

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670543

研究課題名(和文) 時計遺伝子発現解析に基づいた概日リズム性睡眠障害治療のための基盤研究

研究課題名(英文) Development of a detection method for circadian rhythm sleep disorders based on clock gene expression

研究代表者

明石 真 (Akashi, Makoto)

山口大学・時間学研究所・教授

研究者番号：30398119

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヒトの概日時計位相を検出するには時計遺伝子の発現リズムに基づいて位相推定を行う必要があるが、これまでその実現に適した方法は確立されていない。本研究では、まず、私たちが独自に開発してきた位相推定法において測定条件の最適化を行い、従来法よりも測定感度を飛躍的に上昇させることに成功した。次にこの測定系を適用して、従来法では実現が困難な「隠れた概日リズム睡眠障害」の検出を試みた。その結果、社会的生時時刻(特に仕事がある日の起床時刻)に対する時計遺伝子発現位相との時間差を算出することにより、簡便にかつ数日のうちに隠れた概日リズム睡眠障害を検出することが可能となった。

研究成果の概要(英文)：Although the determination of human circadian phase requires the phase estimation based on clock gene expression rhythms, simple and effective methods in clinical settings remain undeveloped. In this study, we have optimized experimental procedures in a phase estimation method using hair follicles that we previously reported, and succeeded in dramatically increasing the measurement sensitivity for clock gene expression levels. Moreover, using this improved method, we have tried to detect "masked circadian rhythm sleep disorders", which are difficult to detect with traditional approaches such as sleep diary and actogram. Consequently, simple and rapid detection of masked circadian rhythm sleep disorders has been realized by calculating and comparing time intervals between socially-enforced time schedules (in particular waking time on work days) and estimated circadian phases in clock gene expression rhythms using hair follicles.

研究分野：時間生物学

キーワード：概日時計 時計遺伝子 睡眠

1. 研究開始当初の背景

睡眠障害にはさまざまな原因が関与しており、それに対する予防や治療の方法もそれぞれ異なっている。しかし、その多くの場合において、鎮静剤や抗不安薬が処方されており、必ずしも原因療法としての確ではないかも知れない。特に、概日時計（約 24 時間周期の体内時計）の機能不全によって起こる「概日リズム睡眠障害」においては、これらの薬物による治療は適切ではないが、現実的には区別して治療することは簡単ではない。この概日リズム睡眠障害は、現代人において潜在的に相当数存在すると想定される。なぜならば、現代光環境においては概日時計位相の後退が起こりやすく、加えて、生活習慣の不安定化が起こりやすいため、頻繁に概日位相の脱同調が起こっていることが疑われる。この状態は「社会的時差ぼけ (social jet lag)」とも呼ばれており、概日時計による自律的な睡眠位相に対して、実生活における就寝のタイミングが脱同調を起こしていること、入眠や覚醒において問題が生じることになる。

2. 研究の目的

このように、現代社会において、社会的時差ぼけによる概日リズム睡眠障害が急速に増えてきていると想定されるにもかかわらず、概日時計の簡易な診断方法は未だ確立されていない。現実の医療においては、主に睡眠日誌のような主観的な方法に依存して診断しており、例えば、社会生活への強制的同調によって「見掛け上は隠れている」概日リズム睡眠障害を検出することは不可能である。この検出は、概日時計の本体である「時計遺伝子発現リズム位相」を決定することで可能となる。本研究課題においては、睡眠に問題を抱える被験者に対して、体毛を用いた時計遺伝子発現測定に基づいた概日時計位相診断を実施して、概日リズム睡眠障害の判定を試みる。特に、隠れた概日リズム睡眠障害を検出することで、本手法の臨床上的有用性を明らかにする。

3. 研究の方法

平成 26 年度は、私たちが開発してきた従来の測定手順を一つ一つ最適化することで、時計遺伝子発現の検出感度を改善することを目指した。さらに、同年度において、健常者の時計遺伝子発現リズムにおける平均的な位相がどのようなものか検証を行った。これに対して、平成 27 年度には、睡眠に問題を抱える被験者に対して同様の試験を実施した。これにより算出された概日位相を健常者のものと比較することで、客観的に概日リズム睡眠障害者を検出することを目指してきた。特に、睡眠日誌のような従来法によっては検出不可能である「隠れた」概日リズム睡眠障害を検出することに挑戦した。

4. 研究成果

平成 26 年度は、私たちが開発してきた概日時計位相決定法の技術的改良を進めた。ヒトで概日時計の診断を行うためには、時計遺伝子の発現リズムにおける位相決定を簡易に行う必要がある。そこで、本測定の基盤である毛根を用いた発現定量法において、リアルタイム PCR を実施するためのサンプル採取・RNA 精製方法・逆転写酵素・PCR 増幅方法および検出方法等のそれぞれの実験操作について条件の最適化を行うことで、従来よりも測定感度を上昇させることを目指してきた。従来方法においては、被験者一人当たり 20 本以上の体毛（主に頭髮）を数時間ごとに採取するケースが多かったため、被験者のみならず採取者側にも実施の際の負担が大きかった。それにもかかわらず、なお測定できない被験者が存在する場合もあったため、診断法として不安定と言わざるを得なかった。しかし、今回の最適化によって、10 本以内の採取によってほとんどすべての被験者において測定が成功するようになった。抜き取った毛根への生細胞の付着が十分量確認できた場合は、1 本の採取毛根でも測定が十分可能であることも確認できており、本測定法の臨床診断法としての応用に大きく近づいたということが出来る。改良が成功したことは、同じサンプルに対するリアルタイム PCR を再度実施することで、改良した手法による発現定量は再現性が極めて高いことが確認できた（図 1）。

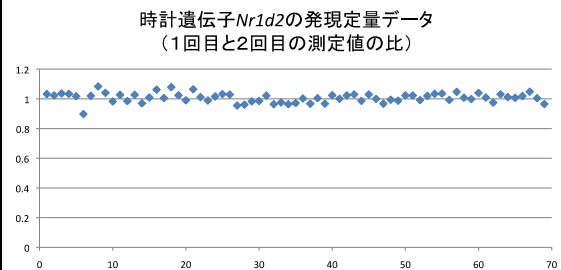


図1 時計遺伝子発現定量解析の信頼性
改良された方法によって、体毛を用いて、Nr1d2遺伝子の発現定量解析を実施した。サンプル数は合計で69個(23名から3サンプルずつ採取)であり、精製トータルRNAから逆転写されたcDNAに対して、リアルタイムPCR定量を2回実施している。縦軸の値は1回目と2回目の測定値の比を示しており、1に近いほど再現性が高い。

このように、平成 26 年度の成果により、ヒトから採取した少数の毛根サンプルから、精度の高い時計遺伝子発現測定が可能になった。平成 27 年度は、この測定系を睡眠障害の被験者に適用した。具体的な目的は、24 時間にわたり 3 回の毛根採取（約 8 時間間隔の採取）を実施して睡眠障害者の概日位相を推定することで、概日位相に異常がみられる被験者を客観的に選別することである。これが実現可能になると、簡便にかつ数日のうちに「隠れた概日リズム睡眠障害者」を臨床的に選別することが可能となり、その結果、適切な睡眠障害治療を展開することが可能になる。現状の概日リズム睡眠障害の診断は、メラトニン（松果体ホルモン）をマーカーに

利用して客観的な概日位相推定を行うことで可能ではあるが、メラトニン測定による概日位相推定する場合、光環境制御や採取頻度等の技術的ハードルのために一般的な病棟でこれをルーチン化するのは容易ではない。そのため、自己睡眠記録や活動量計測が実施されることが多いものの、この方法では社会生活の中に隠れてしまう概日リズム睡眠障害は検出できない。

平成27年度は、まず、無作為に睡眠異常を自覚している被験者を募集し、PSQI(ピッツバーグ睡眠調査票)を用いたスクリーニングを行うことで睡眠障害者を選別した。これらの被験者は社会生活に適応できていることから、従来の概日リズム睡眠障害を罹患していないことがわかった。被験者に対して3回の毛根採取を行い、リアルタイムPCR法による時計遺伝子発現定量を実施した。得られたデータは18S-rRNAの発現量によって補正された後、独自のコサインフィッティング法を適用することで概日位相が推定された。この推定精度が高いことは、測定・推定結果の再現性によって確認できた(図2)。過去の我々の研究成果によって、社会的生時時刻(特に仕事がある日の起床時刻)に対する時計遺伝子発現位相の「時間差」を算出すると、睡眠健常者においては一定の時間差に収束することがわかっていた。今回の測定結果によると、この時間差から大きく外れる被験者が含まれており、隠れた概日リズム睡眠障害者の検出に成功したと考えることができる。

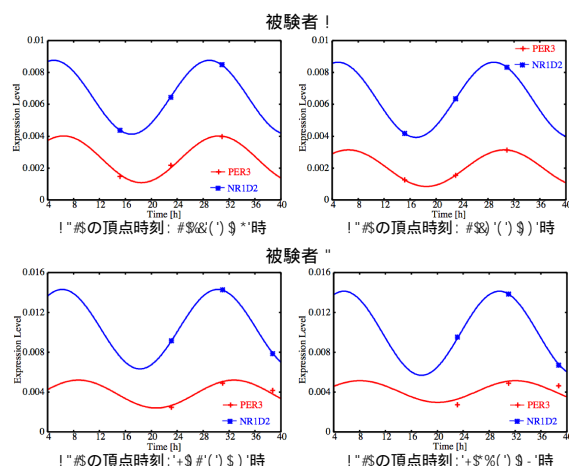


図2 改良された概日位相推定の実施例(2名)
2名の被験者に対して約4時間間隔で頭髪採取を行った後に、リアルタイムPCR法で時計遺伝子PER3とNR1D2の発現定量を行った。波形はコサインフィッティングによって推定された発現リズム。図の下には推定されたPER3の最大発現時刻を示している。左右の図は、同じ1231サンプルに対して、独立して行ったPCR定量および位相推定の結果を示している(再現性の確認)。被験者'は比較的再現性が低い例である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Matsumura. R., Node. K., and **Akashi. M. (corresp. author)**

Estimation methods for human circadian phase using peripheral tissues

Hypertension Research 査読有 2016; in press

Matsumura. R., Tsuchiya. Y., Tokuda. I., Matsuo. T., Sato. M., Node. K., Nishida. E., and **Akashi. M. (corresp. author)**

The mammalian circadian clock protein period counteracts cryptochrome in phosphorylation dynamics of circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK).

The Journal of Biological Chemistry (JBC) 査読有 2014; 289(46): 32064-32072

Sato. M., Murakami. M., Node. K., Matsumura. R., and **Akashi. M. (corresp. author)**

The role of the endocrine system in feeding-induced tissue-specific circadian entrainment

Cell Reports (CELL PRESS) 査読有 2014; 8(2): 393-401

Akashi. M. (corresp. author), Okamoto. A., Tsuchiya. Y., Todo. T., Nishida. E., and Node. K. A positive role for PERIOD in mammalian circadian gene expression

Cell Reports (CELL PRESS) 査読有 2014; 7(4): 1056-1064

〔学会発表〕(計6件)

2015年10月17日 電気・情報関連学会中国支部連合大会(山口大学:山口県宇部市)特別講演「なぜ体内時計は大切なのか」**明石真**

2015年5月21日 日本糖尿病学会(海峡メッセ:山口県下関市)シンポジウム(招待講演)「食と体内時計」**明石真**

2014年11月9日 日本時間生物学会(九州大学:福岡県福岡市)「New methods for assessing human and mouse circadian clocks」**明石真**

2014年7月12日 日本高齢消化器病学会(ANA クラウンプラザホテル宇部:山口県宇部市)特別講演「概日時計と疾患リスク」**明石真**

2014年6月7日 日本時間学会(保健医療経営大学:福岡県みやま市)公開学術シンポジウム「体内時計の効果的な活用は可能か」**明石真**

2014年6月1日 日本栄養食糧学会(酪農学園大学:北海道江別市)シンポジウム(招待講演)「ヒトの体内時刻をはかる」**明石真**

〔図書〕(計7件)

2016年3月1日発行 New Diet Therapy 第31巻 第4号(65-70頁)日本臨床栄養協

会「概日時計はなぜ大切なのか」明石真

2015年11月1日発行 いま小児科医に必要な実践臨床小児睡眠医学(2-10頁)診断と治療社「概日時計と時差ぼけ型不眠」明石真

2015年9月1日発行 Diabetes Journal 第43巻 第3号(巻頭1-9頁)協和企画「概日リズムとインスリン」明石真

2015年4月18日発行 医学のあゆみ 第253巻 第3号(219-224頁)医歯薬出版「概日時計とそのしくみ」明石真、野出孝一

2015年3月31日発行 時間学研究 第8巻(37-50頁)日本時間学会「E系列の時間とはなにか」野村直樹、橋元淳一郎、明石真

2015年2月26日発行 THE LUNG perspectives 第23巻 第1号(84-91頁)メディカルレビュー社「概日時計の研究法(その2)」明石真

2014年11月14日発行 THE LUNG perspectives 第22巻 第4号(82-87頁)メディカルレビュー社「概日時計の研究法(その1)」明石真

〔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://www.rits.yamaguchi-u.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

明石 真 (AKASHI, Makoto)

山口大学時間学研究所・教授

研究者番号：30398119

(2)研究分担者

無

(3)連携研究者

徳田 功 (TOKUDA, Isao)

立命館大学理工学部・教授

研究者番号：00261389

平野 均 (HIRANO, Hitoshi)

山口大学保健管理センター・教授

研究者番号：70228807