

期が一致する時期と一致しない時期を繰り返す。起床時間が早すぎ、夕方には眠くなってしまう睡眠相前進症候群(ASPS)も存在する。これらリズム障害の一部は家族性に発症することが知られており、少なくとも一部には遺伝子の異常が原因となっている群が存在すると考えられる。

一方、時間生物学の進歩により、単細胞生物から哺乳動物に至るまで、生物の概日リズムの形成は複数の遺伝子(生体時計関連遺伝子)の働きによってコントロールされていることが判明してきた。最初はショウジョウバエやアカパンカビの概日リズムに異常をきたす遺伝子としてそれぞれから *Per* 遺伝子、*Frq* 遺伝子が単離されたが、1990年代にはいるとハムスターやマウスといった哺乳動物の場合も遺伝子の変異が概日リズムの異常につながる事が明らかになり、その原因遺伝子が次々に単離された。これらの研究により、現在までに哺乳動物から10個ほどの生体時計関連遺伝子が報告されている。*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Clock*, *BMAL1(Mop3)*, *Cry1*, *Cry2*, *Casein Kinase I ε (CK I ε)* 遺伝子などは概日リズム形成機構に関与すると考えられ、メラトニン 1A, 1B 受容体遺伝子、5HT₇ 受容体遺伝子などは概日リズムの修飾に関与すると考えられる。*CLOCK* と *BMAL1* 蛋白が2量体を形成し、E-box に結合して *Per1* 遺伝子などの転写を促進し、*CRY1*, *CRY2*, *PER2* 蛋白などがその転写を促進ないし抑制するという複

数のフィードバックループが概日リズム形成に関与することが示されている。同様のフィードバックループは藍色細菌やアカパンカビの生体時計機構にも存在し、これが概日リズム形成機構の基本的構造ではないかと考えられている。また、ショウジョウバエのリズム異常を引き起こす遺伝子とハムスターにリズム異常を引き起こす遺伝子とをそれぞれ単離すると、共通の遺伝子であった (*CK I ε*) ことが判明しており、生体時計の構成に関与する遺伝子の数は比較的限られていると考えられている。既述した生体時計関連遺伝子の中で *Per2*, *Clock*, *BMAL1*, *Cry1/2*, *CK I ε* 遺伝子に関してはその変異が哺乳動物の概日リズム異常を引き起こすことが実際に確認されている。従って、ヒトの場合もこれらの遺伝子の多型の組み合わせによって前述した概日リズム障害が生じている可能性が高いと考えられる。

精神疾患の多くは複数の遺伝子に関与する多型性のある疾患と考えられるが、その中で、概日リズム障害は比較的客観的な診断が可能であること、既述したように概日リズム形成の中核となる遺伝子は比較的数が限られていることを考えると、比較的解析しやすいと思われる。つまり、生体時計関連遺伝子の全てを対象に多型解析を行うことが物理的に可能であり、そうすることで複数の遺伝子の多型が疾患発症に結びつく過程を把握することが可能と思われる。

この研究の目的は、概日リズム障害を対象に全生体時計関連遺伝子の異常を検索し、ヒトの概日リズムに個体差が生じる原因を探ることで、概日リズム障害の治療法開発や、その人にあった生活リズムを見つけ出す手掛かりを得ることにある。また、複数の遺伝子異常が表現型に結びついていく過程を調べていく過程で、概日リズム障害のみならず、複数の遺伝子が関与する多型性のある疾患を研究する上でのモデルケースを作成することも可能となる。概日リズム障害に結びつく遺伝子多型が見つければ、リズム障害の関与が想定されている躁鬱病などほかの精神疾患解明への糸口となるであろう。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

この研究は参加各施設の倫理委員会から承認されており、各被験者には研究内容をよく説明し、文書による同意を得ている。

対象：参加各施設（「考察」の末尾を参照）の協力を得て、概日リズム障害患者 78 名 (DSPS 48 名、N-24 30 名)、及び正常コントロール 100 名から静脈血を採取し、Qiagen 社製 QIAamp DNA Blood Maxi Kit を用いてゲノム DNA を抽出した。

ヒト *Per3* (*hPer3*) 遺伝子の解析：研究を開始した際、*hPer3* 遺伝子のゲノム DNA の配列は既に報告されていたが、

cDNA の配列は知られていなかったため、かずさ DNA 研究所 長瀬隆弘博士より *cDNA* 配列の情報提供を受け、データベース上に登録されているゲノム配列 (GenBank Accession No. Z98884) と比較してそのエクソン・イントロン構造を決定した。この結果、*hPer3* 遺伝子の翻訳領域は計 21 個のエクソンに分かれることが判明した (表 1)。

Exon	Amino acids	Nucleotides (in Z98884)
1	1-43	(-224)-128(61873-62224)
2	43-92	129-274(62660-62805)
3	92-130	275-390(63940-64055)
4	131-198	391-592(65264-65465)
5	198-215	593-644(71176-71227)
6	215-265	645-793(75744-75892)
7	265-291	794-872(78332-78410)
8	291-327	873-979(80266-80372)
9	327-379	980-1136(80911-81067)
10	379-414	1137-1242(86112-86217)
11	415-457	1243-1371(87112-87240)
12	458-508	1372-1522(87657-87807)
13	508-553	1523-1658(96504-96639)
14	553-595	1659-1783(97334-97458)
15	595-653	1784-1957(97686-97859)
16	653-730	1958-2188(103699-103929)
17	730-962	2189-2886(104337-105034)
18	963-1072	2887-3214(107053-107380)
19	1072-1133	3215-3398(112981-113164)
20	1133-1183	3399-3549(114218-114368)
21	1184-1210	3550-3630(119891-119971)

表 1 : *hPer3* 遺伝子のエクソン・イントロン構造。括弧内の数値は GenBank Accession No. Z98884 の核酸配列上の位置

ヒト *Clock* (*hClock*) 遺伝子の解析：
hClock 遺伝子についてはヒトの *cDNA* の配列は報告されていたが、ゲノム DNA の核酸配列が報告されていなかったため、

マウスの *Clock* 遺伝子の構造から *hClock* 遺伝子のエクソン構造を推定し、ヒトゲノム DNA を鋳型にエクソン間での long PCR 法を使ってイントロン部分を増幅し、直接シーケンス法によってエクソンに隣接する部分のイントロン配列を決定した。ただし、解析を行っている間にデータベース上に *hClock* 遺伝子のゲノム配列が登録された (AC069200.3) ため、以後はデータベース上の配列を使用した。*hClock* 遺伝子の翻訳領域は 20 のエクソンに分かれていた。

遺伝子多型の解析; *hPer3*, *hClock* 遺伝子の各翻訳領域を含む全エクソンについて PCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) 法により変異の有無を探るため、*hPer3* 遺伝子については 25 組計 50 本のプライマーを (表 2)、*hClock* 遺伝子については 23 組計 46 本のプライマーを作成した。PCR 断片の長さは 300bps 以下 (一部を除く) にして変異の見逃しを減らした。*hClock* 遺伝子については 3'-非翻訳領域の T3111C 変異が睡眠パターンの朝型・夜型と相関していると報告されたため、T3111C 変異を検出するプライマーを 1 組追加作成し、計 24 組を解析に使用した。プライマーはすべて蛍光物質 fluorescein でラベルし、島津製シーケンサー DSQ-1000S で泳動パターンが検出できるようにした。泳動ゲルは 5%グリセロールを添加したもの、添加しないものの 2 通りを使用した。SSCP 泳動パ

ターンにより変異の存在が見いだされた場合は、さらに外側のプライマーを作成して PCR 法で増幅し、内側のプライマ

Exon	Forward(F) and reverse(R) primers(5'-3')	Product size(bp)
1A	F: ctg tct gtt cca ttt gtc cct tgt cac cct tg R: cgg ggc tcc acg tgc tgc tgg gac	257
1B	F: tga gaa acc ggt gtc tgt cac tga ctg caa ag R: cca ggg aag gac aac gaa cgc atg g	274
2	F: ctg gct tgc agt ttg tgt tcc cta ag R: tct ggc tgc tgg tat gag tcc tgg tg	290
3	F: cca gct tga tag tga tga aat ggt ttc c R: cat cta gag cag gcc ctt agg aaa agt c	259
4	F: tat tgc tag tga gta tct caa tat ttg c R: tgt aag aat gaa act gat ctt gat gag g	314
5	F: gtg caa cat tgt ttc act gag aaa gac c R: tct cgc aac aga agt gag ctg aat aca c	224
6	F: tac caa taa aat att tct ccc agc ctt g R: cct atc tga ttg ctg aca ttt ctg cal c	280
7	F: taa tta gat att tgc ctt taa atg ggt c R: aac atg caa aca taa tgt aat ctt ctt c	209
8	F: ata aga att acc tga tga gta tgc cac c R: tta aag gtt gcg ctc taa tga gal g	249
9	F: atg gct taa aaa gga cat ttg taa tca g R: tca gag ggc agt caa taa gct aag g	310
10	F: tgc act tca ttt aaa ttg ttt gac tca g R: cat taa aac aaa aca caa ttc agg gaa c	211
11	F: atg att cta gat gag ctc tgc ggt gg R: gaa ccg agg tag tac aga aaa cac gat g	266
12	F: tag tgg aca ttt tta taa ttt ttg aaa c R: tga cgt cta tgc aga gag tga cag	267
13	F: cat gct ggg tac ttt taa ttg cac atc c R: agt ctc tac agt ggc agt gta tgc ttc c	248
14	F: gaa atg gca caa tta ggg aac agg taa g R: cag ttc ttt gaa ttt aac tct gag ggg c	220
15	F: cgt tgg gaa ttt ttc ttt tca ctg tca g R: tgg tat tca tga ctt ttg ttt tct cal c	300
16	F: tag gaa tta aaa tta aat atg tct tct tcc ac R: tac agt ttg taa cat tta cat aga tta atg gc	324
17A	F: ttg ggt tta att ttc cat aat ttg cct cta cc R: gga aaa gct ggg acg agg taa ggg g	289
17B	F: acc tgc agc ccg acc ttc cca cct g R: caa aaa cga tgg cga caa cag agg aca gca	261
17C	F: agc ctt acc cag ctt tcc ctt ttc ctt act tg R: ggg tga gct gct tct cga agt aat gaa cgg	272
17D	F: aac tct gga ccc acc ccc ttc agt cac c R: act gag aat gtc agc act gag tcc caa cgc	290
18	F: aat gtc tgg cat tgg agt ttg aaa cat tag R: gaa gat taa agt gtc ttt tca tgt gcc ctt ac	414
19	F: tat aaa aag tgg gtt ttc taa agt gct ttc R: aat cag tgc gac agg tct ttt cta att atg	267
20	F: cta cct ggc caa aat aca tga gta tat gac R: cgg gaa aag aac cct gtc tct tat tca g	261
21	F: tga taa ctt cat ggt cat tta aaa gtc cag R: tta ggt gac att gac atc aag taa ctc gcc	230

表 2 : *hPer3* 遺伝子の SSCP 解析に用いたプライマー。F; forward primer, R; reverse primer。

一を用いて直接核酸配列を決定した。
hPer3 遺伝子のエクソン 18 には 54 塩基が 4 回ないし 5 回繰り返す多型が認められたため、制限酵素 *Nco* I を用いた PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) 解析も併用した。

Hardy-Weinberg 平衡の検定、連鎖不平衡の検定にはそれぞれ Arlequin program (<http://lgb.unige.ch/arlequin/software/> より入手) を使用した。

C. 研究結果

概日リズム障害 36 例 (DSPS 23 例、N=24 13 例) を対象に *hPer3* 遺伝子の全翻訳領域及び隣接するイントロン領域を対象に SSCP 法で多型の検出を行ったところ、計 20 個の多型を検出した。その核酸配列を決定したところ、うち 6 個がアミノ酸配列の置換を伴う多型 (ミスセンス多型) であることが判明した。6 個のミスセンス多型のうち 5 個は single nucleotide polymorphisms (SNPs) であり、1 個は 18 アミノ残基をコードする 54 塩基の繰り返し配列が 4 回または 5 回繰り返す多型 (4-repeat/5-repeat 多型) だった。全被験者のゲノム DNA を対象にこの 6 個のミスセンス多型の分布を調べたところ、DSPS の一例のみに heterozygote として存在した 1 個を除き、他の 5 個は複数の被験者に認められた。その 5 個のうち、M1037T 多型及び 4-repeat/5-repeat 多型はともに第 18

エクソン上に存在したが、PCR-RFLP 法で繰り返し配列の数及び M1037 多型の有無を全サンプルについて調べたところ、M1037T 多型はすべて 4-repeat 多型を持つアレル上に存在する事が判明した (図 1)。複数の被験者に認められた 5 個の変異はコントロール群、全被験者群

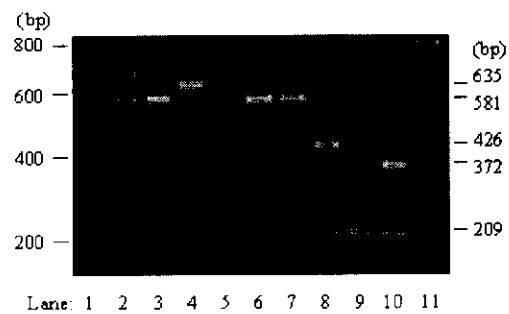


図 1 : PCR-RFLP 法によるエクソン 18 の多型解析。PCR 産物を制限酵素 *Nco* I で切断することにより、計 6 種類のパターンが出現した。レーン 1,11; 100bps のマーカー、レーン 2-4;制限酵素 *Nco* I での切断前の PCR 増幅断片、レーン 5-10; *Nco* I での切断後に現れた 6 つのパターン。

でそれぞれ Hardy-Weinberg 平衡から有意な逸脱を認めなかった。また、5 つの変異はそれぞれ連鎖不平衡の関係にあり、計 4 つのハプロタイプ (H1, H2, H3, H4) を形成していることが明らかになった (表 3)。

4 つのハプロタイプの分布をみると、H4ハプロタイプの頻度はDSPSでは7.3%で、正常コントロール群の1%と比較して優位に多かった (P=0.0062, Odds ratio=7.79)。4 つのハプロタイプ及び 2

Haplotype	Carrier frequency(%)			Haplotype frequency(%)		
	DSPS	N-24	Controls	DSPS	N-24	Controls
H1 haplotype	40/48(83.3)	28/30(93.3)	89/100(89.0)	62/96(64.6)	42/60(70.0)	137/200(68.5)
H2 haplotype	16/48(33.3)	7/30(23.3)	34/100(34.0)	19/96(19.8)	7/60(11.7)	39/200(19.5)
H3 haplotype	7/48(14.6)	10/30(33.3)	19/100(19.0)	8/96(8.3)	10/60(16.7)	22/200(11.0)
H4 haplotype	7/48(14.6) ^a	1/30(3.3)	2/100(2.0)	7/96(7.3) ^b	1/60(1.7)	2/200(1.0)

表3 : *hPer3* 遺伝子の各ハプロタイプの患者群、正常コントロール群での頻度

^aP=0.0055 vs controls, Bonferroni's correction P=0.033

^bP=0.0062 vs controls, Bonferroni's correction P=0.037

種類の疾患を対象とした Bonferroni の補正を行った後も有意な差が認められた (P=0.037)。従って、H4 ハプロタイプは DSPS 発症と相関があることが示唆された (論文印刷中)。

hClock 遺伝子についても翻訳領域を含む全エクソンを対象に解析を行い、ミスセンス多型 1 個及びサイレント多型 1 個の計 2 個の多型を見いだした。現在これら 2 個の多型に加え、朝型・夜型との相関が報告された T3111C 多型を対象に、全被験者に関して分布を調べているところである (投稿準備中)。

D. 考察

hPer3 遺伝子の H4 ハプロタイプを構成する多型のうち、2 個は H4 ハプロタイプのみに見られた。うち 1 個は脊椎動物の *Per* 遺伝子でよく保存されているアミノ酸残基の多型なので、DSPS 発症の危険因子となっている可能性が高いと考えられた。ただし、*hPer3* 遺伝子の発現調節領域やイントロンなどほかの領域に大きな機能変化を生じる多型が存在し、

H4 ハプロタイプはその多型と連鎖不平衡にある可能性も否定できない。

この多型は PER1 蛋白や PER2 蛋白で CK I ε 結合部位とされている領域と相同な領域に存在する。しかも、最近報告された PER2 蛋白のリン酸化部位に相当する部位の近傍にある。PER3 蛋白では未だ CK I ε によるリン酸化を証明した報告はないが、アミノ酸配列上の類似性から、PER3 蛋白も CK I ε によるリン酸化を受ける可能性は高い。また、kinase によるリン酸化はその標的部位のみならず、周囲のアミノ酸配列や蛋白の立体構造の影響を受けることを併せ考えると、この多型により PER3 蛋白のリン酸化が変化を受ける可能性が考えられる。この多型を持つ被験者のうち 2 人は正常コントロールであったので、CK I ε など他の遺伝子にも変異があり、その相乗効果で機能変化が顕在化する可能性も有ろう。

今後はこの多型が CK I ε 結合、あるいは CK I ε によるリン酸化に及ぼす影響を探る必要がある。

最近 *Per3* 遺伝子のノックアウトマ

ウスが作成・報告された。それによると、概日リズムは消失しなかったが、概日リズム周期が有意に短くなったという。PER3 蛋白の生体時計機構の中での機能については未だ詳細が判っておらず、PER1, PER2, CRY1, CRY2 蛋白と結合して細胞質から細胞核内へと移行させる働き、BMAL1/CLOCK による転写促進を押さえる働きが報告されているほか、生体時計内部で発生した概日リズムを外部へ伝える働きなどが想定されている。DSPS の発症については、光刺激に対する感受性の低下、概日リズム周期の延長、概日リズム周期と睡眠覚醒周期の結合の異常などが想定されている。今回見いだされた変異の機能を探っていくことで、DSPS 発症の過程や *Per3* 遺伝子の機能について更なる洞察が得られるものと思われる。

最近になり、ASPS の家系の一部について原因遺伝子が判明し、*hPer2* 遺伝子の変異が原因だったと報告された。既述したように、*hClock* 遺伝子の 3'非翻訳領域の多型が睡眠パターンの朝型・夜型と相関するとの報告もある。我々の見いだした変異に加え、これら生体時計関連遺伝子の多型の組み合わせにより、病的・生理的な概日リズムの個体差が生じている可能性が高い。

我々は今後も様々な生体時計関連遺伝子の変異を探り、概日リズムの個体差と遺伝子変異との相関を総合的に把握する。これにより、概日リズム障害の原因

究明、診断・治療法の開発のみならず、複数の原因が関与する多型性のある疾患の原因究明へのモデルとなることが期待される。

この研究は多施設共同研究であり、多くの研究者の協力のもとに行われている。以下に参加各施設及び研究者のリストを掲載する。

高橋清久 (国立精神神経センター)

梶村尚史、加藤昌明、関本正規、渡辺剛 (国立精神神経センター・武蔵病院)

内山真、渋谷佳代 (国立精神神経センター・精神保健研究所精神生理部)

亀井雄一、工藤吉尚 (国立精神神経センター・国府台病院)

上土井貴子 (熊本大学医学部)

金圭子 (東京女子医科大学医学部)

山田尚登、尾関祐二、大川匡子 (滋賀医科大学医学部)

三島和夫 (秋田大学医学部)

井上雄一 (順天堂大学医学部)

尾崎紀夫 (藤田保健衛生大学医学部)

石田直理雄 (通産省工業技術院・生命研)

長瀬隆弘、小原収 (かずさ DNA 研究所)

岩瀬利郎、池田正明、杉下真理子、豊嶋良一、山内俊雄 (埼玉医科大学医学部)

(順不同)

E. 結論

我々は、概日リズム障害患者を対象に生体時計関連遺伝子である *hPer3*, *hClock* 遺伝子の変異解析を行った。

hPer3 遺伝子のハプロタイプの一つは正常コントロール群と比較し、DSPS 群で約 7 倍の頻度で認められ、発症の危険因子の一つと考えられた。

F. 健康危険情報
なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Takashi Ebisawa, Makoto Uchiyama, Naofumi Kajimura, Kazuo Mishima, Yuichi Kamei, Masaaki Katoh, Tsuyoshi Watanabe, Masanori Sekimoto, Kayo Shibui, Keiko Kim, Yoshinao Kudo, Yuji Ozeki, Mariko Sugishita, Ryoichi Toyoshima, Yuichi Inoue, Naoto Yamada, Takahiro Nagase, Norio Ozaki, Osamu Ohara, Norio Ishida, Masako Okawa, Kiyohisa Takahashi, and Toshio Yamauchi. Association of structural polymorphisms in the human *period3* gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Reports*, in press, 2001.

2. Masaaki Ikeda, Wangjie Yu, Momoki Hirai, Takashi Ebisawa, Sato Honma, Kazunori Yoshimura, Ken-ichi Honma, Masahiko Nomura. cDNA cloning of a novel bHLH-PAS transcription factor superfamily gene, BMAL2: Its mRNA expression,

subcellular distribution, and chromosomal localization. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 275, 493-502, 2000.

3. 海老澤尚. 睡眠覚醒リズム障害と時計遺伝子、神経研究の進歩、第 44 巻、第 6 号、891-897, 2000.

4. 海老沢尚. 生体時計の分子機構—ストレスへの時間生物学的アプローチに向けて—、日本神経精神薬理学雑誌、20, 107-111, 2000.

5. 海老沢尚. 家族性致死性不眠症、Clinical Neuroscience, Vol.18, No.10, 94-95, 2000.

6. 海老沢尚. 生体リズム障害の分子生物学、臨床脳波、Vol.42, No.10, 629-633, 2000.

7. 海老澤尚. 睡眠覚醒リズム障害と遺伝子変異、自律神経、第 37 巻、第 2 号、158-162, 2000.

8. 海老澤尚. 概日リズム障害と遺伝子変異、脳と精神の医学、第 11 巻 1 号、1-7, 2000.

2. 学会発表

1. 池田正明、余旺節、平井百樹、海老沢尚、本間さと、吉村和法、本間研一、野村正彦. 時計遺伝子 BMAL1 にホモロジーのある新規 bHLH-PAS 型転写因子 BMAL2 のクローニング、第 23 回日本分子生物学会年会、神戸 (2000 年 12 月 14 日).

2. 海老沢尚、内山真、梶村尚史、三島

和夫、亀井雄一、加藤昌明、渡辺剛、関本正規、渋井佳代、金圭子、工藤吉尚、尾関祐二、杉下真理子、豊嶋良一、井上雄一、山田尚登、長瀬隆弘、尾崎紀夫、小原収、石田直理雄、大川匡子、高橋清久、山内俊雄。概日覚醒リズム障害とヒト *period3* 遺伝子多型との相関、第 7 回日本時間生物学会学術大会、東京 (2000

年 11 月 10 日)。

3. 海老沢尚. メラトニンと生体リズムの遺伝子機構—メラトニン受容体遺伝子研究から睡眠覚醒異常のゲノム解析へ—、日本睡眠学会第 25 回定期学術集会シンポジウム「生体リズム機構と分子生物学」、新横浜 (2000 年 6 月 8 日)。

平成 12 年度厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）
分担研究報告書

ヒト睡眠・概日リズム調節機能の老化過程とそのメカニズム

分担研究者 三島 和夫 秋田大学医学部精神科学講座助教授
草薙 宏明、松本 康宏 同上

研究要旨：蛍光標識した配列特異的オリゴヌクレオチドを用いた RT-PCR 法により、ヒト末梢循環白血球細胞を試料とした human period1 homolog 遺伝子 mRNA (hper1 mRNA) の定量法を確立した。ヒト末梢循環白血球細胞においても hper1 mRNA が発現していることが明らかになった。また、hper1 mRNA の発現量には、明期に高く暗期に低い日内変動が生じている可能性が示唆された。

A. 研究目的

本研究の目的は、睡眠・概日リズム調節機能の生理的及び病的老化過程とその発現メカニズムを解明し、効果的な睡眠調整法を開発することにある。

従来、生物時計である視交叉上核から、末梢生体器官へと至る概日リズムシグナルの伝達特性は、深部体温やメラトニン分泌等が安定的なリズム指標とされてきた。これらの指標は末梢効果器において生理学的マーカーとして測定可能なリズム表現型であり、かつ視交叉上核から各効果器への直接的な神経投射を介したリズム制御様式が明らかにされているものである。しかし、概日リズム変動はあらゆる生体機能に認められるものでありながら、圧倒的多数を占めるその他の末梢器官・細胞機能にみられる概日リズムを駆動・制御するメカニズム、すなわち視交叉上核から末梢組織への概日リズムシグナルの一般的な伝達メカニズムについてはほとんど明らかになっていない。

近年、齧歯類の培養繊維芽細胞や視交叉

上核スライスなどを用いた幾つかの基礎研究により、PER、CLOCK をはじめとする種々の時計遺伝子が視交叉上核以外の末梢組織細胞でも普遍的に発現し、かつ、その転写レベルが視交叉上核内での相同時計遺伝子の転写レベルと一定の位相関係を保ちつつ周期的に変動していることが報告された。これらの測定系をヒトに応用できれば、これまで不明であった視交叉上核から各種のヒト末梢生体組織への概日リズムシグナル伝達の様式や、痴呆疾患や各種の睡眠リズム障害患者における概日リズム障害の特性を遺伝子レベルで解析する道が開ける。

本研究では、若年成人、健常高齢者、及び、視交叉上核細胞の変性が生じやすいとされるアルツハイマー型老年痴呆患者を対象として、末梢白血球細胞内での時計遺伝子 mRNA の発現リズムを RT-PCR 法を用いて継続的に定量し、従来型の概日リズム生理指標と比較検証することで、その加齢特性、障害特性、及び概日リズム指標としての妥当性について検証する。

B. 研究方法

本年度は、候補時計遺伝子 mRNA のうち human period1 homolog 遺伝子 mRNA (Homo sapiens hper1 mRNA、GeneBank accession No.: AB002107) を末梢白血球から抽出し転写量を継続的に補足するための測定系の確立をめざした。

1) mRNA 抽出：採取した全血 2ml から 1500rpm×30 分の遠心分離により白血球分画を得た。既製の mRNA 抽出キット (Promega 社、PolyATtract System1000) を用いて mRNA を抽出後に逆転写を行い cDNA の状態でマイクロチューブに分注し、RT-PCR の施行まで -30℃ で凍結保存した。mRNA の抽出は各測定サンプルにつき独立した 2 名のテクニシャンにより duplicate で行われた。

2) RT-PCR：得られた cDNA を試料として、Roche 社のライトサイクラー V3 システムにより、抽出した mRNA の半定量的定量を行った。ライトサイクラー V3 システムは PCR 装置であり、増幅 1 cycle 毎の PCR をリアルタイムでモニターし、PCR 産物を間接的に定量することのできるものである。PCR モニタリングには、標的遺伝子の塩基配列に特異的に結合する 2 種類の蛍光標識オリゴヌクレオチドをプローブとして用いるハイブリダイゼーションプローブ法を採用した。この測定システムでは、PCR 産物に対して融解曲線分析を行うことにより、PCR 産物の同一性の確認と非特異的産物の識別を行うことが可能であるため、標的とする mRNA に関して情報をより特異的に捕らえることが可能である。蛍光標識オリゴヌクレオチドの作成は遺伝子研究所 (仙台) と共同で行い、

種々の PCR 条件 (温度条件、Mg 濃度等) での増幅率について検討した。

3) 上記の手法を用いて、基礎実験の結果から hper1 mRNA の発現が最大となることが期待される明期の中間点 (実験導入前 7 日間の平均入眠時刻の 12 時間後) に 10 名の健常成人 (平均年齢 28.5 歳) での hper1 mRNA の発現量を測定した。また、hper1 mRNA 発現量の日内変動に関する予備的検討として、健常若年者 2 名 (21 歳、20 歳、男性) を対象として、平均入眠時刻の 4 時間前から 6 時間おきに 24 時間 (5 ポイント) の持続採血を行い、hper1 mRNA 発現量を測定した。

なお、研究への参加協力の要請に際しては、研究の主旨、研究方法、倫理上の配慮等に関して十分に説明し、文書での同意を得た。研究過程で得られた血液、DNA、RNA 試料は測定後は速やかに廃棄し、遺伝情報と被験者との対照鍵は分担研究者のみ管理した。

C. 研究結果及び考察

1) PCR 用プライマー設計及び増幅試験

PCR 用プライマーの設計及び増幅試験を行い、以下のプライマーセットにより hper1 遺伝子領域の PCR 産物が安定的に得られることを、電気泳動及び直接シーケンスにより確認した。

hper1 遺伝子増幅用 primer

(upper) 5'-AgCAgCAgCCTCgTTTT-3'

(lower) 5'-CTCCTCCTCCATAgCCAAgT-3'

2) 検量線用の標準物質の作成

上記プライマーを用いて増幅・精製した PCR 産物を T-ベクター (Novagen 社) にライゲーションさせ、大腸菌にトランスフ

オームした。その後、既知の方法で、培養、プラスミドベクターの精製を行うことにより、*hper1* (30 μg/μl) の標準物質をた。

3) 蛍光標識オリゴヌクレオチド

hper1 遺伝子用蛍光標識オリゴヌクレオチドは、5'-ATggCCTgTgTggACTgTggg-3'-フルオレセイン、及び、LCRed-5'-gCAGCACCCAAgATCCTggTC-3'-p に設定し、種々の PCR 条件下での増幅率について検討を行った結果、安定的かつ再現性の高い増幅曲線が得られた。温度条件、Mg 濃度等の増幅条件の詳細は別報する。

4) 健常成人における *hper1* mRNA の発現

対象成人 10 名中 8 名において、平均入眠時刻の 12 時間後に採取した末梢白血球細胞において *hper1* mRNA の発現が認められた。図 1 は、代表的な 1 名の被験者において、上記の遺伝子増幅用プライマー、蛍光標識オリゴヌクレオチド、及び増幅条件を用いて行った RT-PCR の増幅曲線である。被験者サンプル (図 1a、曲線 X) は、設定した検量用標準物質の増幅曲線 (図 1a、曲線 A - E) のカバー領域内にあり、検量線 (図 1b) からその相対的転写量が算出できる。

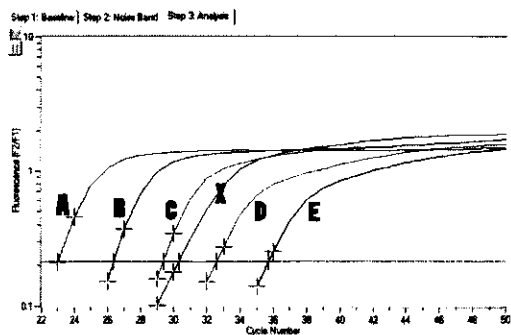


図 1a : サンプル(X) 及び標準物質 (A - E) の RT-PCR 増幅曲線

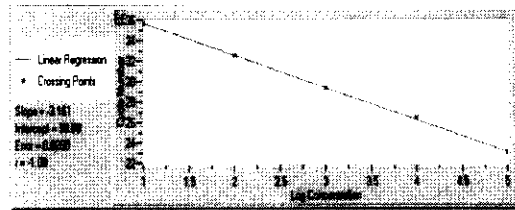


図 1b : 検量線

5) *hper1* mRNA 発現量の日内変動

図 2 に、健常成人 2 名で検出された *hper1* mRNA 発現量の日内変動を示した。この 2 名では、*hper1* mRNA 発現量は明期に高く暗期に低い相似した日内変動を示した。この際の mRNA 発現量の実測値は 2 名の測定者間で極めて高い一致が認められ、測定系の安定性が高いものと推測された。本研究で得られたヒト末梢循環白血球細胞内での *hper1* mRNA 発現の日内変動パターン (位相) は、齧歯類の視交叉上核細胞内での *per1* mRNA 発現のそれに極めて相似していた。

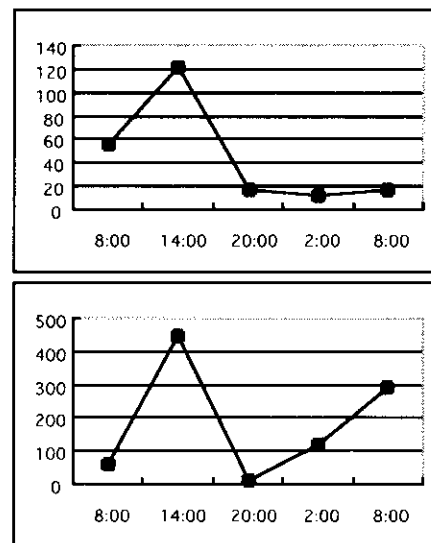


図 2 : 被験者 2 名での *hper1* mRNA 発現量の日内変動

D. 結論

齧歯類末梢組織細胞と同様に、ヒト末梢循環白血球細胞においても human period1 homolog 遺伝子 mRNA (hper1 mRNA) が発現していることが明らかになった。hper1 mRNA の発現量には、明期に高く暗期に低い日内変動が生じている可能性が示唆された。

E. 研究発表

1) 論文発表

- ・三島和夫: 生物時間の分子細胞機構－脳機能の時間統合メカニズム－「ヒト概日リズム調節の異常とその遺伝的側面」. 神経研究の進歩 2000; 44:856-867
- ・三島和夫: 冬季うつ病を光で治す－光と脳内神経機構, 光が招く生命科学・第5巻「光による医学治療」. 三宅養三編(日本光生物学協会編), 東京, 共立出版株式会社, 2000, pp16-35
- ・三島和夫: 老化、痴呆とサーカディアンリズム, 一般医のための睡眠臨床ガイドブック. 菱川泰夫, 井上雄一編, 東京, 医学書院, 2001, pp192-206
- ・Mishima K, Okawa M, Hozumi S, Hishikawa Y: Supplementary administration of artificial bright light and melatonin as potent treatment for disorganized circadian rest-activity, and dysfunctional autonomic and neuroendocrine systems in institutionalized demented elderly persons.

Chronobiol Int 2000; 17:419-432

- ・Mishima K, Okawa M, Shimizu T, Hishikawa Y: Diminished melatonin secretion in the elderly due to insufficient environmental illumination. J Clin Endocrinol Metab 2001; 86:129-34

2) 学会発表

- ・三島和夫. お年寄りの睡眠と生体リズム. 厚生労働省厚生科学研究脳科学研究事業研究成果発表会 市民公開講座「睡眠・生体リズムと私たちの健康」東京, 2001年2月.
- ・三島和夫. シンポジウム「老化と睡眠」: 痴呆性疾患における生体リズム障害とそのメカニズム. 第17回臨床神経生理東京談話会. 東京大学山上会館, 2000年6月.
- ・Mishima K. Sleep-waking disturbances in elderly. World Federation of Sleep Research Societies: 3rd International Congress. Dresden, Germany, October, 2000: .
- ・Tozawa T, Mishima K, Satoh K, Matsumoto Y, Shimizu T, Hishikawa Y. A LONGITUDINAL STUDY OF SLEEP STATE AND RHYTHM AMPLITUDE IN INSTITUTIONALIZED ELDERLY PEOPLE. 15th Congress of the European Sleep Research Society. Istanbul, Turkey, 2000 September.

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

ヒト睡眠・生体リズム障害における光同調機構

分担研究者 山田尚登 滋賀医科大学精神医学講座 助教授

研究要旨

ヒト生体リズム異常の病態解明及び新たな治療法を開発するために、①概日リズム睡眠障害における光同調機構について検討を加えた。実際には、これらの患者でメラトニンの抑制率を指標として光に対する反応性を検討した。また、高齢者において見られる生体リズム異常の病態を検討するために、高齢者においてもメラトニン抑制率を指標として光に対する反応性を検討した。更に、概日リズム睡眠障害患者において時間遺伝子の一つである *hper* 遺伝子の検討を行い、いくつかの変異を発見した。患者と正常被験者間で変異の割合に有意な差は見られなかったが、この変異は一般人において朝方・夕方指向性と関連していることを明らかにした。

A. 研究目的

ヒトにおける生体リズム異常に関連する疾患の病態解明及び新たな治療法を開発するために、①概日リズム睡眠障害及び高齢者における光同調機構について検討した。更に、②概日リズム睡眠障害患者において時間遺伝子 *hper* 遺伝子異常の検討を行った。

①光同調機構に関する検討では、

- 1 光照射が生体におよぼす影響
- 2 概日リズム睡眠障害における光感受性
- 3 メラトニンを指標とした加齢に伴う光感受性の変化、について調べた。

②概日リズム睡眠障害における時間遺伝子の検討では、

- 4 概日リズム睡眠障害における *hper* 遺伝子異常を調べた。

① 光同調機構光の検討

1 光照射が生体におよぼす影響

光照射が生体におよぼす影響には、メラトニン分泌抑制作用とメラトニン分泌リズムの位相への影響がある。1980年、Lewyらは2500ルクスの高照度光暴露が生体においてメラトニン分泌を抑制することを初めて報告した。また、1988年のBrainardらや1996年のMcIntyerらは、低照度でもメラトニンの産成を抑制し、かつ、分泌が抑制される量は照度に依存していると報告した。一方、光照射が生体の体温変化に与える影響については、1993年にMyersらによる異なる照度間で有意な差は認めないという報告や、Foretらによる1000ルクスの高照度においては体温を上昇させるとの報告等、未だ一致した見解を得るには至っていない。

我々は健常者に対して異なった照度の光を照射し、光の照度とメラトニン分泌の抑制率との関連を検討した。更に、光照射によるメラトニンの変化と深部体温の変化との関連を検討した。

2 概日リズム睡眠障害における光感受性

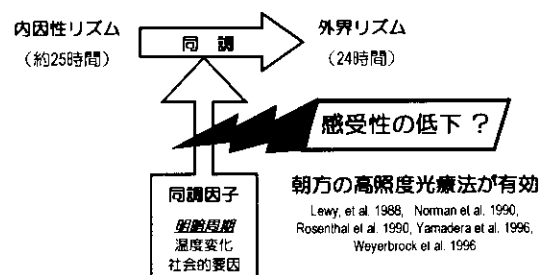
この障害は、患者の睡眠覚醒リズムと社会的な望ましい睡眠覚醒リズムとの間のずれによって引き起こされる睡眠障害の一群と定義されている。代表的な疾患として睡眠相後退症候群（Delayed Sleep Phase Syndrome, DSPS）がある。本疾患は、外界の24時間周期への同調がうまく行われず、睡眠相が望ましい時刻から遅れて固定した状態が慢性的に続き、睡眠相を前進させることが困難になり引き起こされる。睡眠の長さや構造は健常者とはあまり変わらない。患者は勤務・登校などのスケジュールに同調するために無理に起床するために、結果として慢性的な睡眠時間の短縮を招き過度の眠気・頭重感・食思不振・易疲労感・集中困難などを呈する。遅刻といった社会的な不適応によって二次的に抑うつ気分・自信喪失・意欲低下に至ることも多い。通常ヒトは、生体時計を明暗、温度、心理社会的な要因などの様々な同調因子によって、24時間より長い内因性の周期を外界の24時間周期に同調させている。DSPSは外界の明暗周期への同調がうまく行われなために生じており、その原因として外界の同調因子に対する感受性の低下が推定されてきた（図1）。

一方、同調因子の一つである高照度光は、その照射時刻に応じて生体時計の位相を前進させたり後退させたりする作用を有するが、高照度光療法の治療有効性は DSPS 患者でも同調因子を強めることにより外的環境

に同調させ得ることを示している。しかし、これまで DSPS において同調因子に対する感受性の低下を実際に調べた報告はない。

そこで、DSPS 患者において同調因子の一つである光に対するメラトニンの分泌抑制を指標として、同調因子に対する感受性を調べた。

図1

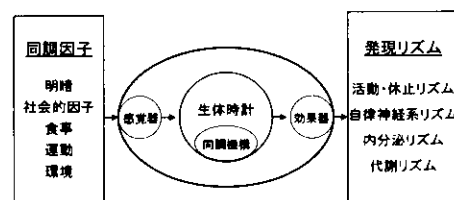


3 メラトニンを指標とした加齢に伴う光感受性の変化

加齢により睡眠やその他の生体リズムの変化が起こる。具体的なものには、

- 1) 睡眠障害
- 2) 体温リズムの変化
- 3) ホルモンリズムの変化がある。

図2



その原因として睡眠・覚醒中枢の器質の変化に加えて、睡眠・覚醒リズムの振幅減少および位相前進が認められることから概日リズム機構（図2）の機能変化が関与している可能性が示唆されている。しかし、これまで外界からの同調因子である光に対する感受

性の加齢変化については検討されたことがない。

そこで、光照射に対するメラトニンの分泌抑制を指標として、健常人において加齢による光感受性に関して若年者と比較検討を行った。

②概日リズム睡眠障害における時間遺伝子

4 概日リズム睡眠障害における hper 遺伝子

睡眠覚醒リズムをはじめとして、全ての生体機能は内因性のサーカディアンリズムを示す。近年、このサーカディアンリズムの産生に関与する生物時計の分子機構が次第に明らかにされ、ショウジョウバエの時計遺伝子である *dper* の人ホモログ *hper* が同定された。睡眠障害のなかでサーカディアンリズムの障害がその病因に深く関与すると考えられる疾患に概日リズム睡眠障害(睡眠相前進症候群、睡眠相後退症候群、非24時間睡眠覚醒障害)がある。今回我々は、概日リズム睡眠障害の患者において *hper* の遺伝子配列を検討し、更に、多型と睡眠習慣の関連を健常被験者において調べてみた。

B. 研究方法

①光同調機構

1 光照射が生体におよぼす影響

対象は滋賀県内在住の健常男子5名・年齢は27歳から40歳・平均年齢は33.6歳±6.6歳であった。

19時に夕食を摂取させ、これ以後、安静を保ち、20時に直腸温測定用のプローブを挿入した。21時より5時間、10ルクス以下の条件下で睡眠をとり、翌朝午前2時に起床させ、2時間光を照射した。照度は500,1000,2500,5000ルクスの4段階で、1人当たり4回、各照度実験の間少なくとも1週

間以上間隔をあけて行った。照射終了後、午前4時から2時間、50ルクス以下の暗条件にし、午前6時に測定を終了した。実験中は常に室温を25度に保ち、被験者は午前2時以降の覚醒時間中はソファーに座らせ、常に座位を保持させた。メラトニン測定のため唾液を30分間隔で採取し、採取後は直ちに遠心分離し、測定まで-80度で保存した。測定はブルマン社製のラジオイムノアッセイ・キットを用いて測定した。直腸温は、1分間隔で測定した。

(倫理面への配慮)

実験前に、実験の内容・目的・方法などについて説明し、文書による同意を得た。

2 概日リズム睡眠障害における光感受性

対象は、滋賀医科大学医学部附属病院精神科神経科を受診し、睡眠障害国際分類に基づいて診断されたDSPS患者15名(女性4名・男性11名)および、性別・年齢を一致させた正常被験者15名である。

実験は2つのセッションにより構成されており、第1セッション(各被験者における頂点位相の時刻の検索)と第2セッション(光によるメラトニン分泌の抑制)は、2週間の間隔をあけて行った。

第1セッション：被験者によって生体時計の位相が異なるので、各被験者に同じサーカディアン時刻に光を照射するため、各被験者のメラトニンリズムの頂点時刻を求めた。特に、DSPS患者のメラトニンリズムの位相は健常者に比較して大きく後退しているので、この時刻を予め調整する必要があった。21:00より翌朝06:00までの10ルクス以下の条件下で睡眠をとらせ、その間60分間隔で血液採取を行った。ラジオイムノアッセイによりメラトニンの測定を行い、メラトニンリ

ズムの頂点時刻を求めた。

第2セッション:第1セッションで得られたメラトニン頂点時刻の2時間前から頂点時刻に至る2時間の間1000 luxの光を照射し、この間メラトニン測定のための唾液を30分間隔で採取した。第1セッションと異なり、唾液を用いたのは被検者の侵襲を軽減するためであり、唾液中メラトニンの値が血清中メラトニンの値を十分反映していることは既に確認されていた。

メラトニンの基礎値の個人差が大きいため、光によるメラトニンの抑制の比較は測定開始時点の値を基準にして、その後の低下を百分率に換算した値を用いた。

(倫理面への配慮)

すべての被検者に対して研究の趣旨について十分に説明し、研究に対する同意を得た後に研究を開始した。本研究は滋賀医科大学倫理委員会の審査承認を得ている。

3メラトニンを指標とした加齢に伴う光感受性の変化

健常男性被検者16名(若年者群・高齢者群それぞれ8名ずつ)を対象とした。若年者群の平均年齢は25.0歳(SD=2.67)、高齢者群の平均年齢は65.0歳(SD=2.56)。すべての被検者は精神疾患および眼科疾患の合併がないことを実験前に確認している。方法は前項2と同様なプロトコールを用いた。

(倫理面への配慮)

すべての被検者に対して研究の趣旨について十分に説明し、研究に対する同意を得た後に研究を開始した。本研究は滋賀医科大学倫理委員会の審査承認を得ている。

②概日リズム睡眠障害における時間遺伝子

4概日リズム睡眠障害におけるhper遺伝子

10名の概日リズム睡眠障害患者より末梢

血の採血を行い、PBMCs(peripheral blood mononuclear cells)を収集した。mRNAを抽出しRT-PCR方を用いてcDNAを作成し、hper1遺伝子を増幅した。cDNAの翻訳領域の遺伝子配列を調べ、これまで報告されている配列(rigui)と比較した結果、5個所の変異を検出した。その中で、アミノ酸の置換を伴う個所が存在したため、次に12名の睡眠相後退症候群患者及び5名の非24時間睡眠覚醒障害患者及び20名の健常被験者に対してアミノ酸置換が見られた部位に関してのみ遺伝子配列を解析した。また、20名の健常被験者に対して、19項目のHorne-Ostberg朝方夕方尺度を施行した。

(倫理面への配慮)

すべての被検者に対して研究の趣旨について十分に説明し、研究に対する同意を得た後に研究を開始した。本研究は滋賀医科大学倫理委員会の審査承認を得ている。

C. 研究結果

①光同調機構

1光照射が生体におよぼす影響

結果を図4に示す。照度別に5人の被検者のメラトニン濃度平均をグラフに表している。経過時間を横軸にし、メラトニンの値は個人差があるため、測定開始時点つまり午前2時の値をゼロとして、その後の低下を百分率で縦軸に表示している。低下率の算出式は図3に示している。

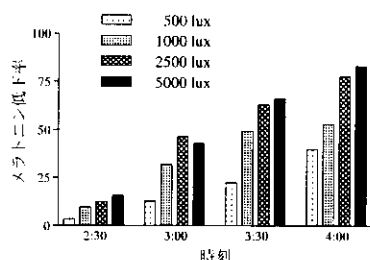
図3

$$\frac{\text{午前2時のメラトニン値} - \text{各時刻のメラトニン値}}{\text{午前2時のメラトニン値}} \times 100 \quad (\%)$$

メラトニン濃度を従属変数、照度または、経過時間を独立変数として、それぞれ、一元配

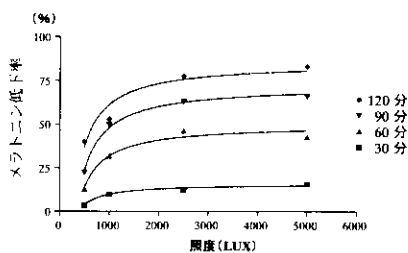
置分析を行った。まず、照度との関係について、時間の経過と共に有意な低下は認められた。また、経過時間について、2:00および3:00時には、有意な低下は認めなかったが、3:30および4:00において有意な低下を認めた。

図4



この結果を基にし、各時間帯における低下率を縦軸、照度を横軸にし、更にそれらの近似曲線を描くと図5となる。

図5



それぞれの近似曲線の式から (表1)、メラトニン抑制するための最低照度は、30分・60分・90分・120分照射でそれぞれ393ルクス・366ルクス・339ルクス・285ルクスとなった。

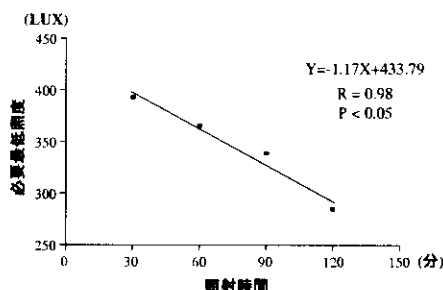
つまり、照射時間が60分の場合366ルクス、同様に120分の場合285ルクス以上あればメラトニンが低下すると推測される。逆に、これ以上低い照度では抑制はされないと予測される。

表1

照射時間	近似曲線式	B1	B0	r	P	最低照度
30分	$Y=B1/X+B0$	-6334	16.11	0.988	<.05	393 lux
60分	$Y=B1/X+B0$	-18310	50.03	0.981	<.05	366 lux
90分	$Y=B1/X+B0$	-24580	72.45	0.998	<.05	339 lux
120分	$Y=B1/X+B0$	-24400	85.53	0.965	<.05	285 lux

これらの数字を用いて横軸に照射時間、縦軸に予測される必要最低照度としたグラフを図6に示す。図のように唾液中のメラトニン濃度を抑制する為に必要と予測される最低照度は、その照射時間によって異なるということが明らかとなった。

図6



次に深部体温との関係について表2に示す。統計解析の結果、照度と体温変化・照射時間と体温変化との間には有意な関係は認められなかった。また、全ての照度において、唾液中メラトニン濃度と体温変化との間において有意な関係は認められなかった。

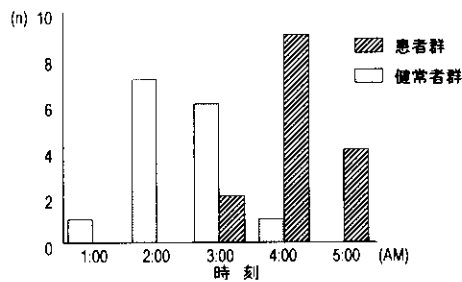
表2

光照射による深部体温への影響	
照度	F=0.292, df=2, P=0.747 (NS)
照射時間	F=0.845, df=8, P=0.565 (NS)
交互作用	F=0.146, df=16, P=1.000 (NS)
(ANOVA)	
メラトニンと深部体温との相関関係	
500lux	R=-0.715, P=0.175
1000lux	R=-0.275, P=0.654
2500lux	R=-0.393, P=0.513
(ピアソンの相関係数)	

2 概日リズム睡眠障害における光感受性

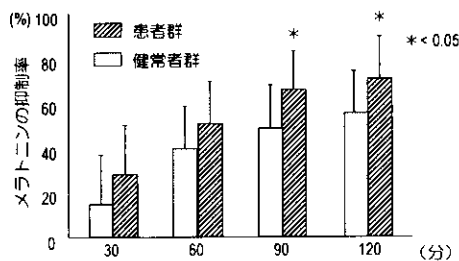
セッション1 (図7): メラトニンの最高値時刻は健常者群に比較して患者群の方が有意に後退していることが示された(患者群 4.1 ± 0.6 時、健常者群 2.5 ± 0.8 時、 $P < 0.001$)。

図7 夜間メラトニンの最高値時刻



セッション2 (図8): 各被験者で光によるメラトニン分泌抑制を repeated measures ANOVA により解析した結果、患者群・正常被験者群共に光照射により唾液中メラトニン濃度は低下し、その抑制率は時間の経過と共に増加した ($F=98.4$, $df=4$, $P < 0.001$)。更に、光による唾液中メラトニン濃度の抑制率は患者群の方が有意に高かった ($F=5.8$, $df=1$, $P < 0.05$)。

図8 メラトニンの光による抑制率



3 メラトニンを指標とした加齢に伴う光感受性の変化

1000 ルクスの光照射によって唾液中メラトニン濃度は若年者群・高齢者群共に有意に

低下し ($F=18.17$, $df=4$, $P < 0.001$)、照射2時間ではじめの値から若年者群で48.2%、高齢者群で70.7%の低下となった。唾液中メラトニン濃度の低下率は、若年者群に比べて高齢者群の方で有意に高かった ($F=4.67$, $df=1$, $P < 0.05$)。

図9 実測値による比較

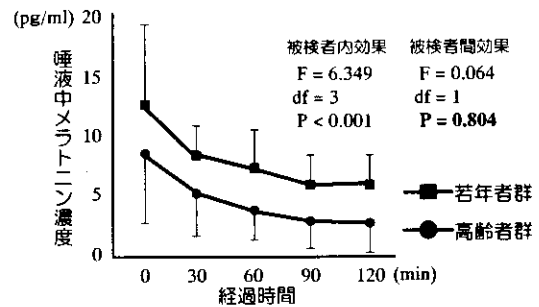
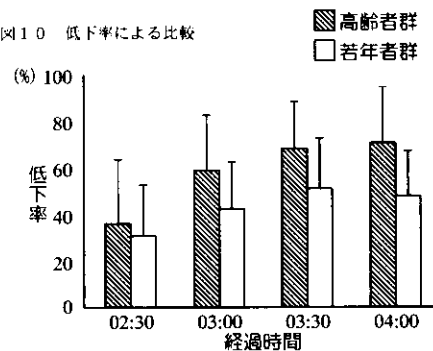


図10 低下率による比較

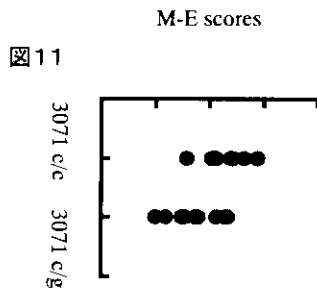


②概日リズム睡眠障害における時間遺伝子

4 概日リズム睡眠障害におけるhper遺伝子

5 個所の変異を検出した (a826a/c a1828g t2434t/c g2548g/a c3071c/g)。アミノ酸の置換を伴う個所 (c3071c/g, Pro→Ala) が存在したため、次に DSPS 患者及び N24 患者及び健常被験者に対してアミノ酸置換が見られた部位に関してのみ遺伝子配列を解析した。各々の変異の出現頻度に差はなかった。しかしながら、Horne-Ostberg の朝方・夜型尺度を一般被験者に行い hper 変異との関連を検討した結果、この置換が夕方傾向と有意な関

連があることが認められた($F = 5.41$, $df=1$, $p < 0.05$)。

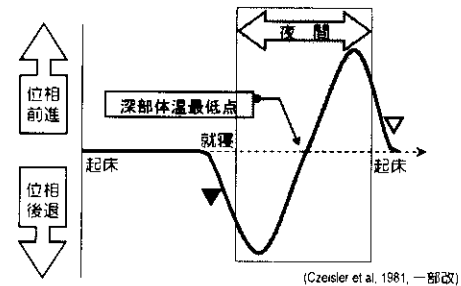


D. 考察

この研究によって唾液中のメラトニン濃度の抑制率は照度依存的に、また、照射時間依存的に抑制されることが確認された。次に唾液中メラトニン濃度を抑制する為に必要な最低照度は、その照射時間によって異なるということが確認された。一方、深部体温の変化には、照度の相違および時間因子との間には明らかな関連は認められなかった。すなわち、体温の変化はメラトニンのみではなく、別の要因も関与しているということが示唆された。

現在、ヒトの睡眠相と光との関係において位相反応曲線が提唱されている。これによると深部体温の最低点を中心として、その前後で光を浴びることによる位相反応が異なるとされている。図 1 2 に示したように、体温最低点より朝方に光を浴びると位相は前進し、逆に体温最低点より前に光を浴びると位相が後退すると言われている。これまで DSPTS の病因として、DSPTS 患者では生体時計の位相前進部分 (図 1 2 中▽) に異常があり、光などの同調因子に対する感受性が低下しているのではないかと考えられてきた。

図12 光による位相反応曲線模式図



本研究の結果、光に対するメラトニンの抑制は、健常群と比較して DSPTS 患者群の方がむしろ高く、これまでの推測とは逆の結果となった。即ち、DSPTS において光に対する過感受性が示唆された。更に、これらに結果から DSPTS 患者に見られる睡眠相の後退は、夕方の光による位相の後退が関与している (図 1 2 中▼) ののではないかとの可能性が示唆された。

高齢者群で若年者に比べてメラトニン抑制率がむしろ高かったことから、高齢者における睡眠・覚醒リズムの異常が同調因子の一つである光に対する感受性における低下に由来するものではないことを示している。メラトニン抑制率はむしろ亢進しており、加齢に伴い見られる位相の前進や振幅の低下は時計機構そのものの或いは発現機構の障害によるものと考えられる。

時間遺伝子に関しては、我々が見つけた変異以外にもこれまでに clock の変異が報告されており、これも睡眠習慣と関連性があることが認められている。

E. 結論

今回の結果から、光環境の調整を行うことで生体リズム異常に基づく睡眠障害の治療が行えることが明らかになった。更に、朝夕夜型に関連する遺伝子が存在する可能性が

明らかにされた。

F. 健康危険情報

夕方光は、あまり浴びない方が入眠に良い可能性が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

Aoki A, Ozeki Y, Yamada N: Hypersensitivity of Melatonin Suppression in Response to Light in Patients with Delayed Sleep Phase Syndrome. *Chronobiology International* Aug 4, 2001 (in press)

2. 学会発表

Yamada N, Ozeki Y, Aoki H, Aoki N, Nakajima S, Shiino Y: A hper1 genepolymorphysm associated with sleep habituation but not with circadian rhythm sleep disorders. *European Sleep Research Society (Istanbul)* September 12-16, 2000

H. 知的財産等の出願・登録状況

現在の所なし。