

F 健康危険情報 特になし

G 研究発表 (分担研究者論文発表)

- 1) Yamaguchi S, Isejima H, Matsuo T, Ohkura R, Yagita K, Kobayashi K, Okamura H Synchronization of cellular clocks in the suprachiasmatic nucleus Science 302, 1408-1412, 2003
- 2) Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division Science 302, 255-259, 2003
- 3) Nakahara D, Nakamura M, Iigo M, Okamura H Bimodal circadian secretion of melatonin from the pineal gland in a living CBA mouse Proc Natl Acad Sci USA 100, 9584-9589, 2003
- 4) Terazono H, Mutoh T, Yamaguchi S, Kobayashi M, Akiyama M, Udo R, Ohdo S, Okamura H, Shibata S Adrenergic regulation of clock gene expression in the mouse liver Proc Natl Acad Sci USA 100, 6795-6800, 2003
- 5) Sujino M, Matsumoto K, Yamaguchi S, van der Horst G, Okamura H, Inouye SIT Suprachiasmatic nucleus grafts restore circadian behavioral rhythms of genetically arrhythmic mice Curr Biol 13, 664-668, 2003

H 知的財産権の出願 登録状況
特になし

厚生労働省科学研究費補助金（こころの健康科学研究事業）
分担研究報告書

ヒト睡眠・覚醒リズム障害の分子生物学的精神解明とテララーメイト治療法開
発に関する基盤的研究

分担研究者 尾崎紀夫 名古屋大学大学院医学系研究科精神医学分野

研究要旨 睡眠覚醒リズムが関与する考えられる双極性障害の病態生理を解明するため、同しく睡眠覚醒リズムと考えられる5-HT系遺伝子のうちで、染色体上の存在部位を考慮してHTR4を候補遺伝子とした関連解析を行った。HTR4上の変異検索を行った上、LD mappingを検討した結果、本遺伝子が一つの連鎖平衡ブロックを形成していることが確認された。そこで、tag SNPとしてbranch siteに位置するd-25T>Cを用い、双極性障害334人を対象にして関連解析を行った。その結果、本多型と双極性障害の間に有意な関連を見出し、またGenomic Controlで確認したところ、この関連がstratificationによるものではないことを立証した。

A 研究目的

気分障害は頻度が高く、しかも自殺等の多大な損失をもたらすことから、その対策の重要性が再認識されている。しかし、気分障害には治療抵抗性の例も多く、病態生理解明による根本的予防・治療法が求められている。気分障害の病態生理は不明であるか、遺伝疫学的研究により環境的因子とともに多数の遺伝子が関与する複雑疾患であることが明らかにされており、近年の分子遺伝学の進歩とともに、遺伝子レベルから病態生理に接近する研究が行われている。

方法論は positional approach、candidate gene approach に二分されるか、我々は、以下の諸点からセロトニン(5-HT)系を候補遺伝子として気分障害の検討を行ってきた。1)気分障害の治療

薬である向精神薬は5-HT系に対する薬理効果を持っている。2)気分障害の病態には生体リズムが関与している可能性が示唆されているか、5-HT系が生体リズム調節において重要な役割を果たしていることが明らかにされている。3)気分障害の5-HT系異常が報告されている。

そこで、我々は、5-HT系遺伝子を候補遺伝子として多型検索を行い、これらの多型を使用して季節性感情障害、双極性障害の関連研究および単極性感情障害の薬理遺伝学的研究を行ってきた。

今回は5-HT系遺伝子の中でも、5-HT4受容体遺伝子(HTR4)の染色体上の部位(5q 33.2)が双極性障害発症脆弱性遺伝子の候補部位の近傍に位置している点

に着目して、双極性障害との関連解析をおこなった。

B 研究方法

1 変異検索には日本人精神障害患者（統合失調症37人、双極性障害27人、大うつ病性障害2人、パニック障害10人、強迫性障害10人、アンフェタミン関連障害10人）を対象に行った。HTR4のexon領域に加え、本遺伝子が多数のsplicing variantを作成する点を鑑みintron領域のbranch siteでも多型検索を行った。多型の検出方法としてはDHPLC (Denaturing high performance liquid chromatography) を用いて行い、同定した変異はSequenceにて確認した。さらに、双極性障害50例をもちいてLD mappingをおこなった。なお、genotypeはPCR-RFLPあるいはPrimer Extension法にて行った。

2 関連解析には双極性障害100人と、日本人正常対照者200人をまず行い。さらに多数症例を用いた確認のため双極性障害334人と、日本人正常対照者399人を用いた。また、sample内のstratificationを検討するため、20SNPsと41STRマーカをgenotypeし"STRUCTRE BY Pritchard"を用いた。

3 本研究は米国NIHと三省合同のゲノム研究に関する倫理指針に則った名古屋大学倫理審査委員会、藤田保健衛生

大学倫理審査委員会の承認を得ており、対象者には本研究に関して十分な説明を行い、文書にて同意を取得した。

C 研究結果

1 変異検索

Exon領域のアミノ酸置換を来さない多型1つとintron領域の多型6つを同定した。頻度の高い4つのSNPsを用いてLD mappingを行った結果、 $D'=1$ であり、ひとつの連鎖平衡ブロックを形成していることか確認できたので、以下の関連解析ではtag SNPsとしてbranch siteに位置するd-25T>Cを用いることにした。

2 関連解析

双極性障害100例での検討結果 C alleleの頻度が双極性障害では51%であり、コントロールでは42%と有意差を持っていた($p=0.03$)

- 双極性障害334人に確認した結果でも、やはり有意な関連が検出された($p=0.011$, odds ratio 1.33)。また、genomic control方を用いてstratificationを検討したところ、stratificationは検知されなかった。

D 考察と結論

HTR4上のtag SNPを選定して、双極性障害と有意な関連を示した。また、この関連はstratificationの結果生じる見かけ上のもてはなかった。このd-25T>Cはランチサイトにあり、この変

異かスプライノクハリアント形成に影響を与え、その結果、双極性障害の発症に関与する可能性かあると考えられる。

G 研究発表

論文発表

- 1 Okada M, Northup J, Ozaki N, Russell J, Linnoila M, Goldman D Modification of Human 5-HT_{2C} Receptor Function by Cys23Ser, an Abundant, Naturally Occurring Amino Acid Substitution Mol Psychiatry 9 (1) 55-64, 2004
- 2 Iwata N, Suzuki T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Inada T, Ozaki N No Association With the Neuregulin 1 Haplotype to Japanese Schizophrenia Mol Psychiatry 9 (2) 126-127, 2004
- 3 Hashimoto R, Yoshida M, Ozaki N, Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Tatsumi M, Kamijima K, Kunugi H Association analysis of the G308A promoter polymorphism of the tumor necrosis factor alpha (TNF- α) gene in Japanese patients with schizophrenia Journal of Neural Transmission 111 (2) 217-222, 2004
- 4 Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Ikeda M, Ozaki N Effect of DRD2, 5-HT_{2A}, and COMT genes on antipsychotic response to risperidone Pharmacogenomics J 3 (6) 356-361, 2003

- 5 The Japanese Schizophrenia Sib-pairLinkageGroup (JSSLG) (Arinami T IH, Minowa Y, Ohtsuki T, Tsujita T, Imamura A, Yoshikawa T, Toyota T, Yamada K, Shimizu H, Yoshitsugu K, Shibata H, Fujii Y, Fukumaki Y, Tashiro N, Inada T, Iijima Y, Kitao Y, Furuno T, Someya T, Mumtaka T, Kaneko N, Tsuji S, Mineta M, Takeichi M, Ujiike H, Takehisa Y, Tanaka Y, Nakata K, Kitajima T, Nishiyama T, Yamanouchi Y, Iwata N, Ozaki N, Ohara K, Suzuki Y, Shibuya H, Ohmori O, Shinkai T, Horii H, Nakamura J, Kojima T, Takahashi S, Tanabe E, Yara K, Nanko S, Yoneda H, Kusumi I, Kameda K, Koyama T, Fukuzako H, Hashiguchi T, Tanabe K, Okazaki Y) Initial genome-wide scan for linkage with schizophrenia in the Japanese Schizophrenia Sib-pair Linkage Group (JSSLG) families Am J Med Genet (Neuropsychiatr Genet) 120B (1) 22-28, 2003
- 6 Suzuki T, Iwata N, Kitamura Y, Kitajima T, Yamanouchi Y, Ikeda M, Kamatani N, Ozaki N Association of a haplotype in the serotonin 5-HT₄ receptor gene (HTR4) with Japanese schizophrenia Am J Med Genet 121B (1) 7-13, 2003
- 7 Ozaki N, Goldman D, Kaye WH, Plotnicov K, Greenberg BD, Lappalainen J, Rudnick G, Murphy DL Serotonin transporter missense mutation associated with a complex neuropsychiatric phenotype Mol Psychiatry 8 (11) 933-936, 2003

- 8 Okada M, Irie S, Sawada M, Urae R, Urae A, Iwata N, Ozaki N, Akazawa K, Nakanishi H. Pepstatin A induces extracellular acidification distinct from aspartic protease inhibition in microglial cell lines. *Glia* 43 (2) 167-74, 2003
- 9 Noda M, Yasuda S, Okada M, Higashida H, Shimada A, Iwata N, Ozaki N, Nishikawa K, Shirasawa S, Uchida M, Aoki S, Wada K. Recombinant human serotonin 5A receptors stably expressed in C6 glioma cells couple to multiple signal transduction pathways. *J Neurochem* 84 (2) 222-232, 2003
- 10 Ujike H, Harano M, Inada T, Yamada M, Komiyama T, Sekine Y, Sora I, Iyo M, Katsu T, Nomura A, Nakata K, Ozaki N. Nine- or fewer repeat alleles in VNTR polymorphism of the dopamine transporter gene is a strong risk factor for prolonged methamphetamine psychosis. *Pharmacogenomics J* 3 (4) 242-247, 2003
- 11 阿部徳一郎, 尾崎紀夫. 医療経済から見たうつ病の薬物治療. *臨床精神薬理* 6 (7) 879-884, 2003
- 2 学会発表
- 1 Ozaki N, Yamanouchi Y, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Ikeda M. Effect of Dopaminergic and Serotonergic Gene Polymorphisms on Antipsychotic Response to Risperidone, in 11th INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE PACIFIC RIM ASSOCIATION FOR CLINICAL PHARMACOGENETICS, Applications of Pharmacogenomics to Psychiatry LA, 2003
- 2 鈴木竜世, 西山毅, 山之内芳雄, 北島剛司, 他田匡史, 前野信久, 岩田仲生, 尾崎紀夫. 5-HT_{2A} 受容体遺伝子の多型検索と統合失調症との関連研究, in 第25回日本生物学的精神医学会, 2003
- 3 Okada M, Goldman D, Linnola M, Iwata N, Ozaki N, Northup J. COMPARISON OF G-PROTEIN PROMISCUITY TOWARD HUMAN 5-HT_{2C} AND 5-HT_{1A} RECEPTORS, in Satellite Meeting of the International Society of Neurochemistry Kyoto, 2003
- 4 Kitajima T, Suzuki T, Iwata N, Ikeda M, Yamanouchi Y, Ozaki N. Pharmacogenetic Study of Fluvoxamine Response in Major Depression using 5-HTT, HTR_{2A} and HTR_{3A} Gene Polymorphisms, in 11th INTERNATIONAL SYMPOSIUM OF THE PACIFIC RIM ASSOCIATION FOR CLINICAL PHARMACOGENETICS LA, 2003
- 5 尾崎紀夫, 岩田仲生, 北島剛司, 山之内芳雄, 鈴木竜世, 他田匡志, 前野信久. SSRI 反応性とセロトニン(5-HT)系遺伝子多型, in 第13回日本臨床精神神経薬理学会 シンポジウム遺伝子多型と臨床応用 弘前, 2003
- 6 尾崎紀夫, 岩田仲生. 統合失調症の神経発達障害. 神経変性仮説とゲノム研究の統合, in 第35回脳の医学生物学会 名古屋, 2003
- 7 尾崎紀夫, 岩田仲生, 内藤宏一, 鈴木竜世, 野畑綾子. うつ病の発症・経過において環境が果たす役割, in 第10

回日本産業精神保健学会 シンポジウム
「生活習慣病とメンタルヘルス」 東京,
2003

8 他田匡史, 太田龍朗, 鈴木竜世,
山之内芳雄, 西山毅, 北島剛司, 前野信
久, 岩田仲生, 尾崎紀夫 GABAA 受容体
α1 サブユニット遺伝子多型検索と関連
解析, in 第 25 回日本生物学的精神医学
学会, 2003

9 Iwata N, Suzuki T, Kitajima T,
Yamanouchi Y, Ikeda M, Inada T, Ozaki
N MUTATION SCREENING OF THE HUMAN
CANNABINOID RECEPTOR 1 (CNR1) IN
JAPANESE SCHIZOPHRENIA, in 11th World
Congress on Psychiatric Genetics
Quebeck, 2003

10 Iwata N, Ozaki N, Yamanouchi Y,
Suzuki S, Kitajima T, Ikeda M, Maeno H,
Ujike H, Sekine Y, Inada T, Harano M,
Komiyama T, Yamada M, Iyo M, Sora I,

Abuse) JGIMD Candidate Gene Analysis
of Amphetamine-related Disorders, in
Satellite Meeting of the International
Society of Neurochemistry Symposium
(Molecular Genetics of Substance-
related Disorders) Kyoto, 2003

11 前野信久, 楠 和憲, 小野雄一
郎, 今井真, 李 嵐, 粥川祐平, 尾崎紀
夫, 太田龍朗 三次元人格評価尺度
(TPQ) を用いた季節性感情障害 (SAD)
の人格特性の解析, in 第 25 回日本生物
学的精神医学学会, 2003

12 新田 真理, 阿部 徳一郎, 尾
崎紀夫 パニック障害の人格特性と、薬
剤反応性が TCI 得点に及ぼす影響, in 第
13 回日本臨床精神神経薬理学会 新潟,
2003

H 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・覚醒リズム障害の分子生物学的成因解明と
テララーメート治療法開発に関する基盤的研究

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，

我々は、既にほ乳動物の生体時計を構成する要素の一つであり、PER 蛋白などの時計蛋白をリン酸化し、その安定性や細胞内局在をコントロールする casein kinase I epsilon (CKIε) 遺伝子の多型解析を行い、睡眠相後退症候群 (DSPS)、非 24 時間睡眠覚醒症候群 (N-24) の発症を押さえるミスセンス多型を発見していたか、今年度はその詳細な機能解析を他施設と共同で行った。この多型により α-casein を基質として用いた場合のリン酸化酵素活性が約 18 倍に増加するのみならず、内因性の基質である時計蛋白に対するリン酸化酵素活性も上昇することを見出した。このリン酸化酵素活性の上昇か、概日リズム障害発症に対し抑制的作用を生起させると考えられた。メラトニン受容体の R54W 多型はその受容体結合活性に変化を及ぼす（発現量を減少させ、親和性を上昇させる）ことを報告済みで、Gq 蛋白 Gi 蛋白との結合性が変化していることも見出していたか、今年度は他施設と共同で R54W 多型を持つヒトメラトニン受容体を恒久的に発現する培養細胞 (Chinese hamster ovary cells) 株を樹立した。また、他の時計遺伝子から、時計蛋白の機能変化を生じる多型を新たに発見し、現在さらに詳細に解析中である。

A 研究目的

ヒトの概日リズム障害を対象に時計遺伝子多型及びその機能解析を行い、ヒトの概日リズムの個体差に関わる遺伝因子を明らかにし、個人毎の体質に最も適した生活・就労パターンを確立する。

対象，

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

B 研究方法

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、ヒト時計遺伝子のゲノム配列を元にプライマーを作成し、PCR やシーケンスに用いた。

PCR-SSCP (Single strand conformation polymorphism) 法や DHPLC (denaturing high performance liquid chromatography)法を用いて遺伝子多型を検出し、PCR 産物を直接シーケンスしてその多型の位置を特定した。

酵素活性の解析

ヒト *CK1ε* と 99.5% の相同性を持つラット *CK1ε* cDNA に PCR 法を使ってミスセンス多型を導入した。その cDNA を発現ヘクター 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 や時計蛋白を基質として *in vitro* での酵素活性を測定した。酵素解析は大阪大学蛋白質研究所 高野敦子博士、磯島康史博士との共同研究で行われた。

ヒトメラトニン 1A 受容体発現細胞の樹立

野生型及び R54W 変異を導入したヒトメラトニン 1A 受容体遺伝子を Neomycin 耐性遺伝子を持つ発現ヘクター pcDNA3.1 に挿入し、Chinese Hamster Ovary cell に導入した。Neomycin 0.8mg/mL を含む培地で細胞を培養し、

恒久的に導入遺伝子を発現している細胞株を単離した。細胞株の樹立は名古屋大学精神科 尾崎紀夫教授、藤田保健衛生大学精神科 山之内芳雄博士、岩田伸生助教授との共同研究で行われた。

(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 は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か、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

既に昨年、ヒト *CK1ε* 遺伝子から計 4 個の多型を検出し、うち 1 個がアミノ酸配列の置換を伴う多型 (ミスセンス多型) たったこと、同ミスセンス多型の保有者の頻度は、正常被験者に比へ、DSPS 群、N-24 群でそれぞれ約半分と有意に少なかったことを報告し、この多型が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を示した。また、cDNA を発現ヘクター 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 *in vitro* での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 18 倍の高い酵素活性が認められたことも報告した。

今年度は、ミスセンス多型を持つ CK1ε か、その内在性基質の一つであり、概日リズム形成機構の重要な構成要素である時計蛋白そのものに対しても高い酵素活性を示すか *in vitro* の実験系で調べた。その結果、やはり α-casein を基質として用いた場合と同様、多型を持つ蛋白の方が高い酵素活性を持つことが明らかになった。ヒトの生体時計機構の重要な構成物質である時計蛋白に対しても高い酵素活性を示したことで、我々の見出した CK1ε の多型が生体時計機構に直接作用し、概日リズム障害の発症に影響することか裏付けられた。また、この多型はコントロール群の約五人に一人が保有していることから、概日リズム障害のみでなく、健常人の間での概日リズム周期の個体差をももたらしている可能性が示された。

また、我々はメラトニン 1A 受容体遺伝子の多型解析を行い、概日リズム障害患者で多く見られ（有意差には至らず）、受容体の発現量やメラトニンとの結合性を変化させる R54W 変異を見出し、昨年、Gi, Gq 蛋白との結合性か変化することを報告していたか、今年度はさらに R54W 変異が細胞内刺激伝達系に与える影響を探るため、藤田保健衛生大学、名古屋大学と共同で、R54W 変異を持つメラトニン 1A 受容体遺伝子が恒久的に発

現する培養細胞 (Chinese hamster ovary cell) を樹立した。今後、細胞内刺激伝達系に生じる変化を詳細に調べていく予定である。

また、さらに別の時計遺伝子についても多型解析を進めていたか、そのうち一つから蛋白の構造を変化させる新しい多型を見出した。現在さらにその頻度や機能について詳細に解析中である。

D 考察

ほ乳動物の概日リズム形成には *Per1*, *Per2*, *Per3*, *Clock*, *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2*, *CK1ε* などの遺伝子およびその遺伝子産物（時計蛋白）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か判明している。これらの時計蛋白はいずれもリン酸化を受けることか判明しており、PER1, PER2 ではリン酸化を受けることで蛋白の安定性や細胞内局在か変化することか知られている。ハムスターでは CK1ε 遺伝子の変異 (*tau* 変異) が概日リズム周期を短縮させる。また、家族性の睡眠相前進症候群のうちのある家系では *Per2* 遺伝子の変異が PER2 蛋白のリン酸化の減少をもたらすことか米国から報告された。我々が既に報告した DSPS 発症の危険因子である *Per3* 遺伝子の [G647, R1158] ハプロタイプは PER3 蛋白のリン酸化に影響を与えると考えられている。時計蛋白のリン酸化に関わる酵素はそのすべてか判明しているわけではないか、CK1ε はその一つとして機能しており、概日リズム

の形成・維持に大きな影響を与えている。

我々は既に昨年 CK1ε 遺伝子のミスセンス多型が正常被験者に高頻度で見られ、*in vitro* での酵素活性を増加させることを報告した。その際、リン酸化酵素活性を定量化しやすい α-casein を基質として用いた実験を行ったか、内因性の基質である時計蛋白に関しては直接調べていなかった。今年度は他施設と共同で内因性の時計蛋白を基質として酵素活性を測定し、α-casein の場合と同様、ミスセンス多型を持つ方が *in vitro* で高い酵素活性を示すことを示した。内因性の時計蛋白に対しても高い酵素活性を示したことは、我々の見出した多型が直接概日リズム形成機構に影響し、概日リズム障害の発症を抑制していることを機能の面から裏付けるデータである。

また、この多型は正常被験者の約五人に一人の割合で認められたことから、健常人の間での概日リズムの個体差にも関わっている可能性がある。今後更に詳細な解析が望まれる。

メラトニン 1A 受容体遺伝子の R54W 多型については、cDNA を培養細胞に一過性に発現させた実験系を用いて受容体の発現量、リガントとの親和性、G 蛋白との結合性など受容体の様々な性質を変化させることを突き止めていた。しかしこの系では細胞内刺激伝達系に与える影響を調へることは困難だったか、今回他施設と共同で多型を持つ受容体を恒久的に発現する培養細胞株を樹立し得たので、どのような細胞内刺激伝達系の

変化か、概日リズムに変化をもたらすか詳細に解析することか可能となった。

また、すでに別の時計遺伝子からもその蛋白構造を変化させる多型を見出している。

このような多型の検出、機能解析の積み重ねにより、概日リズム周期の個体差をもたらす遺伝子要因が明らかになり、個人の体質にあった生活パターン、就労パターンの樹立が可能になっていくと思われる。

この研究は以下の研究者の協力を得て行われた。

内山真、沢井佳代、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）、尾崎紀夫（名古屋大学）、北島剛司、山之内芳雄、岩田仲生（藤田保健衛生大学医学部精神科）、中島亨（杏林大学医学部精神科）、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 epsilon (CKIε)* 遺伝子から見出した、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は、 α -casein のみならず、概日リズム形成機構の構成蛋白に対してのリノ酸化酵素活性をも増加させた。これが概日リズム障害の発症を抑制する生化学的機序ではないかと考えられる。

R54W 変異を持つヒトメラトニン 1A 受容体を恒久的に発現する培養細胞株を樹立した。

更に別の時計遺伝子からも蛋白の構造変化をもたらす多型を検出した。

F 健康危険情報

なし

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Satoh K, Mishima K, Inoue Y, Ebisawa T, Shimizu T (2003) Two pedigrees of familial advanced sleep phase syndrome in Japan *Sleep*, 26, 416-417
- 2) 海老澤尚 (2003) hPer1 遺伝子 (「KEYWORD 精神第 3 版」樋口輝彦、神庭重信、染谷俊幸、宮岡等編集)、156-157, 先端医学社
- 3) 海老澤尚 (2003) オレキノンノクアウトマウス (「KEYWORD 精神第 3 版」樋口輝彦、神庭重信、染谷俊幸、宮岡等編集)、158-159, 先端医学社
- 4) 海老澤尚 (2003) メラトニン受容体

(「KEYWORD 精神第 3 版」樋口輝彦、神庭重信、染谷俊幸、宮岡等編集)、226-227, 先端医学社

5) 海老澤尚 (2004)、メラトニン受容体の分子生物学 (「メラトニン研究の最近の進歩」三池輝久、山寺博史監修、メラトニン研究会 編)、35-44, 星和書店

6) 海老澤尚 (2004)、ヒトの時計遺伝子変異と疾患 (「時計遺伝子の分子生物学」岡村均、深田吉孝編集)、177-184、ニュブリーカー・フェアラク東京

7) 池田正明、余旺節、朱水梅、林隆司、能谷恵、海老澤尚、岡田尚志郎、野村正彦 時計遺伝子 BMAL1 のリズム発振機構と HPA axis 感情障害の分子病態との関連 (2003) 精神薬療基金研究年報、第 35 集、189-195

2 学会発表

(特別講演、シンポジウム)

- 1) 海老澤尚 (2003 6 12) 睡眠障害の基礎と臨床、第 158 回あさひセミナー、東京
- 2) Ebisawa T (2003 9 9) Clock-gene variations and delayed sleep phase syndrome/non-24-hour sleep-wake syndrome 1st World Congress of Chronobiology, Sapporo
- 3) 海老澤尚 (2003 10 2)、WAVE を用いたヒト時計遺伝子多型解析、第 6 回 DHPLC 技法 (WAVE 法) による最新の遺伝子変異の解析のセミナー、東京
- 4) Ebisawa T (2004 2 26-28) Human circadian behavior and clock-gene

polymorphisms International Symposium on
Molecular Clock Tokyo 2004, Tokyo

(学会一般発表・研究会報告)

1) 海老澤尚、内山真、高野敦子、梶村尚史、亀井雄一、三島和夫、井上雄一、北島剛司、山田尚登、加藤昌明、伊井佳代、尾関祐二、長尾真理子、渡辺剛、令圭子、中島亨、工藤吉尚、堀達、磯島康史、豊嶋良一、尾崎紀夫、大川匡子、水井克也、高橋清久、山内俊雄 (2003 4 17) 睡眠覚醒リズム障害における Casein kinase 1 epsilon 遺伝子の多型、第 25 回日本生物学的精神医学会、金沢

2) Satoh K, Mishima K, Inoue Y, Ebisawa T, Shimizu T (2003 9 10) Two pedigrees of familial advanced sleep phase syndrome in Japan 1st World Congress of Chronobiology, Sapporo

H 知的財産権の出願・登録状況

なし

ヒトの朝型夜型指向性を規定する要因に関する分子遺伝学的研究

分担研究者 三島 和夫

秋田大学医学部 神経運動器学講座 精神医学分野助教授

研究要旨 集団の階層化のリスクが相対的に低い日本人の健常成人（第一次調査対象）およびその同居家族を対象として、朝型夜型指向性に及ぼす遺伝的要因および環境的要因に関する分子遺伝学調査を進めている。本年度は第一次調査対象となり解析が進んでいる 421 名を抽出して、Katzenberg ら(1998)により報告された朝型夜型指向性と *hClock* (*Homo sapiens clock homolog*)の 3'-flanking region に存在する 3111T/C 多型との関連について追試検討した。その結果、日本人集団においては 3111C homozygotes かその他の遺伝子型保有者に比較して Horne-Ostoberg の朝型夜型スコアが有意に低値であり、夜型指向性の感受性を増大させる可能性が示唆された。

A 研究目的

ヒト概日リズム制御機能に影響を及ぼす可能性のある遺伝子多型／遺伝子変異についての知見が蓄積されつつある。これまでに睡眠相前進症候群や睡眠相後退症候群をメンテル型遺伝様式で発症する家系が幾つか報告されている。Johns らは 1999 年に睡眠相前進症候群を高浸透率の常染色体優性遺伝型式で発症する米国の三家系を報告した。その後の連鎖解析により、時計遺伝子である *hPer2* (*Homo sapiens period homolog 2*)の点突然変異がこれらの家系で認められた FASPS の原因である可能性が強く示唆された。実際、この家系の発症メンバーでは、極めて短い概

日リズムのフリーラン周期(τ)が認められ、明暗サイクル下での睡眠の同調位相の極端な前進に寄与しているものと推測された。睡眠相後退症候群の疾患感受性を高める可能性のある遺伝子多型も報告されている。Ebisawa ら(2001)は、*hPer3* (*Homo sapiens period homolog 3*)のある SNP ハプロタイプが睡眠相後退症候群の罹患者において有意に不均衡連鎖をしていることを報告した。また、Archer ら(2003)らは、やはり *hPer3* の Exon18 上にある繰り返し配列多型 (4-repeat、5-repeat) のうち 4-repeat が睡眠相後退症候群の罹患者に有意に高率に認められると報告した。これらの報告では共通して、標的

遺伝子の蛋白コート領域上に認められた突然変異や多型か Casein kinase 1 ϵ (CKI ϵ) のリン酸化を修飾することか概日リズム睡眠障害の病因であると推定している。CKI ϵ は時計遺伝子蛋白のリン酸化を介して視交叉上核細胞内での translation-transcription feedback loop を律速するか、先に報告された遺伝子多型／遺伝子変異はリン酸化部位もしくはその近傍に位置することにより時計遺伝子のリン酸化の速度を変化させ、結果的に τ を修飾するとの仮説が提唱されている。

容易に想像されるように、 τ を変化させるような時計遺伝子の蛋白コート領域、プロモーター領域などに存在する遺伝子多型／遺伝子変異は、概日リズム睡眠障害以外にもさまざまな睡眠・覚醒リズムの表現型を取り得る。例えば、 τ の長短は朝型夜型指向性に有意に相関することか明らかにされている。すなわち、長い τ は夜型指向性の、短い τ は朝型指向性の生物学的基盤になるとされる。視点を換えれば、睡眠相前進症候群や睡眠相後退症候群のような概日リズム睡眠障害に罹患者の少なくとも一部は、極端に強い朝型もしくは夜型指向性を引き起こす時計遺伝子機能の表現型を有する一群から構成されている可能性がある。時計遺伝子の一つである *hClock* (*Homo sapiens clock homolog*) の 3'-flanking region の多型か健常成人の夜型指向性に関連しているという報告かなされている。

Katzenberg ら(1998)は、あるコホート研究の参加者 410 名を対象として、*hClock* の 3111C 保有者(C/T、C/C)か 3111T/T 保有者に比較して、より強い夜型指向性を示すと報告した。しかしながら、Robilliard ら(2002)による追試では、3111T/C 遺伝子型と朝型夜型指向性との間に有意な相関を認めることはできなかった。相関研究にみられるこのような結果の食い違いはしばしば生じるか、その要因の一つに集団の階層化 population stratification effects かある。Katzenberg らの対象者の 95%は Caucasian てあったか、その遺伝的背景の内訳は多岐にわたり、Germany、Great Britain、Scandinavia、Central Europe、South Europe 出身グループから構成されていた。彼らはそれぞれのグループについても 3111C 保有者と非保有者間で比較を行い 3111C 保有者で夜型指向性が強いと結論つけているか、各グループの対象者数は数十名の規模に留まり信頼性についてのさらなる検証か必要である。一方、Robilliard らの対象者の遺伝的背景についての情報は与えられていない。

我々は本研究班での課題として、集団の階層化のリスクか比較的強く抑えられる日本人を対象として、時計遺伝子およびその近傍に存在する遺伝子多型と朝型夜型指向性との相関研究を進めている。また、強い朝型指向性を遺伝的に引き継いでいる家系（もしくは睡眠相前進症候群を発症している家

系)は極めて稀であると信じられているか、我々は、実はかなりの潜在群か一般人口中に存在し、睡眠維持障害などの睡眠障害リスクに晒されているものと推測している。そこで、調査対象者の中から強い朝型指向性を有している群を抽出したうえで、同群での表現型(睡眠覚醒特性)を評価するとともに、その遺伝的特徴を明らかにするための系統的な家族調査を進める予定である。

B 研究対象と方法

第一次調査対象者は、秋田県内に在住の20歳以上60歳未満の健常成人である。Horne-Ostoberg 質問紙およびPittsburg 睡眠調査票により朝型夜型指向性と睡眠特性に関する自覚評価情報を得た。同時に、人口集団中のうつ病、うつ状態のスクリーニングに適している the Center for Epidemiologic Studies Depression Scale (CES-D)を施行した。第一次対象者からは末梢血を採取し、既存の方法でDNAを抽出し多型解析に供した。第二次調査対象者は第一次調査対象者の同居者である。同居者はいわゆる血縁関係者に限らず、食事、入浴などを含めた生活環境の少なくとも一部を共有しているものとし、同居年数、同居の形態、寝室の区別、睡眠覚醒の相互干渉の程度、食事を一緒にとる回数などについての質問項目を設けた。本研究は秋田大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。研究の実施

に際しては、研究の主旨と方法、遺伝子試料の取り扱い等に関して文書により説明し、書面による同意を得て行った。本年度は、第一次調査を終了した421名(平均年齢、35.5歳 20~58歳, M/F = 115/306)について、朝型夜型指向性と Katzenberg らにより報告された *hClock* の 3111T/C 多型との関連について報告する。

C 研究結果

本研究での被験者における Horne-Ostoberg 質問紙による朝型夜型指向性スコア(Morningness-Eveningness Score, ME スコア)のヒストグラムを図1に示す。421名全体でのMEスコアは平均 51.0 ± 0.44 (\pm SEM)点、範囲25-73点の正規分布を示した。MEスコアとPittsburg 睡眠調査票から算出した入眠時刻($r = 0.541, p < 0.0001$)、覚醒時刻($r = 0.513, p < 0.0001$)、睡眠中間点(入眠時刻と覚醒時刻の中間時刻, $r = 0.630, p < 0.0001$)との間にはそれぞれ有意な相関が認められた。このことは

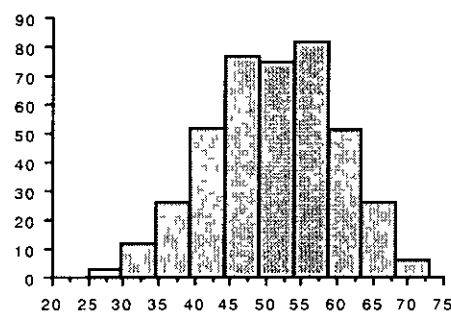


図1 朝型夜型スコアの分布(横軸がスコアを、縦軸が度数を示す)

今回の研究対象となった被験者の同調条件下での睡眠相を規定している概日リズム特性を予測するマーカーとして ME スコアが有用であることを示している。

秋田県の被験者において観察された 3111C/T 対立遺伝子頻度、遺伝子型頻度を表 1 に示した。表 1 には Katzenberg ら(1998)および Robilliard ら(2002)らの報告から算出した対応する数値を併記した。今回の秋田県での被験者での遺伝子型 3111T/T、T/C、C/C の頻度は Hardy-Weinberg 法則に従っていた($\chi^2 = 0.20$, $df = 2$, $p = 0.90$)。

日本人での 3111T/T、T/C、C/C の各遺伝子型を有する被験者の分布を、過去の 2 つの報告で調査対象となった集団でのそれらと比較したところ、3 つのグループ間で有意な偏りが認められた($\chi^2 = 56.10$, $df = 4$, $p < 0.0001$)。日本人グループ vs Katzenberg らのグループ($\chi^2 = 31.9$, $df = 2$, $p < 0.0001$)、日本人グループ vs Robilliard らのグループ($\chi^2 = 43.2$, $df = 2$, $p < 0.0001$)のみならず、Katzenberg らのグループ vs Robilliard らのグループ($\chi^2 = 8.83$, $df = 2$, $p < 0.02$)の間にも、遺伝子型分布の有意な偏りが認められた。

3111T 保有者と非保有者(3111C/C)の分布を検討した結果、3 つのグループ間で有意な偏りが認められた($\chi^2 = 23.9$, $df = 2$, $p < 0.0001$)。日本人グループ vs Katzenberg らのグループ($\chi^2 = 7.18$, $df = 1$, $p < 0.01$)、日本人グループ

vs Robilliard らのグループ($\chi^2 = 25.6$, $df = 1$, $p < 0.0001$)のみならず、Katzenberg らのグループ vs Robilliard らのグループ($\chi^2 = 7.56$, $df = 1$, $p < 0.01$)の間にも、遺伝子型分布の有意な偏りが認められた。

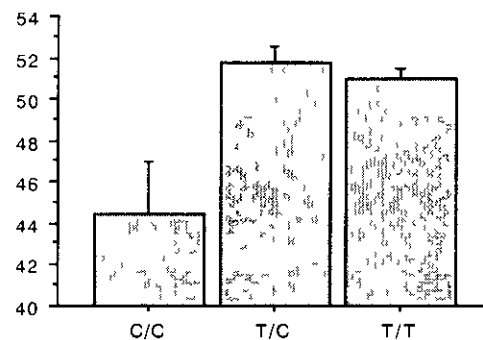


図 2 遺伝子型別の朝型夜型スコア (横軸がスコアを示す) テータは Mean ± SEM

図 2 に各遺伝子型ごとの ME スコアを示した。3111 C/C 群 (44.5 ± 2.5)、3111C/T 群 (51.6 ± 0.98)および 3111T/T 群 (50.8 ± 0.5)の間には ME スコアに関して有意な群間差があり (One-way ANOVA, $F = 3.59$, $df = 2$, $p = 0.029$)、3111C/C 群では 3111T/T 群および 3111T/C 群と比較して有意に ME スコアが低値であった($p = 0.014$, $p < 0.01$, Bonferroni's post hoc analysis)。このことは、3111C/C 群では 3111T 保有者群と比較して夜型指向性がより顕著であることを意味する。一方、3111T/T 群および 3111T/C 群との間には ME スコアに関して有意な群間差は認めなかった。また、3111C 保有群および非保有群との間にも ME スコアに関して有意

な群間差は認めなかった。

D 考察

本年度の検討から、日本人においても *hClock* の 3111C/T 多型と朝型夜型指向性との間に一定の相関関係が認められた。すなわち、3111C/C homozygotes のみか、3111T/T homozygotes もしくは 3111C/T heterozygotes に比較して有意な夜型指向性を示した。これらの知見は必ずしも *hClock* の 3111C/C 多型が夜型指向性を規定する責任部位である直接的な証拠とはならないか、*hClock* の 3111C/C 多型自体もしくはその近傍に同調条件下での睡眠相の異常を引き起こす何らかの遺伝子多型/変異が連鎖して存在している可能性を強く示唆している。3111C/C homozygotes とその他の 2 遺伝子型との間に認められた ME スコアの得点差は 6 - 7 点に達し、Katzenberg ら(1998)が示した 3111C 保有群と非保有群との間に認められた 3 点に比較しても大きく、3111C/C homozygotes の日本人の夜型指向性に及ぼすより大きい影響力が示唆された。

ただし、今回得られた日本人での 3111T/C 多型に関するデータと Katzenberg ら(1998)の報告内容のそれとの間には幾つかの相違点が認められた。Katzenberg らの被験者では、3111C/C homozygotes と 3111C/T heterozygotes との間に ME スコアの有意差は認められなかった。このことは、3111C 対立遺伝子は夜型指向性の発現に優性的に作

用し得ることを意味しており、3111C 対立遺伝子の影響力を極めて高く評価することと同義である。この結論は、3111T/C 遺伝子型と ME スコア、3111T/C 遺伝子型と盲目患者での τ のいずれの比較においても有意な遺伝子型間差を認めず、さらに睡眠相後退症候群の罹患者と対照健全群間での対立遺伝子頻度にも有意差を認めなかったとする Robilliard ら(2002)らの報告とはまったく対照的なものである。また、今回の日本人の調査対象者での遺伝子型頻度および対立遺伝子頻度か、Katzenberg らおよび Robilliard らの調査対象となった被験者でのそれらと有意に異なっていた。日本人集団での 3111C/C homozygotes 頻度は、先に報告された Caucasian 集団のそれに比較して有意に低値であった。さらに、Katzenberg らおよび Robilliard らの調査集団間にも有意な遺伝子型頻度および遺伝子頻度の群間差が認められた。これらは、それぞれの相関研究が対象とした調査集団の遺伝的背景が異なることを考え合わせると当然予測されることである。このような調査集団の遺伝的背景の違いにもかかわらず、また、3111T/C 多型の夜型傾向に及ぼす影響についての知見の不一致を考慮に入れても、集団の階層化 population stratification effects のリスクが低いと期待される日本人集団においても、Katzenberg らの Caucasian 集団と同様に 3111C が夜型指向性を有する一群に

不均衡連鎖することか確認できたことは注目すべきである。今後は、3111T/C 部位近傍を含め、*hClock* の機能修飾をもたらす可能性のある遺伝子多型もしくは遺伝子変異の検索を系統的に進めることによって、*hClock* かヒトの朝型夜型指向性に及ぼす影響力についての評価が可能になるものと期待される。また、当然ながら、朝型夜型指向性は単一の遺伝子により規定されるものではない。明暗環境下での同調位相に影響する τ を規定する複数の時計遺伝子、光感受性を規定する遺伝子群、睡眠の開始と維持に関連する数多くの遺伝子群など、多様な遺伝子群がそれぞれに朝型夜型指向性に影響を及ぼしているものと推測される。今後は、これらの朝型夜型指向性に影響を及ぼす可能性のある候補遺伝子群の多型解析および組み合わせ解析を通して、概日リズム睡眠障害の罹患高感受性群、ひいては朝型夜型指向性を決定する蛋白プロセスを同定することか可能になるものと思われる。

E 結論

日本人集団においては 3111C homozygotes かその他の遺伝子型保有者に比較して **Horne-Ostoberg** の朝型夜型スコアが有意に低値であり、夜型指向性の感受性を増大させる可能性が示唆された。

G 研究発表

1 論文発表

- 1) Satoh K, Mishima K, Inoue Y, et al Two pedigrees of familial advanced sleep phase syndrome in Japan SLEEP 2003, 26 416-7
- 2) Tozawa T, Mishima K, Satoh K, et al Stability of human sleep timing against the biological clock phase in the elderly Clinical implications J Clin Endocrinol Metab 2003, 88 4689-95
- 3) Echizenya M, Mishima K, Satoh K, et al Heat Loss, Sleepiness, and Impaired Performance after Diazepam Administration in Humans Neuropsychopharmacology 2003, 28 1198-206
- 4) Echizenya M, Mishima K, Satoh K, et al Enhanced heat loss and hypersensitivity to diazepam in the elderly J Clin Psychopharmacol 2004, in press
- 5) Katoh T, Echizenya M, Maruyama F, et al Diazepam-induced sedative effects trace a profile of enhanced heat loss in humans Clin Neuropharmacology 2004, submitted
- 6) Kusanagi H, Satoh K, Echizenya M, et al Similar profiles in human Period1 gene expression in peripheral mononuclear and

- polymorphonuclear cells neurosci Lett 2004, submitted
- 7) Tozawa T, Mishima K, Satoh K, et al A polymorphism in hCLOCK affect morningness-eveningness properties in Japanese population Neurosci Lett 2004, prepared
- 8) 三島和夫 睡眠・覚醒を維持する脳内神経メカニズム 成人病と生活習慣病 2003,33 1171-7
- 9) 三島和夫 高齢者で問題となりやすい睡眠障害 最新医学 2004,59 91-97
- 2 学会発表
- 1) 三島和夫, シンポジウム「健康維持増進とノエロンテクノロジー」 高齢者を取り巻く光環境と睡眠, ノエロンテクノロジー研究フォーラム 2003, 東京, 2003 年 12 月
- 2) 三島和夫, シンポジウム「睡眠医療における精神科医の役割」 加齢に伴う睡眠障害と精神医学—睡眠の老化を促す要因とその対処法—, 第 99 回日本精神神経学会総会, 東京, 2003 年 6 月
- 3) Mishima K Physiological meaning of decreased melatonin secretion for aging sleep in human (Symposium), 1st World Congress of Chronobiology, Sapporo, Japan, 2003 年 9 月
- 4) Kusanagi H, Mishima K, Satoh K, et al, Peripheral mononuclear cells and polymorphonuclear neutrophils possess same circadian phase of hPer1 mRNA expression in human, 1st World Congress of Chronobiology, Sapporo, Japan, † 2003 年 9 月
- 5) Tozawa T, Mishima K, Satoh K, et al, Stability of sleep timing against the melatonin secretion rhythm with advancing age Clinical implications, 1st World Congress of Chronobiology, Sapporo, Japan, 2003 年 9 月
- H 知的財産権の出願・登録状況
特になし。

Table 1 hCLOCK 3111 T/C allele frequencies in Akita in comparison with previously reported data

	Genotypes			3111T		Allele frequency	
	3111T/T	3111T/C	3111C/C	positive	negative	3111T	3111C
in Akita	303 / 421	106 / 421	12 / 421	409	12	0.848	0.152
Katzenberg et al	219 / 410	163 / 410	28 / 410	382	28	0.731	0.269
Robilliard et al	45 / 105	44 / 105	16 / 105	89	16	0.655	0.345

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・覚醒リズム障害の疫学的研究

分担研究者 角谷 寛 京都大学・医学研究科 先端領域融合医学研究機構
特任助教授（研究員(科学技術振興)(常勤形態)）

日本人の睡眠障害およびリズム障害に関する遺伝的疫学研究を開始した。

A 研究目的

日本人は遺伝的背景が比較的良く揃っているため、遺伝的疫学研究を行う対象としては最適である。したがって、日本人を対象とした精度の高い遺伝的疫学調査を行うことは、睡眠障害・リズム障害の原因解明および将来のテーラード治療法開発に繋がると考えられる。そこで、そのための基本的データの収集ならびに解析を行うことが本研究の目的である。

B 研究方法

日本人を対象として、遺伝的疫学研究を開始した。まず、睡眠時無呼吸症候群患者における ApoE（アポリポ蛋白 E）の対立遺伝子多型に関して解析を行った。国内の睡眠医療センターよりサンプルの提供を受けて、遺伝子多型を解析した。

（倫理面への配慮）

京都大学 医の倫理委員会にて承認されており（第 G73 号）、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、インフォームドコンセントを得た後に実施した。

C 研究結果

日本人の睡眠時無呼吸症候群患者約 150 人における ApoE（アポリポ蛋白 E）の対立遺伝子 ϵ 4 の頻度は 10%であった。

D 考察

健常者におけるこの遺伝子多型の割合を調べる必要がある。そこで、約 500 人の一般を対象に睡眠障害およびリズム障害に対する多角的調査を実施する。現在、京都大学 医の倫理委員会にて審査中であり、審査終了後、平成 16