

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09817

研究課題名(和文) 生体リズムと気分調節における機能障害の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanism regulating circadian rhythms and mood

研究代表者

肥田 昌子(Hida, Akiko)

国立研究開発法人国立精神・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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：睡眠-覚醒相後退障害患者の末梢時計周期は、健常者の周期と比べて違いは認められなかった。一方、非24時間睡眠-覚醒リズム障害患者の末梢時計周期は健常者と比べて有意に延長していることが明らかになった。また、各患者の時間療法に対する反応性を調べた結果、睡眠-覚醒相後退障害患者では治療反応群の末梢時計周期と治療非反応群の周期に違いは認められなかったが、非24時間睡眠-覚醒リズム障害患者では治療非反応群の周期は治療反応群の周期よりも有意に長いことが判明した。これらの結果は、末梢時計周期は概日リズム睡眠-覚醒障害の診断や治療反応性を予測する有用なバイオマーカーとなることを示している。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the circadian phenotypes of patients with delayed sleep-wake phase disorder (DSWPD) and non-24-hour sleep-wake rhythm disorder (N24SWD), two different circadian rhythm sleep-wake disorders (CRSWDs) by measuring Bmal1-luciferase (Bmal1-luc) rhythms in fibroblast cells derived from individual patients (in vitro rhythms). The period length of the Bmal1-luc rhythm (in vitro period) varied among individuals. The N24SWD group showed a significantly longer in vitro period than did the control or DSWPD group. Furthermore, in vitro period was associated with response to chronotherapy in the N24SWD group. Longer in vitro periods were observed in the non-responders compared to the responders in the N24SWD group. In vitro rhythm assays could be useful for predicting circadian phenotypes and clinical prognosis in patients with CRSWDs.

研究分野：時間生物学

キーワード：生物時計

### 1. 研究開始当初の背景

睡眠覚醒、ホルモン分泌量、体温、気分などに見られる約1日24時間を周期とした日内変動は概日リズムと呼ばれ、脳視床下部・視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus:SCN) に存在する生物時計 (中枢時計) によって制御されている。この概日リズムは、明暗サイクルや摂食タイミングなどの外因性シグナルにリセットされて24時間周期の外界環境へ同調している。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・翻訳制御に関わるフィードバックループが生物時計の中核をなす。転写因子CLOCKとBMAL1はヘテロダイマーを形成し、E-box配列を介してDNAに結合することで、時計遺伝子群であるPer (Period)1、Per2、Per3、Cry (Cryptochrome) 1、Cry2やレチノイン酸関連核内受容体Ror、Rev-Erbなどの転写を活性化する。転写翻訳後、時計遺伝子産物PERはCKI (Casein Kinase I) によりリン酸化修飾を受け、CRYと複合体を形成し核内へと移行する。そして、PER:CRY複合体は、CLOCK:BMAL1によって活性化された自らの転写を抑制するネガティブフィードバックを形成する。一方、同様にCLOCK:BMAL1の制御下にある核内受容体であるRORとREV-ERBは、Bmal1プロモーター上に存在するRORE配列に結合し、RORはBmal1の転写を活性化しREV-ERBはBmal1の転写を抑制することが知られている。

概日リズム睡眠-覚醒障害患者では、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認められる。また、時計遺伝子の一つClockの変異動物 (Clock<sup>19/19</sup>) 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、概日リズム睡眠-覚醒障害患者では生物時計の調節障害に加えて気分調節の異常が併存していることが明らかにされ

ている。気分安定薬として用いられるリチウムは、ラットやマウスの脳内ではGSK3を阻害すること、カテニン量を増すこと、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、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。GSK3は時計遺伝子タンパクCLOCK、BMAL1、PER2、CRY2、REV-ERBをリン酸化すること、GSK3の機能を阻害すると時計遺伝子発現リズム周期や時計遺伝子タンパクの安定性が変化することから、生物時計および気分調節の両システムの制御に関わる何らかのシグナル系が存在することを強く示唆している。

### 2. 研究の目的

概日リズム睡眠-覚醒障害患者は、睡眠覚醒リズムの異常を主徴とするが、うつ状態など気分障害を高頻度に併発する。そこで、概日リズム睡眠-覚醒障害患者の末梢組織を用いて、生物時計と気分調節の両システムの機能障害に関わる分子メカニズムを検証する。患者および健常被験者の生体組織由来の初代培養細胞系で、細胞内の時計遺伝子発現リズムをリアルタイム測定するアッセイ系を利用して、概日リズム睡眠-覚醒障害患者に特徴的な生物時計の障害特性を決定する。

### 3. 研究の方法

研究対象者: International Classification of Sleep Disorders (ICSD) に準じて概日リズム睡眠-覚醒障害と診断された患者67人および対照として標準的な睡眠パターンの健常者50人。睡眠-覚醒相後退障害41人: 男性29人、平均年齢32.14歳。女性12人平均年齢33.08歳。非24時間睡眠-覚醒リズム障害26人: 男性17人、平均年齢28.82歳。女性9人、平均年齢30.33歳。健常者50人:

男性 50 人、平均年齢 27.06 歳。

除外基準：重篤な身体合併症に罹患している者、神経疾患に罹患している者、本研究の結果に影響を及ぼす治療薬もしくは物質を摂取している者、キシロカインに対するアレルギーを有する危険性が高い者、ならびに医師が対象として不適当と判断した者。

患者および健常被験者の背部・臀部から局所麻酔下でプランジャー付き生検トレパンを用いて皮膚切片（直径 2mm×深さ 5mm）を採取し、得られた皮膚生検から初代線維芽培養細胞を樹立した。概日リポーター遺伝子 Bmal1-luc（時計遺伝子 Bmal1 プロモーター + ルシフェラーゼ遺伝子）を各被験者の初代線維芽培養細胞に導入させた。その後、37 インキュベーター内に設置した微弱発光測定システムを用いて、細胞内のルシフェラーゼ発光量の変化を経時的に記録した。得られた発光リズム（末梢時計リズム）の解析を行い、各被験者の発光リズム周期（末梢時計周期）を決定し、患者と健常者の生物時計特性の比較・検証を行った。

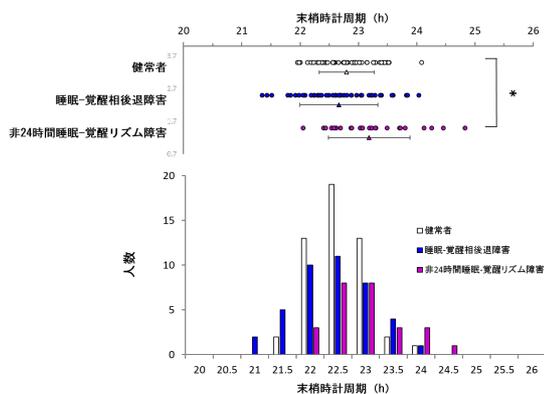
患者および健常被験者の睡眠表もしくはは活動量計のデータから、入眠時刻と覚醒時刻を決定し、その中点（睡眠中点）を計算した。非 24 時間睡眠-覚醒リズム障害患者については、その中点から睡眠覚醒リズム周期を計算した。睡眠-覚醒相後退障害については睡眠中点、非 24 時間睡眠-覚醒リズム障害患者については睡眠覚醒リズム周期を指標に用いて、各患者の時間療法（高照度光療法やメラトニン/メラトニン受容体作動薬などを用いて睡眠時間帯を正常化させる治療法）に対する反応性を調べた。

#### 4. 研究成果

睡眠-覚醒相後退障害患者の末梢時計周期（平均値 ± 標準偏差：22.67 ± 0.67 h）は、健常者の周期（22.80 ± 0.47 h）と比べて違いは認められなかった。一方、非 24 時間

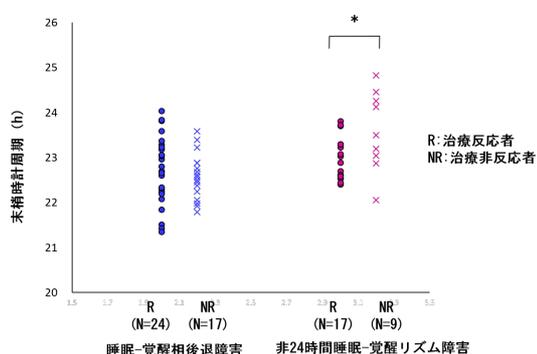
睡眠-覚醒リズム障害患者の末梢時計周期（23.18 ± 0.70 h）は健常者と比べて（22.67 ± 0.67 h）有意に延長していることが明らかになった（図 1）。

図 1：概日リズム睡眠覚醒障害患者の末梢時計周期



また、各患者の時間療法に対する反応性を調べた結果、睡眠-覚醒相後退障害患者では治療反応群の末梢時計周期（22.73 ± 0.77 h）と治療非反応群の周期（22.58 ± 0.51 h）に違いは認められなかったが、非 24 時間睡眠-覚醒リズム障害患者では治療非反応群の周期（23.59 ± 0.89 h）は治療反応群の周期（22.97 ± 0.47 h）よりも有意に長いことが判明した（図 2）。これらの結果は、末梢時計周期は概日リズム睡眠-覚醒障害の診断や治療反応性を予測する有用なバイオマーカーとなることを示している。

図 2：治療反応性と末梢時計周期



現代社会は夜型化・24時間化が進み、不規則な生活リズムに陥っている人々が年々増加している。睡眠覚醒リズムの障害は患者のみならず一般生活者も悩まされる臨床および公衆衛生学上の重要な課題である。皮膚細胞を用いた末梢時計リズム測定法が概日リズム障害の診断ツールとして実用化が可能となれば、患者個人に合ったテーラーメイド医療の提供やリズム障害に関連する様々な精神・神経疾患の発症メカニズムの解明に貢献するであろう。

#### 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 8 件)

1. Hida A, Ohsawa Y, Kitamura S, Nakazaki K, Ayabe N, Motomura Y, Matsui K, Kobayashi M, Usui A, Inoue Y, Kusanagi H, Kamei Y, Mishima K (2017) Evaluation of circadian phenotypes utilizing fibroblasts from patients with circadian rhythm sleep disorders. *Translational psychiatry* 7: e1106
2. Katsunuma R, Oba K, Kitamura S, Motomura Y, Terasawa Y, Nakazaki K, Hida A, Moriguchi Y, Mishima K (2017) Unrecognized sleep loss accumulated in daily life can promote brain hyperreactivity to food cue. *Sleep* 40: zsx137
3. Motomura Y, Kitamura S, Nakazaki K, Oba K, Katsunuma R, Terasawa Y, Hida A, Moriguchi Y, Mishima K (2017) Recovery from Unrecognized Sleep Loss Accumulated in Daily Life Improved Mood Regulation via Prefrontal Suppression of Amygdala Activity. *Frontiers in neurology* 8: 306
4. Kitamura S, Katayose Y, Nakazaki K, Motomura Y, Oba K, Katsunuma R, Terasawa Y, Enomoto M, Moriguchi Y, Hida A, Mishima K (2016) Estimating individual optimal sleep duration and potential sleep debt. *Scientific reports* 6: 35812
5. Shi SQ, White MJ, Borsetti HM, Pendergast JS, Hida A, Ciarleglio CM, de Verteuil PA, Cadar AG, Cala C, McMahon DG, Shelton RC, Williams SM, Johnson CH (2016) Molecular analyses of circadian gene variants reveal sex-dependent links between depression and clocks. *Translational psychiatry* 6: e748
6. Toyoda H, Miyagawa T, Koike A, Kanbayashi T, Imanishi A, Sagawa Y, Kotorii N, Kotorii T, Hashizume Y, Ogi K, Hiejima H, Kamei Y, Hida A, Miyamoto M, Imai M, Fujimura Y, Tamura Y, Ikegami A, Wada Y, Moriya S, Furuya H, Takeuchi M, Kirino Y, Meguro A, Remmers EF, Kawamura Y, Otowa T, Miyashita A, Kashiwase K, Khor SS, Yamasaki M, Kuwano R, Sasaki T, Ishigooka J, Kuroda K, Kume K, Chiba S, Yamada N, Okawa M, Hirata K, Mizuki N, Uchimura N, Shimizu T, Inoue Y, Honda Y, Mishima K, Honda M, Tokunaga K (2015) A polymorphism in CCR1/CCR3 is associated with narcolepsy. *Brain, behavior, and immunity* 49: 148-155
7. Miyagawa T, Toyoda H, Hirataka A, Kanbayashi T, Imanishi A, Sagawa Y, Kotorii N, Kotorii T, Hashizume Y, Ogi K, Hiejima H, Kamei Y, Hida A, Miyamoto M, Imai M, Fujimura Y, Tamura Y, Ikegami A, Wada Y, Moriya S, Furuya H, Kato M, Omata N, Kojima H, Kashiwase K, Saji H, Khor SS, Yamasaki M, Ishigooka J, Kuroda K, Kume K, Chiba S, Yamada N, Okawa M, Hirata K, Uchimura N, Shimizu T, Inoue Y, Honda Y, Mishima K, Honda M, Tokunaga K (2015) New susceptibility variants to narcolepsy identified in HLA class II region. *Human molecular genetics* 24: 891-898
8. Miyagawa T, Toyoda H, Kanbayashi T, Imanishi A, Sagawa Y, Kotorii N, Kotorii T, Hashizume Y, Ogi K, Hiejima H, Kamei Y, Hida A, Miyamoto M, Ikegami A, Wada Y, Takami M, Fujimura Y, Tamura Y, Omata N, Masuya Y, Kondo H, Moriya S, Furuya H, Kato M, Kojima H, Kashiwase K, Saji H, Khor SS, Yamasaki M, Ishigooka J, Wada Y, Chiba S, Yamada N, Okawa M, Kuroda K, Kume K, Hirata K, Uchimura N, Shimizu T, Inoue Y, Honda Y, Mishima K, Honda M, Tokunaga K (2015) An association analysis of HLA-DQB1 with narcolepsy without cataplexy and idiopathic hypersomnia with/without long sleep time in a Japanese. *Human Genome Variation* 2: 15031

〔学会発表〕(計 12 件)

1. Hida A. Mental and physical disorders attributable to desynchronization between social time requirements and an individuals sleep-wake rhythm. 第 95 回日本生理学会大会. 香川 (2018.03.28-30.)
2. Hida A. Pathophysiology of Circadian Rhythm Sleep-Wake Disorders. The 6th Annual IIS Symposium. 東京 (2017.12.14.)
3. 肥田昌子 概日リズム睡眠覚醒障害の遺伝要因の探索 第 24 回日本時間生物学会学術大会 京都(2017.10.28-29.)
4. Hida A. Evaluation of Circadian Phenotypes Utilizing Fibroblasts from Patients with Circadian Rhythm Sleep-Wake Disorders. Bilateral NCNP-MPI-LMU Workshop. Munich, Germany. (2017.10.16-18.)
5. Hida A. Benefits and Mysteries of Sleep. JAGFoS (Japanese-American-German Frontiers of Science Symposium). Bad Neuenahr, Germany. (2017.09.21-24.)
6. 肥田昌子, 北村真吾, 中崎恭子, 綾部直子, 元村祐貴, 加藤美恵, 松井健太郎, 小林美奈, 碓氷章, 井上雄一, 草薙宏明, 亀井雄一, 三島和夫 概日リズム睡眠障害の知慮反応性と抹消時計リズム周期 日本睡眠学会第 42 回定期学術集会 神奈川 (2017.6.29-30.)
7. 肥田昌子 生体リズムと女性 日本睡眠学会第 42 回定期学術集会 神奈川 (2017.6.29-30.)
8. 肥田昌子 概日リズム睡眠障害の病態生理と治療反応性 第 23 回日本時間生物学会学術大会 名古屋 (2016.11.12-13.)
9. 肥田昌子, 北村真吾, 中崎恭子, 綾部直子, 元村祐貴, 加藤美恵, 松井健太郎, 小林美奈, 碓氷章, 井上雄一, 草薙宏明, 亀井雄一, 三島和夫 睡眠相後退型、フリーラン型の抹消時計リズム周期 日本睡眠学会第 41 回定期学術集会 東京 (2016.7.7-8.)
10. 肥田昌子, 北村真吾, 片寄泰子, 加藤美恵, 小野浩子, 角谷 寛, 内山 真, 海老澤尚, 井上雄一, 亀井雄一, 大川匡子, 高橋清久, 三島和夫 Association study of circadian genes in a Japanese population. 第 22 回日本時間生物学会学術大会 東京 (2015.11.21-22.)
11. 肥田昌子, 北村真吾, 片寄泰子, 加藤美恵, 小野浩子, 角谷寛, 内山真, 海老沢尚, 井上雄一, 亀井雄一, 大川匡子, 高橋清久, 三島和夫 日本人集団における概日リズム睡眠障害の多型解析 第 37 回日本生物学的精神医学会

東京 (2015.9.24-26.)

12. 肥田昌子, 北村真吾, 片寄泰子, 加藤美恵, 小野浩子, 角谷寛, 内山真, 海老沢尚, 井上雄一, 亀井雄一, 大川匡子, 高橋清久, 三島和夫 概日リズム障害と PER3 反復配列・OPN4 多型の関連解析 日本睡眠学会第 40 回定期学術集会 栃木 (2015.7.2-3.)

〔図書〕(計 1 件)

肥田昌子 15 章 睡眠と体内時計を測る睡眠科学 三島和夫編化学同人 京都 (2016.8.20.)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

<https://www.ncnp.go.jp/nimh/sleep/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

肥田 昌子 (Hida, Akiko)  
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

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )