

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 5 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25293255

研究課題名(和文) 生物時計の障害特性に基づく概日リズム睡眠障害の治療最適化とその効果検証

研究課題名(英文) Verification of the effect of chronotherapy on circadian rhythm sleep disorders optimized based on circadian pathophysiology

研究代表者

三島 和夫 (Mishima, Kazuo)

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・部長

研究者番号：40239223

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：概日リズム睡眠障害の高精度診断と治療最適化のため、生物時計のリズム周期・位相の迅速診断法を確立しリズム障害特性に基づいたテーラーメイド時間療法の開発に資する臨床データを収集した。睡眠相後退型・フリーラン型患者、健常対照者の皮膚線維芽細胞に概日リポーター遺伝子Bmal1-lucを導入し、培養細胞内の微弱発光量変化の経時的測定により得られた発光リズムの特性を決定した。フリーラン型患者は有意に長い末梢時計リズム周期を示した。超長周期患者では発光リズム振幅が早期に低下し概日性が失われ高照度光・メラトニンによる時間療法に対する反応性が乏しかった。超長周期が臨床転帰の予測因子となる可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We have developed rapid diagnostic technique for biological clock period and clock phase of the patients with circadian rhythm sleep disorders, and gathered clinical and pathophysiological research data to develop strategies for precise diagnosis and optimization of made-to-order chronotherapy. Skin fibroblasts from patients with delayed sleep phase type and non-entrained type, as well as healthy controls were obtained and transfected with the Bmal1-luc reporter construct Bp/527-LUC, and luminescence from the cells was continuously measured to detect the peripheral clock dysfunction of the disorders. As a results, non-entrained type patients showed significantly prolonged period of peripheral clock. Especially, patients with severely prolonged period suffered from rapidly dumped luminescence rhythm amplitude and poor response to chronotherapy, indicating that peripheral clock period properties could be useful surrogates to predict clinical outcomes of the disorder.

研究分野：睡眠医学

キーワード：概日リズム 睡眠障害 末梢時計 時間療法

1. 研究開始当初の背景

生物時計の調節異常に起因する睡眠障害である概日リズム睡眠障害 (Circadian rhythm sleep disorder; CRSD) は時点有病率が計 3% 以上と高く、特に内因型 CRSD は慢性経過をたどる難治性疾患である。CRSD の治療の主軸は高照度光やメラトニン (受容体作動薬) を用いて睡眠・生体リズム位相を調整する時間療法であるが、入眠・覚醒時刻が望ましい時間帯にまで正常化する寛解症例は 50% 以下にとどまる。奏効率を押し下げる主な要因は 1) 時間療法の適応となる原発性患者の診断が難しい、2) 照射・投薬設計に必須であるリズム位相の計測が難しい、の二点である。CRSD の高精度診断、時間療法の最適化、および病態生理研究にきわめて有効なツールとなる生物リズム周期およびリズム位相の簡便な *in vitro* 計測システムを確立することが求められている。

2. 研究の目的

難治性で慢性経過を辿りやすい概日リズム睡眠障害 (睡眠・覚醒リズム障害) の高精度診断と治療最適化のため、睡眠リズム調整の二大因子である生物時計の「リズム周期」と「リズム位相」の迅速診断法を確立し、概日リズム睡眠障害患者の生物時計機能の障害特性を明らかにする。患者の生物リズム周期は皮膚繊維芽細胞/毛包細胞内の時計遺伝子転写リズムのリアルタイム測定によって、リズム位相は血漿中振動物質群の包括的メタボローム解析によって決定し、シミュレーション試験および患者調査により精度確認を行う。これら 2 つの *in vitro* 診断システムを用いて、患者固有のリズム障害特性をもとに高照度光及びメラトニン (受容体作動薬) の照射・投薬時刻を最適化したテーラーメイド時間療法プログラムを作成し、その有効性試験を行う。

3. 研究の方法

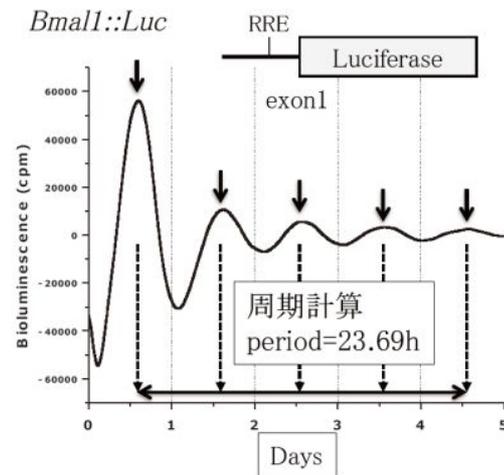
本研究では、3 つの研究課題を設定した。末梢時計計測システムの信頼性試験: CRSD 患者の末梢時計リズム周期が、長期隔離試験で測定した睡眠/生理機能リズム周期を正確に反映しているか、原発性/二次性 CRSD の弁別能を有するか検証する。原発性及び二次性 CRSD 患者を対象として末梢時計周期を測定し、コンスタントルーチン及び強制脱同調プロトコル (研究計画参照) により精密測定した生物時計周期との相同性を確認し、リズムの異常周期 (延長・短縮) を有する患者群においても本計測システムがワークするか検証する。健常者も含めた多数例のデータを累積して原発性 CRSD 患者/二次性 CRSD 患者/健常対照者を鑑別診断するための末梢時計周期のカットオフ値を設定する。

最適化時間療法プログラムの有効性試験: 睡眠相後退型患者を対象にして、DLMO をもとに高照度光およびメラトニンの照射・投

薬時刻を最適化した 4 週間の時間療法プログラムを実施し、睡眠リズム (入眠・覚醒時刻) および生物リズム位相 (DLMO) の位相調整効果を検証する。末梢時計計測システムで同定した生物リズム周期が治療反応性に関与するか検証する。

4. 研究成果

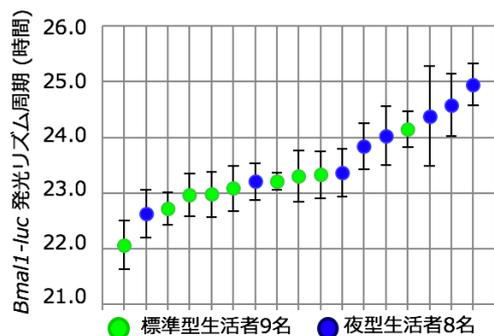
末梢細胞中にも時計遺伝子群の翻訳-転写 feedback loop に基づく固有の概日リズム発振機能 (末梢時計) が存在することから、末梢時計をサロゲートにして生物時計を駆動する視交叉上核 (SCN) 機能を推定することを試みた。ヒト生物時計リポーター遺伝子 *hbm11::Luc* (human *bmal1* プロモーター+ルシフェラーゼ遺伝子) を作製し、皮膚小切片 (1mm x 4mm) から起こした初代培養の皮膚繊維芽細胞及び毛包細胞内の *bmal1* 転写レベル (ルシフェラーゼ発光量) の概日変動を測定する末梢時計計測システムを確立した。得られた発光リズムデータからコサイナー法を用いて一周期ごとの acrophase を算出し、3-5 日間のデータから概日リズム周期を算出した。



末梢時計計測システムの性能試験のため、健常者では *bmal1* 転写リズム周期と従来法 (長期隔離試験) で得られた生物リズム周期との間に機能的相関性があることを確認し、同計測システムで個人のリズム周期が推定できることを示した。17 名の健常ボランティア (標準型クロノタイプ 9 名、夜型クロノタイプ 8 名) を対照に、睡眠日誌およびアクチグラフ測定によって在宅での睡眠パターンを記録した。日周指向性 (朝型夜型クロノタイプ) 睡眠習慣・睡眠障害の有無を評価した。*Bmal1-luc* 発光リズムの周期計算の結果、夜型生活者は標準生活者に比較して長周期を有することが明らかになった。

さらに、*Bmal1* 遺伝子発現リズム周期長は休日・フリーデーの入眠覚醒時刻と有意に相関していた。一方、平日の入眠覚醒時刻との

間には有意な相関は認められなかった。平日は出社や登校など社会時間による制約があるため、個人の体質にマッチしない時間帯で就床行動を取っているためであると推察された。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。



睡眠障害国際分類第2版に準じた CRSD・睡眠相後退型と診断された16歳以上の患者35名および同・フリーラン型25名、睡眠障害をもたない健常対照者47名をエントリーした。患者群および対照群から採取した皮膚由来初代線維芽培養細胞に概日リポーター遺伝子 Bmal1-luc を導入し、培養細胞内の微弱発光量変化の経時的測定により得られた発光リズムの特性を決定した。

フリーラン型患者群は対照被験者群に比べて有意に長い末梢時計リズム周期を示した。相当数が対照被験者群と周期長がオーバーラップしており、他の発症要因(光同調能、位相反応性など)の存在が示唆された。

概日リズム周期長と治療反応性との関連を検証するため、輪唱経過観察中のいずれかの時点で、高照度光、メラトニンまたはメラトニン受容体作動薬(ラメルテオン)を用いた時間療法を受けた。光、メラトニンおよびラメルテオンは位相前進が期待できる以下の時間帯で照射もしくは投与された。

・光療法：覚醒後から6時間以内に、自宅もしくは入院環境下で5000~8000ルクスの高照度光を2~3時間照射した。

・メラトニン：前日の入眠時刻の7時間前に1mg、5.5時間前に0.5mg、4時間前に0.5mgを分割服用した。

・ラメルテオン：前日の入眠時刻の7時間前に4mgを一回服用した。

光照射および服薬1週間以降の睡眠表から、以下の基準で時間療法への治療反応性を評価した。

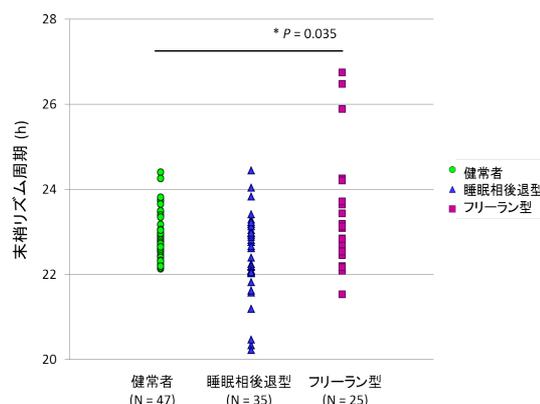
・Responder：睡眠・覚醒リズムが24時間リズムに同調し、かつ患者本人にとって望ましい時間帯(患者ごとに07時~09時の範囲内で決定)で覚醒できる。

・Partial responder：睡眠・覚醒リズムが24時間リズムに同調したが、望ましい時間帯

で覚醒・離床できず、delayed sleep phase typeで固定した。

・Non-responder：睡眠・覚醒リズムが24時間リズムに同調できなかった。

その結果、概日リズムの超長周期を有する症例では高照度光およびメラトニンを用いた構造化された時間療法に対する反応性が乏しく、超長周期が臨床転帰の予測因子となる可能性が示唆された。睡眠相後退型患者群ではリズム周期の異常は認められなかった。



超長周期の患者群では発光リズム振幅が早期に低下し概日性が失われるなど、末梢時計が概日リズム調整障害のバイオマーカーとなることが期待された。

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)

- Späti J, Aritake S, Meyer AH, Kitamura S, Hida A, Higuchi S, Moriguchi Y, Mishima K: Modeling circadian and sleep-homeostatic effects on short-term interval timing. *Frontiers in Integrative Neuroscience*, 9, 2015. (doi:10.3389/fnint.2015.00015.)
- 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.)
- 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 (7), 845-850, 2014.
(doi:10.3109/07420528.2014.914035.)

4. 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.)
5. Kitamura S, Hida A, Enomoto M, Watanabe M, Katayose Y, Nozaki K, Aritake S, Higuchi S, Moriguchi Y, Kamei Y, Mishima K: Intrinsic circadian period of sighted patients with circadian rhythm sleep disorder, free-running type. *Biol Psychiatry* 73(1):63-69, 2013.
(doi:10.1016/j.biopsych.2012.06.027.)

〔学会発表〕(計 18 件)

1. Kitamura S, Hida A, Mishima K: Biological basis of circadian rhythm sleep disorder. International Symposium on Human Adaptation to Environment and Whole-body Coordination, Hyogo, 2015.3.14-16.
2. 三島和夫:概日リズム睡眠障害の薬物療法. 第 25 回日本臨床精神神経薬理学会, 東京, 2015.10.29-30.

ほか

〔図書〕(計 1 件)

1. Mishima K: Circadian Regulation of Sleep. *Circadian Clocks: Role in Health and Disease*. Gumz ML, ed. New York: Springer; 2016: pp103-15.

〔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

<http://labo.sleepmed.jp/index.html>

6. 研究組織

- (1)研究代表者 三島和夫 (Mishima Kazuo)
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・部長
研究者番号: 40239223