

令和元年6月19日現在

機関番号：11401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05381

研究課題名(和文) 高齢者の睡眠障害に関わる環境及び遺伝の相互作用の解明

研究課題名(英文) Genetic and environmental interactions that determine sleep and circadian deterioration with advancing age

研究代表者

三島 和夫 (Mishima, Kazuo)

秋田大学・医学系研究科・教授

研究者番号：40239223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：健康若年成人と60歳以上の健康高齢者を対象として、48時間にわたり睡眠ポリグラフ検査、生体リズム測定ならびにメチル化タイピング用採血を行った。866,895マーカーを搭載するInfinium MethylationEPIC BeadChip キットを用いてマイクロアレイシステムによるゲノム全体のメチル化タイピングを行った。睡眠・生体リズム調節機能に関わるメチル化領域を同定するため、得られたメチル化量の時系列変化をコサイナー法により解析した。その結果、若年者3名以上、高齢者3名以上に共通してリズム性が認められた領域が16箇所見いだされ、概日リズム形成に重要なメチル化領域である可能性が高い。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の目的は、睡眠の質的量的低下や内的脱同調などの睡眠・生体リズム調節障害が高齢者の認知機能や気分調節に及ぼす影響を精密に評価し、その罹患脆弱性や個人差が生じる生理・分子的基盤を遺伝要因と環境要因の相互作用の視点から明らかにすることにある。また、睡眠・生体リズムを効果的に調整するための生活習慣の確立とその奏功メカニズム、高齢者の頑健な睡眠機能の生理的意義の解明に資する基盤データを得ることにある。本研究により概日リズム制御に関わる可能性のあるメチル化領域が明らかになった。今後、睡眠・概日リズム障害を呈する疾患患者を対象にして同候補領域におけるメチル化機能の変化を追跡する。

研究成果の概要(英文)：We performed polysomnography, circadian rhythm measurement and blood sampling for methylation typing (8 points every 4 hours) for 48 hours for healthy young adults and healthy elderly people over 60 years old. Methylation typing of the entire genome was performed by the microarray system using the Infinium Methylation EPIC BeadChip kit equipped with the 866,895 markers. In order to identify the methylated region involved in sleep and biological rhythm regulatory functions, the time series change of the obtained methylation amount was analyzed by the cosinor method. As a result, there were 16 regions where circadian rhythmicity was recognized in both young and elderly people. These methylation sites could be essential for the formation of circadian signal irrespective of age.

研究分野：精神医学

キーワード：睡眠障害 概日リズム メチル化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

睡眠は、活動中の疲労や熱蓄積に対する代償機構としての休息行動（睡眠恒常性）であると同時に、生物時計に駆動され時刻決定的に出現する振動現象（概日リズム）でもある。個人にとって最適な睡眠時間帯やレム・ノンレム睡眠構造は体熱制御、メラトニン分泌、HPA 軸機能等の睡眠調節因子の影響を強く受けるため、1) 十分なエネルギー消費と精神活動によって必要睡眠量が維持されていることと、2) 睡眠相とこれら生理機能リズム群が適正な位相関係を保つ（同調する）ことが良質な回復性睡眠には必須である。

高齢者では実質睡眠時間が短縮し、深睡眠の減少、中途覚醒の増加、レム睡眠構造の不規則化など浅く持続性の乏しい非回復型睡眠に陥ることが多い。また高齢者の一部では睡眠相と上記の生理機能リズム間の相互位相関係（位相角差）に大きな日間変動が認められ、時には交代勤務や時差ボケにも類した数時間にも及ぶズレ（内的脱同調、位相の不安定性）が生じ、睡眠相が著しく不安定になる。このような睡眠の質的量的低下や内的脱同調などの睡眠・生体リズム調節障害は高齢者の精神運動機能低下や抑うつなど（QOL 障害）の一因となっていると考えられている。

一方で、内的脱同調を生じる脆弱性には大きな個人差も存在し、入院や退職等に伴うライフスタイルの軽微な変化で容易に内的脱同調に陥る高齢者の一群が存在する。また同程度の位相角差に陥っても心身の不調の頻度や程度にはやはり大きな個人差が認められる。このような重層的な個体差が生じるメカニズムは生体リズム調整（光感受性、位相反応特性等）および睡眠恒常性（基礎代謝、産放熱、内分泌等）に関わる個体側の遺伝的要因のほか、日照量の減少、食習慣の変化、運動量の減少等から生じる環境要因の相互作用から理解する必要があるが、現時点ではその生理的及び分子的基盤は不明である。

近年の研究から加齢により DNA メチル化などエピゲノム制御の変化が起きること、また少なくともその一部は食事や運動習慣など環境要因の影響を大きく受けることが明らかになっている。ゆえに、加齢に伴って生じる内的脱同調の罹患脆弱性の個人差にもエピゲノム制御の加齢変化およびライフスタイルによる修飾が深く関している可能性が高いと推測される。

睡眠の質的量的低下や内的脱同調は認知症患者の睡眠障害と随伴症状にも関わっている。睡眠および生物時計機能の加齢変化に加えて、視交叉上核や関連神経核の器質障害、同調因子の減弱などにより、不眠や睡眠リズム異常、せん妄、日没症候群など複雑な病態を呈することで介護負担を増大させており、在宅介護を困難にさせる懸念材料となっている。高齢者の睡眠調節機能の障害と精神機能に及ぼす影響を解明し、その神経基盤、分子基盤を明らかにすることは精神科学領域のみならず社会医学的観点からも喫緊の課題であると言える。

睡眠・生体リズム機能の加齢変化およびライフスタイル（日照曝露量や運動など）の影響については長年にわたり主として臨床生理学の方面から検討されてきたが、そのメカニズムや大きな個体差が存在する背景要因の分子基盤は全く不明である。高齢者の QOL を低下させる大きな原因の一つがこれら睡眠問題（睡眠障害）であることは多数の疫学・臨床研究から明らかにされている。

2. 研究の目的

本研究では、睡眠の質的量的低下や内的脱同調などの睡眠・生体リズム調節障害が高齢者の認知機能や気分調節に及ぼす影響を精密に評価し、その罹患脆弱性や個人差が生じる生理・分子的基盤を遺伝的要因と環境要因の相互作用の視点から明らかにする。また、睡眠・生体リズムを効果的に調整するための生活習慣の確立とその奏功メカニズム、高齢者の頑健な睡眠維持が健康長寿に資する生理的意義を明らかにする。そのため、若年者と高齢者の生体リズムおよび睡眠・覚醒構造の加齢変化を特殊環境下で精密に測定し、生物時計および睡眠恒常性機能の加齢変化の特徴、個体差、それらを規定する遺伝的要因（ゲノム・エピゲノム）・環境的要因（ライフスタイル）を分析することで高齢者の睡眠表現型への寄与度、相互作用を解明する。

3. 研究の方法

対象者：健常若年男性 10 名（21 歳～28 歳、平均年齢 24.11 歳）と健常高齢男性 6 名（60 歳～73 歳、平均年齢 66.50 歳）

在宅調査：自宅で睡眠日誌と活動量計を用いて 2 週間にわたる睡眠習慣の記録ならびに睡眠研究調査票に回答した。

【評価項目】

睡眠日誌：睡眠覚醒時刻を主観的に記録する日誌

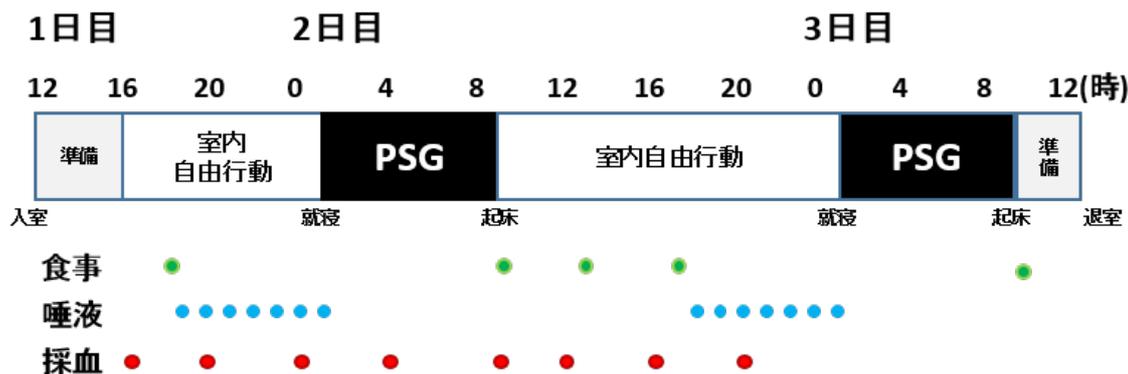
活動量リズム：非利き腕に取り付けた活動量計により重力加速度頻度から活動量の概日変動を連続モニター

睡眠研究調査票：睡眠の質を評価するピッツバーグ睡眠質問票（PSQI）、朝型夜型指向性を検定する朝型夜型質問紙（MEQ）、朝型夜型を評価するミュンヘンクロノタイプ質問紙（MCTQ）、うつ

病の自己評価尺度 (CES-D)、うつ症状の自己評価尺度 (SDS)

本試験：その後、実験室内にて 2 日間にわたり、睡眠・生体リズム指標の測定を行った。第 1 日目の 12 時に隔離実験室に入室し、第 3 日目の 12 時に退室した。その間、1 時～9 時は個室で就寝し、夜間睡眠脳波記録 (Polysomnography: PSG) により睡眠中の脳波を計測した。食事時刻は 9 時、13 時、18 時とし、実験室内では自由に行動した。

高齢者は睡眠時間帯が早かったため若年者より 1 時間早いスケジュールで本試験を行った。



【評価項目】

- ・睡眠日誌：睡眠覚醒時刻を主観的に記録する日誌
- ・活動量リズム：非利き腕に取り付けた活動量計により重力加速度頻度から活動量の概日変動を連続モニター
- ・睡眠覚醒リズム：夜間睡眠脳波記録 (PSG) * により睡眠構築を測定する。定点脳波記録から周波数解析により覚醒度の概日変動を連続モニター
- * PSG：脳波、眼球運動、顎筋電図、心電図、呼吸曲線、前頸骨筋筋電図など複数の指標を就床から起床まで同時に計測することで、睡眠構築を評価する測定法。診療や研究で頻用されている検査法
- ・メラトニン分泌リズム：メラトニン分泌開始時刻 (Dim Light Melatonin Onset: DLM0) を測定した。19 時から翌日 1 時まで低照度条件で唾液を 1 時間おきに 7 ポイント採取した。
- ・エピゲノム解析：全血から抽出した DNA を用いてマイクロアレイシステムによるゲノム全体のメチル化領域を定量した。静脈内持続留置カテーテルにより 1 ポイントあたり 10mL の採血を行った。1 日目 16 時、20 時、2 日目 0 時、4 時、9 時、12 時、16 時、20 時の合計 8 ポイント 80ml の血液を採取した。

若年者群のゲノム全体を調べ、コサイナー法により概日変動を示すメチル化領域 (概日メチル化領域) を同定した。次に、高齢者群において同様の解析を行い、概日変動を示すメチル化領域 (概日メチル化領域) や加齢変化を示す領域 (加齢メチル化領域) を同定した。

4. 研究成果

若年被験者 10 名と高齢被験者 6 名について、本試験で測定した第 1 日目のメラトニン分泌開始時刻 DLM01 と第 2 日目のメラトニン分泌開始時刻 DLM02、ならびに在宅調査で調べた入眠時刻 (SOT)、覚醒時刻 (WT)、総睡眠時間 (TST)、睡眠中点 (Mid)、睡眠の質 (PSQI)、朝型夜型指向性 (MEQ)、休日の睡眠中点 (MSF)、睡眠調整後の休日睡眠中点 (MSFsc)、うつ病尺度 (CES-D)、うつ症状尺度 (SDS) の平均値を表 1 にまとめた。

表 1-全被験者の生体リズム・睡眠・うつ指標

若年者10人	年齢	DLM01	DLM02	SOT	WT	TST	Mid	PSQI	MEQ	MSF	MSFsc	CES-D	SDS
平均値	24.11	22.13	22.00	1.01	8.21	7.20	4.61	4.50	44.30	5.33	5.01	14.90	38.44
標準偏差	2.76	1.05	0.77	0.80	0.97	0.62	0.83	2.01	7.30	1.28	1.26	7.02	5.46
高齢者6人	年齢	DLM01	DLM02	SOT	WT	TST	Mid	PSQI	MEQ	MSF	MSFsc	CES-D	SDS
平均値	66.50	20.97	20.55	-0.44	6.84	7.12	3.09	3.17	58.50	3.44	3.30	8.83	34.67
標準偏差	5.61	1.38	1.26	0.72	1.18	0.70	0.70	2.14	8.83	0.70	0.78	12.42	13.03

Mann-Whitney の U の検定を行った結果、年齢、DLM02、SOT、WT、Mid、MEQ、MSF、MSFsc の値は若年者群と高齢者群で有意な違いが認められた。高齢者は若年者と比べて、入眠時刻、覚醒時刻、睡眠中点が早く、朝型指向性が強い (MEQ スコアが高い)、朝型傾向が強い (MSF と MSFsc スコアが低い) ことが明らかになった。これらの結果は従来の報告と一致している。Spearman の相関法で相関性を調べると、若年者群では DLM01 と SOT (相関係数 0.667)、DLM01 と MSFsc (相関係数 0.717)、DLM01 と CES-D (相関係数 0.795)、SOT と CES-D (相関係数 0.667) の間に有意な相関性が認められた。高齢者群では、DLM01 と PSQI (相関係数 -0.853) が相関していた。SOT と WT と Mid、MEQ と MSF、CES-D と SDS など関連する項目は若年者群ならびに高齢者群ともに強く相関していた。

睡眠・生体リズム機能の加齢変化にエピゲノム制御が関わっているか調べるため概日変動を示すメチル化領域 (概日メチル化領域) の探索を行った。そこで、在宅調査中の睡眠時間帯や総睡眠時間が安定しており、うつ症状のない若年被験者 4 名 (21 歳 ~ 25 歳、平均年齢 23 歳) と高齢被験者 4 名 (61 歳 ~ 72 歳、平均年齢 66.5 歳) を選んだ。エピゲノム解析対象の被験者についても、高齢者は若年者より睡眠時間帯が早く、朝型指向性が強かった。エピゲノム解析を行った被験者の DLM0、睡眠指標、質問紙、自己評価尺度の結果を表 2 に示す。また、PSG 解析によると高齢者 4 名はいずれも深睡眠が少なく中途覚醒が多い高齢者に特徴的な睡眠構造を示した。

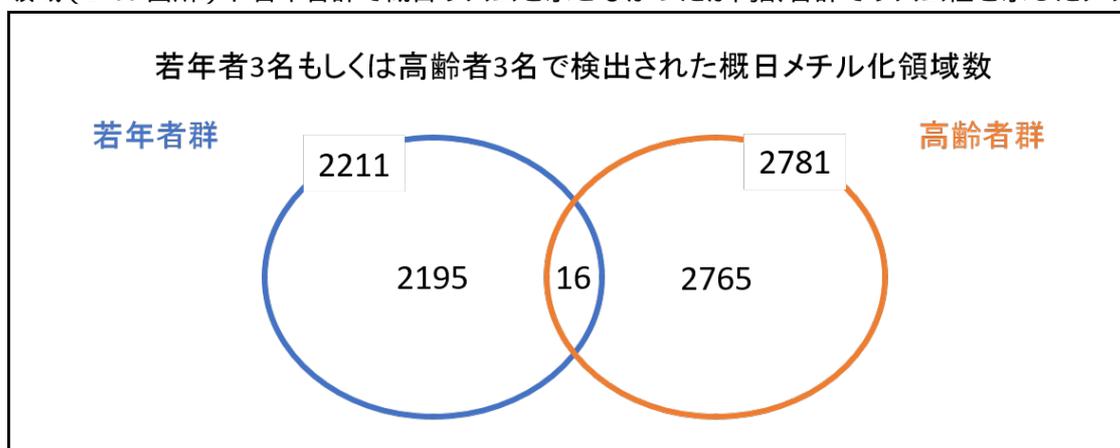
表 2-エピゲノム解析被験者の生体リズム・睡眠・うつ指標

エピゲノム解析対象者から 8 ポイントずつ採取した血液より DNA を抽出し、Infinium

若年者4人	年齢	DLM01	DLM02	SOT	WT	TST	Mid	PSQI	MEQ	MSF	MSFsc	CES-D	SDS
平均値	23.00	21.45	21.51	0.52	7.57	7.05	4.05	4.25	45.00	4.82	4.65	10.00	35.00
標準偏差	1.83	1.22	0.98	0.16	0.95	0.97	0.47	2.50	8.91	1.58	1.75	5.23	5.72
高齢者4人	年齢	DLM01	DLM02	SOT	WT	TST	Mid	PSQI	MEQ	MSF	MSFsc	CES-D	SDS
平均値	66.50	20.79	20.51	-0.67	6.35	7.03	2.83	3.25	62.75	3.05	2.83	3.00	31.75
標準偏差	4.93	1.61	1.47	0.37	0.95	0.74	0.61	2.22	4.99	0.36	0.30	4.08	13.25

MethylationEPIC BeadChip キットを用いてマイクロアレイシステムによるゲノム全体のメチル化タイプピングを行った。若年者群 (21 歳 ~ 25 歳、平均年齢 23 歳) は 866,297 マーカー搭載する BeadChip、高齢者群は 866,895 マーカー搭載する BeadChip を用いた。概日変動を示すメチル化領域 (概日メチル化領域) を同定するため、得られたメチル化量の時系列変化をコサイン法により解析を行った。

若年者 4 人全員にリズム性が認められた領域は 55 箇所、3 人にリズム性が認められた領域は 2156 箇所あり、3 人以上にリズム性が認められた合計 2211 領域は調べた全マーカーの 0.26% であった。一方、高齢者 4 人全員にリズム性が認められた領域は 87 箇所、3 人以上にリズム性が認められた領域は 2695 箇所、3 人以上にリズム性が認められた合計 2781 領域は調べた全マーカーの 0.32% であった。また、若年者と高齢者全員に共通する概日メチル化領域は存在しなかったが、若年者 3 人以上と高齢者 3 人以上に共通してリズム性が認められた領域は 16 箇所存在した。この 16 箇所は加齢変化というよりも概日リズム性の形成・維持に重要なメチル化領域である可能性が高い。また、若年者群で概日リズムを示したが高齢者群でリズム性が失われたメチル化領域 (2195 箇所) や若年者群で概日リズムを示さなかったが高齢者群でリズム性を示したメチル化領域 (2765 箇所) も存在した。



ル化領域(2765箇所)は少なくともその一部は、睡眠・生体リズム機能の加齢変化制御に関わっていると考えられる。

本研究では、生物時計および睡眠恒常性機能の加齢変化の特徴、個体差、それらを規定するエピゲノム制御候補領域を同定した。日本の成人の約30%が不眠症状に、10%が強い眠気に悩み、その割合は加齢とともに増加する。高齢者のQOLを低下させる大きな原因の一つがこれら睡眠問題(睡眠障害)である。不十分な休養は日中の覚醒水準を低下させ、生産的な活動を阻害し、うつ病や生活習慣病の遠因となることも多数の疫学・臨床研究から明らかにされている。本研究の成果は、高齢者の健康長寿にとって必須となる健やかな睡眠習慣および健康生活に資するライフスタイルの確立のための貴重な情報となるものと期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件) すべて査読有

1. Hida A, Kitamura S, Kadotani H, Uchiyama M, Ebisawa T, Inoue Y, Kamei Y, Mishima K. Lack of association between PER3 variable number tandem repeat and circadian rhythm sleep-wake disorders. *Hum Genome Var*. 2018;5:17:10.1038/s41439-41018-40017-41437. eCollection 42018.
2. Tsukada E, Kitamura S, Enomoto M, Moriwaki A, Kamio Y, Asada T, Arai T, Mishima K. Prevalence of childhood obstructive sleep apnea syndrome and its role in daytime sleepiness. *PLoS One*. 2018;13:e0204409. doi: 0204410.0201371/journal.pone.0204409. eCollection 0202018.
3. Okada M, Otaga M, Tsutsui T, Tachimori H, Kitamura S, Higuchi S, Mishima K. Association of sleep with emotional and behavioral problems among abused children and adolescents admitted to residential care facilities in Japan. *PLoS One*. 2018;13:e0198123. doi: 0198110.0191371/journal.pone.0198123. eCollection 0192018.
4. Miyagawa T, Khor SS, Toyoda H, Kanbayashi T, Imanishi A, Sagawa Y, Kotorii N, Kotorii T, Ariyoshi Y, Hashizume Y, Ogi K, Hiejima H, Kamei Y, Hida A, Miyamoto M, Ikegami A, Wada Y, Takami M, Higashiyama Y, Miyake R, Kondo H, Fujimura Y, Tamura Y, Taniyama Y, Omata N, Tanaka Y, Moriya S, Furuya H, Kato M, Kawamura Y, Otowa T, Miyashita A, Kojima H, Saji H, Shimada M, Yamasaki M, Kobayashi T, Misawa R, Shigematsu Y, Kuwano R, Sasaki T, Ishigooka J, Wada Y, Tsuruta K, Chiba S, Tanaka F, Yamada N, Okawa M, Kuroda K, Kume K, Hirata K, Uchimura N, Shimizu T, Inoue Y, Honda Y, Mishima K, Honda M, Tokunaga K. A variant at 9q34.11 is associated with HLA-DQB1 06:02 negative essential hypersomnia. *J Hum Genet*. 2018;28:018-0518.
5. Mishima K. Pathophysiology and strategic treatment of sighted non-24-h sleep-wake rhythm disorders. *Sleep and Biological Rhythms*. 2017;15:11-20.
6. 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. Evaluation of circadian phenotypes utilizing fibroblasts from patients with circadian rhythm sleep disorders. *Transl Psychiatry*. 2017;7:e1106. doi: 1110.1038/tp.2017.1175.

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：

番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：肥田昌子

ローマ字氏名：Hida Akiko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。