

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860176

研究課題名(和文) 睡眠相後退症候群の睡眠制御破綻におけるアデノシン受容体シグナル異常の解析

研究課題名(英文) Defection of signaling of adenosine receptors in Delayed sleep phase syndrome (DSPS)

研究代表者

鈴木 登紀子 (Suzuki, Tokiko)

東北大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：10415531

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：睡眠相後退症候群(DSPS)は、明け方まで眠れず、午後まで起きられない睡眠障害であり、社会生活に深刻な支障をきたす。徹夜の後、健康者は直ちに回復睡眠に入るのに対し、患者は明け方まで眠ることができないという特徴もある。回復睡眠には、脳内に蓄積するアデノシンが大きく関わっている。このことから申請者は、DSPS患者における睡眠制御の破綻にアデノシンシグナリングが関わっている可能性を考え、病態モデルマウスを用いてそれについて検証した。その結果、前脳基底核において断眠によるアデノシン受容体発現制御における障害を示唆する結果を得た。

研究成果の概要(英文)：Delayed sleep phase syndrome (DSPS) is one of the sleep disorder which shows delay of circadian phase to have difficulty in social life. After sleep deprivation of 24 hours, patient of this disorder cannot enter recovery sleep which healthy individuals have immediately after relief of sleep deprivation. It is reported that accumulation of adenosine in basal forebrain is involved in regulation of recovery sleep. Accordingly, I examined the possibility of involvement of adenosinergic signaling in defect of sleep regulation in DSPS using model mice. As a result, I obtained result which suggests alteration of expression of adenosine receptor between DSPS model mice and wild-type mice in basal forebrain.

研究分野：時間薬理学

キーワード：アデノシン DSPS

1. 研究開始当初の背景

我々は誰も、朝に目が覚めて活動し、夜に睡眠をとって休息するという 24 時間周期のサイクルを、日々繰り返しながら生活している。哺乳類生体内では複数の時計遺伝子が機能しており、これらの遺伝子のリズム的な発現により、体内時計が形作られていると考えられている。体内時計の異常は概日リズム睡眠障害を引き起こすが、最も発症率が高い睡眠相後退症候群 (Delayed sleep phase syndrome; DSPS) は、不眠患者の 6-16%を占める(Ebisawa T.J Pharmacol Sci. 2007)。その症状は、本人の意志に関わらず、明け方まで眠れず、午後まで起きられないというものであり、社会生活に深刻な支障をきたす。多くの場合鬱症状も伴うことから、近年社会問題化している不登校や引きこもりの原因となることが懸念されている(Abe T, et al., Sleep Med. 2011)。しかし現在までのところ、DSPS に関する研究はほぼ臨床研究に限られており、発症機序の詳細は不明である。従って治療は、睡眠薬を用いた対症療法に限られている。DSPS 患者には、睡眠相の後退以外にも、健常者との大きな違いが見られる。それはすなわち、24 時間の断眠をした場合、健常者では直ちに回復睡眠に入るのに対し、DSPS 患者ではやはり明け方まで入眠できない(Uchiyama M, et al., Psychiatry Clin Neurosci.1999)、という点である。つまり DSPS 患者では、睡眠におけるホメオスタシス制御が破綻していると考えられるが、その機構は全く不明である。一方、実験動物を用いた研究において、断眠により前脳基底部分からのアデノシン放出とアデノシン A1 受容体の活性化が引き起こされることが報告されており(Elmenhorst D,et al., Brain Res. 2009)、睡眠のホメオスタシス制御には、アデノシン受容体を介した神経情報伝達が関与していると考えられている。このことから申請者は、DSPS における睡眠ホメオスタシス制御の破綻に脳内の細胞外アデノシン及びその受容体のシグナル伝達異常が関与している可能性を考えた。

2. 研究の目的

以上のような背景から、申請者は DSPS モデルマウスにおいて、アデノシン受容体を介した睡眠制御機構に障害が生じている可能性を考え、アデノシンシグナルの異常が DSPS の発症及び病態形成においてどのような役割を果たしているかを明らかにする必要があると考えた。本研究では、DSPS モデルマウスを用いて、DSPS における睡眠ホメオスタシス制御の破綻へのアデノシンの関与を検証する。

DSPS は患者の社会適応の難しさ、QOL の著しい低下にも関わらず、根本的な治療法はない。更に昨今の社会の 24 時間化においては、健常者でも体内時計が乱れがちの人は多く、今後発症率は益々増加して行くことが考

えられる。本研究は、DSPS モデルマウスを用いて発症の分子メカニズムに迫る世界初の研究であり、アデノシンとの関係に着目する研究も全く他に類を見ない。本研究により、アデノシンやアデノシン受容体の選択的リガンドを DSPS の根本的治療薬に応用できることが期待できる。

3. 研究の方法

全ての実験において、表 1 の通りの実験群を作製し、得られた結果が遺伝子型、光環境、DSPS 発症のいずれに起因するののかを探る。

表1. 実験群の内訳

	遺伝子型	離乳までの光環境	行動リズム
グループ1	野生型	明暗	正常
グループ2	野生型	恒明	正常
グループ3	Clock変異	明暗	正常
グループ4	Clock変異	恒明	正常
グループ5	Clock変異	恒明	DSPS

(1) DSPS マウスの睡眠ホメオスタシス制御の障害の検討

近年、主要な時計遺伝子の一種である clock の変異マウスを出生から離乳まで恒明条件で飼育することで、約半数の個体が DSPS 様の行動リズムを示し、これらの後退した行動リズムは、ヒト DSPS の治療に用いられるメラトニンの投与により改善されることが明らかにされ、世界で初めての DSPS モデルマウスとして有用であることが報告された(Wakatsuki Y,et al., Eur J Neurosci. 2007)。本研究ではこれに従って DSPS マウスを作製し、マウスの行動時間である明期 12 時間の全睡眠剥夺後の回復睡眠について、赤外線による焦電型行動リズム測定装置を用いて検討する。

(2) DSPS マウスの断眠による細胞外アデノシン放出の障害の検討

マウスの前脳基底部分付近にマイクロダイアリシス (微小透析) 用のプローブを埋め込む手術を行う。一週間の回復期間の後、動きを妨げないチューブをプローブに接続し、自由行動下でマイクロシリンジポンプによって人工脳脊髄液を注入し、マイクロダイアリシス法によって脳脊髄液を経時的に採取する。採取開始 1 時間後からジェントルハンドリングによる 3 時間の全睡眠剥夺を行い、睡眠剥夺前後の細胞外アデノシン濃度を比較する。アデノシン定量法としては、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いる。実験終了後に脳切片を作製し、顕微鏡観察によりプローブが間違いなく前脳基底部分付近に挿入されていたことを確認する。正常ラットで睡眠剥夺により前脳基底部分のアデノシン濃度が上昇するという報告(Elmenhorst D,et

al., Brain Res. 2009)があるので、正常マウスでの再現性を確認し、DSPS 個体での変化を解析する。

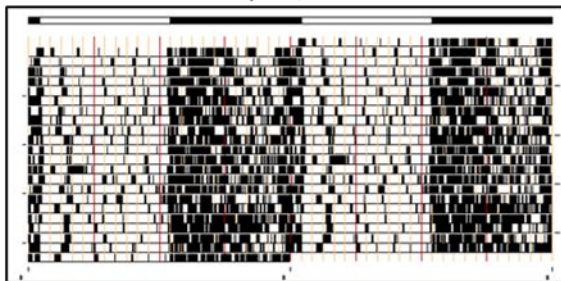
### (3) DSPS マウスの断眠によるアデノシン受容体発現上昇の障害の検討

既に、Elmenhorst らによって、睡眠剥奪は前脳基底底部においてA1 受容体 mRNA レベルを上昇させることが報告され、睡眠のホメオスターシス制御に重要であることが明らかとなっている(Brain Res. 2009)。そこで、表 1 に示すマウスに対してジェントルハンドリングにより 3 時間の全睡眠剥奪を行う。終了後直ちに(睡眠剥奪を行わないコントロールは同時刻に)過剰麻醉下で安楽死させ、摘出した脳から、前脳基底底部を摘出し、リアルタイム RT-PCR 法によりアデノシン受容体サブタイプの発現量を解析する。

### 4. 研究成果

(1) clock 変異マウスを入手し、繁殖を行い、出生から離乳までの 3 週間を恒明条件下で飼育することにより、約半数の個体の自発行動リズムの位相が 3 時間以上遅れることを観察し、Wakatsuki らの文献の再現性を得ることに成功した(図 1)。

正常マウス(ICR, 明暗発育)



DSPSマウス(clock変異、恒明発育)

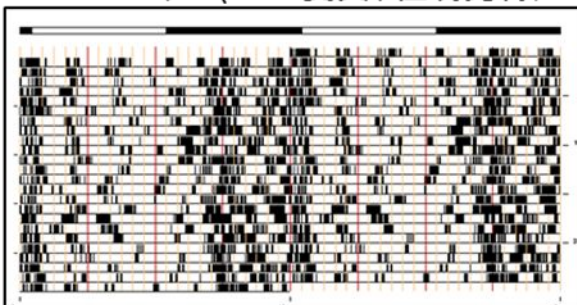


図 1. 正常マウスと DSPS マウスの自発行動リズムの比較

次いで明期 12 時間の全睡眠剥奪をジェントルハンドリングによって行い、前日の暗期開始より 24 時間連続の覚醒状態を作製した。睡眠剥奪実験終了直後の 24 時間の行動リズムを測定することで、5 分以上の連続無動時間を回復睡眠に相当するとして解析したが、

恒明、明暗発育させた野生型、また DSPS 症状を示さない clock 変異マウスと DSPS 様マウスとの間で回復睡眠に関しては顕著な違いは見られなかった。今後、睡眠剥奪時間や剥奪方法の検討が必要である。

ただ本実験において、重要な知見を見出した。すなわち、対象群として離乳まで恒明条件下で飼育した野生型(ICR)マウスの自発行動リズムを解析したところ、興味深い結果を得た。すなわち、図 2 に示すように恒明条件下で発育させた場合には通常の場合と比較して睡眠時間に相当する無動時間帯が分断化し、体内時計に可塑的な機能変化がもたらされている可能性が示唆されたのである。睡眠覚醒のパターンは体内時計による制御と、体内時計とは無関係に覚醒時間の長さによって蓄積する睡眠負債によって誘発される制御によって決定されるという「2 プロセスモデル」が提唱されている。図 2 の結果がそのどちらに起因するかを調べるため、明期 12 時間の全睡眠剥奪を行い、睡眠負債を十分に蓄積させた上で直後の回復睡眠を解析したところ、明暗発育、恒明発育の個体で有意差はなかった。よって、恒明発育が体内時計機能に影響を及ぼしていることが示唆された。

このように、申請者は恒明発育によって体内時計中枢である間脳視床下部の視交叉上核の体内時計の可塑的な機能変化が引き起こされ、図 2 のような体内時計リズム異常が発現した可能性を考え、その機構を今後明らかにする計画である。このように本研究課題より新たな研究計画を派生させることができたことも、一つの成果であると言える。

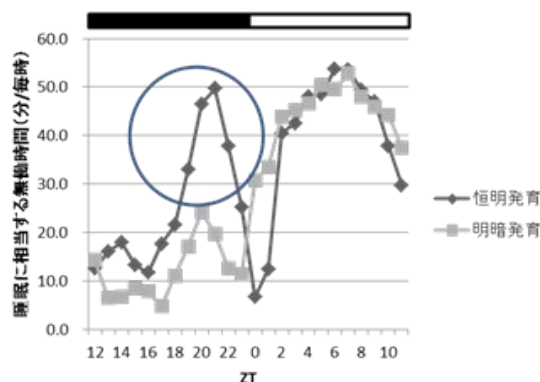


図 2. 野生型(ICR)マウスを誕生から離乳まで三週間に亘り明暗或いは恒明条件下で発育させ、その後 8 週齢まで共に明暗環境で飼育した。8 週齢から明暗条件下における自発行動リズムを 2 週間に亘って記録した。5 分以上連続して行動量がゼロである時間を「睡眠に相当する無動時間」とし、2 週間の平均時間を縦軸にプロットした。グラフ上部の 12 時間ずつの白黒のバーは黒が暗期、白が明期を表している。

(2) 前脳基底核付近にマイクロダイアリスプロブ埋め込み手術を行い、脳切片を顕微鏡観察することで目的の位置にプローブが達していることを確認した。次いで脳脊髄液を採取しながら3時間及び6時間の全睡眠剥奪を行い、アデノシン含有量についてHPLCを用いて解析した。その結果、野生型マウスで睡眠剥奪によりアデノシン量が増加することの確認はできたが、個体差が大きく、DSPS症状を示さないマウスとDSPS様マウスとの間で違いが見られると明確に結論づけることはできなかった。個体数が十分ではないので、今後実験数を増やし、睡眠剥奪時間の検討を行う等更なる検討を実施する予定である。

(3) 定量PCRの結果、文献でラットにおいて示されている通り、野生型マウスでは前脳基底核において3時間の睡眠剥奪によってアデノシン受容体のサブタイプの一つであるA<sub>1</sub>RのmRNA発現量が上昇し、DSPSマウスではそれが見られないという結果を得た。今後さらに例数を増やし、他のアデノシン受容体サブタイプについても検討を続ける。

#### 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 2 件)

Tokiko Suzuki, Kazunori Namba, Natsumi Mizuno, Hiroyasu Nakata  
"Hetero-oligomerization and specificity changes of G protein-coupled purinergic receptors: novel insight into diversification of signal transduction"  
Methods in Enzymology, 521 巻, pp. 239-257, 2013 年 (査読有)

Natsumi Mizuno, Tokiko Suzuki, Yu Kishimoto, Noriyasu Hirasawa.  
"Biochemical assay of G protein-coupled receptor oligomerization: adenosine A<sub>1</sub> and thromboxane A<sub>2</sub> receptors form the novel functional hetero-oligomer."  
Methods in Cell Biology, 117 巻, pp. 213-227, 2013 年 (査読有)

[学会発表](計 29 件)

鈴木登紀子、福澤啓睦、守屋孝洋、柴田重信

「プリン受容体ヘテロ多量体形成の体内時計制御への関与」日本生化学会東北支部 第79回例会・シンポジウム, 2013年5月11日、東北大学 片平さくらホール(宮城県仙台市)

福澤啓睦、鈴木登紀子、守屋孝洋、柴田重信

「A<sub>1</sub>アデノシン受容体とP2Y<sub>4,6</sub>受容体の相

互作用と体内時計制御の関係」第52回日本薬学会東北支部大会、2013年10月20日(東北大学川内キャンパス、宮城県仙台市)

福澤啓睦、鈴木登紀子、柴田重信、守屋孝洋

「睡眠相後退症候群(DSPS)とアデノシンの関係」第20回日本時間生物学会学術大会、2013年11月9日(近畿大学東大阪キャンパス、大阪府東大阪市)

鈴木登紀子、福澤啓睦、柴田重信、守屋孝洋

「体内時計制御におけるアデノシン A<sub>1</sub> 受容体と P2Y<sub>4,6</sub> 受容体の相互作用」第20回日本時間生物学会学術大会、2013年11月9日(近畿大学東大阪キャンパス、大阪府東大阪市)

佐々木崇志、谷本和也、原弥生、太田英伸、程肇、小林正樹、鈴木登紀子、守屋孝洋

「視交叉上核の中核時計における P2Y プリン受容体の役割の解明」日本薬学会 第134年会、2014年3月30日(熊本大学、熊本県熊本市)

佐々木崇志、谷本和也、原 弥生、太田英伸、程肇、小林正樹、柴田重信、鈴木登紀子、守屋孝洋

「細胞外ヌクレオチド - 受容体シグナルによる中枢および末梢時計の同調機構の解析」第21回日本時間生物学会学術大会、2014年11月8日(九州大学医学部 百年講堂、福岡県福岡市)

佐々木崇志、谷本和也、原 弥生、茂木明日香、太田英伸、程肇、小林正樹、柴田重信、鈴木登紀子、守屋孝洋

「概日時計の細胞間シンクロ機構における細胞外ヌクレオチド-受容体シグナルの役割の解明」第88回日本薬理学会年会、2015年3月19日(名古屋国際会議場、愛知県名古屋市)

[その他]

ホームページ等

<http://www.pharm.tohoku.ac.jp/~saibou/>

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 登紀子 (SUZUKI, Tokiko)

東北大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号: 10415531