウスについては、ケージの床敷きを水道水に変更するとともに、飲水ボトルに入れた水道水を自由飲水にて摂取させた。1日当たりの摂取量は平均6mLであり、D-リボース群のマウスについては、1日当たり1000mg/kg体重のD-リボースを摂取した換算となった。いずれの群のマウスについても回転輪上で飼育し、慢性的なストレスを負荷して睡眠障害を誘発させた。そして、ストレス負荷を開始してから1日経過後、3日間脳波を測定した。図1に示すように、睡眠障害を誘発させたマウスについては、D-リボースを摂取させることで、休息期（8：00～20：00）において覚醒時間の減少及び睡眠時間の増加が認められた。特に

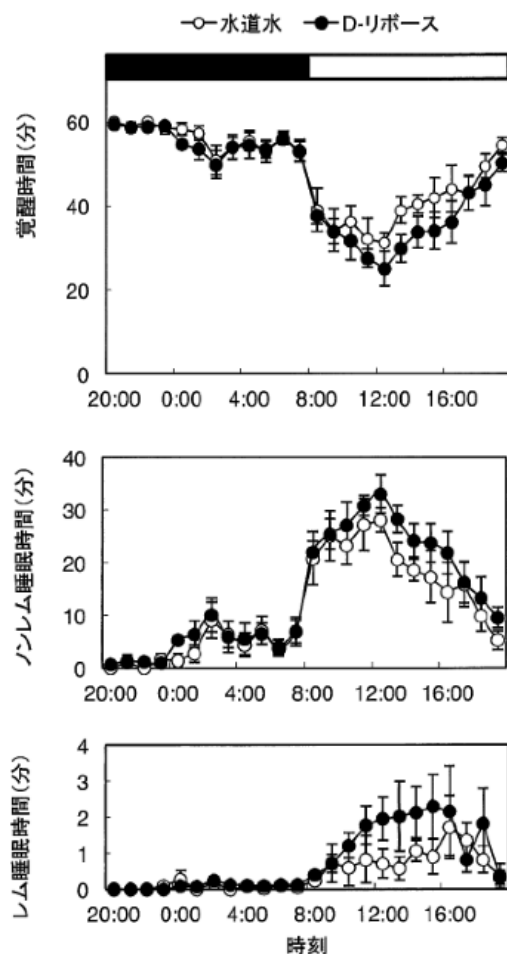


図1. 睡眠障害モデルマウスにおけるD-リボース投与による覚醒、ノンレム睡眠、レム睡眠時間に及ぼす影響（黒：D-リボース投与、白：水投与）

、休息期の後半（12：00～20：00）においては、覚醒時間の減少及び睡眠時間の増加が顕著であることから、D-リボースの摂取による影響をより強く受けていると考えられる。さらに、NREM睡眠及びREM睡眠のいずれについても、D-リボースを投与した影響が認められた。

睡眠障害モデルマウスのNMRによるメタボローム解析

睡眠障害のバイオマーカーを探索する試みとして、睡眠障害モデルマウスの血液を用いて、血液中代謝物を簡便に勝つ包括的に解析するNMRメタボリックプロファイリングを行った。活動期および休息期のそれぞれで採血を行った。その結果、NMRスペクトルの多変量解析を行った結果、睡眠障害モデルマウスと健常マウスの休息期血液成分の間で、代謝物構成の違いを反映した分布を示す変数が存在する事がわかった（図2）。これは双方のマウスを区別出来る一群の因子が存在している事を意味している。NMRスペクトルと既知のデータベースとの照合により、一部のアミノ酸や乳酸がその候補となり得る可能性が示唆された。

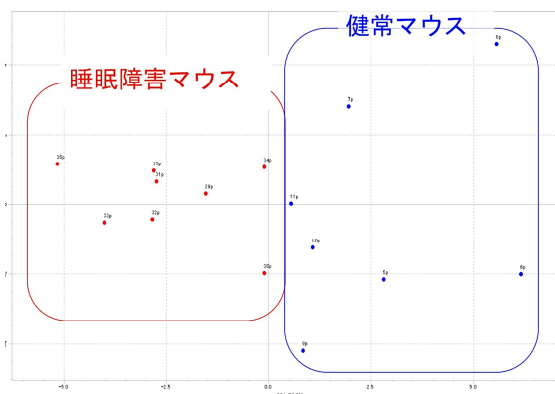


図2. 睡眠障害モデルマウスとコントロールマウスの血液メタボローム解析（赤：睡眠障害モデルマウス、青：コントロールマウス）

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)

Kondoh D, Yamamoto S, Tomita T, Miyazaki K, Itoh N, Yasumoto Y, Oike H, Doi R and Oishi K, Harmine lengthens circadian period of the mammalian molecular clock in the suprachiasmatic nucleus. BPB-Note, (2014) in press.
Horii Y, Nakakita Y, Fujisaki Y, Yamamoto S, Itoh N, Miyazaki K, Kaneda H, Oishi K, Shigyo T, Nagai K. Effects of intraduodenal injection of Lactobacillus brevis SBC8803 on autonomic neurotransmission and appetite in rodents. Neurosci Lett. 2013 Feb 28;539:32-7. doi: 10.1016/j.neulet.2013.01.037.

Miyazaki K, Itoh N, Ohyama S, Kadota K, Oishi K. Continuous exposure to a novel stressor based on water aversion induces abnormal circadian locomotor rhythms and sleep-wake cycles in mice. PLoS One. (2013) 8(1):e55452. doi: 10.1371/journal.pone.0055452.

Shimizu T, Hirai Y, Murayama C, Miyamoto A, Miyazaki H, Miyazaki K. Expressions of the circadian genes Per2, Bmal1, Clock and Cry1 during the different stages of follicular development and their regulation by FSH in bovine granulosa cells from small follicles Livestock Science, 145, 292-297 (2012)
DOI : 10.1016/j.livsci.2012.01.012

Kinoshita C, Miyazaki K, Ishida N. Chronic stress affects PERIOD2 expression through glycogen synthase kinase-3 phosphorylation in the central clock. Neuroreport, 23, 292-297 (2011)
doi: 10.1097/WNR.0b013e32834e7ec2.

Shimizu T, Hirai Y, Murayama C, Miyamoto A, Miyazaki H, Miyazaki K. Circadian Clock genes Per2 and clock regulate steroid production, cell proliferation, and luteinizing hormone receptor transcription in ovarian granulosa cells. Biochem Biophys Res Commun. 412, 132-134, (2011) DOI : 10.1016/j.bbrc.2011.07.058

〔学会発表〕(計5件)

宮崎 歴、伊藤奈々子、大石勝隆 他 Lactobacillus brevis SBC8803 株の熱処理菌体摂取がマウス自発行動リズムおよび睡眠に及ぼす影響 第68回日本栄養・食糧学会大会、2014.5.31、北海道

伊藤奈々子、宮崎 歴、大石勝隆 他 酸化ストレスに与える概日リズムと摂食行動の影響 第66回日本酸化ストレス学会 2013. 6.13 名古屋

宮崎 歴、伊藤奈々子、大石勝隆 他 ストレス性睡眠障害モデルマウスの睡眠リズムと生理的变化の解析 第11回産総研/産議連 LS-BT 合同研究発表会 2012. 1.31 つくば

宮崎 歴、伊藤奈々子、大石勝隆 他 ストレス性睡眠障害モデルマウスの睡眠リズムと生理的变化の解析 第18回日本時間生物学会学術大会 2011.11.7 名古屋

宮崎 歴、伊藤奈々子、大石勝隆 他 Development and Characterization of mouse model for stress induced sleep disorder. 第34回日本神経科学学会大会 2011.9.15 横浜

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計7件)

名称：睡眠改善剤およびそれを用いた飲食品

発明者：宮崎歴、大石勝隆ら

権利者：産総研他

番号：特願 2014-101037

出願年月日：2014/5/15

国内外の別：国内

名称：睡眠障害のバイオマーカーの検出方法

発明者：根本直、宮崎歴、大石勝隆ら

権利者：産総研

番号：特願 2012-234036

出願年月日：2012/10/2

国内外の別：国内

名称：睡眠障害のバイオマーカーの検出方法

発明者：根本直、宮崎歴、大石勝隆ら

権利者：産総研

番号：特願 2012-234036
出願年月日：2012/10/2
国内外の別：国内

名称：小動物飼育装置
発明者：宮崎歴、大石勝隆ら
権利者：産総研他
番号：特願 2012-178079
出願年月日：2012/8/10
国内外の別：国内

名称：概日リズムの乱れを予測する
ためのバイオマーカー
発明者：大石勝隆、宮崎歴ら
権利者：産総研
番号：特願 2012-144660
出願年月日：2012/5/15
国内外の別：国内

名称：概日リズム改善剤
発明者：大石勝隆、宮崎歴ら
権利者：産総研他
番号：特願 2012-046806
出願年月日：2012/3/2
国内外の別：国内

名称：行動リズムモニタリング用バイオ
マーカー
発明者：宮崎歴、大石勝隆ら
権利者：産総研
番号：特願 2012-067165
出願年月日：2012/2/23
国内外の別：国内

取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://unit.aist.go.jp/biomed-ri/biomed-bcl/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮崎 歴 (MIYAZAKI, Koyomi)

(独)産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・主任研究員

研究者番号：70358124

(3) 連携研究者

大石 勝隆 (OISHI, Katsutata)

(独)産業技術総合研究所・バイオメディカル研究部門・グループリーダー

研究者番号：50338688

勢井宏義 (SEI, Hiroyoshi)

徳島大学・ヘルスバイオサイエンス研究部・教授

研究者番号：40206602