

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24621015

研究課題名(和文) 睡眠障害における生体リズム異常の分子メカニズム

研究課題名(英文) Molecular mechanism underlying disturbed circadian rhythms in sleep disorder

## 研究代表者

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・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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの皮膚切片から培養した細胞内で時計遺伝子の発現リズム(体内時計リズム)を測定し、体内時計リズムの周期がクロノタイプ(朝型夜型)や休日の睡眠習慣(入眠覚醒時刻)と関連した。体内時計リズム周期の長さは個人の生物時計機能を反映している可能性がある。そこで、概日リズム睡眠障害患者を対象として体内時計リズムを測定したところ、概日リズム睡眠障害の一つのサブタイプ患者群では健常者群と変わらないリズム周期長を示したが、異なるサブタイプの患者群では有意に長い周期を示すことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Circadian clocks regulate daily behavioral and physiological rhythms. These rhythms are generated by a self-sustained clock system. The circadian clock system involves transcription-translation negative feedback loops of multiple clock genes. Circadian rhythm sleep disorders (CRSDs) are defined by persistent or recurrent disturbed sleep-wake cycles and are thought to result from the impairment of the circadian clock system. Clock gene expression was measured in fibroblasts derived from healthy subjects and rhythmic expression was observed in the cells (in vitro rhythm). The period length of in vitro rhythm was correlated with diurnal preference and preferred sleep timing. Evaluating in vitro rhythm may therefore be an appropriate method to assess an individual's circadian clock phenotype. In vitro rhythms were measured in fibroblasts derived from patients with CRSDs and the circadian characteristics of in vitro rhythms were compared to the phenotypes of the patients.

研究分野：時間生物学

キーワード：生物時計 睡眠 生体リズム

## 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, *Per*2, *Per*3, *Cry* (*Cryptochrome*) 1, *Cry*2 やレチノイン酸関連核内受容体 *Rora*、*Rev-Erb*  $\alpha$  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 $\alpha$  と REV-ERB $\alpha$  は、*Bmal1* プロモーター上に存在する RORE 配列に結合し、ROR $\alpha$  は *Bmal1* の転写を活性化し REV-ERB $\alpha$  は *Bmal1* の転写を抑制することが知られている<sup>1)</sup>。

概日リズム睡眠障害では、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>$\Delta$ 19/ $\Delta$ 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<sup>2,3)</sup>。

## 2. 研究の目的

概日リズム睡眠障害は睡眠覚醒リズム異常を主徴とし、うつ状態など気分障害を高頻度に併発する。本研究は、概日リズム睡眠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システムを利用して、概日リズム睡眠障害に特徴的な生物時計の障害特性を決定する。さらに、同システムを用いて生物時計と気分調節の両システムの関わり合いならびに両システムに介在するシグナル系の存在を明らかにする。

## 3. 研究の方法

研究対象者：

International Classification of Sleep Disorders (ICSD) 2<sup>nd</sup> edition に準じて概日リズム睡眠障害と診断された患者 (睡眠相後退型、睡眠相前進型、フリーラン型、不規則型睡眠覚醒) および対照者として健常成人。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。

被験者のスクリーニングのため、睡眠覚醒パターンや気分、日周指向性の定量評価を行う。

- i) 睡眠覚醒：自記式の睡眠日誌の記録とアクチグラフの活動量記録計による連続記録を行う。主観的評価として Pittsburg Sleep Quality Index (PSQI) 日本語版を施行する。
- ii) 日周指向性：Horne-Oestberg questionnaire (MEQ) および Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ) 日本語版を施行し、朝型夜型などの日周指向

性を調べる。

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する。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る。その後、37°C 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リアルタイムに測定する。得られた発光リズム（末梢時計リズム）データの解析を行い、各被験者の概日リズム特性（周期・位相・振幅）を決定する。患者と健常者の概日リポーター遺伝子発現リズム特性（周期・位相・振幅）を比較・検証を行い、患者の障害特性を明らかにする。

#### 4. 研究成果

標準型生活被験者と夜型生活被験者に対して末梢時計リズム（図 1）を測定した。*Bmal1-luc* 発現リズム周期を調べると、標準型被験者に比べて夜型被験者はより長い周期を示すことが明らかとなった。さらに、*Bmal1-luc* 発現リズム周期の長さは、クロノタイプ（朝型夜型）（図 2）をあらわす指標ならびに休日の睡眠中点（入眠覚醒時刻の中間点）（図 3）と有意に相関した。以上の結果から、末梢時計リズム周期の長さは個人の生物時計機能を反映していると考えられる。そこで、概日リズム睡眠障害患者を対象として末梢時計リズム測定による個人の生物時計機能の評価を試みた。

睡眠相後退型患者群では標準型被験者群と変わらない末梢時計リズム周期長を示したが、フリーラン型患者群では有意に長い周期を示すことが明らかとなった。このことから、フリーラン型の病態には確かに生物時計周期の延長が関わっていると考えられる。しかしな

がら、他の生物時計機能障害が影響している可能性も否定できない。

図 1 末梢時計リズム

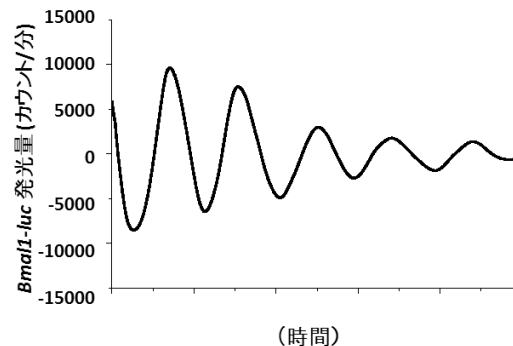
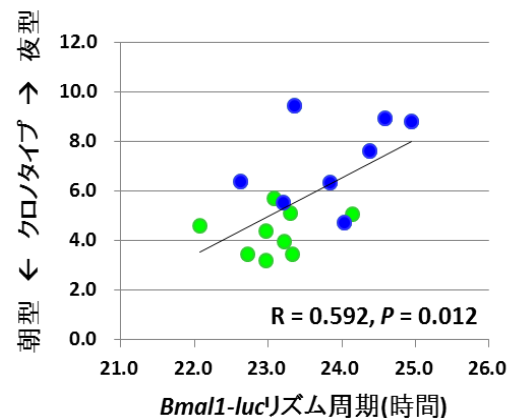
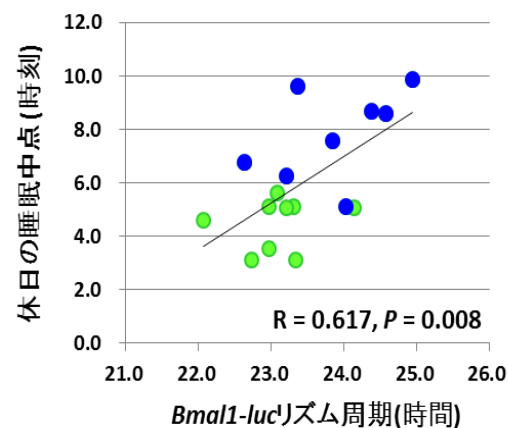


図 2 クロノタイプとの相関



● 標準型  
● 夜型

図 3 睡眠中点との相関



● 標準型  
● 夜型

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 5 件) 査読有

1. Hida, A., Kitamura, S., Katayose, Y., Kato, M., Ono, H., Kadotani, H., Uchiyama, M., Ebisawa, T., Inoue, Y., Kamei, Y., Okawa, M., Takahashi, K. & Mishima, K. Screening of Clock Gene Polymorphisms Demonstrates Association of a PER3 Polymorphism with Morningness-Eveningness Preference and Circadian Rhythm Sleep Disorder. *Sci Rep* 4, 6309 (2014). DOI:10.1038/srep06309
2. Kitamura, S., Hida, A., Aritake, S., Higuchi, S., Enomoto, M., Kato, M., Vetter, C., Roenneberg, T. & Mishima, K. Validity of the Japanese version of the Munich ChronoType Questionnaire. *Chronobiol Int* 31, 845-850 (2014). DOI:10.3109/07420528.2014.914035
3. Hida, A., Kitamura, S., Ohsawa, Y., Enomoto, M., Katayose, Y., Motomura, Y., Moriguchi, Y., Nozaki, K., Watanabe, M., Aritake, S., Higuchi, S., Kato, M., Kamei, Y., Yamazaki, S., Goto, Y., Ikeda, M. & Mishima, K. In vitro circadian period is associated with circadian/sleep preference. *Sci Rep* 3, 2074 (2013). DOI:10.1038/srep02074
4. Watanabe, M., Hida, A., Kitamura, S., Enomoto, M., Ohsawa, Y., Katayose, Y., Nozaki, K., Moriguchi, Y., Aritake, S., Higuchi, S., Tamura, M., Kato, M. & Mishima, K. Rhythmic expression of circadian clock genes in human leukocytes and beard hair follicle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 425, 902-907 (2012). DOI:10.1016/j.bbrc.2012.08.008

5. Hida, A., Kitamura, S., Enomoto, M., Nozaki, K., Moriguchi, Y., Echizenya, M., Kusanagi, H. & Mishima, K. Individual traits and environmental factors influencing sleep timing: a study of 225 Japanese couples. *Chronobiol Int* 29, 220-226 (2012). DOI:10.3109/07420528

[学会発表] (計 13 件)

1. Hida A. Potential pathogenesis of circadian rhythm sleep disorders. Asian Sleep Research Society 2014. GV Raja Convention Center, Kerala, India. (2014. 9. 22-24.)
2. 肥田昌子, 北村真吾, 中崎恭子, 元村祐貴, 綾部直子, 加藤美恵, 小野浩子, 松井健太郎, 小林美奈, 碓氷章, 井上雄一, 亀井雄一, 三島和夫 概日リズム睡眠障害の発症機序: 末梢時計機能の評価 日本睡眠学会第 39 回定期学術集会 徳島あわぎんホール (2014. 7. 3-4.)
3. Hida A, Kitamura S, Katayose Y, Kato M, Ono H, Kadotani H, Uchiyama M, Ebisawa T, Inoue Y, Kamei Y, Okawa M, Takahashi K, Mishima K. Association of a PER3 Polymorphism with Morningness-Eveningness Preference and Circadian Rhythm Sleep Disorder. 第21回日本時間生物学会学術大会 福岡九州大学医学部百年講堂 (2014. 11. 7-9.)
4. Hida A. Dissection of circadian clock system in humans. 第91回日本生理学会大会 鹿児島 鹿児島大学郡元キャンパス(2014. 3. 16-18.)
5. 肥田昌子 In vitro リズムアッセイによる体内時計評価法. 第 20 回日本時間生物学会学術大会. 大阪 近畿大学東大阪キャンパス(2013. 11. 9-10.)
6. 肥田昌子, 北村真吾, 大澤要介, 中崎恭子, 元村裕貴, 綾部直子, 片寄泰子, 野

- 崎健太郎, 榎本みのり, 加藤美恵, 小野浩子, 亀井雄一, 三島和夫概日リズム睡眠障害患者の体内時計機能障害. 第128回日本薬理学会関東部会. 東京 早稲田大学井深大記念ホール (2013. 7. 14.)
7. Hida A. Potential pathogenesis of Circadian Rhythm Sleep Disorders. Neuro2013. 京都 国立京都国際会館 (2013. 6. 20-23.)
8. 肥田昌子, 北村真吾, 片寄泰子, 中崎恭子, 元村祐貴, 大場健太郎, 野崎健太郎, 加藤美恵, 小野浩子, 松井健太郎, 小林美奈, 碓氷章, 井上雄一, 亀井雄一, 三島和夫概日リズム睡眠障害患者の生物時計機能障害日本睡眠学会第38回定期学術集会. 秋田 秋田キャッスルホテル (2013. 6. 27-28.)
9. Hida A. Assessment of Individual Circadian Phenotypes Using Biopsy Samples- Application to Circadian Rhythm Sleep Disorder Patients. 13th Society for Research on Biological Rhythms Meeting. Beyton Conference Center, Florida, USA (2012. 5. 19-23.)
10. 肥田昌子, 北村真吾, 大澤要介, 榎本みのり, 片寄泰子, 野崎健太郎, 加藤美恵, 守口善也, 亀井雄一, 三島和夫 生体組織を利用したヒト生物時計機能評価—概日リズム睡眠障害患者への応用—. 日本睡眠学会第37回定期学術集会. 神奈川 パシフィコ横浜 (2012. 6. 28-30.)
11. 肥田昌子, 北村真吾, 大澤要介, 片寄泰子, 野崎健太郎, 榎本みのり, 有竹清夏, 樋口重和, 加藤美恵, 亀井雄一, 池田正明, 三島和夫末梢時計リズムは個人の睡眠特性・生物時計機能を反映する. 第19回日本時間生物学会学術大会. 北海道 北海道大学学術交流会館 (2012. 9. 15-16.)
12. Hida A, Kitamura S, Katayose Y, Enomoto M, Ohsawa Y, Watanabe M, Nozaki K, Aritake S, Higuchi S, Kato M, Moriguchi Y, Kamei Y, Ikeda M, Mishima K. Period of fibroblast rhythm predicts individual circadian/sleep properties. 第35回日本神経科学大会. 愛知 名古屋国際会議場 (2012. 9. 18-21.)
13. Hida A, Yamazaki S, Mishima K, Johnson CH, Tei H. Effects of E-box and CRE on *Per1* expression in SCN and periphery in mice. 第19回日本時間生物学会学術大会. 北海道 北海道大学学術交流会館 (2012. 9. 15-16.)
- [図書] (計 0 件)  
なし
- [産業財産権]  
○出願状況 (計 0 件)  
なし
- 取得状況 (計 0 件)  
なし
- [その他]  
[http://www.ncnp.go.jp/press/press\\_release140909.html](http://www.ncnp.go.jp/press/press_release140909.html)
- [http://www.ncnp.go.jp/press/press\\_release130705.html](http://www.ncnp.go.jp/press/press_release130705.html)
- <http://www.ncnp.go.jp/nimh/division/seiri.html>
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  
なし
- (3) 連携研究者  
なし