

厚生労働科学研究費補助金
こころの健康科学研究事業

睡眠調節の分子機構と臨床応用に関する研究

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 (財) 大阪バイオサイエンス研究所
名誉所長 早石 修

平成15(2003)年 4月

目 次

I. 総括研究報告	
睡眠覚醒の分子機構と臨床応用に関する研究	1
早石 修	
II. 分担研究報告書	
1. 睡眠覚醒の分子機構と臨床応用に関する研究	5
裏出 良博	
2. 睡眠覚醒の分子機構と臨床応用に関する研究	7
江口 直美	
3. 睡眠覚醒の分子機構と臨床応用に関する研究	9
池田 真行	
4. 睡眠覚醒の分子機構と臨床応用に関する研究	10
坂田 三恵	
5. 睡眠覚醒の分子機構と臨床応用に関する研究	11
曲 衛敏	
6. 睡眠覚醒の分子機構と臨床応用に関する研究	13
儲 敏	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	14
IV. 研究成果の刊行物・別刷	16

睡眠調節の分子機構と臨床応用に関する研究

主任研究者 早石 修（財）大阪バイオサイエンス研究所 名誉所長

研究要旨

（１）内因性睡眠物質であるプロスタグランジン（PG） D_2 は、前脳基底部のクモ膜に分布するPG D_2 受容体（DP受容体）を介して、第二の内因性睡眠物質であるアデノシンの細胞外濃度の上昇を起して徐波睡眠を誘発することを、野生型およびDP受容体遺伝子欠損マウスを用いて証明した。（２）さらに、PGD合成酵素遺伝子欠損マウスおよびDP受容体遺伝子欠損マウスでは、断眠による睡眠要求の蓄積が起り難いことを発見し、PGD $_2$ が長期間の覚醒により不足した睡眠を補う場合に特に重要であることを証明した。

（３）内因性覚醒物質であるPGE $_2$ やオレキシンは、結節乳頭核のヒスタミン神経系を活性化し、脳内の遊離ヒスタミン濃度を上昇させることを証明した。そして、ヒスタミンH1受容体遺伝子欠損マウスでは、オレキシンの脳室内投与による覚醒誘発が全く起らないことを発見した。（４）小動物用の無線方式自動薬液注入ポンプを開発し、さらに、睡眠自動判定ソフトに睡眠判定アルゴリズムの自己学習機能及び動物行動観察用の赤外線ビデオ画像の同時取り込み機能を組み込んで、睡眠覚醒調整医薬品候補化合物のスクリーニング系を整備した。（５）PGD合成酵素とPGE合成酵素の構造解析を進め、睡眠覚醒調整薬としての酵素阻害剤の開発を進めた。

分担研究者 裏出 良博

（財）大阪バイオサイエンス研究所

第2研究部 研究部長

江口 直美

（財）大阪バイオサイエンス研究所

第2研究部 副部長

池田 真行

（財）大阪バイオサイエンス研究所

第2研究部 研究員

坂田三恵

（財）大阪バイオサイエンス研究所

第2研究部 特別研究員

曲 衛敏

（財）大阪バイオサイエンス研究所

第2研究部 受託研究員

儲 敏

（財）大阪バイオサイエンス研究所

第2研究部 共同研究員

A. 研究目的

生化学的および分子生物学的手法を用いて、睡眠および覚醒の内因性調節物質であるPGD $_2$ とアデノシン、および、PGE $_2$ 、オレキシン、ヒスタミンの作用機構に関する基礎知識を深め、合理的な睡眠異常や睡眠覚醒障害の治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

- 1) 無麻酔下のマウス脳室への薬物投与と睡眠覚醒の同時測定法を開発し、各種の遺伝子欠損マウスに応用する。
- 2) ウレタン麻酔下のマウス前脳基底部分への微小脳内透析プローブの埋め込みを行い、クモ膜下腔における睡眠情報の変換機構を解析する。
- 3) 小動物（ラットおよびマウス）用の無線方式自動薬液注入ポンプを開発する。
- 4) 動物睡眠自動判定ソフトを改良し、睡眠判定データの編集速度を向上させる。
- 5) 野生型マウス、PGD合成酵素遺伝子欠損マウス

- ス、DP 受容体遺伝子欠損マウス、アデノシン A_{2A} 受容体遺伝子欠損マウス、ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子欠損マウスに6時間の断眠負荷を行い、その前後の睡眠覚醒を測定する。
- 6) PGD 合成酵素の結晶化条件を改良し、阻害剤との複合体の結晶化を試みる。
 - 7) 小胞体膜結合型 PGE 合成酵素の cDNA クローニングを行い、遺伝子組換え型酵素を精製する。
 - 8) ラットの覚醒中枢（結節乳頭核）への微量脳内透析プローブの埋め込みを行い、覚醒情報の変換機構を解析する。
 - 9) カルシウム感受性蛍光蛋白質カメレオン遺伝子を導入したトランスジェニックマウスを用いて、睡眠覚醒中枢における神経細胞内カルシウム濃度の変化をリアルタイムで測定する。

C. 研究結果

- 1) マウス脳室への PGD₂ の持続注入により、野生型マウスでは容量依存性の徐波睡眠の選択的な増加が起きるが、DP 受容体遺伝子欠損マウスでは睡眠誘発が起きない。
- 2) ラットおよび野生型マウスの前脳基底部クモ膜下腔に微小透析チューブを挿入して PGD₂ を投与し還流液中に回収されるアデノシン濃度を測定すると、PGD₂ 投与量に依存した細胞外アデノシン濃度の上昇が観察された。
- 3) マウス脳室へのアデノシン A_{2A} 受容体作動薬の持続注入は、徐波睡眠とレム睡眠の容量依存性の増加を起すすが、A₁ 受容体作動薬の投与は睡眠に影響を与えなかった。さらにアデノシン A_{2A} 受容体遺伝子欠損マウスでは、PGD₂ 誘発睡眠が野生型マウスと比較して、約 50% に低下していた。
- 4) 無線方式によるコントロールが可能な小動物用の微量薬液注入ポンプを開発し、その小型化を進め、重量 1 g 以下の試作器を作製した。さらに、動物睡眠自動判定ソフトに動物行動観察用の赤外線ビデオ画像の同時取り込み機能を加えた。
- 5) PGD 合成酵素遺伝子欠損マウス、DP 受容体遺伝子欠損マウス、およびアデノシン A_{2A} 受容体遺伝子欠損マウスに断眠負荷を行い、断眠解除後の睡眠内容を測定した結果、いずれの遺伝子欠損マウスも断眠解除後の徐波睡眠のリバウンドをほとんど示さなかった。
- 6) 遺伝子組換え型のヒト造血器型 PGD 合成酵素、およびマウス・リポカリン型 PGD 合成酵素と阻害剤との複合体の結晶化に成功し、大型放射光施設 (SPring-8) を利用した X 線結晶構造解析を行い、数種類の複合体について高分解能 (1.2~2.4Å) の三次元構造座標を決定した。
- 7) マウスおよびヒトの小胞体膜結合型のグルタチオン要求性 PGE 合成酵素の cDNA のクローニングを行い、酵素活性を示す遺伝子組換え型酵素の大腸菌を用いた発現に成功した。さらに特異性の高いポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を作製し、免疫組織化学的な手法を用いて、マウス、ラット、サル各種臓器における本酵素の細胞局在を明らかにした。
- 8) ラットおよびマウスの後部視床下部の覚醒中枢（結節乳頭核）近傍に PGE₂ や 4 種類の PGE₂ 受容体 (EP₁₋₄) の作動薬あるいはオレキシンを投与し、脳内の遊離ヒスタミン濃度を測定した。その結果、PGE₂、EP₄ 受容体作動薬およびオレキシンでは、投与量に比例した遊離ヒスタミン濃度の上昇と覚醒時間の延長が観察された。
- 9) ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子欠損マウスでは、野生型マウスに比べ、16 秒以下の短い中途覚醒が半減して、徐波睡眠の平均持続時間が 30% 程度延長し、夜間の覚醒時間が 20% 程度減少することを明らかにした。さらに、本遺伝子欠損マウスは、6 時間の断眠負荷後の徐波睡眠のリバウンドが野生型マウスに比べ有意に増加していた。
- 10) 睡眠覚醒調節物質 (PGD₂、PGE₂、アデノシン、およびヒスタミン) の各合成酵素、分

解酵素および受容体の遺伝子欠損マウス/遺伝子大量発現マウスの脳スライスを用いて神経細胞内カルシウム動態の解析を行った。

D. 考察

研究結果に 1) より、PGD₂ 誘発睡眠は 2 種類の PGD₂ 受容体 (DP 受容体と CRTH2 受容体) のなかで DP 受容体を介して起きると考えられる。

研究結果 2) -3) より、PGD₂ 誘発睡眠には、アデノシン A_{2A} 受容体に依存性の機構と非依存性の機構の 2 種類が存在すると考えられる。

研究結果 4)により、動物睡眠バイオアッセイ系の改良を進めた。

研究結果 5)により、PGD₂・DP 受容体・アデノシン・アデノシン A_{2A} 受容体を介する睡眠誘発機構は、断眠による寝不足を補う場合に特に重要な機能を果たすと考えられる。

研究結果 6)により、数種類の複合体の高分解能 (1.2~2.4Å) の三次元構造座標は PGD 合成酵素を新たな作用点とする睡眠覚醒調整薬 (居眠り防止薬) の理論的分子設計の鋳型として利用できる。

研究結果 7)により、本酵素のマウス、ラット、サルの各種臓器における細胞局在を明らかにした。

研究結果 8)により、PGE₂ は EP₄ 受容体を介し、オレキシンはオレキシン受容体を介して、結節乳頭核に起始核を持つヒスタミン神経系を刺激し覚醒を起こすと考えられる。

研究結果 9)から、ヒスタミン神経系は徐波睡眠から覚醒へのステージ遷移の調節に関与し、覚醒の維持に重要な役割を果たすと考えられる。

研究結果 10)から、この手法を発展させ、カメレオン遺伝子を導入したトランスジェニックマウスに応用することにより、脳ス

ライスを用いた試験管内での睡眠研究が可能になる。

E. 結論

- 1) PGD₂ は前脳基底部クモ膜に分布する DP 受容体を介して局所の細胞外アデノシン濃度の上昇を誘発し、アデノシン A_{2A} 受容体に依存性と非依存性の 2 種類の機構により視索前野の睡眠中枢を活性化させ、後部視床下部の覚醒中枢 (結節乳頭核) の活動を抑制して徐波睡眠の選択的な増加を誘発する。この睡眠誘発機構は、断眠による寝不足を補う場合に特に重要な機能を果たす。
- 2) PGE₂ やオレキシンは EP₄ 受容体およびオレキシン受容体を介して結節乳頭核に起始核を持つヒスタミン神経系を刺激し、脳内に広く分布するヒスタミン H1 受容体を介して覚醒を起こす。そして、ヒスタミン神経系は徐波睡眠から覚醒へのステージ遷移の調節に関与し、覚醒の維持に重要な役割を果たす。
- 3) PGD 合成酵素遺伝子欠損マウス、DP 受容体遺伝子欠損マウス、アデノシン A_{2A} 受容体遺伝子欠損マウス、ヒスタミン H1 受容体遺伝子欠損マウスは、いずれも断眠解除後の徐波睡眠のリバウンドに異常を示す新しい睡眠覚醒障害モデル動物である。
- 4) 小動物用の無線方式自動薬液注入ポンプの開発と動物睡眠自動判定ソフトの改良により、睡眠覚醒調整医薬品候補化合物の *in vivo* スクリーニング系の効率化を進めた。
- 5) リポカリン型 PGD 合成酵素および造血器型 PGD 合成酵素と選択的阻害剤との複合体の X 線結晶構造を決定した。小胞体膜結合型 PGE 合成酵素の cDNA クローニングと遺伝子組換え型酵素の発現に成功した。これらの成果により PGD₂ と PGE₂ の産生を阻害する新たな睡眠覚醒調整薬の開発が促進され、「自然な」睡眠及び覚醒の調節物質の開発に繋がる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表 (原著・総説)

1. Lazarus, M., Kubata, B.K., Eguchi, N., Fujitani, Y., Urade, Y., and Hayaishi, O. (2002) Biochemical characterization of mouse microsomal prostaglandin E synthase-1 and its colocalizaion with cyclooxygenase-2 in peritoneal macrophages. Arch. Biochem. Biophys. 397, 336-341
2. Hayaishi, O. and Urade, Y.(2002) Prostaglandin D₂ in Sleep-wake regulation: recent progress and perspectives. The Neuroscientist 8, 12-15
3. Hayaishi, O.(2002) Molecular genetic studies on sleep-wake regulation – with special emphasis on the prostaglandin D₂ system-. J. Appl. Physiol. 92, 863-868
4. Hayaishi, O.(2002) Unraveling the enigma of sleep-molecular mechanisms of sleep-wake regulation-. Oxygen and Life –Oxidases and Lipid Mediators- (Ishiura, Y. ed.) Elsevier

2. 学会発表・講演

1. 早石 修(2003)「最近の睡眠科学の進歩について」最新の睡眠研究 国際フォーラム
2003年3月23日 福岡国際会議場

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

睡眠調節の分子機構と臨床応用に関する研究

分担研究者 裏出 良博（財）大阪バイオサイエンス研究所 第2研究部 研究部長

研究要旨

小動物用の無線方式自動薬液注入ポンプを開発して、睡眠覚醒調整医薬品候補化合物のスクリーニング系を整備した。PGD合成酵素と阻害剤との複合体のX線結晶構造を決定した。さらに、小胞体膜結合型のグルタチオン要求性PGE合成酵素のcDNAのクローニングと酵素活性を示す遺伝子組換え型酵素の大量発現に成功し、睡眠覚醒調節薬として期待されるPGD合成酵素およびPGE合成酵素阻害剤の開発に道を開いた。そして、PGE₂、EP₄受容体作動薬およびオレキシンは、ヒスタミン神経系を刺激して、覚醒を起こすことを証明した。

A. 研究目的

生化学的および分子生物学的手法を用いて、内在性睡眠物質であるPGD₂の合成酵素の立体構造解析を進め、PGD₂の産生を調節して睡眠覚醒を調整する医薬品の開発方法を確立する。

B. 研究方法

- 1) 小動物（ラットおよびマウス）用の無線方式自動薬液注入ポンプを開発する。
- 2) PGD合成酵素の結晶化条件を改良し、阻害剤との複合体の結晶化を試みる。
- 3) 得られた結晶について、大型放射光施設（SPring-8）を利用したX線結晶回折データの収集を行い、三次元構造を決定する。
- 4) 小胞体膜結合型PGE合成酵素のcDNAをクローニングし、遺伝子組換え型酵素を発現させる。
- 5) ラットの後部視床下部にPGE₂や4種類のPGE₂受容体（EP₁₋₄）の作動薬あるいはオレキシンを投与し、脳内の遊離ヒスタミン濃度と睡眠覚醒を測定する。

C. 研究結果

- 1) 重量1g以下の微量薬液注入ポンプの試作器を作製した。

2) 遺伝子組換え型のヒト造血器型PGD合成酵素およびマウスリポカリン型PGD合成酵素と阻害剤との複合体の結晶化に成功した。

3) ヒト造血器型PGD合成酵素およびマウスリポカリン型PGD合成酵素と数種類の阻害剤との複合体について、高分解能（1.2~2.4Å）の三次元構造を決定した。

4) マウスおよびヒトの小胞体膜結合型のグルタチオン要求性PGE合成酵素のcDNAをクローニングし、酵素活性を示す遺伝子組換え型酵素の大量発現に成功した。

5) ラットの後部視床下部の覚醒中枢（結節乳頭核）近傍にPGE₂やEP₄受容体作動薬を投与すると、投与量に比例した遊離ヒスタミン濃度の上昇と覚醒時間の延長が観察された。

D. 考察

PGD合成酵素の構造座標は、新たな作用点をもつ睡眠覚醒調整薬（居眠り防止薬）の理論的分子設計の鋳型として利用できる。PGE₂はEP₄受容体を介し、オレキシンはオレキシン受容体を介して、ヒスタミン神経系を刺激し覚醒を起こすと考えられる。

E. 結論

無線方式自動薬液注入ポンプの開発による非拘束マウスへの薬物投与と睡眠覚醒の同時測定系の確立により、睡眠覚醒調整医薬品候補化合物のスクリーニング系がより一層整備された。PGE合成酵素や EP₄ 受容体が新たな覚醒調整薬の標的となる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Diaz, B.L., Fujishima, H., Kanaoka, Y., Urade, Y., and Arm, J.P. (2002) Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and IL-6 expression in mouse bonemarrow-derived mast cells by exogenous but not endogenous prostanoids. *J. Immunol.* 168, 1397-404
- 2) Oda, H., Shiina, Y., Seiki, K., Sato, N., Eguchi, N., and Urade, Y. (2002) Development and evaluation of a practical ELISA for human urinary lipocalin-type prostaglandin D synthase. *Clini. Chem.* 48 1445-1453
- 3) Lazarus, M., Munday, C.J., Eguchi, N., Matsumoto, S., Killian, G.J., Kubata, B.K., and Urade, Y. (2002) Immunohistochemical localization of microsomal PGE synthase-1 and cyclooxygenases in male mouse reproductive organs. *Endocrinology* 143, 2410-2419
- 4) Inui, T., Ohkubo, T., Emi, M., Irikura, D., Hayaishi, O., Urade, Y. (2002) Characterization of the unfolding process of lipocalin-type prostaglandin D synthase. *J. Biol. Chem.* 278, 2845-2852
- 5) Irikura, D., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Ago, H., Miyano, M., Kubata, B. K., Sakai, H., Hayaishi, O., and Urade, Y. (2003) Cloning, expression, crystallization, and preliminary X-ray analysis of recombinant mouse lipocalin-type prostaglandin D synthase, a somnogen-producing enzyme. *J. Biochem.* 133, 29-32
- 6) Fujimori, K., Fujitani, Y., Kadoyama, K., Kumanogoh, H., Ishikawa, K., and Urade, Y. (2003) Regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase gene expression by Hes-1 through E-box and interleukin-1 β via two NF- κ B elements in rat leptomeningeal cells. *J. Biol. Chem.* 278, 6018-6026
- 7) 裏出良博 (2002) 「睡眠障害とその治療-睡眠覚醒機構に関する最近の研究」 「脳 21」 (金芳堂) 19, 29-32
- 1) Urade, Y., Eguchi, N., Huang, Z.-L., Qu, W.-M., and Hayaishi, O. (2002) 'Genetic dissection of sleep-wake regulation.' International Conference on Fatigue Science, June 9-13, Sandhamn, Sweden
- 2) Urade, Y., Eguchi, N., Qu, Wei-Min, Huang, Zhi-Li, Chen, J.-F., and Hayaishi, O. (2002) 'Sleep regulation in adenosine A_{2A} receptor-deficient mice' Translating Adenosine A_{2A} Receptor Biology into Novel Therapies for Parkinson's Disease/ an International Conference, September 27, Boston, U.S.A.
- 3) Urade, Y., Qu, W-M, Huang, Z-L, Eguchi, N., and Hayaishi, O. (2002) 'Sleep behaviors of gene-knockout mice for prostaglandin D₂ synthase and receptor' Society for Neuroscience, 32nd Annual Meeting, November 2-7, Orlando, Florida, U.S.A
- 4) 裏出良博 (2003) 「ねむりの科学」 最新の睡眠研究 国際フォーラム March 23, Fukuoka, Japan (国内学会)
- 1) 大久保忠恭, 乾 正樹, 乾 隆, 吉田卓也, 裏出良博, 小林祐次 (2002) 「マウス由来リポカリン型プロスタグランジン D 合成酵素(L-PGDS)のNMRによる立体構造解析」第 2 回日本蛋白質科学会, 6 月 13-15 日, 名古屋
- 2) 裏出良博 (2002) 「睡眠のメカニズムと生物にとっての睡眠の意義を解明する」日本睡眠学会第 27 回定期学術集会, シンポジウム II 「睡眠学の創設にむけて」7 月 4-5 日, 仙台
- 3) Urade, Y. Eguchi, N., Kuwahata, Y., Qu, W.-M., Huang, Z.-L., and Hayaishi, O. (2002) Sleep-promoting system triggered by prostaglandin D₂ is involved in the homeostatic control of NREM sleep after sleep deprivation. (プロスタグランジン D₂ による睡眠誘発機構は断眠後のノンレム睡眠のホメオスタシスに関与する) 第 45 回日本神経化学学会大会, 7 月 17-19 日, 札幌
- 4) 裏出良博, 江口直美, 曲 衛敏, 黄 志力, 早石修 (2002) 「ホメオスタティックな睡眠調節としてプロスタグランジン D₂ の作用」第 75 回日本生化学会大会, 10 月 14-17 日, 京都
- 5) 丸山敏彦, 有竹浩介, 裏出良博 (2002) 「LC-QMS を用いて生体試料中の Prostaglandin(PG)を測定する」第 75 回日本生化学会大会, 10 月 14-17 日, 京都
- 6) 裏出良博, 江口直美, 早石 修 (2003) 「リポカリン型及び造血器型プロスタグランジン D 合成酵素の機能解析」シンポジウム第 76 回日本薬理学会, 3 月 24-26 日

2. 学会発表 (国際学会)

睡眠調節の分子機構と臨床応用に関する研究

分担研究者 江口 直美（財）大阪バイオサイエンス研究所 第2研究部 副部長

研究要旨

動物睡眠自動判定ソフトに動物行動観察用の赤外線ビデオ画像の同時取り込み機能を加えた。PGD 合成酵素遺伝子欠損マウス、DP 受容体遺伝子欠損マウス、およびアデノシン A_{2A} 受容体遺伝子欠損マウスは、断眠解除後の徐波睡眠のリバウンドをほとんど示さなかった。逆に、ヒスタミン H1 受容体遺伝子欠損マウスは断眠負荷後の徐波睡眠のリバウンドが野生型マウスに比べ有意に増加していた。

A. 研究目的

動物睡眠バイオアッセイ系の改良を進め、内因性睡眠物質である PGD₂ とアデノシン、および内因性覚醒物質であるヒスタミンの作用機構に関する知識を深める。さらに、別の内因性覚醒物質である PGE₂ の合成酵素の細胞局在を明らかにして、合理的な睡眠異常や睡眠覚醒障害の治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

- 1) 動物睡眠自動判定ソフトにビデオ画像取り込み機能を加える。
- 2) 野生型マウス、PGD 合成酵素遺伝子欠損マウス、DP 受容体遺伝子欠損マウス、アデノシン A_{2A} 受容体遺伝子欠損マウス、ヒスタミン H1 受容体遺伝子欠損マウスに6時間の断眠負荷を行い、その前後の睡眠覚醒を測定する。
- 3) 小胞体膜結合型のグルタチオン要求性 PGE 合成酵素に対する抗体を作製し、免疫組織染色を行う。

C. 研究結果

- 1) 動物睡眠自動判定ソフトに動物行動観察用の赤外線ビデオ画像の同時取り込み機能を加えた。
- 2) PGD 合成酵素遺伝子欠損マウス、DP 受容体遺伝子欠損マウス、およびアデノシン A_{2A} 受容体

遺伝子欠損マウスは断眠解除後の徐波睡眠のリバウンドをほとんど示さなかった。

- 3) ヒスタミン H1 受容体遺伝子欠損マウスは、6時間の断眠負荷後の徐波睡眠のリバウンドが野生型マウスに比べ有意に増加していた。
- 4) マウスおよびヒトの小胞体膜結合型のグルタチオン要求性 PGE 合成酵素に対する特異性の高いポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を作製した。
- 5) 免疫組織化学的手法を用いて、マウス、ラット、サル各種臓器における PGE 合成酵素の細胞局在を明らかにした。

D. 考察

1) の結果により、動物睡眠バイオアッセイ系の信頼性が向上した。

2) の結果から、PGD₂・DP 受容体・アデノシン・アデノシン A_{2A} 受容体を介する睡眠誘発機構は、断眠による寝不足を補う場合に特に重要な機能を果たすと考えられる。

3) の結果から、ヒスタミン神経系は徐波睡眠から覚醒へのステージ遷移の調節に関与し、覚醒の維持に重要な役割を果たすと考えられる。

4と5) の結果から、内因性覚醒物質である PGE₂ の産生部位が明らかになった。

E. 結論

PGD₂・DP 受容体・アデノシン・アデノシン A_{2A} 受容体を介する睡眠誘発機構は、断眠による寝不足を補う場合に特に重要な機能を果たす。ヒスタミン神経系は徐波睡眠から覚醒へのステージ遷移に関与し、覚醒の維持に重要な役割を果たす。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Taniike, M., Mohri, I., Eguchi, N., Beuckmann, C.T., Suzuki, K., and Urade, Y. (2002) Perineuronal oligodendrocytes protect against neuronal apoptosis through the production of lipocalin-type prostaglandin D synthase in a genetic demyelinating model. *J. Neurosci.* 22 4885-4896
- 2) Urade, Y., and Eguchi, N. (2002) Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence. *Prostaglandin & other Lipid Mediators* 68-69, 375-382

2. 学会発表

(国際学会)

- 1) Eguchi, N., W-M, Huang, Z-L, Narumiya, S., Urade, Y., and Hayaishi, O. (2002) 'Lack of non-REM sleep rebound after sleep deprivation in DP receptor-deficient mice.' Society for Neuroscience, 32nd Annual Meeting, November 2-7, Orlando, Florida, U.S.A.
- 2) Kameyama, M., Suzuki, T., Sota, T., Sugiyama, T., Kuwahata, Y., Eguchi, N., Urade, Y., and Yoshioka, T. (2002) 'A novel analysis of mouse electroencephalogram which reflects gene mutation.' Society for Neuroscience, 32nd Annual Meeting, November 2-7, Orlando, Florida, U.S.A.
- 3) Eguchi, N. (2003) Molecular mechanism of prostaglandin D₂ mediated Non-REM sleep homeostasis studied by gene-knockout mice. Recent Progress in Sleep Research: International Symposium in Osaka-Biological, Clinical and Social Impact. March 20-21, Osaka

(国内学会)

- 1) 江口直美, 桑幡裕子, 曲 衛敏, 黄 志力, 裏出良博, 早石 修 (2002) 'プロスタグランジン D₂による睡眠誘発機構に関連する遺伝子の欠損は断眠後の熟睡障害を起こす' 日本睡眠学会第 27 回定期学術集会, 7月 4-5 日, 仙台

- 2) 江口直美, 桑幡裕子, 裏出良博, 早石 修 (2002) 「断眠中のマウス脳内に蓄積したプロスタグランジン D₂はDP受容体を介して過剰なノンレム睡眠を誘発する」 'Genetic identification of prostaglandin D₂ as the sleep substance accumulated during sleep deprivation' 第 25 回日本神経科学会, 7月 7-9 日 東京
- 3) 龜山美帆, 鈴木鉄兵, 宗田孝之, 杉山 崇, 桑幡裕子, 江口直美, 裏出良博, 吉岡 亨 (2002) 「遺伝子変異を反映する EEG(脳波)の新しい解析法」 第 25 回日本神経科学会, 7月 7-9 日 東京
- 4) 江口直美, 曲 衛敏, 黄 志力, 坂田三恵, 有竹浩介, 成宮 周, 裏出良博, 早石 修 (2003) 「DP 受容体を介したプロスタグランジン D₂ 誘発睡眠の分子機構」第 76 回日本薬理学会, 3月 24-26 日

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

睡眠調節の分子機構と臨床応用に関する研究

分担研究者 池田 真行（財）大阪バイオサイエンス研究所 第2研究部 研究員

研究要旨

神経細胞内カルシウム濃度の変化を長期間リアルタイムで測定する実験系を開発した。

A. 研究目的

マウス培養脳スライスを用いて、睡眠覚醒中枢における神経細胞内カルシウム濃度の変化を長期にリアルタイムで測定することにより、培養神経細胞における睡眠研究実験系を開発する。

B. 研究方法

睡眠覚醒中枢を含む脳スライスにカルシウム感受性蛍光タンパク遺伝子を導入し、神経細胞内カルシウム濃度の変化を長期にリアルタイムで測定する。

C. 研究結果

脳スライスを用いて神経細胞内カルシウム濃度の変化を最大10日間にわたりリアルタイムで測定することが可能となった。

D. 考察

この手法を発展させることにより、神経細胞における、睡眠覚醒調節物質（PGD₂、PGE₂、アデノシン、およびヒスタミン）の各合成酵素や分解酵素の生理作用が明らかになると考えられる。また、これらの受容体の遺伝子欠損マウスや遺伝子大量発現マウスを用いることで、神経細胞レベルでのこれらの分子の機能がより感度よく解析することが可能になる。

E. 結論

睡眠覚醒中枢を含む脳スライスを用いて、神経細胞内カルシウム動態を解析することにより、培養神経細胞レベルで睡眠モデル実験が可能になる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ikeda, M., Yoshioka, T., Allen, C.N. (2003) Developmental and circadian changes in Ca²⁺ mobilization mediated by GABA_A and NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus. *Eu. J. Neurosci.* 17 (2003) 57-70.
- 2) Ikeda, M., Allen, C.N. (2003) Developmental changes in calbindin-D28k and calretinin immunoreactive neurons in the suprachiasmatic nucleus. *Eu. J. Neurosci.* in press.

2. 学会発表

- 1) 池田真行 (2002) 「視床下部視索前野におけるアデノシン A1 受容体を介した神経活動抑制作用-免疫組織化学とカルシウムイメージング技法による検討」日本睡眠学会第27回定期学術集会, 7月4-5日, 仙台
- 2) 熊ノ郷晴子, 池田真行, 黄 志力, 裏出良博 (2002) 「マウス・リポカリン型プロスタグランジン(PG)D合成酵素(L-PGDS)遺伝子の発現制御機構の解析」第75回日本生化学会大会, 10月14-17日, 京都
- 3) Ikeda, M. (2003) Circadian rhythms in Ca²⁺ release from ryanodine-sensitive Ca²⁺ stores in suprachiasmatic nucleus neurons. (2003) Recent Progress in Sleep Research: International Symposium in Osaka -Biological, Clinical and Social Impact. March 20-21, Osaka, Japan

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

睡眠調節の分子機構と臨床応用に関する研究

分担研究者 坂田 三恵（財）大阪バイオサイエンス研究所 第2研究部 特別研究員

研究要旨

6時間の断眠を行うと、アデノシン A_{2A} 受容体遺伝子欠損マウスは断眠負荷後の徐波睡眠のリバウンドを示さないが、ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子欠損マウスでは野生型マウスに比べ明らかに増加した徐波睡眠のリバウンドを示す。

A. 研究目的

内因性睡眠物質であるアデノシンと内因性覚醒物質であるヒスタミンの作用機構に関する知識を深め、合理的な睡眠異常や睡眠覚醒障害の治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

野生型マウス、アデノシン A_{2A} 受容体遺伝子欠損マウス、ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子欠損マウスに6時間の断眠負荷を行い、その前後の睡眠覚醒を測定する。

C. 研究結果

- 1) アデノシン A_{2A} 受容体遺伝子欠損マウスは6時間の断眠負荷後の徐波睡眠のリバウンドを示さなかった。
- 2) ヒスタミン H₁ 受容体遺伝子欠損マウスは6時間の断眠負荷後の徐波睡眠のリバウンドが野生型マウスに比べ有意に増加していた。

D. 考察

- 1) の結果から、アデノシン A_{2A} 受容体を介した睡眠誘発は断眠による寝不足を補う場合に特に重要な機能を果たすと考えられる。
- 2) の結果から、ヒスタミン H₁ 受容体は覚醒の維持に重要な機能を果たすと考えられる。

E. 結論

アデノシン A_{2A} 受容体は断眠による寝不足を補う場合に重要であり、ヒスタミン H₁ 受容体は覚醒の維持に重要である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) Sakata, M., Qu, W.-M., Huang, Z.-L., Eguchi, N., Chen, J.-F., Schwarzschild, M. A., Urade, Y., and Hayaishi, O. (2003) Lack of non-rapid eye movement sleep rebound after sleep deprivation in adenosine A_{2A} receptor knockout mice. Recent Progress in Sleep Research: International Symposium in Osaka-Biological, Clinical and Social Impact. March 20-21, Osaka

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

睡眠調節の分子機構と臨床応用に関する研究

分担研究者 曲 衛敏（財）大阪バイオサイエンス研究所 第2研究部 受託研究員

研究要旨

マウス脳室へのアデノシン A_{2A} 受容体作動薬の持続注入は、徐波睡眠とレム睡眠の容量依存性の増加を起こすが、A₁ 受容体作動薬の投与は睡眠に影響を与えない。一方、アデノシン A_{2A} 受容体遺伝子欠損マウスの PGD₂ 誘発睡眠は野生型マウスの約 50%に低下している。又、ヒスタミン H1 受容体遺伝子欠損マウスは、野生型マウスに比べ、徐波睡眠の平均持続時間が延長し夜間の覚醒時間が減少する。

A. 研究目的

内因性睡眠物質である PGD₂ とアデノシン、および内因性覚醒物質であるヒスタミンの作用機構に関する知識を深め、合理的な睡眠異常や睡眠覚醒障害の治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

- 1) 野生型マウスとアデノシン A_{2A} 受容体遺伝子欠損マウスの側脳室に薬液注入用チューブの埋め込み手術を行い、アデノシン A_{2A} 受容体作動薬 CGS21680、アデノシン A₁ 受容体作動薬 CPA、あるいは PGD₂ を投与して、睡眠覚醒を測定する。
- 2) 生理条件下で、野生型マウスとヒスタミン H1 受容体遺伝子欠損マウスの睡眠覚醒を測定する。

C. 研究結果

- 1) マウス脳室へのアデノシン A_{2A} 受容体作動薬の持続注入は、徐波睡眠とレム睡眠の容量依存性の増加を起こすが、A₁ 受容体作動薬の投与は睡眠に影響を与えなかった。
- 2) アデノシン A_{2A} 受容体遺伝子欠損マウスでは、PGD₂ 誘発睡眠が野生型マウスの約 50%に低下していた。
- 3) ヒスタミン H1 受容体遺伝子欠損マウスでは、野

生型マウスに比べ、16秒以下の短い中途覚醒が半減して徐波睡眠の平均持続時間が約30%延長し、夜間の覚醒時間が約20%減少していた。

D. 考察

- 1) の結果から、アデノシンはアデノシン A_{2A} 受容体を介して睡眠を誘発すると考えられる。
- 2) の結果から、PGD₂ 誘発睡眠には、アデノシン A_{2A} 受容体に依存性の機構と非依存性の機構の2種類が存在すると考えられる。
- 3) の結果から、ヒスタミン神経系は徐波睡眠から覚醒へのステージ遷移の調節に関与し、覚醒の維持に重要な役割を果たすと考えられる。

E. 結論

PGD₂ はアデノシン A_{2A} 受容体に依存性と非依存性の2種類の機構により睡眠を誘発する。ヒスタミン神経系は徐波睡眠から覚醒へのステージ遷移の調節に関与し、覚醒の維持に重要な役割を果たす。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 学会発表

- 1) Qu, W-M, Huang, Z-L, Mochizuki, T., Taniike, M., Eguchi, N., Chen, J-F, Urade, Y., and Hayaishi, O. (2002) 'Adenosine A_{2A} receptor deficiency attenuates the somnogenic effect of prostaglandin D₂.' Society for Neuroscience, 32nd Annual Meeting, November 2-7, Orlando, Florida, U.S.A.
- 2) Qu, W-M, Huang, Z-L, Kuwahata, Y., Eguchi, N., Chen, J-F, Urade, Y., Hayaishi, O. (2002) 'Adenosine A_{2A} receptor partially mediates the somnogenic effect of PGD₂.' 日本睡眠学会第 27 回定期学術集会, 7 月 4-5 日, 仙台
- 3) Qu, W.-M., Huang, Z.-L., Mochizuki, T., Eguchi, N., Chen, J.-F., Schwarzschild, M. A., Fink, S. J., Urade, Y., and Hayaishi, O. Adenosine A_{2A} receptor deficiency attenuates the somnogenic effect of Prostaglandin D₂. Recent Progress in Sleep Research: International Symposium in Osaka-Biological, Clinical and Social Impact. March 20-21, Osaka

厚生科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

睡眠調節の分子機構と臨床応用に関する研究

分担研究者 儲 敏（財）大阪バイオサイエンス研究所 第2研究部 共同研究員

研究要旨

ラットの後部視床下部に4種類のPGE₂受容体（EP₁₋₄）の作動薬を投与すると、EP₄受容体作動薬の場合にのみ、投与量に比例して遊離ヒスタミン濃度が上昇する。

A. 研究目的

内因性覚醒物質であるPGE₂の作用機構に関する知識を深め、合理的な睡眠異常や睡眠覚醒障害の治療法の開発を目指す。

B. 研究方法

ラットの後部視床下部に薬液注入用の微小透析チューブの埋込み手術を行い、PGE₂や4種類のPGE₂受容体（EP₁₋₄）の作動薬を投与し、局所の遊離ヒスタミン濃度を測定する。

C. 研究結果

PGE₂およびEP₄受容体作動薬では、投与量に比例した遊離ヒスタミン濃度の上昇が観察された。

D. 考察

PGE₂はEP₄受容体を介してヒスタミン神経系を刺激し覚醒を起こすと考えられる。

E. 結論

PGE₂はEP₄受容体を介して後部視床下部のヒスタミン系覚醒中枢（結節乳頭核）を刺激する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Hayaishi, O.	Unraveling the enigma of sleep-molecular mechanisms of sleep-wake regulation.	Ishiura, Y. ed.al	Oxygen and Life -Oxidases and Lipid Mediators	Elsevier	Amsterdam	2002	503-510

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Lazarus, M., Kubata, B.K., Eguchi, N., Fujitani, Y., Urade, Y., and Hayaishi, O.	Biochemical characterization of mouse microsomal prostaglandin E synthase-1 and its colocalization with cyclooxygenase-2 in peritoneal macrophages.	Arch. Biochem. Biophys.	397	336-341	2002
Hayaishi, O. and Urade, Y.	Prostaglandin D ₂ in Sleep-wake regulation: recent progress and perspectives.	The Neuroscientist	8	12-15	2002
Hayaishi, O.	Molecular genetic studies on sleep-wake regulation - with special emphasis on the prostaglandin D ₂ system.	J. Appl. Physiol.	92	863-868	2002
Diaz, B.L., Fujishima, H., Kanaoka, Y., Urade, Y., and Arm, J.P.	Regulation of prostaglandin endoperoxide synthase-2 and IL-6 expression in mouse bonemarrow-derived mast cells by exogenous but not endogenous prostanoids.	J. Immunol.	168	1397-1404	2002
Oda, H., Shiina, Y., Seiki, K., Sato, N., Eguchi, N., and Urade, Y.	Development and evaluation of a practical ELISA for human urinary lipocalin-type prostaglandin D synthase.	Clini. Chem.	48	1445-1453	2002
Lazarus, M., Munday, C.J., Eguchi, N., Matsumoto, S., Killian, G.J., Kubata, B.K., and Urade, Y.	Immunohistochemical localization of microsomal PGE synthase-1 and cyclooxygenases in male mouse reproductive organs.	Endocrinology	143	2410-2419	2002
Inui, T., Ohkubo, T., Emi, M., Irikura, D., Hayaishi, O., Urade, Y.	Characterization of the unfolding process of lipocalin-type prostaglandin D synthase.	J. Biol. Chem.	278	2845-2852	
裏出良博	「睡眠障害とその治療-睡眠覚醒機構に関する最近の研究」	「脳 21」 金芳堂	19	29-32	

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Taniike, M., Mohri, I., Eguchi, N., Beuckmann, C.T., Suzuki, K., and Urade, Y.	Perineuronal oligodendrocytes protect against neuronal apoptosis through the production of lipocalin-type prostaglandin D synthase in a genetic demyelinating model.	J. Neurosci.	22	4885-4896	2002
Urade, Y., and Eguchi, N.	Lipocalin-type and hematopoietic prostaglandin D synthases as a novel example of functional convergence.	Prostaglandin & other Lipid Mediators	68-69	375-382	2002
Irikura, D., Kumasaka, T., Yamamoto, M., Ago, H., Miyano, M., Kubata, B. K., Sakai, H., Hayaishi, O., and Urade, Y.	Cloning, expression, crystallization, and preliminary X-ray analysis of recombinant mouse lipocalin-type prostaglandin D synthase, a somnogen-producing enzyme.	J. Biochem.	133	29-32	2003
Fujimori, K., Fujitani, Y., Kadoyama, K., Kumanogoh, H., Ishikawa, K., and Urade, Y.	Regulation of lipocalin-type prostaglandin D synthase gene expression by Hes-1 through E-box and interleukin-1 β via two NF- κ B elements in rat leptomeningeal cells.	J. Biol. Chem.	278	6018-6026	2002
Ikeda, M., Yoshioka, T., Allen, C.N.	Developmental and circadian changes in Ca ²⁺ mobilization mediated by GABA _A and NMDA receptors in the suprachiasmatic nucleus.	<i>Eur. J. Neurosci</i>	17	57-70	2002
Ikeda, M., Allen, C.N.	Developmental changes in calbindin-D28k and calretinin immunoreactive neurons in the suprachiasmatic nucleus.	<i>Eur. J. Neurosci</i>	in press		2003

20020903

以降は雑誌/図書に掲載された論文となりますので、
P.14- P.15の「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。