

研究発表

1. 論文

Iwase T, Kajimura N, Uchiyama M, Ebisawa T, Yoshimura K, Kamei Y, Shibui K, Kim K, Kudo Y, Katoh M, Watanabe T, Nakajima T, Ozeki Y, Sugishita M, Hori T, Ikeda M, Toyoshima R, Inoue Y, Yamada N, Mishima K, Nomura M, Ozaki N, Okawa M, Takahashi K, Yamauchi T: Mutation screening of the human Clock gene in circadian rhythm sleep disorders. *Psychiatry Res* 109: 121-128 (2002).

Yanagida H, Nakajima T, Kajimura N, Kato M, Watanabe T, Hori T, Takahashi K: Physical symptoms under forced phase advance treatment in a DSPS patient: a case report. *Psychiatry Clin Neurosci* 56: 219-220 (2002).

Nakajima T, Kajimura N, Kato M, Watanabe T, Hori T, Takahashi K: Napping predicts responsiveness to hypnotics in primary circadian rhythm disorder patients. *Psychiatry Clin Neurosci* 56: 231-232 (2002).

中林哲夫, 梶村尚史: 睡眠・覚醒障害をどうするか? : 高照度光療法 今月の治療 10: 71-75 (2002).

梶村尚史: 生体リズムとしての睡眠の

メカニズム *Pharma Medica* 20: 21-25 (2002).

梶村尚史: 睡眠障害の診断・治療 Q&A : 睡眠障害と治療の基本 (内山 真, 土井永史 監修). 診療新社 pp135-144 (2002).

梶村尚史: 第IV章 睡眠障害治療に使われる薬物 1 睡眠薬の基礎 臨床医のための睡眠・覚醒障害ハンドブック (大川匡子, 内山 真 編) メディカルレビュー社 pp126-134 (2002).

Kajimura N, Uchiyama M, Takayama Y, Uchida S, Uema T, Kato M, Sekimoto M, Watanabe T, Nakajima T, Horikoshi S, Ogawa K, Nishikawa M, Hiroki M, Kudo Y, Matsuda H, Okawa M, Takahashi K: Functional neuroanatomy of human non-rapid eye movement sleep-a study using a positron emission tomography. *Excerpta Medica International Congress Series*. In Hirata K, Koga Y, Nagata K and Yamazaki K (eds) Amsterdam: Elsevier Science, pp 801-805 (2002).

梶村尚史: 睡眠障害の対応と治療ガイドライン 分担執筆 (内山 真 編) じほう, 東京 (2002).

2. 学会発表

中島 亨, 梶村尚史, 中林哲夫, 堀 達,
加藤昌明, 渡辺 剛, 高橋清久: 難治
性熟眠障害に対するカルシトニン注の効果
第 23 回日本生物学的精神医学会,
さいたま 4.12, 2002.

Watanabe T, Kajimura N, Kato M,
Sekimoto M, Nakajima T, Hori T,
Takahashi K, De Carli F, Ferrillo F:
Altered sleep structure in DSPS
patients. 16th Congress of the
European Sleep Research Society,
Reykjavik, 6.3-7, 2002.

中島 亨, 梶村尚史, 中林哲夫, 堀 達,
加藤昌明, 高橋清久, 渡辺 剛: カル
シトニン筋肉内投与時の体温変化 第27
回日本睡眠学会定期学術集会 仙台 7.5,
2002.

Watanabe T, Kajimura N, Kato M,
Sekimoto M, Nakajima T, Hori T,
Takahashi K,

F. De Carli, F. Ferrillo: Disturbi
del sonno e del ritmo circadiano in
pazienti con sindrome da ritardo

di fase. 11th Congresso Nazionale,
Associazione Italiana Medicina del
Sonno, Pisa, Italy, 10.17, 2001.

吉田統子, 梶村尚史, 中林哲夫, 堀 達,
加藤昌明, 佐々木征行, 加我牧子, 高橋

清久,

中島 亨, 土井由利子, 渡辺 剛: 概
日リズム睡眠障害と精神疾患との関連:
武蔵病院リズム障害専門外来における調
査結果について 第 9 回日本時間生
物学会学術大会 名古屋 11.14, 2002.

堀 達, 梶村尚史, 中林哲夫, 吉田統子,
中島 亨, 渡辺 剛, 高橋清久: 長期
に光療法を施行した DSPS 患者 2 例の PSG
と体温リズムの検討 第 9 回日本時間生
物学会学術大会 名古屋 11.15, 2002.

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）

分担研究報告書

ヒト睡眠・生体リズム障害の病態と治療予防法開発に関する基盤研究

分担研究者 海老澤 尚 埼玉医科大学神経精神医学教室講師

研究要旨；

概日リズム障害を対象に、生体時計遺伝子の一つであり、ハムスターの概日リズム変異体である *tau* 変異体の原因となる *Casein kinase I epsilon (CK I ε)* 遺伝子の多型解析を行った。ヒト *CK I ε* 遺伝子からミスセンス多型 1 個を含む計 4 個の多型を見いだした。うちミスセンス多型は概日リズム障害群での保有率が正常群の約半分と少なく、概日リズム障害の発症危険率を下げる働きをしていると考えられた。同多型を持つ *CK I ε* 蛋白の酵素活性は、野生型の蛋白に比べて約 1.8 倍の活性を示し、この酵素活性の変化が概日リズム障害の発症を妨げる働きに関与していると考えられた。また、既に報告済みである、非 24 時間睡眠覚醒症候群に多く出現するメラトニン 1A 受容体の R54W 多型について更に詳細に解析し、R54W 多型により受容体と G 蛋白との結合性が変化していることを見出した。

A. 研究目的

概日リズム障害の病因を解明するため、ヒトの時計遺伝子の多型解析を行って疾患の発症に関与する多型を見だし、その機能変化を調べる。疾患の原因究明や診断・治療法の開発、概日リズムの個体差を理解し、概日リズムの個人差に適した生活・就労スケジュールの確立に役立てる。

B. 研究方法

対象：

概日リズム障害患者 137 名(睡眠相後退症候群 98 名、非 24 時間睡眠覚醒症候群 39 名)及び正常被験者 138 名。

多型解析：

被験者から採取した静脈血から QIAGEN Blood & Cell Culture DNA Midi Kit 又は QIAamp DNA Blood Maxi Kit を

用いてゲノム DNA を抽出した。DDBJ に登録されている、ヒト Casein kinase I epsilon (CK I ϵ) のゲノム DNA (AL020993) 及び cDNA (AB024597) 配列から CK I ϵ のエクソン・イントロン構造を決定した。その構造に基づき、CK I ϵ の全翻訳領域を含むエクソン及びその近傍のイントロン領域を PCR 法により増幅するためのオリゴヌクレオチドを 9 組計 18 本合成した。各オリゴヌクレオチドは Fluorescein でラベルした。PCR 増幅断片を、5%グリセロールを含むもの、含まないものの 2 種類の Single strand conformation polymorphism (SSCP) ゲルで電気泳動し、島津社製 DNA シーケンサー-DSQ-500S で DNA バンドを検出した。泳動パターンの変化から遺伝子多型の存在が示された領域についてはその領域を含む更に広い領域を増幅する別の PCR プライマーを合成し、PCR 産物を QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) で精製し、直接シーケンスしてその多型の位置を特定した。直接シーケンスによって核酸配列の欠失が認められたサンプルについては、PCR 法で増幅した DNA 断片を pGEM-T Easy vector (Promega) に挿入し、組み換え体プラスミドを複数シーケンスしてその配列を確定した。

全サンプルを対象とするミスセンス多型の有無の検索には、SSCP 法その他、denaturing high performance liquid

chromatography (DHPLC) 法も用いた。DHPLC 法には、Transgenomic 社製 WAVE DNA Fragment Analysis System を用いた。PCR 増幅断片を加熱変性させてから DNASep Column に打ち込み、acetonitrile グラジエントで heteroduplex を分離した。多型が検出された場合、PCR 産物の直接シーケンスでその位置を確認した。

酵素活性の解析：

ヒト CK I ϵ と 99.5% の相同性を持つラット CK I ϵ cDNA に PCR 法を使ってミスセンス多型を導入した。その cDNA を発現ベクター pcDNA3 (Invitrogen) に挿入し、COS-7 細胞を使って *in vivo* での酵素活性の解析 (pulse-chase analysis) を行った。また、発現ベクター pGEX4T-3 (Pharmacia) に挿入し、大腸菌 BL21(DE3) で蛋白を発現させ、精製してから α -casein を基質として *in vitro* での酵素活性も測定した。酵素解析は大阪大学蛋白質研究所 高野敦子、磯島康史両氏によって行われた。

メラトニン 1A 受容体の機能解析：

ヒトメラトニン 1A 受容体 cDNA を発現ベクター pcDNA1.1 (Invitrogen) に挿入し、G 蛋白のキメラ cDNA と共に COS-1 細胞で発現させた。培養細胞に 1nM のメラトニンを作用させ、細胞内の cAMP 量を測定した。G 蛋白のキメラ

cDNA は、G α s 蛋白の cDNA の C 末端側 5 アミノ酸残基をコードする配列を、それぞれ G α i1/2, G α i3, G α q/11, G α 12, G α 13, G α 14, G α 16, G α o, G α z 蛋白の C 末端 5 アミノ酸残基をコードする核酸配列に置き換えたもので、それぞれの C 末端アミノ酸残基配列により G 蛋白結合性受容体に対する結合の選択性は保存されているが、一旦結合すれば、受容体の種類を問わず N 末端側の G α s 蛋白の働きで cAMP の産生が増加する。つまり cAMP の増加の有無を調べることにより、対象となる受容体がどの G α 蛋白と結合するか知ることができるシステムである。これら G 蛋白のキメラ遺伝子は慶応大学薬理学教室西本教授より提供を受けた (Komatsuzaki K et al. FEBS Lett 406; 165-170; 1997)。

ヒトメラトニン受容体遺伝子及び G 蛋白のキメラ遺伝子を FuGENE6 (Roche) を用いて COS-1 細胞に導入し、3 日後に 1nM のメラトニンを作用させて細胞内 cAMP 量の変化を測定した。cAMP の測定には cAMP-Screen ELISA for cAMP (ABI) を用いた。

(倫理面への配慮)

本研究は参加各施設の倫理委員会の承認を受けており、被験者には研究内容・研究対象となることを断ってもその患者の不利にならないこと、いったん同

意してもいつでも断れることなどをよく説明し、文書による承諾を得ている。研究対象者の個人情報厳密に守られている。患者に与える苦痛は採血時の疼痛であるが、なるべく少なくするよう注意している。「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」(平成 13 年 3 月 29 日 文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号) を遵守している。

C. 研究結果

ヒト CK I ϵ の全翻訳領域を対象として、PCR-SSCP 法及び PCR 産物の直接シーケンス法で遺伝子多型を検出したところ、計 4 個の多型が検出された。うち 1 個のみがアミノ酸配列の置換を伴う多型 (ミスセンス多型) だった。同ミスセンス多型の有無を全被験者を対象に調べたところ、正常被験者に比べ、DSPS 群、N-24 群での保有者の頻度がそれぞれ約半分と有意に少なかった。つまり、この多型は概日リズム障害発症の抑制因子として機能している可能性が示された。

次に、この多型が CK I ϵ の酵素活性の変化をもたらすか調べるため、cDNA を発現ベクター pcDNA3 に挿入し、pulse-chase 解析で *in vivo* での酵素活性の変化を調べたが、特に変化は認められなかった。次に *in vitro* での酵素活性を調べるため、cDNA を発現ベクター pGEX4T-3 に

挿入して大腸菌に導入し、glutathione-S-transferase(GST)-tagged 組み換え蛋白を産生させ、精製した蛋白を使って酵素活性を調べたところ、多型を持つ蛋白の方が持たないものに比べて約 1.8 倍の高い酵素活性が認められた。

また、メラトニン 1A 受容体の R54W 変異が G 蛋白との結合に変化を生じるか調べるため、メラトニン 1A 受容体 cDNA に R54W 変異を導入し、発現ベクター pcDNA1.1 に挿入して G 蛋白のキメラ cDNA と共に COS-1 細胞に導入し、1nM のメラトニンを作用させて細胞内の cAMP の変化を調べた。Gi1/2, Gi3 のキメラ遺伝子と共発現させた場合の cAMP の変化量は、R54W 変異を持つ cDNA の方が野生型よりやや多いか同等だったが、Gq/11 等と共発現させた場合の cAMP 産生量は R54W 多型を持つ cDNA の方が有意に少なかった (図 1)。

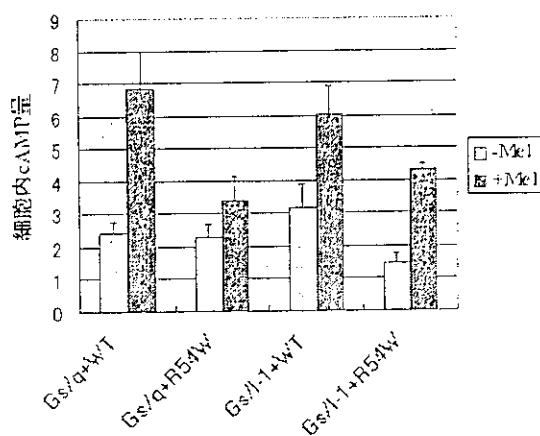


図 1. 野生型 (WT) 及び R54W 変異を持つ(R54W)ヒトメラトニン 1A 受容体と G 蛋白キメラとの結合

D. 考察

ヒトを含むほ乳動物の概日リズムを形成する際中心的役割を果たす遺伝子、「時計遺伝子」が現在までに約 10 個見つかっている。*Per1*, *Per2*, *Per3*, *Clock*, *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2*, *CK I ε* などの遺伝子であるが、それぞれの産物が互いの転写・翻訳を介してのフィードバックループを形成し、概日リズムを生み出すことが判明している。CLOCK, BMAL1 蛋白は互いに結合して 2 量体を形成し、*Per1/2/3*, *Cry1/2* 遺伝子の上流部分にある E-box 配列に結合し、それぞれの遺伝子の転写を促進する。発現した遺伝子から翻訳された PER1/2/3, CRY1/2 蛋白は逆に CLOCK/BMAL1 による遺伝子の転写を抑制する。CK I ε はこれらの蛋白をリン酸化し、細胞内での局在や蛋白の安定性に影響を与える。

CK I ε 遺伝子が初めて概日リズム形成に重要と判明したのは、1998 年のショウジョウバエの概日リズム変異体、*doubletime (dbt)* 変異体の発見によるのである。*Dbt* 遺伝子はその変異によりショウジョウバエの概日リズム周期を短縮・延長・消失させる原因遺伝子として見つかったが、その構造がほ乳動物の *CK I*

ϵ 遺伝子に似ていたことから、ほ乳動物の $CK I \epsilon$ 遺伝子も概日リズム形成に重要な役割を果たしていると考えられた。2000 年には、既に報告されていたハムスターのリズム変異体である *tau* 変異体の原因が $CK I \epsilon$ 遺伝子の変異で有ることが判明し、 $CK I \epsilon$ がほ乳動物の時計遺伝子であることが証明された。2001 年に家族性睡眠相前進症候群の原因が時計遺伝子の一つ *Per2* 遺伝子の S662G 変異であることが判明したが、この変異により PER2 蛋白が $CK I \epsilon$ から受けるリン酸化が阻害されることが明らかになった。また、我々は *Per3* 遺伝子の H4 ハプロタイプが DSPS 発症の危険因子であることを報告したが、H4 ハプロタイプを構成する多型の一つは PER3 蛋白が $CK I \epsilon$ によりリン酸化を受ける標的部位のすぐ近傍にあり、やはりリン酸化に変化が生じると推定された。

このようにほ乳動物の生体時計機構のなかで $CK I \epsilon$ 遺伝子は重要な役割を果たしており、そこに多型が有れば概日リズムに変化が生じる可能性が高いと考えられた。

そこで我々はヒト $CK I \epsilon$ 遺伝子の全翻訳領域を対象に多型解析を行い、ミスセンス多型 1 個を含む複数の多型を見いだした。このミスセンス多型は、正常被験者群の約 20% に認められたが、概日リズム障害群 (DSPS 及び N-24) では約

10% にしか認められず ($P=0.013$)、概日リズム障害の発症を抑制する作用を持つことが推定された。このミスセンス多型は各脊椎動物の $CK I \epsilon$ 、及び $CK I \epsilon$ と類似の構造を持つ $CK I \delta$ で良く保存されているアミノ酸であり、また、 $CK I \epsilon$ の機能に重要な役割を果たす領域に存在したことから、機能変化をもたらす可能性が高いと考えられた。そこで我々は、大阪大学蛋白質研究所の高野・磯島両氏と共同研究を行い、酵素活性の変化を調べたところ、大腸菌により *in vitro* で合成されたミスセンス多型を持つ $CK I \epsilon$ 蛋白は、野生型のそれと比較して約 1.8 倍の活性を持つことを見出した。この活性の変化が、概日リズム発症の抑制に何らかの役割を果たしていると考えられた。(投稿準備中)

また、我々は既にメラトニン 1A 受容体遺伝子から複数の多型を検出し、うち R54W 多型が N-24 に高頻度で認められ、受容体の性質を変化させる (B_{max} を約 3 分の 1 に、 K_d を約 3 分の 2 にする) ことを報告した。今年度はこの R54W が受容体と G 蛋白との結合に影響を及ぼし、細胞内刺激伝達系に影響を与えるか詳細に検討した。その結果、R54W 変異を含むメラトニン 1A 受容体は、野生型に比べ、 G_i 蛋白との結合性は野生型とほぼ同じかやや増加し、 G_q 蛋白との結合性は有意に減少していた。R54W 変異を

持つ受容体は野生型と比較して培養細胞で人工的に発現させた場合の発現量が少ないため、単純に比較することはできないが、我々の得た結果は、R54W 変異により少なくとも Gi, Gq 蛋白に対する結合性が相対的に変化することを示していると考えられる。今後 R54W 変異を持つメラトニン 1A 受容体を stable に発現する細胞株を樹立し、更に詳細に細胞内刺激伝達系に生じる変化を探る必要があると思われる。

これら一つ一つの時計遺伝子の多型と概日リズム障害や概日リズムの個体差との相関を調べ、その多型がもたらす機能変化を調べていくことにより、遺伝子の差異がヒトの概日リズムにどのような影響を与えるか総合的に把握することが可能と思われる。このことは、ヒトの概日リズムの個体差に応じた生活・就労スケジュールの策定などストレスや事故の少ない健康的な生活を送ることを可能にするばかりでなく、ヒトの精神・行動に遺伝子多型がどのように影響を与えるのか、着実な理解につながるものと期待される。

この研究は以下の研究者の協力を得て行われた。

内山真、渋井佳代、金圭子（国立精神神経センター・精神保健研究所精神生理部）、梶村尚史、加藤昌明、渡辺剛、中

島亨、堀達（国立精神神経センター・武蔵病院）、亀井雄一、工藤吉尚（国立精神神経センター国府台病院）、高橋清久（国立精神神経センター）、三島和夫（秋田大学医学部精神科）、井上雄一（順天堂大学医学部精神科）、北島剛司、尾崎紀夫（藤田保健衛生大学医学部精神科）、山田尚登、尾関祐二、大川匡子（滋賀医科大学医学部精神科）、高野敦子、磯島康史、永井克也（大阪大学蛋白質研究所）、西本征央（慶応義塾大学医学部薬理学）、長尾真理子（埼玉県立精神保健総合センター）、豊嶋良一、山内俊雄（埼玉医科大学医学部神経精神科）

E. 結論

時計遺伝子の一つである *Casein kinase I epsilon (CK I ε)* 遺伝子から、概日リズム障害の発症を抑制する働きを持つと思われるミスセンス多型を見いだした。同多型は、*in vitro* での CK I ε の酵素活性を約 1.8 倍に増加させ、これが概日リズム障害への影響に関わると考えられた。また、N-24 で多くみられるメラトニン 1A 受容体の R54W 変異は、受容体と各 G 蛋白との結合性を変化させることを突き止めた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kohtoku Satoh, Kazuo Mishima, Yuichi Inoue, Takashi Ebisawa, Tetsuo Shimizu. (2003) Two pedigrees of familial advanced sleep phase syndrome in Japan. *Sleep*. In press.
- 2) 海老澤 尚 (2003) 概日リズムと睡眠障害—時計遺伝子からみた睡眠障害、医学のあゆみ、204(11), 799-802.
- 3) 海老澤 尚 (2003) 体内時計機構の分子医学、*Molecular Medicine*, 40(3), 318-325.
- 4) 海老澤 尚 (2002) 時計遺伝子の発見と時間生物学、*精神科*、1(5), 382-387.
- 5) 海老澤 尚 (2002) 時計遺伝子と睡眠覚醒障害、*脳と精神の医学*、13(3), 289-295.
- 6) 海老澤尚 (2002) 概日リズム障害の遺伝子解析、*内分泌・糖尿病科*、14(4), 408-413.
- 7) 海老澤 尚 (2002) 生体リズム障害の分子生物学的背景、*Prog.Med.*、22, 1385-1389.
- 8) 海老澤 尚 (2002) メラトニン受容体および時計遺伝子多型と概日リズム障害、*現代医療*、34, 63-67.

2. 学会発表

(特別講演、シンポジウム)

- 1) 海老澤尚 (2002.12.20-21) ヒトの概日リズムと時計遺伝子の多型、基礎生物学研究所共同利用研究会・動物行動プログ

ラムの遺伝・生物学的基盤、岡崎。

- 2) 海老澤尚 (2002.11.14-15) 季節性感情障害や睡眠リズム異常とヒト時計遺伝子多型、第9回日本時間生物学会シンポジウム「遺伝子発現と治療薬からみた体内時計研究」、名古屋。

- 3) 海老澤尚 (2002.4.10) 時計遺伝子と睡眠覚醒障害、第24回日本生物学的精神医学会・若手企画シンポジウム、埼玉。

(学会一般発表・研究会報告)

- 1) Takashi Ebisawa, Toshio Iwase, Naofumi Kajimura, Makoto Uchiyama, Kimio Yoshimura, Yuichi Kamei, Kayo Shibui, Keiko Kim, Yoshinao Kudo, Masaaki Katoh, Tsuyoshi Watanabe, Toru Nakajima, Yuji Ozeki, Mariko Nagao, Toru Hori, Masaaki Ikeda, Ryoichi Toyoshima, Yuichi Inoue, Naoto Yamada, Kazuo Mishima, Masahiko Nomura, Norio Ozaki, Masako Okawa, Kiyohisa Takahashi, and Toshio Yamauchi (2002.5.22-26) Mutation scanning of the human *clock* gene in circadian rhythm sleep disorder patients and control subjects. 8th Meeting, Society for Research on Biological Rhythms (一般発表), Florida.

- 2) 海老澤尚、三島和夫、佐々木司、内山真、梶村尚史、長尾眞理子、南光進一郎、大川匡子、高橋清久、山内俊雄 (2002年4月11日) 季節性感情障害における時計遺伝子多型の解析、第24回日本生物学的精神医学会、埼玉。

II. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

ヒト睡眠・生体リズム障害の病態と治療予防法開発に関する基盤研究

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

ヒト時間遺伝子 *hper2* のリン酸化に関与するカゼインキナーゼ Jε 結合領域は、家族性睡眠相前進症候群を引き起こす部位として注目されている。この部位のポリモルフィズムを 88 名の気分障害患者と 127 名の正常対象者で検討した。この領域において見つけられた 4 つのポリモルフィズムの内、アミノ酸置換を伴うことが予想される S662G を調べたが、両群間に有意な差は認められなかった。また、61 名の気分障害患者と 144 名の正常対象者でヒト時間遺伝子 *hper1* の全転写領域の変異を検索し、5 つのポリモルフィズムを見つけた。その内、アミノ酸置換を伴う C3071G のポリモルフィズムの頻度を両群間で比較検討した。しかし、両群間に有意な違いは見いだせなかった。これらのことから、少なくとも *per1*, 2, のこれらの疾患に対する関連性は低いと考えられる。

一般成人 450 名にピッツバーグ睡眠質問紙を配布し記入してもらった。また、朝唾液を採取し、クロモグラニン A の濃度を測定し、それと睡眠障害の関連性を調べた。その結果、クロモグラニン A は不眠と軽度の関連性が認められ、特に、夜間にトイレなどで起きるなどの項目で高い相関が得られた。不眠時には夜間の交感神経系活動が減少しないため、早朝のクロモグラニン A の上昇がもたらされた可能性があり、これが不眠の客観的な生理学的指標となる可能性が示された。

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検査・治療法を開発するために、①概日リズム

ム睡眠障害及び気分障害における時間遺伝子のポリモルフィズムについて検討を加えた。また、②一般成人に睡眠に関する質問紙を配布し、同時に睡眠

障害の指標として末梢において交感神経系を反映するとされているクロモグラニンA (chromogranin A) の唾液中濃度を測定し、不眠の指標となり得ないかどうかを検討した。

①概日リズム睡眠障害における時間遺伝子

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 *period* 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。また、気分障害、特に双極性障害では早朝覚醒や再発に周期性がみられるなどの臨床症状から病因や病態生理に生体リズムの異常の関与が考えられており、これらの患者の体温やメラトニンなどの生理学的指標に基づいた検索からも生体リズムの異常が示唆されている。今回我々は、概日リズム睡眠障害や気分障害の患者において *hper 1* 及び *hper 2* における遺伝子の異常がないかを検討してみた。

②唾液中クロモグラニンAと睡眠障害

クロモグラニンAは、副腎髄質クロム親和性細胞から見いだされた可溶性タンパク質であるが、近年ストレスとの関連で注目されている。末梢の交感神経系の活動を反映すると考えられており、唾液中で測定可能である。睡眠障害においては、不眠のため交感神経系の夜間の低下が減少していることが予想されるため、睡眠と唾液中クロモグラニンAとの関連性を調べることは興味ある課題である。我々は、質問紙を用い睡眠の状態を把握すると共に同時に唾液中のクロモグラニンAの測定を行った。

B. 研究方法

①概日リズム睡眠障害における時間遺伝子

a) 双極性障害におけるカゼインキナーゼ I エプシロン (CKI ϵ) 領域のポリモルフィズム

滋賀医科大学附属病院精神科神経科に入院または外来通院した88名の双極性障害患者及び127名の健常被験者を対象とした。対象となった全ての健常被験者は精神疾患の既往歴がなく、過去にいかなる投薬も受けていなかった。全ての双極性障害患者はDSM-IVにて診

断された。気分障害患者の23名は男性で65名は女性であった。尚、本研究は滋賀医科大学倫理委員会の承認を受けており、研究開始前に、全ての患者からインフォームドコンセントが得られている。被験者より得られた血液からDNAが抽出された。Per2遺伝子のCKI ε結合領域は17番目のエクソンに存在するため、その部位を増幅するための特異的プライマー (5'-CTGGGCCAGAGCATCTGTGGGA-3' と 5'-CTGGGCCCTGGCTGGCCGCA-3) を作成し、PCRにより増幅した。同様に、(5'-GGCACTGGGTGTTCGGTTTCTC-3' と 5'-CCCCTATCGGGCTATGGTGGGA-3') を用いて nested PCRを行い、シーケンスを行った。

統計はFisher exact test を用いてジェノタイプ及びアレルの分布において両群間に差がないか検討を加えた。

b) 双極性障害におけるhper1のポリモルフィズム

滋賀医科大学附属病院精神科神経科に入院または通院した61名の双極性障害患者と144名の健常被験者を対象とした。20名の患者と20名の被験者から血液を採取し、DNAを抽出した。そのcDNAを作成しその全領域をシーケンスした。その結果5つの変異を見つけたが、その内でアミノ酸置換(c3071c/g

Pro→Ala)を伴うことが予想される部位の検討を行った。その変異を挟むプライマーを作成し、(5'-GAGACTTAGATCTTCCACCTCA と 5'-AAATCCTCTTGTGTCAGGGGTAT)対象患者のシーケンスを行った。

②不眠の指標としてクロモグラニンA

交感神経系の活動を反映する唾液中のクロモグラニンAの濃度を測定し、一般人における不眠の指標として応用できないかを検討した。

表 2 Genotype and allele distribution of the three polymorphisms with no amino acid substitutions in the hper2 gene in bipolar disorder patients and controls

2067(A→G)	Genotypes (%)			Alleles (%)	
	A/A	A/G	G/G	A	G
Subjects	N				
Control	127	98(77.2)	28(22.0)	1(0.8)	224(88.2) 30(11.8)
Bipolar	88	72(81.8)	16(18.2)	0(0)	160(90.9) 16(9.1)

2114(G→A)	Genotypes (%)			Alleles (%)	
	A/A	A/G	G/G	A	G
Subjects	N				
Control	127	1(0.8)	10(7.9)	116(91.3)	12(4.7) 242(95.3)
Bipolar	88	1(1.1)	8(9.1)	79(89.8)	10(5.7) 166(94.3)

2117(G→A)	Genotypes (%)			Alleles (%)	
	A/A	A/G	G/G	A	G
Subjects	N				
Control	127	2(1.6)	21(16.5)	104(81.9)	25(9.8) 229(90.2)
Bipolar	88	4(4.6)	20(22.7)	64(72.7)	28(15.9) 148(84.1)

一般成人450名にピッツバーグ睡眠質問紙を配布し記入してもらった。また、朝唾液を採取し、クロモグラニンAの濃度を測定し、それと睡眠障害

の関連性を調べた。クロモグラニンAの測定は市販のキット (Human Chromogranin A EIA, Yanaihara) を用い、EIA法を用いて測定した。

C. 研究結果

①概日リズム睡眠障害における時間遺伝子

a) 双極性障害におけるカゼインキナーゼ1エプシロン(CKI ϵ)領域のポリモルフィズム

CKI ϵ 結合領域に4つのポリモルフィズムが認められた。この内、セリンからグリシンへのアミノ酸置換を伴うと考えられる部位に関してのジェノタイプ及びアレルの双極性障害患者群と正常被験者群における分布を表1に示す。

表1 Genotype and allele distribution of the 2106(A→G) polymorphism in the hper1 gene in bipolar disorder patients and controls.

Subjects	N	Genotype (%)			Allele (%)	
		A/A	A/G	G/G	A	G
Control	127	127(100)	0(0)	0(0)	254(100)	0(0)
Bipolar	88	87(97.7)	1(1.1)	0(0)	175(99.7)	1(0.6)

また、アミノ酸置換を伴わないと考えられる他の3つのポリモルフィズムの

双極性障害患者群と正常被験者群における分布を表2に示す。4つのポリモルフィズム共に2群間で分布に有意な差は認められなかった。

b) 双極性障害におけるhper1のポリモルフィズム

ヒト時間遺伝子の一つであるhper1のcDNAをシーケンスした結果、5つの変異を見つけだし、その内でアミノ酸置換を起こすことが予想される(c3071c/g Pro→Ala)のポリモルフィズムを双極性障害と正常被験者の間で検討した。表3に示されているように、ジェノタイプにおいてもアレルにおいても両群間で統計学的に有意な違いは認められなかった。

②不眠の指標としてクロモグラニンA

クロモグラニンAは不眠と軽度の関連性が認められ、特に、夜間にトイレなどで起きるなどの項目で高い相関が得られた($r=0.151$, $P<0.01$)。不眠時には夜間の交感神経系が減少するため、早朝のクロモグラニンAの上昇がもたらされた可能性があり、これが不眠の客観的な生理学的指標となる可能性が示された。

表3: Genotype and allele distribution of the 3071(c/g) polymorphism in the hper1 gene in bipolar disorder patients and controls

	number of subjects	Genotype			Alleles	
		C/C	G/C	G/G	3071C	3071G
bipolar	61	35	21	5	0.746	0.254
control	144	60	64	20	0.639	0.361

D. 考察

①概日リズム睡眠障害における時間遺伝子

我々は、双極性障害患者と1健常被験者を用いてper2のCKI ε 結合領域のポリモルフィズムを検討した。4カ所の変異を見つけ、ジェノタイプ及びアレルの出現頻度に患者群と正常被験者で差がないかを検討したが、統計学的に有意な差は見いだせなかった。また、hper1の全翻訳領域の変異を検討したが、いずれの変異も気分障害と健常被験者でその頻度に違いが見られなかった。ヒトhper2の場合は、家族性睡眠相前進症候群に関連があると報告された部位のみの検討であるが、これらの時間遺伝子以外の時間遺伝子についても検討を加える必要がある。

②不眠の指標としてクロモグラニンA

E. 結論

今回の結果では、per1, 2, の双極性障害の疾患に対する関連性は低いと考えられる。さらなる時間遺伝子との関

連性の検討が必要である。クロモグラニンAに関しては、睡眠障害の簡易な指標になる可能性が示唆された。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Toshio Iwase, Naofumi Kajimura, Macoto Uchiyama, Takashi Ebisawa, Kimio Yoshimura, Yuichi Kamei, Kayo Shibui, Keiko Kim, Yoshinao Kudo, Masaki Katoh, Tsuyoshi Watanabe, Toru Nakajima, Yuji Ozeki, Mariko Sugishita, Toru Hori, Masaki Ikeda, Ryoichi Toyoshima, Yuichi Inoue, Naoto Yamada, Kazuo Mishima, Masahiko Nomura, Norio Ozaki, Masako Okawa, Kiyohisa Takahashi, Toshio Yamauchi: Mutation screening of the human *Clock* gene in circadian rhythm sleep disorders. *Psychiatry Research* 109, pp121-128, 2002
- 2) Yayoi Shiino, Satoru Nakajima, Yuji Ozeki, Takahiro Isono, Naoto Yamada: Mutation screening of the human period 2 gene in bipolar disorder. *Neuroscience letters*, 338, 82-84, 2003 (in press)
- 3) Satoru Nakajima, Yuji Ozeki, Yayoi Shiino, Takahiro Isono, Naoto Yamada: Association study between a hper1 gene polymorphism and human patients with bipolar disorder. *Neurosci Lett* (in

submission).

- 4) Naoto Yamada: Mood disorder and biological rhythm. *Recent Advances in the Research of Affective Disorder in Japan*. Eds. Okuma, T., Kanba, S. and Inoue, Y. Elsevier Science, Amsterdam, pp107-112, 2002

2. 学会発表

- ## H. 知的財産等の出願・登録状況
- 現在の所なし。

平成 14 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

高齢者の早朝覚醒のメカニズム：メラトニン分泌低下の生理的意義

分担研究者 清水 徹男 秋田大学医学部精神科学講座教授

研究協力者 三島 和夫、佐藤 浩徳、松本 康宏、

越前屋 勝、戸澤 琢磨、草薙 宏明

研究要旨： 高齢者で認められる早朝覚醒の発現機序はいまだ不明である。松果体分泌ホルモンであるメラトニンは、ヒト睡眠・概日リズムの調整作用を有することから、加齢に伴うメラトニン分泌低下が高齢者に特徴的な睡眠維持能低下の一因である可能性が論議されている。本研究では、60 歳以上の健常高齢者 51 名（平均年齢 68.2 歳、61～76 歳）を対象として、睡眠維持能とメラトニン分泌低下との関連についての追跡調査を行った。その結果、経過期間中にメラトニン分泌低下と平行して睡眠維持能が低下する不眠群の存在が明らかになった。しかしながら、この不眠群では観察期間中のメラトニン分泌量低下は認められたものの、観察終了時点におけるメラトニン基礎分泌量には、その他の高齢者群と比較して有意差は認められなかった。これらの知見は、メラトニン分泌低下に起因する高齢者の睡眠障害の存在を示唆していると共に、投与時点でのメラトニン低分泌を指標に判断されているメラトニン補充療法の適用基準に一石を投じている。

A. 研究目的

加齢に伴い睡眠障害が増加することは数多くの疫学調査からも明らかにされている。高齢者の睡眠障害の最大の特徴は早朝覚醒（睡眠維持障害）であるが、その発症メカニズムには不明な点が多く、有効な治療法の開発の妨げとなっている。

これまで時間生物学の観点から、高齢者では、種々の生体機能リズムに対して相

対的により遅い生物時計位相（Biological Clock Phase; BCP）で睡眠をとるため、睡眠後半での覚醒圧が若年者に比較して相対的に亢進しているとする仮説が提唱されてきた。具体的には、加齢に伴い多くの生体機能のリズム位相が大幅に前進するのに対して、高齢者の入眠・覚醒時刻が相対的に小幅な前進にとどまる結果、若年者に比較して、高齢者の睡眠後半の

より早期にメラトニン分泌低下、深部体温上昇、糖質コルチコイド分泌亢進、甲状腺ホルモン分泌亢進など覚醒圧を高める（もしくは睡眠維持を阻害する）シグナルが増大することになり、これが高齢者で早朝覚醒が生じるメカニズムの一部を説明すると考えるものである。しかし、昨年度の報告で示したように、睡眠によるマスキングを受けないメラトニン分泌リズム位相を指標として、高齢者での睡眠とBCPとの相互位相関係を精密に評価した結果、この両者の関係には若年者でのそれとの間に有意な加齢変化が生じていないことが示された。一方、高齢者で睡眠維持能の低下が認められた早朝の時間帯では、メラトニンの絶対分泌量は低下していた。メラトニンは、BCPを予測する信頼のおける生理マーカーであるとともに、このホルモン自体が、睡眠の維持作用を有していることが数多くの臨床研究から示唆されている。また、その夜間分泌量が加齢とともに減少することが知られており、我々が得た知見もそれに合致するものであった。このことから、本研究で対象となった高齢者でのメラトニン分泌低下が睡眠維持能の低下に果たす役割を検討する必要がある。ただし、この検討のためには、あるサンプリング時点での横断的な解析は意味をなさない。なぜならば、メラトニン分泌レベルにも、睡眠時間や睡眠効率などの睡眠特性にも、

生来的に大きな個人差が認められるからである。すなわち、個人内でのメラトニン分泌特性の変動と睡眠維持能との関連を縦断的に検討する必要がある。我々はこの視点から、健常高齢者を対象とした追跡調査を継続している。本年度は、2～3年間にわたり睡眠およびメラトニン分泌特性を追跡調査し得た51名の健常高齢者について解析を行った。

B. 研究方法

対象は、60歳以上の健常高齢者51名（エントリー時点の平均年齢68.2歳、61～76歳）である。秋田県内で1994年から進められている概日リズムと睡眠の加齢変化に関する追跡調査研究への参加者の中から、2～3年間の観察期間を完遂したもののデータを抽出し解析対象とした。参加者には予め研究の趣旨をよく説明し、同意を得た。解析対象者は、エントリー時および観察終了時点で、内科的、精神科的診察を受け、睡眠障害の原因となる中等度以上の疾患に罹患していないことが確認されている。対象者は、睡眠および概日リズム特性を評価するため、参加時点および観察終了時点で下記の測定を行った。

睡眠状態の評価：通常生活環境下で連続5～7日間にわたり記録したアクチグラフデータからColeらのアルゴリズムにより睡眠特性の解析を行い、総睡眠時間、睡

眠効率、中途覚醒回数、総覚醒時間

(WASO) を算出した。また、同時期に記載させた睡眠表から、入床、起床時刻、就床時間を算出した。この観察期間の平均入眠時刻を各被験者の00時とした。

メラトニン分泌リズムの評価：アクチグラフの測定終了翌日の14時から1時間おきに24時間にわたり低照度下にて持続留置カテーテルを用いた無痛採血を行い、血清中メラトニン濃度を radio-immuno assay 法にて定量した。結果は平均値 \pm SEM で表した。

C. 研究結果及び考察

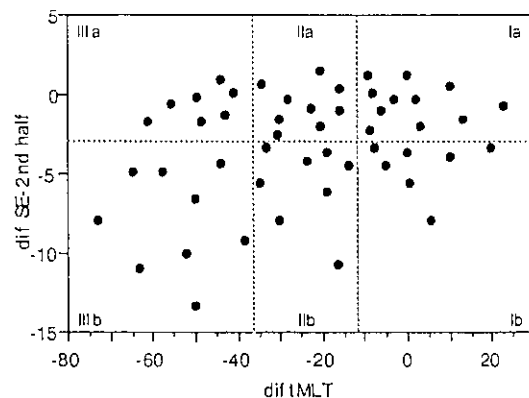
対象者のエントリー時の睡眠特性：入床時間 (489.9 ± 7.3 分)、入眠潜時 (18.4 ± 1.1 分)、総睡眠時間 (431.4 ± 7.0 分)、睡眠効率 ($86.2 \pm 0.8\%$) であった。

対象者の観察終了時の睡眠特性：入床時間 (485.2 ± 6.3 分)、入眠潜時 (20.0 ± 1.1 分)、総睡眠時間 (419.2 ± 6.6 分)、睡眠効率 ($83.9 \pm 0.7\%$) であった。

メラトニン分泌量と睡眠効率との相関：エントリー時点、および観察終了時点での横断的な検討では、メラトニン分泌量と睡眠効率との間には有意な相関関係は認められなかった。

観察期間中のメラトニン分泌量の減少と睡眠効率の低下との関連：縦断的な検討の結果、観察期間中のメラトニン分泌量の低下度と睡眠効率の低下度との間に

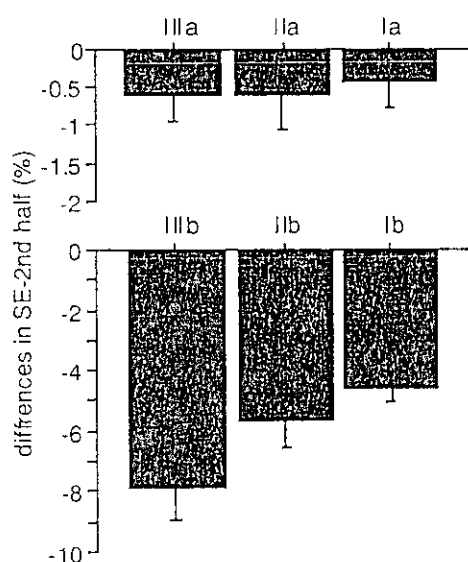
興味深い知見が得られた。



上図は、観察期間中のメラトニン分泌量の低下幅をx軸に、睡眠維持能の指標である睡眠後半の睡眠効率の低下幅をy軸にとった両者の相関図である。図中央横線は、睡眠効率の低下幅の51名での平均値 -3.22% を、2本の縦線はメラトニン分泌低下幅の平均値 \pm SD/2 (-12.1 、 -36.1 pg/ml*hr) を示しており、これらをcutoff pointsとして対象者を6群に分けた。対象者全体では、この両者間には有意な直線回帰関係は認められなかった。しかし、メラトニン分泌維持群 (Ia+Ib)、中間群 (IIa+IIb)、分泌低下群 (IIIa+IIIb) の3群間での睡眠後半の睡眠効率の低下幅を比較した結果、右図の様な結果が得られた。すなわち、経過観察中に睡眠が維持されていたa群では、Ia、IIa、IIIa群の間で睡眠効率の低下に関する有意な群間差は認められなかった。これに対して、経過観察中に睡眠効率が低下したIb、IIb、IIIb群の間では、睡眠効率の低下に関する有意な

群間差が認められた ($F = 3.71, df = 2, p < 0.05$ by One-way ANOVA)。

メラトニン分泌減少を伴っていたIIIb群ではメラトニン分泌が維持されていたIb群と比較して有意に睡眠後半の睡眠効率が低下し ($p = 0.0163$, by Bonferroni post-hoc analysis)、IIb群と比較しても低下する傾向が認められた ($p = 0.0750$)。IbおよびIIb群との間には睡眠効率の低下幅に関する有意な群間差は認められなかった。



本研究で得られたデータは、メラトニンのヒトの睡眠維持に果たす生理的意義に関する重要な情報を提供している。第一に、横断的な検討では、メラトニン分泌量と睡眠効率との間には有意な相関関係が認められなかった。これまでに、この両者の関係について関連ありとするものとそれを否定するものの相反した報告があるが、我々のデータは、関連を否

定するものであった。今回対象とした高齢者のメラトニン分泌量にはエントリー時点で大きな個人差があった。昨年度に報告した若年者でのそれにもやはり大きな個人差があり、両年代群でのメラトニン分泌量に相当のオーバーラップがあった。このことは、ヒトのメラトニン分泌量には生来的に大きな個人差があり、生来的にメラトニン分泌量が低レベルにあるケースでは、睡眠維持におけるメラトニンの果たす役割が相対的に小さいか、感受性亢進などによる代償機構が形成されている可能性が高い。このような視点から、我々はメラトニン分泌量の低下と睡眠維持能の低下の関連に関する追跡調査を行った。対象となった高齢者51名でのエントリー時のメラトニン分泌量は 273.2 ± 8.8 pg/mL*hrであり、経過観察中に平均 24.1 pg/mL*hr (8.8%) のメラトニン分泌量の低下が認められた。同種の研究は過去になく、この低下幅の大小については今後の論議になる。しかしながら、少なくとも高齢者の一部には、何らかの原因により60歳以降の3年間という比較的短時間でメラトニン分泌量が大幅に低下し、それと平行して睡眠効率が低下している一群が存在することが示唆された。興味深いことに、IIIb群とその他の群の間にはエントリー時点だけではなく、観察終了時点においても、メラトニン分泌量に統計的有意差が認められなかった。