

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24370102

研究課題名(和文) ヒトのメラノプシン遺伝子多型と生理機能：機能的潜在性の発現と環境適応能

研究課題名(英文) Melanopsin Gene Polymorphism and physiological functions in human

## 研究代表者

樋口 重和 (Higuchi, Shigekazu)

九州大学・芸術工学研究科(研究院)・教授

研究者番号：00292376

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：過去の研究でメラノプシンの遺伝子多型1394T (rs1079610)が瞳孔の対光反応に関連していることを明らかにした。本研究では、メラノプシンが光波長特性を有することから、異なる光波長における生理機能とメラノプシン遺伝子多型の関係について調べた。その結果、メラノプシンを強く刺激する短波長光でのみCC+CT群の瞳孔の縮瞳率がTT群に比べ有意に大きかった。さらに、TC群とTT群の対光反応性はそれぞれ476nmと480nmでピークを示し、遺伝子型によって波長特性が異なることがわかった。睡眠習慣の比較では、CC群の就寝・覚醒時刻がTTやTC群より有意に遅いことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：In our previous study, we found that a single nucleotide polymorphism of 1394T (rs1079610) in the melanopsin gene was associated with pupillary light response in human. Since melanopsin has a characteristic spectral sensitivity to light, in this study, we aimed to determine associations among 1394T genotypes and physiological responses under diverse light wavelengths. In the results, the CC+CT subjects showed greater percentage of pupillary constriction than the TT subjects under light conditions that strongly excites melanopsin (high-intensity and short wavelength). In addition, there was a difference in spectral sensitivity between the genotype groups; the TC subjects and TT subjects showed peak responsiveness at 476 nm light and 480 nm light, respectively. In the comparison of habitual sleep between the genotype groups, sleep/wake timing of CC subjects was significantly later than the TT or TC subjects.

研究分野：生理人類学

キーワード：生理人類学 環境適応 光環境 光感受性 遺伝的多型 メラノプシン 瞳孔

### 1. 研究開始当初の背景

網膜で受光した光は、異なる経路を通して脳に伝えられる。ひとつは、脳の視覚野に伝えられ、明るさや色の知覚をもたらす(視覚作用)。もう一つは、体内時計の中核である視交叉上核などに伝えられ、生体リズムの位相調節、メラトニンの分泌抑制、瞳孔の対光反応などの視覚とは異なる作用をもたらす(非視覚的作用)。2000年になってメラノプシンという光感受性タンパクが網膜の神経節細胞(以下 mRGC)に存在することが発見された。近年の研究で、この mRGC は、光の非視覚作用に重要な役割を担っていることが明らかにされている。

このメラノプシンの遺伝子にはいくつかの多型が存在するが、生理機能との関連はほとんどわかっていない。我々の先行研究において、メラノプシン遺伝子の一塩基多型(rs1079610)が光に対する瞳孔の縮瞳率と関連があることを明らかにした。しかしながら、結果の再現性の確認も含めた、より詳細な実験が必要であった。また、瞳孔の対光反応だけではなく、その他の生理指標と野関連や環境適応および機能的潜在性の観点からの検討も必要であった。

### 2. 研究の目的

メラノプシン遺伝子多型と光の非視覚作用の関係を詳細に検討することを目的として以下の4つの実験を行った。実験1ではメラトニン遺伝子多型と瞳孔の対光反応の関係が光の波長によって異なるかどうかを明らかにすることを目的とした。実験2では瞳孔の対光反応の分光感度特性を詳細に検討し、ピーク波長に違いがあるかどうかを検討することを目的とした。実験3では、メラノプシン遺伝子多型と睡眠習慣の関係を明らかにすることを目的とした。実験4では、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について明らかにすることを目的とした。実験5では、メラノプシン遺伝子以外の計遺伝子と非視覚的な作用の関連を調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

(実験1) 先行研究とは異なる195名の健常な男女大学生を対象に、毛髪からDNAを抽出し、メラノプシン遺伝子の一塩基多型(rs1079610, I394T)を調べた結果、3つの遺伝子型(TT, TC, CC)に分類され、TT型126名、TC型55名、CC型8名であった。本実験に参加したのは色覚異常のないTT型34名(20.8±2.0歳)、TC型33名(21.0±2.3歳)、CC型8名(21.3±1.7歳)の計75名であった。光源は、赤、青、緑の発光ダイオード(LEDs)を配置させたパネル(350mm×350mm)にディヒューザを組み合わせたものを使った。各色光のピーク波長はそれぞれ465nm(青)、536nm(緑)、632nm(赤)であり、光強度は5条件(12、13、14、14.5、15

log photons/cm<sup>2</sup>/s)とした。実行前に20分間の暗順応(<0.1 lx)を設け、弱い光(12 log photons/cm<sup>2</sup>/s)から強い光の順に1分ずつ呈示した。瞳孔の測定は、左目を対象に赤外線カメラ付きのアイマークレコーダー(NAC, EMR-8)を用いた。光曝露後の定常状態の瞳孔を2~3回繰り返し行った。

(実験2) 実験1の被験者の中から、35名の被験者の協力を得て実験を行った。TT型18名とTC型17名であった。光源装置(朝日分光MAX-301)を用い、10種類の単波長光(ピーク波長はそれぞれ430, 460, 470, 480, 500, 520, 540, 560, 580, 600 nm)を設定した。これらの光に対する瞳孔の縮瞳率から各遺伝子型のピーク反応性を推定した。

(実験3) 過去の被験者と今回の被験者を合わせた合計338名の男女大学生のデータを分析に用いた。その結果、TT型231名(男128:女103, 21.0±2.3歳)、TC型93名(男49:女44, 20.8±2.0歳)、CC型14名(男4:女10, 21.3±1.5歳)であった。睡眠習慣は社会的制約を受けやすい平日と、その影響が少ない休日に分けて質問紙により調べた。質問の内容は、就寝時刻、覚醒時刻、睡眠時間であった。

(実験4) 夜間の光によるメラトニンの抑制実験を行った。照度条件は1000 lxであった(目の位置での鉛直面照度)。被験者数39名(TT型23名、TC型16名)であった。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。唾液中メラトニン濃度の分析はRIA法で行った(RK-DSM, Buhlmann)。

(実験5) 実験4と同じ被験者および瞳孔の対光反応とメラトニン抑制率のデータを利用し、時計遺伝子多型との関係を調べた。本研究ではPER2に着目した。国際HapMapデータベースで報告されているPER2領域に含まれる6つのSNPを分析対象として選択し、PCR-direct sequencingとTaqMan法により遺伝子型を決定した。

### 4. 研究成果

(実験1) 瞳孔の縮瞳率における遺伝子型の比較を行った。縮瞳率は、各色光の12 log photons/cm<sup>2</sup>/sを基準に算出した。遺伝子型の違いについて光条件ごとに対応のあるt検定を行った結果、青色光と緑色光の両方の14.5、15 log photons/cm<sup>2</sup>/sにおいて遺伝子型の差が見られ、TC+CC型の縮瞳率がTT型に比べ有意に大きかった(図1上)。しかし、

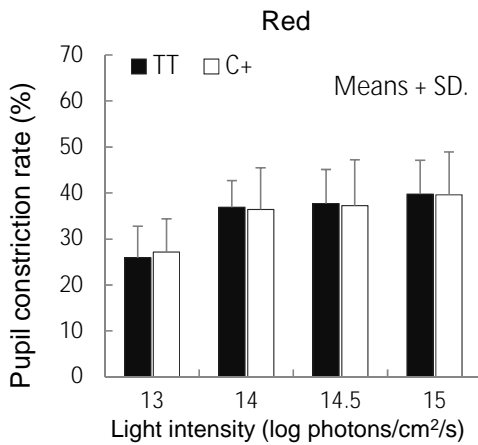
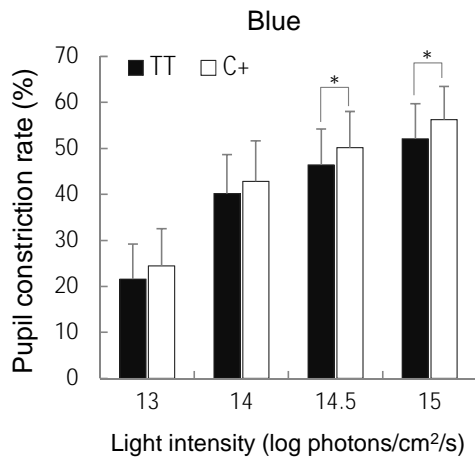


図1 .メラノプシン遺伝子多型と瞳孔の縮瞳率の関係 (上は青色光、下は赤色光) (Lee et al., 2013)

赤色光下では有意な差は見られなかった (図1下)。メラノプシン遺伝子の一塩基多型による瞳孔反応の違いは光の明るさだけでなく光の色 (波長) にも依存することが明らかになった。

(実験2) 光波長に対する瞳孔縮瞳率のピーク反応性を推定した結果、TT型の被験者は479.7 nmの光波長でピークを示し、TC型の被験者は476.0 nmの光波長でピークを示した。TC型の方がTT型に比べてピーク波長が有意に短く、両遺伝子型で波長特性が異なることが明らかになった。

(実験3) 平日の就寝時刻、覚醒時刻、睡眠の midpoint において遺伝子型の主効果が見られ、いずれにおいてもCC型がTT型とTC型に比べ有意に遅く、TT型とTC型の間には有意な差はなかった。睡眠時間については全ての遺伝子型間で統計的な有意差は見られなかった。睡眠習慣は概日リズムの位相に影響を受けることからCC型の概日リズムの位相が他の遺伝子型に比べてより後退している可能性が示唆された。

(実験4) メラトニン抑制率について、遺伝

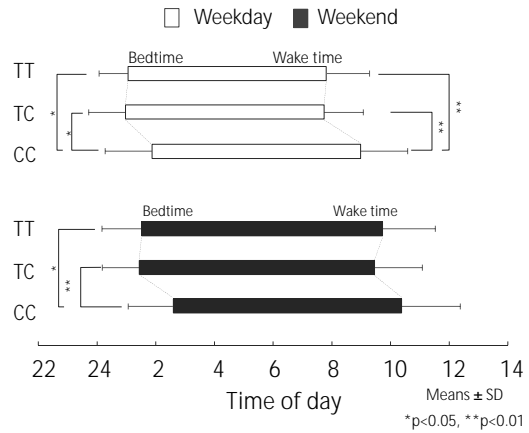


図2 .メラノプシン遺伝子多型と睡眠習慣の関係 (上は平日、下は休日) (Lee et al., 2014)

子型 (TT, TC) 時間 (曝露 1 時間後, 2 時間後, 3 時間後) を要因とした 2 元配置の分散分析を行った。その結果、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。有意な交互作用もなかった。本実験で用いた光条件ではメラトニン抑制率とメラノプシン遺伝子型間に有意な関連は認められなかった。

(実験5) *PER2* ハプロタイプとメラトニン抑制率の関係について統計解析したところ、1つのハプロタイプ (Hap3) が他のハプロタイプと比べて、有意にメラトニン抑制率が低いことが分かった。メラトニン抑制率の生理的多型と *PER2* の遺伝的多型は、統計学的に有意に関連があることが明らかとなった。また、世界の地域集団のハプロタイプ頻度を調べたところ、フリカでは Hap3 の頻度が最も高いこともわかった。

## 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計5件)

Higuchi S, Hida A, Tsujimura S, Mishima K, Lee Si, Kinjo Y, Miyahira M, Melanopsin Gene Polymorphism I394T Is Associated with Pupillary Light Responses in a Dose-Dependent Manner, PLOS ONE, 8(3): e60310, 2013. (査読有)

樋口重和, 光の非視覚的作用と概日リズム: 生理的多型性へのアプローチ, 日本生理人類学会誌, 18, 1, 39, 43, 2013. (査読有)

Lee Si, Hida A, Tsujimura S, Morita T, Mishima K, Higuchi S, Association between melanopsin gene polymorphism (I394T) and pupillary light reflex is dependent on light wavelength, J Physiol Anthropol, 12;32:16, 2013. (査読有)

Lee Si, Hida A, Kitamura S, Mishima K, Higuchi S, Association between the melanopsin gene polymorphism

OPN4\*11e394Thr and sleep/wake timing in Japanese university students, *J Physiol Anthropol*, 33, 2014. (査読有)  
樋口 重和, 李 相逸, 光のサーカディアンリズムとメラトニン分泌への作用の個人差, *照明学会誌*, 99(1), 20-24, 2015. (査読無)

[学会発表](計16件)

樋口重和, 夜の光によるメラトニン抑制とその個体差, 第51回日本生体医学学会大会, 2012

李相逸, 樋口重和, 西剛史, 肥田昌子, 三島和夫, 辻村誠一, 森田健, 稲見香, メラノプシン遺伝子多型(I394T)と瞳孔の対光反応の関係: 光の強度と色光の影響, 日本生理人類学会第68回大会, 2013

Higuchi S, Lee S, Hida A, Tsujimura S, Mishima K, Are phenotypic variations in non-visual effects of light associated with gene polymorphism of melanopsin photoreceptors?, 11th International Congress of Physiological Anthropology, 2013.

Lee S, Higuchi S, Hida A, Mishima K, Tsujimura S, Morita T, Effects of wavelength of light on association between melanopsin gene polymorphism I394T and pupillary light response., XIII Congress of the European Biological Rhythms Society, 2013

樋口重和, 概日リズムと視覚入力, 日本視覚学会 2014年冬季大会, 2014 (招待講演)

Akiyama T, Higuchi S, Oota H, A genetic polymorphism of the PER2 gene associates with physiological polytypisms for light sensitivity in humans, 国際人類学民族科学連合(IUAES), 2014 (招待講演)

Lee Si, Higuchi S, Association between genetic polymorphism of melanopsin photoreceptor and sleep/wake timing, 国際人類学民族科学連合(IUAES), 2014 (招待講演)

Lee SI, Hida A, Higuchi S, The I394T Single nucleotide polymorphism of human melanopsin Gene might be associated spectral sensitivity of melanopsin, SLTBR 26th Annual Meeting, 2014

樋口重和, メラノプシン遺伝子多型と光感受性および睡眠の関係, 日本睡眠学会 第39回定期学術集会, 2014 (招待講演)

樋口重和, 生理学的なヒトの概日リズムの評価方法, 第21回日本時間生物学学会学術大会, 2014 (招待講演)

李相逸, 樋口重和, ヒトのメラノプシ

ン遺伝子の一塩基多型 I394T と光波長に対する反応特性の関係, 第21回日本時間生物学学会学術大会, 2014

Higuchi S, Ota H, Phenotypic variations in non-visual effects of light associated with melanopsin and clock gene polymorphism in human, International Symposium on Human Adaptation to Environment and Whole-body Coordination, 2015 (招待講演)

樋口重和, 自然環境への適応と人工環境への不適応 ~光と生体リズムの観点から~, 日本生理人類学会第72回大会, 2015 (招待講演)

樋口重和, 現代社会の光がもたらす social jetlag への影響, 日本睡眠学会 第40回定期学術集会, 2015 (招待講演)

Lee Si, Matsumori L, Higuchi S, A Proposal to Simplify the Estimation of Characteristic Spectral Responses of Melanopsin to Light Wavelengths, The 12th International Congress of Physiological Anthropology, 2015

Higuchi S, Light and Circadian Rhythms, The 11th Joint Workshop on Machine Perception and Robotics, 2015 (招待講演)

[図書](計2件)

樋口 重和, 人間科学の百科事典(日本生理人類学会編), 丸善出版, 「眼(p94-95)」, 「概日リズム(p184-186)」, 「生体リズム(p187-188)」, 2015.

樋口重和, 子どものからだと心・連絡会議, 子どものからだと心白書 2015, ブックハウス・エイチディ, 夜の光の影響は子どもの方が大きかった!, 2016.

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

北村 真吾 (KITAMURA SHINGO)  
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(80570291)

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