

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791330

研究課題名(和文) 時計遺伝子を用いた、せん妄及び不眠症の病態発現における生物学的基盤の解明

研究課題名(英文) The elucidation of the biological base in delirium and insomnia using clock genes

研究代表者

足立 浩祥 (ADACHI, HIROYOSHI)

大阪大学・保健センター・准教授

研究者番号：00303785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：せん妄発症予測のバイオマーカーにつなげるため、ヒトの時計遺伝子発現量測定による睡眠障害モデルのバイオマーカー探索を行うことを目的とした。この結果、代表的な時計遺伝子において、その遺伝子発現量が大きく変動するもの、変動幅が小さいものなどその特徴がそれぞれ見られ、今後本研究の臨床応用をさらに進めることにより正常睡眠・覚醒リズムの発生メカニズム及び時計遺伝子を主とするその構成要素の破綻モデルからせん妄の病態発現に迫ることができるものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：For detecting the biological markers of delirium, we have performed the search of biological marker of sleep disturbance model by using the measurement of human clock gene expression. The results indicate that each typical human clock gene has shown different type of fluctuation, and has had specific features respectively. In future study, clinical application will be important for approaching the elucidation of pathophysiological system of delirium and sleep disturbance.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・精神神経科学

キーワード：睡眠障害 不眠 睡眠覚醒リズム

## 1. 研究開始当初の背景

正常睡眠の発現に関しては「Two-Process Model」が提唱されており、主として概日リズムの影響をもたらすプロセスC[覚醒しにくい時間帯(夜間)としやすい時間帯(昼間)を規定]と、体内環境の恒常性(ホメオスタシス)を保つためのプロセスS[起きている時間が長くなるにつれ睡眠欲求が高まる]の2つの要素が作用していることが明らかとなっている。この説においては、睡眠物質は主としてプロセスSとして作用することになる。また、生体時計によりプロセスCが作り出され、プロセスCとプロセスSとの距離が最大化した時に、最も入眠しやすいタイミングが作り出されると考えられている。

このように睡眠・覚醒状態は、複雑な機構によりそのシステムが形成されているが、大きく恒常性維持機構と生体リズムにより調節されていることがこれまでの研究から解明されている。睡眠・覚醒状態が適切でなくなると、夜間においては不眠症状が認められるようになる。上記の生体リズムの機構を維持するためには、適切な時計遺伝子の発現がなされ、リズムの調節が日々行われている。一方、せん妄患者ではしばしば昼夜逆転がみられ、不眠症状や睡眠覚醒リズムの乱れが認められ、概日リズム(プロセスC)を主とした Two-Process Model の破綻が起こっていると推定される。しかし、実臨床において生物学的指標に基づいた病態解明は全く行われていない。せん妄は、老年期や緩和ケアを中心としてリエゾン精神医学の領域において非常に高頻度に認められる症状である。これらの症状に対しては、従来ベンゾジアゼピン系の睡眠導入剤、抗精神病薬、抗不安薬、抗うつ薬などが治療介入の方法として用いられてきた。一方、その診断についてはあくまでも患者の主訴や観察された状態像を元に臨床現場の経験に基づいてなされ、その症状形成の生物学的基盤を考慮した診断・治療はなされていない。特に、認知症におけるせん妄や睡眠障害は、BPSDとして患者本人のみならず介護者にも多大な負担をかけ、その経過に悪影響を及ぼす症状であるが、その生物学的基盤も考慮した評価・介入を行うことは現時点では行われていない。

これまで我々は、「慢性不眠症状、概日リズム」のより基礎的な形成要因に着目し、その自律神経機能の与える影響等について研究を進めてきた。この自律神経機能の日内変動も、最終的には生体時計という振動体によって影響を受け形成されるものであり、その根本には睡眠構成要素の破綻が生じていることが予想される。

近年、これまでに、哺乳類を含む動物、昆虫、植物においては時計遺伝子の発現機構が次々と解明されつつあり、ヒトにおいてもより複雑ではあるが同様の機構が働いていることが報告されている。しかし、その臨床応用については確立された方法は得られてお

らず、その手法は探索過程の状況であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、上記の背景およびこれまでの研究成果をもとに、せん妄発症予測のバイオマーカーにつなげるため、健常者(不眠症状を有さない者)の時計遺伝子発現量が同一時刻においてどの程度の発現量の範囲に保たれるのか変動幅を探索的に検討すること、また、不眠症状の典型的なモデルとして時差移動における時計遺伝子発現量が、その移動によりどの程度変化をきたしうるのか検討を行うことを主な目標とし、ヒトの時計遺伝子発現量測定による睡眠障害モデルのバイオマーカー探索を行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 対象はボランティアの参加を募り、本研究に文書による同意の得られた者のうち、健常群(自覚的な不眠症状を有さず(治療中でも可:生活習慣病等を含むなんらかの身体疾患による加療中でも除外しない)、ピッツバーグ睡眠質問票日本語版で6点未満の者)、時差移動群(自覚的な不眠症状を有さず(治療中でも可:生活習慣病等を含むなんらかの身体疾患による加療中でも除外しない)ピッツバーグ睡眠質問票日本語版で6点未満、±3時間以上の時差を有する地域に移動し、移動先において3日以上30日以内の滞在を行う者)に該当する者とした。両群とも、初回試料採取前1週間の起床時刻が午前5時30分から午前8時30分の範囲にある者のみを対象者とした。

(2) 健常群においては、初回評価時午前9時に10ccの採血を行い、7日後(就寝起床時刻がそれぞれ±30分以上変動しない任意の7日間を選択する)の午前9時に再度10ccの採血を行った。時差移動群においては、出国前日(初回評価)午前9時に10ccの採血を行い、帰国翌日午前9時に再度10ccの採血を行った。また両群とも、初回試料採取前1週間と2度目の試料採取前1週間(1週間未満の場合はその期間)に睡眠覚醒リズム表の記入を行った。

(3) 採取した血液から時計遺伝子発現量測定のため全RNAを抽出した。リアルタイムPCRでは、標準遺伝子としてACTB(beta-actin)を用い、目的遺伝子としてはPeriod1(PER1)、Period3(PER3)、Rev-erbd(NR1D1)を選択し解析を行った。健常群では、2回の評価において、時計遺伝子発現量の変動幅がどの程度認められるのか検討を行った。時差移動群では、時差移動に伴い時計遺伝子発現量がどの程度変動しうるのかを検討した。

## 4. 研究成果

(1) まず、実臨床においてヒトの時計遺伝子発現量をどのように測定することが、将来的に臨床応用につながるのか、また、本研究の主なターゲットである時計遺伝子の測定

を安定して行う手法について検討と実践を行った。時計遺伝子を抽出する生体試料としては、毛髪(毛母細胞)、血液、口腔粘膜が主に検討されたが、その確実性と実際上の侵襲性の問題から、血液中の単球からの抽出が最も現時点で妥当であろうと考えられた。実際の測定においては、NANO DROP における3検体の濃度測定結果は Concentration および 260/280 でそれぞれ、24.1 (2.23)、139.5 (2.07)、35.3 (2.05) との結果であり、260/280 比はおおむね「2」前後が得られていた。また、バイオアナライザーを用いた5検体の電気泳動結果では、RIN 値がそれぞれ 9.30、7.20、9.40、8.60、9.00 との結果であり、全検体いずれも RIN 値が「7」以上の値が得られた。

(2)

採取された各血液サンプルについて、標準遺伝子の Qty(SDM)の平均値(Qty Avg.(SDM))を指標に目的遺伝子の Qty(SDM)の平均値(Qty Avg.(SDM))を標準化することにより、各サンプル中の目的遺伝子の相対定量値(Rel.Qty(SDM))を算出した。その結果、ACTVは標準遺伝子のため Rel.Qty(SDM)はすべてのサンプルで1.00E+00であった。

同一被験者において同時刻に反復測定を行った場合 Rel.Qty(SDM)は、PER1では Pre (1.40E+00~7.54E-01)、Post (1.20E+00~6.90E-01)と対象者間での大きな相違がみられた。ただし、低値の者は反復測定でも低値であり、高値の者は反復測定でも高値である傾向を認めた。PER3も PER1と類似した結果であり、Pre (1.36E+00~7.75E-01)、Post (1.12E+00~9.00E-01)と対象者間での大きな相違がみられたが、低値の者は反復測定でも低値であり、高値の者は反復測定でも高値である傾向を認めた。一方、NR1D1では同時刻の反復測定において、同一被験者内で Rel.Qty(SDM)の値は大きな相違を示した。

同一被験者における時差症候群においては、同時刻に測定した場合、PER1では Pre、Post、Recover の状態で、Pre から Post で変動がみられた後、Recover 時点では Pre の値に近い状態にまた戻る傾向が強く、ヒトの体内リズムの変動を強く反映しやすいものと考えられた。PER3では、Pre、Post、Recover の状態で Rel.Qty(SDM)は、ほぼ類似した値を示し、時差異動に伴う変化は小さいものであった。また、NR1D1では、同一被験者の同時刻反復測定の結果と同じく、同一被験者内で値が一定せず、体内リズムの動きと連動しているとは考えにくい結果であった。

せん妄ではその発症前に90%以上の割合で睡眠・覚醒リズム障害及び不眠症状を示していることに着目し、本研究の臨床応用を行うことにより正常睡眠・覚醒リズムの発生メカニズム及び時計遺伝子を主とするその構成要素の破綻モデルからせん妄の病態発現に迫ることができるものと考えられる。本研究結果を応用することにより、現在は不眠、

せん妄に対し予測因子もなく観察による症状評価のみに頼っている臨床現場において、不眠症状の重症度評価やせん妄を早期発見・発症予測するバイオロジカルマーカーを同定することにつながり、新しい診断方法や予防介入、治療評価への臨床応用に展開されることが可能になるものと考えられる。

#### 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7件)

Comparison of the utility of the everyday memory test and the Alzheimer's Disease Assessment Scale-Cognitive part (ADAS-Cog) for evaluation of mild cognitive impairment (MCI) and very mild Alzheimer's disease (AD). Adachi H, Shinagawa S, Komori K, Toyota Y, Mori T, Matsumoto T, Sonobe N, Kashibayashi T, Ishikawa T, Fukuhara R, Ikeda M. Psychiatry Clin Neurosci 67(3);148-153, 2013 (査読有)  
DOI: 10.1111/pcn.12034.

神経領域の生理機能検査の現状と新たな展開 - 睡眠時の神経生理検査. 足立浩祥、野々上茂. 臨床検査 57(10);1091-1096, 2013 (査読無)

REM 睡眠に伴う睡眠時随伴症 - 認知症の睡眠障害の最新知見. 足立浩祥、杉田義郎. 睡眠医療 7(3);311-317, 2013 (査読無)

不眠症 問診と質問票. 足立浩祥. CLINICIAN 59(2);169-175, 2012 (査読無)

Sleep Debt Must be Paid Off: Relationship Between Sleep Loss and Mental Health Among Japanese Workers. Mikami A, Matsushita M, Watanabe T, Sugiyama E, Adachi H, Matsuura R, Sugita Y, Takeda M. The Open Sleep Journal 5;25-32, 2012 (査読有)

NREM 期の睡眠時随伴症. 足立浩祥、杉田義郎. 睡眠医療 5(2);135-139, 2011 (査読無)

睡眠呼吸障害と精神症状. 松下正輝、足立浩祥. 総合臨床 60(8);1676-1681, 2011 (査読無)

[学会発表](計5件)

大学新入生における Presenteeism 尺度が悪い者に夜型生活を自覚する者が多くなる. 菅沼仲盛、壁下康信、足立浩祥、松下正輝、野々上茂、重土好古、三上章良、杉田義郎、第5回日本臨床睡眠医学会(神戸ファッションマート、神戸市)8/2-4(発表日8月3

日),2013

地域住民に対する健康増進活動における睡眠教育の睡眠および生活の質に与える効果の検討. 足立浩祥、松下正輝、三上章良、菅沼仲盛、壁下康信、重土好古、野々上茂、杉田義郎、第 38 回日本睡眠学会(秋田市にぎわい交流館あう、秋田市)6/27-28(発表日6月27日),2013

末梢脈波振幅低下と呼吸関連覚醒反応の関連について. 壁下康信、菅沼仲盛、野々上茂、重土好古、足立浩祥、三上章良、杉田義郎、第 38 回日本睡眠学会(秋田市にぎわい交流館あう、秋田市)6/27-28(発表日6月27日),2013

睡眠負債は返済しなければならない:日本の労働者における睡眠不全と精神健康との関連性. 三上章良、松下正輝、渡邊琢也、杉山恵美子、壁下康信、足立浩祥、杉田義郎、第 38 回日本睡眠学会(秋田市にぎわい交流館あう、秋田市)6/27-28(発表日6月28日),2013

地域における認知症患者の高齢介護者の実態について. 園部直美、松本光央、清水秀明、豊田泰孝、森崇明、品川俊一郎、足立浩祥、石川智久、福原竜治、谷向知、池田学、上野修一、28回日本老年精神医学会(大阪国際会議場、大阪)6/5-6(発表日6月5日),2013

〔図書〕(計 2 件)

睡眠時随伴症とは. 脳とこころのプライマリケア 5.意識と睡眠, 千葉茂編集, シナジー, 713-716, 2012  
足立浩祥、杉田義郎

高齢者の睡眠障害 睡眠時無呼吸症候群. 日常診療で出会う高齢者精神障害のみかた, 松下正明監修, 栗田主一編著, 中外医学社, 29-35, 2011  
足立浩祥

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等  
該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

足立 浩祥(ADACHI, Hiroyoshi)  
大阪大学・保健センター・准教授  
研究者番号: 00303785

### (2)研究分担者

なし

(3)連携研究者  
なし