

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2023

課題番号：18K07580

研究課題名(和文)概日リズム睡眠覚醒障害の遺伝的要因とその発症分子メカニズム

研究課題名(英文) Genetic factors and molecular mechanisms in the development of circadian rhythm sleep-wake disorders

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 睡眠・覚醒障害研究部・客員研究員

研究者番号：20333354

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：非24時間睡眠-覚醒リズム障害の発症に寄与する潜在的な遺伝的要因を明らかにするため、視力障害を伴わない日本人非24時間睡眠-覚醒リズム障害患者17例を対象に、次世代シーケンサーを用いて概日リズムや睡眠に関連する76遺伝子の塩基配列を決定した。さらに、17例を含む64例のN24SWDのCLOCK遺伝子とNR1D2遺伝子について配列解析を行った結果、CLOCK遺伝子に新規バリエーション1つと既知バリエーション4つ、NR1D2遺伝子に新規バリエーション1つと既知バリエーション8つ同定され、NR1D2遺伝子に新規バリエーションを有する症例では新規のPER1ミスセンスバリエーションも検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

概日リズム睡眠-覚醒障害は、定まった時刻に寝起きすることができず、通常の世界生活へ適応することが困難となる睡眠障害である。概日リズム睡眠-覚醒障害の発症には内因性の生物時計周期の延長や光同調機能不全が関わっているとされているが、その分子機序は未だ明らかにされていない。本研究では、概日リズム睡眠-覚醒障害のサブタイプである非24時間睡眠-覚醒リズム障害に関わる潜在的な遺伝的要因が特定され、概日リズム睡眠-覚醒障害発症機序の解明、ヒトにおける概日リズムと睡眠調節分子機序の解明に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：To identify potential genetic factors contributing to the development of non-24-hour sleep-wake disorder (N24SWD), a subtype of circadian rhythm sleep-wake disorder, targeted sequencing of 76 genes was performed using next-generation sequencing in 17 sighted Japanese individuals with N24SWD. Sanger sequencing of the CLOCK and NR1D2 coding regions was then performed in a total of 64 sighted Japanese individuals with N24SWD, including the 17 N24SWD individuals. One novel and four known CLOCK variants and one novel and eight known NR1D2 variants were identified in our study population of 64 N24SWD individuals. In addition, the novel PER1 variant was found in the N24SWD individual carrying the novel NR1D2 variant.

研究分野：時間生物学、睡眠科学

キーワード：睡眠障害 概日リズム 遺伝子

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

概日リズム睡眠-覚醒障害の遺伝要因は、家族性前進型睡眠-覚醒障害において分子遺伝学的手法により原因遺伝子がいくつか同定されているが、家族例は非常に稀である。患者の大部分を占める孤発例に対しては DNA 多型関連解析研究が行われ、疾患に関連するバリエントがいくつか同定されているが、原因遺伝子の特定ならびに発症機序の解明には至っていない。一般日本人集団における概日リズム睡眠-覚醒障害の発症率はすべてのサブタイプを合わせても 0.13%といわれており、ゲノムワイドアプローチによる DNA 多型関連解析を行うために十分なサンプル数を集めることは難しかった。そこで、概日リズム睡眠-覚醒障害の遺伝要因を同定するためにはエクソーム解析のような探索型的手法がより望ましいと考えられた。

### 2. 研究の目的

概日リズム睡眠-覚醒障害患者の DNA サンプルを用いてエクソーム解析を行い、その疾患発症に関連する遺伝要因を探索・同定する。

### 3. 研究の方法

概日リズム睡眠-覚醒障害のサブタイプのひとつである非 24 時間睡眠-覚醒障害患者 64 例 (男性 45 例、女性 19 例、平均±SD 年齢: 27.7±9.61 歳) を対象とした。対象者は全員血縁関係がなく、視力障害を伴わない日本人であり、International Classification of Sleep Disorders 2nd edition に基づいて、訓練を受けた精神科医により診断された。本研究は国立精神・神経医療研究センター倫理委員会の承認を受けてヘルシンキ宣言に従って実施され、各対象者から書面による同意を得た。

対象者の血液サンプルから DNA サンプルが抽出され、次世代シーケンサーを用いて非 24 時間睡眠-覚醒障害患者 17 例 (男性 11 例、女性 6 例、平均年齢±標準偏差: 32.82±10.05 歳) を対象に、概日リズムと睡眠に関連する 76 遺伝子 (表 1) のターゲットシーケンスが実施された。リファレンス配列は University of California Santa Cruz assembly GRCh37/hg19 が使用された。ミスセンスバリエントがタンパク質の機能に与える影響は Polyphen-2 と PROVEAN で評価された。

### 4. 研究成果

本研究では、非 24 時間睡眠-覚醒障害患者 17 例を対象に 76 遺伝子のターゲットシーケンスを行い、合計 94 のバリエントが検出された。APOE、CLOCK、NR1D2、PER1 の各遺伝子で、それぞれ新規のミスセンスバリエントが検出された。これら 4 つのバリエントは公開データベースである Genome Aggregation Database、1000Genomes、Human Genetic Variation Database 及び日本人全ゲノム参照パネル 8.3KJPN で評価された。APOE と CLOCK のバリエント (それぞれ rs1969838696 と rs1723064872 と指定されている) は 8.3KJPN で稀なバリエントとして観察され (対立遺伝子頻度=0.00012)、NR1D2 と PER1 のバリエントはどのデータベースにも報告されていなかった。これまでの動物モデルを用いた研究から、Clock 遺伝子と REV-ERBβ 遺伝子 (NR1D2) は概日リズムと睡眠覚醒リズムを調節するメカニズムに関与していることが示唆されている。一方、APOE 欠損マウスや Per1 ノックアウトマウスでは、野生型マウスと同等の強力な行動リズムが観察される。そのため、概日時計システムにおいて複数の時計遺伝子を制御する負の転写フィードバックループの中核的要素として考えられている CLOCK 遺伝子と NR1D2 遺伝子に着目し、17 例を含む計 64 例の非 24 時間睡眠-覚醒障害患者に対しての CLOCK および NR1D2 のコーディング領域についてサンガーシーケンシングが行われた。

非 24 時間睡眠-覚醒障害患者 64 例からなる対象集団において、1 つの新規バリエントと 4 つの既知バリエントが CLOCK 遺伝子で同定された。さらに、非 24 時間睡眠-覚醒障害 47 例のうち 1 例において、エクソン 18 の新規バリエントが同定された (NM\_004898.3: c.1488C>G: p.Q[Gln]496H[His]) (図 1A)。アミノ酸の Q と H は等電点で異なり、Q496H 置換は Polyphen-2 によっておそらく有害 (0.887) と予測され、PROVEAN によって有害 (-2.854) と予測された。Q496H 置換は、NAD<sup>+</sup> 依存性ヒストン脱アセチル化酵素である SIRT1 と結合する可能性の

表 1 概日リズムと睡眠に関連する76遺伝子

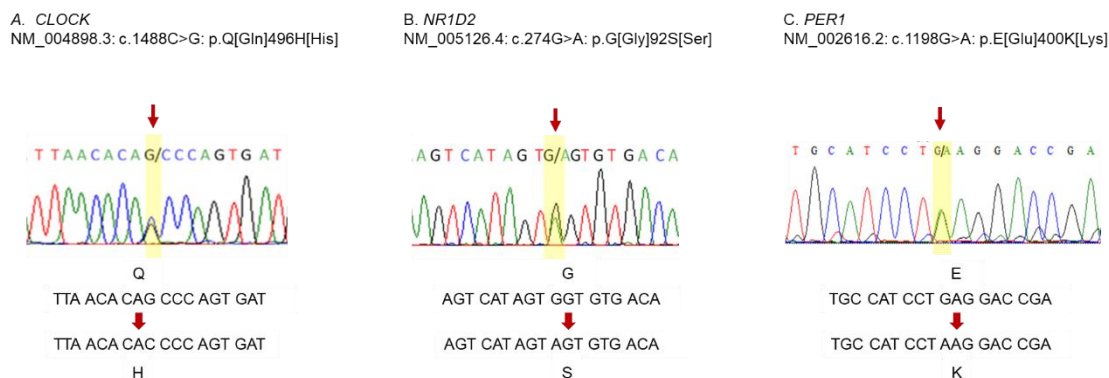
Chromosome	Gene
chr17	AANAT
chr19	APOE
chr11	ARNTL
chr12	ARNTL2
chrX	ASMT
chr20	AVP
chr12	AVPR1A
chr1	AVPR1B
chrX	AVPR2
chr11	BDNF
chr3	BHLHE40
chr12	BHLHE41
chr4	CLOCK
chr12	CRY1
chr11	CRY2
chr17	CSNK1D
chr22	CSNK1E
chr3	GSK3B
chr17	HORT
chr6	HORTR2
chr6	HLA-A
chr6	HLA-B
chr6	HLA-C
chr6	HLA-DMA
chr6	HLA-DMB
chr6	HLA-DOA
chr6	HLA-DOB
chr6	HLA-DPA1
chr6	HLA-DPB1
chr6	HLA-DPB2
chr6	HLA-DQA1
chr6	HLA-DQA2
chr6	HLA-DQB1
chr6	HLA-DQB2
chr6	HLA-DRA
chr6	HLA-DRB1
chr6	HLA-DRB5
chr6	HLA-DRB6
chr6	HLA-E
chr6	HLA-F
chr6	HLA-FAS1
chr6	HLA-G
chr6	HLA-H
chr6	HLA-L
chr5	HTR1A
chr13	HTR2A
chrX	HTR2C
chr11	HTR3A
chr11	HTR3B
chr3	HTR3C
chr3	HTR3D
chr3	HTR3E
chr5	HTR4
chr7	HTR5A
chr2	HTR5B
chr1	HTR6
chr10	HTR7
chr7	IL6
chr4	MTNR1A
chr11	MTNR1B
chr2	NPAS2
chr17	NR1D1
chr3	NR1D2
chr10	OR4H
chr17	PER1
chr2	PER2
chr1	PER3
chr22	PPARA
chr15	RORA
chr9	RORB
chr12	TIMELESS
chr6	TNF
chr6	VIP
chr3	VIPR1
chr7	VIPR2

あるドメインで起こる。SIRT1はCLOCK:BMAL1クロマチン複合体にリクルートされ、CLOCKのヒストンアセチル基転移酵素機能を調節することで標的遺伝子の転写を制御する。Q496H置換により、CLOCKとSIRT1の結合相互作用が変化し、クロマチンリモデリングが阻害される可能性がある。また、エクソン22の既知のバリエーション(rs1723064872)は、グルタミン酸へのアミノ酸置換(NM\_004898.3: c.2278C>G: p.Q[Gln]760E[Glu])を引き起こす。アミノ酸QとEは等電点において異なるが、Q760E置換はPolyphen-2によって良性(0.033)と予測され、PROVEANによって中立(-1.289)と予測された。Q760E置換はC末端ドメインのポリQ領域にある。Q-richモチーフは転写因子の活性化ドメインの特徴として知られている。さらに、Clock変異マウスは野生型マウスよりも行動リズムの周期が長い。Clock変異マウスが持つ遺伝子変異はエクソンスキップを引き起こし、CLOCK転写活性化ドメイン内の51アミノ酸が欠失する。注目すべきことに、CLOCKの機能的ドメインにおけるミスセンスバリエーションが2人の非24時間睡眠-覚醒障害で同定された。これらのCLOCKミスセンスバリエーションは非24時間睡眠-覚醒障害の表現型に寄与している可能性がある。

非24時間睡眠-覚醒障害患者64例からなる対象集団において、1つの新規バリエーションと8つの既知バリエーションがNR1D2遺伝子で同定された。エクソン2の新規バリエーションは、グリシンからセリンへのアミノ酸置換を引き起こす(NM\_005126.4: c.274G>A: p.G[Gly]92S[Ser]) (図1B)。アミノ酸のGとSは極性が異なるが、G92S置換はPolyphen-2によって無害(0.011)と予測され、PROVEANによって中立(-1.094)と予測された。エクソン5の既知のバリエーション(rs139583758)は、グルタミンをヒスチジンに置換するアミノ酸置換を引き起こす(NM\_005126.4: c.696A>C: p.Q[Gln]232H[His])。アミノ酸のQとHは等電点において異なり、Q232H置換はPolyphen-2によって有害である可能性(0.925)があると予測され、PROVEANによって有害(-2.518)であると予測された。エクソン7の別の既知のバリエーション(rs78292562)は、アラニンからスレオニンへのアミノ酸置換を引き起こす(NM\_005126.4: c.1351G>A: p.A[Ala]451T[Thr])。アミノ酸AとTは極性が異なる。さらに、A451T置換はPolyphen-2によっておそらく有害(0.995)と予測され、PROVEANによって有害(-3.157)と予測された。A451T置換はNR1D2の潜在的リガンド結合ドメインで起こる。ヘムはリガンド結合ドメインに結合し、NR1D2がコアプレッサーをリクルートし、標的遺伝子の転写を抑制する能力を調節する。NR1D1 (REV-ERB $\alpha$ )とNR1D2 (REV-ERB $\beta$ )は、マウスの睡眠構造と情動行動を制御する。REV-ERBアゴニストは覚醒を誘発し、急速眼球運動と徐波睡眠を減少させる。興味深いことに、REV-ERB $\beta$ 欠損マウスを用いた薬理学的研究では、REV-ERB $\beta$ が活動期間中の覚醒状態の維持を調節していることが示されている。これらのNR1D2ミスセンスバリエーションはNR1D2の機能に変化をもたらす、睡眠調節障害を引き起こす可能性がある。また、エクソン2にNR1D2の新規バリエーションを持つ非24時間睡眠-覚醒障害患者において、PER1の新規バリエーションが発見された。このPER1バリエーション(NM\_002616.2: c.1198G>A: p.E[Glu]400K[Lys])はサンガーシーケンシングにより確認された(図1C)。

これらのバリエーションが非24時間睡眠-覚醒障害の発症に寄与していることを証明するには、さらなる解析が求められるが、本研究は非24時間睡眠-覚醒障害の表現型に関連する新たな遺伝的要因の存在を明らかにした。

図1 非24時間睡眠-覚醒障害患者で検出された時計遺伝子CLOCK (A)、NR1D2 (B)、PER1 (C)の新規ミスセンスバリエーション



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hida A, Iida A, Ukai M, Kadotani H, Uchiyama M, Ebisawa T, Inoue Y, Kitamura S, Mishima K.	4. 巻 46
2. 論文標題 Novel CLOCK and NR1D2 variants in 64 sighted Japanese individuals with non-24-hour sleep-wake rhythm disorder	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Sleep	6. 最初と最後の頁 zsad063
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/sleep/zsad063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hida A, Kitamura S, Kadotani H, Uchiyama M, Ebisawa T, Inoue Y, Kamei Y, Mishima K	4. 巻 5
2. 論文標題 Lack of association between PER3 variable number tandem repeat and circadian rhythm sleep-wake disorders	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Genome Variation	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41439-018-0017-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 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, et al.	4. 巻 63
2. 論文標題 A variant at 9q34.11 is associated with HLA-DQB1*06:02&nbsp;negative essential hypersomnia	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Hum Genet	6. 最初と最後の頁 1259,1267
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s10038-018-0518-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 肥田昌子	4. 巻 36
2. 論文標題 概日リズムを末梢で計測する	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 CLINICAL NEUROSCIENCE	6. 最初と最後の頁 1107,1108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鶴飼基生、肥田昌子、北村真吾、井上雄一、三島和夫
2. 発表標題 家族性概日リズム睡眠-覚醒相前進障害の新規遺伝要因
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 肥田昌子、鶴飼基生、北村真吾、綾部直子、加藤美恵、亀井雄一、三島和夫
2. 発表標題 76遺伝子を対象とした非24時間睡眠-覚醒リズム障害遺伝要因の探索
3. 学会等名 日本睡眠学会第43回定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鶴飼基生、肥田昌子、北村真吾、加藤美恵、井上雄一、三島和夫
2. 発表標題 家族性概日リズム睡眠-覚醒相前進障害に関わる遺伝要因の探索
3. 学会等名 日本睡眠学会第43回定期学術集会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------