

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25893099

研究課題名(和文)体内時計を介した気分障害早期治療メカニズムの探索

研究課題名(英文) Exploratory investigation of circadian clock mediated treatment of affective disorder

研究代表者

松尾 雅博 (Matsuo, Masahiro)

滋賀医科大学・医学部・講師

研究者番号：70456838

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：うつ病を代表とする気分障害は、年間有病率が3%に至るとする報告があるなど、非常に頻繁に見られる精神疾患である。うつ病治療に一般的に用いられている薬物療法は、治療効果発現に2週間程度かかる一方で、非薬物療法は、薬物療法よりも効果出現が早いことが知られている。本研究では、これまで明らかにすることが困難であった断眠療法・光療法の効果とその時刻依存性について、分子レベルから明らかにすることを目的とした。この結果、生体時計の位相評価法を確立するとともに、分子メカニズム解明基盤のための誘導遺伝子定量計測系を確立した。

研究成果の概要(英文)：Affective disorders, including depression, are reported to affect as much as 3% of general population. Although affective disorders are quite common disease nowadays, pharmacotherapy that is used most often used to treat the disease, requires more than 2 weeks to induce first improving effects on the disease.

In contrary to conventional pharmacotherapy, interventions focusing on the sleep/wake cycle are used if not common as pharmacotherapy. These include sleep deprivation therapy, light therapy, and they are known to improve disease faster than 2 weeks.

In this study, we focused on the anti-depression mechanism of these sleep/wake cycle mediated depression therapy. By examining the molecular mechanisms of therapeutic effects and their time-dependency, it is expected to pave the way to develop more sophisticated therapy of depression.

研究分野：時間生物学、精神科疾患

キーワード：気分障害 時計遺伝子 時間治療学

1. 研究開始当初の背景

気分障害を代表とする多くの精神疾患は睡眠覚醒リズムとの関連が強く、精神症状の悪化に睡眠覚醒リズムの異常は必ずといって良いほど伴うことが知られている。一方で、睡眠覚醒リズムを変化させる作用のある断眠療法・光療法が、気分障害治療に効果的であることから、気分障害の発症・病因メカニズムに睡眠覚醒リズムが密接に関与していると長く考えられてきた。

現在、一般的に気分障害の治療には薬物療法が用いられているが、これらは体内リズムに直接影響を与えようとは考えられておらず、セロトニンなどのモノアミンニューロトランスミッターの伝達を制御することで神経の可塑性など改善することが治療効果発現の機序と考えられている。しかし、この機序ため、治療効果が出現するのに10日から2週間かかり、急速な治療効果が必要な自殺念慮の強い重症患者の治療において重大な足かせとなっている。

一方で断眠療法、光療法、電気痙攣療法(ECT)に代表される非薬物療法は、薬物療法治療困難例でも有効性が高く、当日のうちに効果が出現するなどの共通点が知られている。以上から、断眠療法・光療法・電気痙攣療法が薬物療法とは異なる共通の分子メカニズムにより気分障害の治療に効果を出している可能性が想定される。

一方、生体時計研究は、過去10年の間にめまぐるしく進展し、その結果、生体リズムの実体が、時計遺伝子と呼ばれる遺伝子群が生み出す転写・翻訳のネガティブフィードバックループで構成されていることが明らかとなった。さらに、この時計が生み出す約24時間周期が、細胞レベルで代謝活動・入力信号に対する反応性などを制御することで、個体レベルの睡眠覚醒リズム・体温など多岐にわたる機能を制御していることが明らかとなっている。

これらの知見が構築されたにも関わらず、生体時計と密接な関係があると考えられる断眠療法・光療法の実施方法については、科学的な知見をもとにした運用方針が確立されていない。実際には、光療法は朝早くの方が抗うつ効果が高いことが経験的に知られる等、その投与時刻の重要性が知られているものの、根拠となる生体内メカニズム・分子基盤は明らかになっていない。

2. 研究の目的

即効性・投与時刻依存性の効果発現など、共通点の多い断眠療法・光療法の共通作用メカニズムを解析することは、これらの治療法の最適化に貢献するだけでなく、新たな治療ターゲットを検索するうえで重要な研究である。残念ながら、これまでは薬物療法についての研究が重点的に進められる一方、これ

まで非薬物療法の分子レベルでの機能は十分に理解されていない。

今回対象とする断眠療法・光療法などの非薬物療法は臨床効果に共通する点が多く、作用機序に共通の分子メカニズムがある可能性があると考えている。しかしながら、これまでこれらの治療法の神経基盤の共通点を検索する研究は行われておらず、さらにこれらと密接な関与が予想されている生体時計の役割を交えて解析する研究も行われて来なかった。

薬物療法においては、近年の目覚ましい生体時計研究の成果をもとに「時間薬理学」という概念がすでに一般化され、代謝・細胞生理などの概日変動に合わせた薬物投与をすることで、より副作用が少なく効果的な治療が行われている。一方で、精神科非薬物療法は時刻依存性・体内時計との関わりが強いにもかかわらず、経験則に基づき運用されている。

今回の研究は、生体時計と密接な関係がある気分障害に対する複数の非薬物療法について、初めて網羅的に分子レベルでの共通する効果を同定するもので、その成果はこれまでの薬物療法とは全く異なる創薬ターゲットの発見につながる可能性を秘めている。

さらに、本研究において、脳内での変動を高い時間解像度・空間解像度で調べる必要があり、さらに時刻の依存性に副作用が増強される可能性や、個体差の大きさを考えると、まず動物を用いた実験が必要不可欠である。詳細な検討を動物で行うことにより、より良い臨床治療法の確立に寄与できると考えられる。さらに、本研究は、断眠療法・光療法・電気痙攣療法の臨床効果の最適化を行う上で不可欠であるにとどまらず、体内時計による神経細胞の時刻依存的な反応性を調べるために重要なステップになると考えられる。

3. 研究の方法

断眠・光刺激の3種の非薬物療法で用いられる刺激による、脳内における分子レベルの影響を、実験動物を用いて解明する。

当初、ラットを用いた実験を予定していたが、遺伝子組み換え動物への実験結果の発展性・実験に必要な広さの制限などにより、ラットではなく、マウスも対象に行うこととした。

まず、刺激誘導性遺伝子の発現を見るために、本研究室での遺伝子発現量の計測方法の確立を行った。具体的には、光刺激・断眠などの刺激による脳組織への影響評価として、刺激誘導性の遺伝子の有無を、全脳サンプルから抽出した mRNA を元に、遺伝子発現量の定量を行うこととした。特に、遺伝子転写誘導の指標として早期発現遺伝子である fos の転写量を及び、概日時計構成遺伝子である、時計遺伝子の定量を目標とした。定量系を構築することで、それぞれの非薬物療法におい

て変化もたらされた（少なくとも転写変動が誘導された）組織を特定し、さらに3つの刺激で共通して転写誘導が認められる組織を特定することを目標とした。

4. 研究成果

我々は、まず刺激による脳内での遺伝子発現量の変動を検出するため、リアルタイムPCRの定量系の確立を行った。リアルタイムPCR測定装置として、プロメガ社 Chromo-4 リアルタイムPCRマシンを用いた。酵素としてはサイバークリーン方式の Thunderbird qPCR Mix を用いた。

特に、本実験では探索的に全脳から得た mRNA を元に定量を行う必要があるため、極めて鋭敏で特異度の高いリアルタイムPCR法の確立が不可欠である。これは、全脳を対象にして mRNA を回収した場合、変化が起こる部位の大きさによっては、全脳サンプル中での微量な変動を捉える必要が出てくる。一方で、時計遺伝子にはホモログが多いことも知られており、検出系には、高い感度だけでなく、高い特異度も同時に要求される。このため、まず感度・特異度の高いプライマーセットの作成を行った。まず、既報の論文より得たプライマーセットも同時に検討を行ったが、我々の検出系ではプライマーダイマーなどの問題点が見受けられ、定量性の問題が考えられた。図1

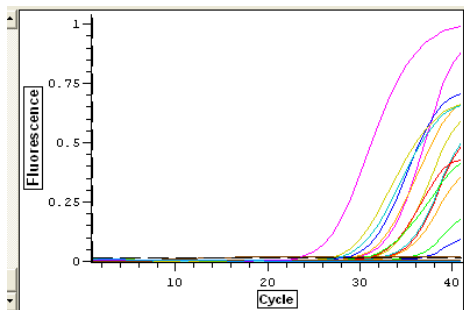


図1. 対象遺伝子の多くで定量性・特異性が低い増幅しか認められなかった。

このため、各定量候補遺伝子に対して、新規に NCBI サイト内に設置している PRIMER-BLAST ソフトウェアを用いて単一遺伝子に対して複数のプライマーセットを設定して検討を行ったが、いずれも pg レベルの微量の mRNA 検出の際に定量性が認められなかった。このため、新たに5セットずつプライマーセットを新規に設定し解析したところ、定量性・感度に改善認められるプライマーセットが各遺伝子に一つ以上認められた。図2

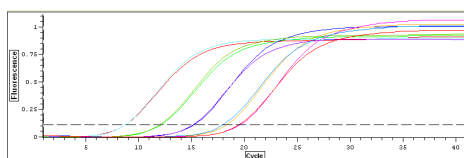


図2. 複数のプライマーセットを網羅的に調べた結果、定量性・特異性が高い増幅が認められるようになった。

一方、動物に対する刺激提示方法に関しては、学会などを通して、断眠刺激に関しては様々な意見がある事が判明した。特に、当初予定していた、「実験動物を水面に面した台におく事で断眠させる方法」については、断眠刺激だけでなく、より複合的なストレス刺激になることが指摘されていた。この結果、この刺激に伴って出現した現象が、純粋に「断眠」による影響であるか、ストレス反応であるのか、一定のコンセンサスを得られず様々な批判の対象になっていることが分かった。文献上では知ることができなかったこういった、実験遂行上での問題が生じたため、純粋な「断眠」刺激として、より適切な刺激提示方法を動物ケージの底に一定の速度で棒を回し、「ネズミに静止させない」方式を用いることにした。

さらに、本研究では「行動量」から生体時計の位相を見つけることも治療効果の時刻依存性を議論する上で必要となる。このため、本研究に関連して、健康成人の行動リズムを特定する circular 解析を応用した数学的アルゴリズムを考案し、学会で発表を行った。このアルゴリズムにより、環境因子（明暗などの光環境）により形成された見かけ上のリズムではなく、環境の影響を受けにくく恒常的に振動している体内時計の位相を行動量から解析することが可能になった。図3

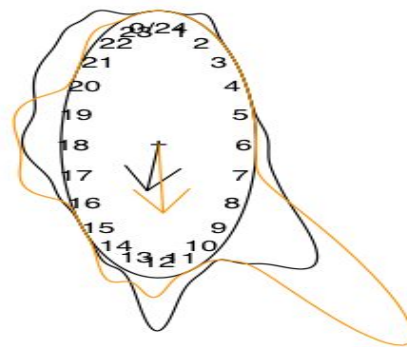


図3. 行動リズムから生体時計の位相を検出するアルゴリズムをグラフ化したもの。一週間の活動量から、個体ごとの活動リズムのピークを circular 解析による検出する。光環境との位相差を見ることも可能である。

このアルゴリズムはヒトだけでなく、多くの動物に応用可能であり本実験の主要な解析の指標となる。

この他、本研究と関連して睡眠と精神疾患に関連した研究を、責任著者としてヨーロッパ睡眠学会の機関誌に投稿し、受理された。

以上の通り、本研究では当初の予定を変更せざるを得ない点があったが、脳内での遺伝子発現量の定量系の確立および動物の体内時計位相の推定を行うためのアルゴリズム

開発など、一定の進展を得た。

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3件)

“ Association of sleep-disordered breathing with decreased cognitive function among patients with dementia ”

Aoki K, Matsuo M, Takahashi M, Murakami J, Aoki Y, Aoki N, Mizumoto H, Namikawa A, Hara H, Miyagawa M, Kadotani H, Yamada N., Journal of sleep research, 23(5), pp.517-23, 2014 (査読有)

“ A Cross-sectional study on working hours, sleep duration and depressive symptoms in Japanese shift workers. ”

Kadotani H, Nakada Y, Murakami J, Matsuo M, Itou H, Yamada N, Journal of Oral Sleep Medicine, in press (査読有)

「MSLT におけるクラスタリング分類と、主観的眠気と睡眠潜時の関連について」

鷹見将規, 松尾雅博, 今井眞, 加根村隆, 中林孝夫, 泉尾護, 角谷寛, 山田尚登
不眠研究 2014 巻 Page33-37, 2014 (査読有)

[学会発表](計4件)

“ Association of sleep-disordered breathing with decreased cognitive function in dementia patients ”

Aoki K, Matsuo M, Takahashi M, Murakami J, Kadotani H, Yamada N, Asia Sleep Research Society Conference 2014

「アクチウォッチを用いた行動と光環境の同調性の個体差の検討」

松尾雅博, 角谷寛, 鷹見将規, 今井眞, 山田尚登
日本睡眠学会 第 39 回定期学術集会, 2014

「認知症における認知機能の低下と呼吸関連睡眠障害の関連」

山田尚登, 松尾雅博, 高橋正洋, 村上純一, 青木浄亮, 青木泰亮, 青木直亮, 水元洋貴, 並川綾子, 原宏子, 宮川正治, 角谷寛,
日本睡眠学会 第 39 回定期学術集会, 2014

「主観的な眠気と客観的な眠気の関連について」

鷹見将規, 今井眞, 松尾雅博, 加根村隆, 山本彬, 中林孝夫, 泉尾護, 角谷寛, 山田尚登,

日本睡眠学会 第 39 回定期学術集会, 2014

6. 研究組織

(1) 松尾 雅博 (MATSUO, Masahiro)
滋賀医科大学・医学部・講師
研究者番号: 70456838