

謝や免疫系の異常を引き起こし、生活習慣病や発癌などにも関連するという病態にも迫れるようになってきた。末梢における時間の司令塔としての副腎の機能の解明を軸としての、今後の睡眠研究の展開が注目される。

F. 健康危険情報
特に無し

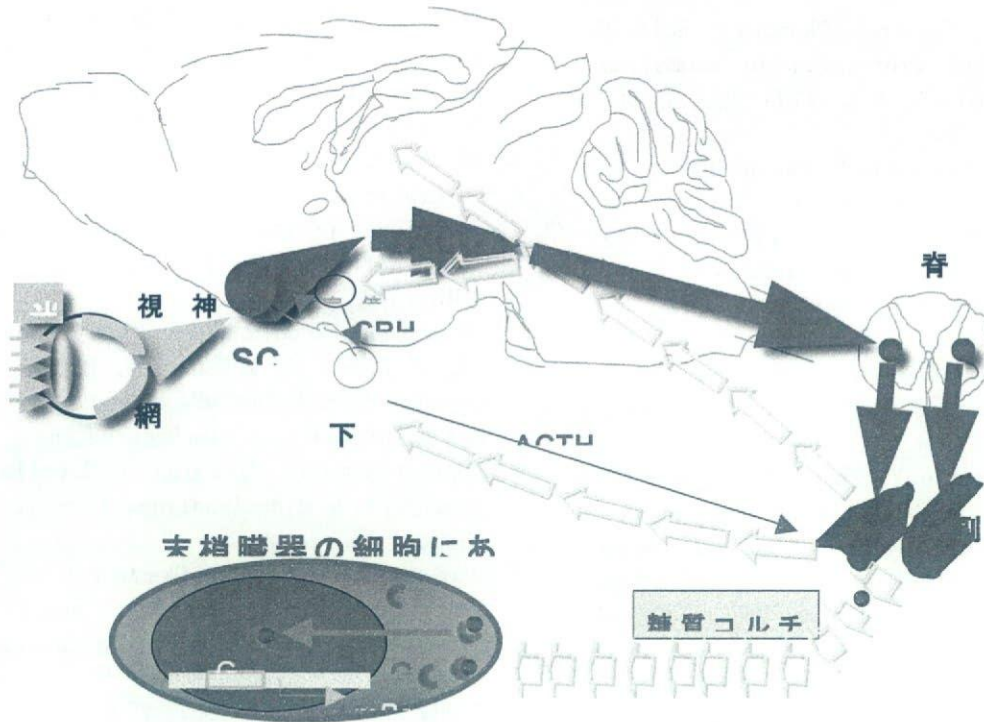


図1 高照度光療法の際に活性化が予測される視交叉上核-脊椎-副腎皮質ホルモン系
光により調律されたリズム情報は SCN から神経情報として発振され、脊椎に至り、交感神経一経を介し副腎に到達する。ここでホルモン情報に変換された時間シグナルは、全身の細胞に到達し、糖質コルチコイド受容体 (GR) と結合し、核内で糖質コルチコイド応答領域 GRE に結合し、核内に移行し mPer1 遺伝子の転写を促進する。産生された PER1 はもう一つの時計蛋白質である PER2 などと会合し、細胞の時間位相を変える。これ以外にも、糖質コルチコイドはさまざまな遺伝子を活性化する。また、糖質コルチコイドは、大脳辺縁系や視床下部 PVN や下垂体にネガティブフィードバックをかけると想定される。

G. 研究発表

論文発表

- 1 Saifur Rohman M, Emoto N, Nonaka H, Okura R, Nishimura M, Yagita K, van der Horst GT, Matsuo M, Okamura H, Yokoyama M: Circadian clock genes directly regulate expression of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 in the kidney. *Kidney Int.* 67, 1410-1419, 2005.
- 2 Yamamoto Y, Yagita Y, Okamura H: Role of cyclic *mPer2* expression in mammalian cellular clock. *Mol. Cell Biol.*, 25, 1912-1921, 2005.
- 3 Iijima M, Yamaguchi S, van der Horst GT, Bonnefont X, Okamura H, Shibata S. Altered food-anticipatory activity rhythm in Cryptochrome- deficient mice. *Neurosci Res.*, 52, 166-173, 2005.
- 4 Tamanini F, Yagita K, Okamura H, van der Horst GT. Nucleocytoplasmic shuttling of clock proteins. *Methods Enzymol.* 393, 418-435, 2005.
- 5 Dong X, Yagita Y, Zhang J, Okamura H: Expression of ubiquitin-related enzymes in the suprachiasmatic nucleus with special reference to ubiquitin carboxy-terminal hydrolase UchL1. *Biomed. Res.*, 26, 43-49, 2005.
- 6 Okamura H: Biological clock in the liver. In *Signaling Pathways in Liver Diseases*, Edited by J. -F. Dufour and P. -A. Clavien, Springer-Verlag, Berlin, 2005, pp 391-403.
- 7 Masubuchi S, Kataoka N, Sassone-Corsi P, Okamura H: Mouse *Period1* (*mPER1*) acts as a circadian adapter to entrain the oscillator to environmental light/dark cycles by regulating *mPER2* protein. *J. Neurosci.*, 25, 4719-4724, 2005.
- 8 Kitahama K., Araneda S, Geffard M, Sei H, Okamura H: Tyramine-immunoreactive neuronal structures in the rat brain: abundance in the median eminence of the mediobasal hypothalamus. *Neurosci. Lett.*, 383, 215-219, 2005.
- 9 Masuki S., Todo T, Nakano Y, Okamura H, Nose H: Reduced alpha-adrenoceptor responsiveness and enhanced baroreflex sensitivity in *Cry*-deficient mice lacking biological clock. *J. Physiology (London)*, 566, 213-224, 2005.
- 10 Ishida A, Mutoh T, Ueyama T, Bando H, Masubuchi S, Nakahara D, Tsujimoto G, Okamura H: Light activates the adrenal gland: Timing of gene expression and glucocorticoid release. *Cell Metabolism*, 2, 297-307, 2005.
- 11 Okamura H, Ueyama T, Masubuchi S, Kitahama K: Morphology of DOPAergic neurons in mammals: In *Neurobiology of DOPA as a Neurotransmitter*, Edited by Y. Misu and Y. Goshima, CRC Press in Taylor & Francis, Boca Raton, 2006, pp 47-62.
- 12 Masamizu Y, Ohtsuka T, Takashima Y, Nagahara H, Takenaka Y, Yoshikawa K, Okamura H, Kageyama R: Real-time imaging of the somite segmentation clock: reversion of unstable oscillators in the individual presomitic mesoderm cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103, 1313-1318, 2006.
- 13 Maywood ES, Reddy AB, Wong GKY, O'Neil JS, O' Brien JA, McMahon DG, Hearn AJ, Okamura H, Hastings MH: Synchronization and maintenance of timekeeping in suprachiasmatic circadian clock cells by neuropeptidergic signaling. *Current Biology* 16, in press.
- 14 Matsui D, Takekida S, Okamura H: Molecular Oscillation of *Per1* and *Per2* Genes in the Rodent Brain: An *In Situ* Hybridization and Molecular Biological Study, *Kobe J. Med. Sci.* 2006 in press.
- 15 Ines C, Yagita K, Barnhoon S, Okamura H, van der Horst TJ, Tamanini F: Functional evolution of the photolyase/cryptochrome protein family: importance of the C terminus of mammalian *CRY1* for circadian core oscillator performance, *Mol. Cell Biol.*, 2006 in press.
- 16 Inoue H, Wataru Ogawa W, Asakawa A, Okamoto Y, Akihiko Nishizawa A, Matsumoto M, Teshigawara K, Matsuki Y, Watanabe E, Hiramatsu R, Notohara K, Katayose K, Okamura H, C. Kahn R, Noda T, Takeda K, Akira S, Akio Inui A, Kasuga M: Role of hepatic STAT3 in brain insulin action on hepatic glucose production, *Cell Metabolism*. 2006 in press.
- 17 Fujimoto Y, Yagita K, Okamura H: Does *mPER2* protein oscillate without its coding mRNA cycling?— Post-transcriptional regulation by cell clock, *Genes Cells*, 2006 in press.

- 18 Hashimoto N, Kido Y, Uchida T, Asahara S, Shigeyama Y, Matsuda T, Takeda A, Tsuchihashi D, Nishizawa A, Ogawa W, Fujimoto Y, Okamura H, Karen C. Arden KC, Herrera P, Tetsuo Noda T, and Kasuga M: Ablation of PDK1 in pancreatic β cells induces diabetes as a result of loss of β -cell mass. *Nature Genetics*, 2006 in press.
- 19 岡村 均、増渕 悟、上山友子：体内時計を司る遺伝子ネットワーク、ホルモンと臨床、53 (6), 603-610, 2005.
- 20 岡村 均：身体の時間を刻む時計遺伝子、関西実験動物研究会会報、26、19-23, 2005.
- 21 岡村 均：はじめに — 生物にとって時計とはなにか、医学のあゆみ、216、199-204、2006. (第216巻3号、2006/1/21号、あゆみ「時計遺伝子」)
- 22 岡村 均：ヒトはなぜ眠るのか? 「特集：時計遺伝子から疾患：睡眠障害」 *メディカル・サイエンス・ダイジェスト* 32、57-58、2006.
- 23 増渕悟、岡村 均：時計遺伝子と体内リズム 「特集：時計遺伝子から疾患—睡眠障害」 *メディカル・サイエンス・ダイジェスト* 32、59-64、2006
- 24 岡村 均、藤本義人、董 新：ユビキチンと体内時計、別冊医学のあゆみ「ユビキチン研究の新展開—メカニズムから疾患研究へ—」pp142-146、2006、医歯薬出版株式会社、145頁。
- 25 上山友子、岡村 均：視交叉上核から副腎皮質を介した全身への時刻シグナル伝達 *実験医学*, 24, 472-478, 2006.
- ライフサイエンスセンター、豊中、2005年7月19日
- 5 石田敦士、上山友子、岡村 均：光・神経・ホルモンと時計遺伝子、シンポジウム「体内時計の神経分子生物学」第28回日本神経科学大会、横浜、2005年7月26日
- 6 岡村 均：遺伝子転写の可視化：時計遺伝子発現の時空間、シンポジウム「脳科学研究におけるイメージング」特定領域研究「統合脳」夏のワークショップ、松代(長野)、2005年8月19日
- 7 岡村 均：脳時計と細胞時計の分子遺伝学、日本人類遺伝学会第50回大会、教育講演、川崎医療福祉大学(倉敷)、2005年9月22日
- 8 Okamura H, Masubuchi S, Ueyama T, Fujimoto Y: Cellular and systemic architecture of the circadian rhythms in mammals、第78回日本生化学会、神戸、2005年10月21日
- 9 岡村 均：生体リズムの分子機構、和歌山県立医大、大学院特別講演、和歌山、2005年10月21日
- 10 岡村 均：光と哺乳類時計遺伝子：中枢時計と末梢時計、大阪大学蛋白質研究所セミナー「体内時計と体内恒常性維持機構」、豊中、2005年10月24日
- 11 岡村 均：体内時計とヒトの身体、第44回兵庫県小児科医会、ラッセホール(神戸)、2005年11月12日
- 12 岡村 均：体内時計の分子生物学、日本毒性病理学会・第6回毒性病理教育セミナー、名古屋、2005年11月19日
- H. 知的財産権の出願・登録状況
特になし

学会発表

- 1 Okamura H, Light signals and circadian clock genes in mammals, *Research in Environmental Medicine: Common problems and similar solutions in Japan and Germany*, Nagoya, Nagoya, April 9-10, 2005 (keynote lecture)
- 2 Okamura H, Cell clock and cell functions, *Gordon Research Conference on Chronobiology 2005*, Newport, July 31-April 5, 2005
- 3 Okamura H, Clock genes in mammalian cell clocks, *X Congress of the EPBRS (European Pineal and Biological Rhythms Society)*, Frankfurt, September 1-5, 2005
- 4 岡村 均：生体リズムの基盤となる時計遺伝子の分子機構、千里ライフサイエンスセミナー「睡眠とリズム：遺伝子から行動まで」、千里

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成因解明と
 テーラーメイド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：生体リズムの異常が双極性障害および大うつ病性障害の病態と関連するとの考えが示されている。*Fragile X mental retardation-1 (FMR1)* と Anterior pharynx defective 1 homolog B (APH-1B), Circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK), Glycogen synthase kinase 3- β (GSK3 β), 5-HT1A, 1B (HTR1A, 1B) はともに生体リズムにおいて重要な役割を果たしていることが示唆されており、双極性障害や大うつ病性障害のゲノム解析の候補遺伝子として妥当と考えられる。そこで、a) FMR1、APH-1B、CLOCK、GSK3 β と双極性障害との関連解析 b) HTR1A、1B とうつ病の早朝覚醒ならびに日内気分変動との関連解析を行った。その結果、APH-1B 上の SNP と双極性障害との関連、HTR1B と早朝覚醒と大うつ病性障害の気分日内変動との marginally significant な関連が認められた。今後、SNP の機能的役割（例えば splicing に影響を与える可能性の検証）ならびにサンプルサイズを拡大した確認を行いたい。

研究協力者

高橋長秀 1、青山渚 1、北島剛司 2、前野信久 1、池田匡志 1・2、斉藤真一 1、季暁飛 1、石原良子 1、吉田契造 1、飯高哲也 1
 岩田仲生 2、鈴木竜世 2、山之内芳雄 2、岸太郎 2、木下葉子 2

1 名古屋大学 大学院医学系研究科 精神医学・精神生物学分野

2 藤田保健衛生大学医学部 精神医学教室

A. 研究目的

気分障害は、1) 症状に周期性がある、2) 断眠が躁転を来す、3) 双極性障害患者には体温リズムやメラトニン系の異常が見られる、4) リチウムをはじめとする双極性障害治療薬が生体リズムに対する効果を有する、5) うつ病において早朝覚醒、REM 睡眠潜時の短縮、日内気分変動がみられる、6) 季節性感

情障害の存在、7) 光療法がリズム障害と気分障害の双方に奏功する、などの証左から、その病態に生体リズムが関与していることが推察されてきた。他方、睡眠・覚醒リズム障害では気分症状の合併が高率にみられる。これらより睡眠覚醒リズム障害と気分障害にはなんらかの共通する生物学的基盤が存在することが想定され、その解明が双方の病態の理解に重要な役割を果たすと考えられる。

Fragile X mental retardation-1 (FMR1) は脆弱 X 症候群の原因遺伝子として知られているが、FMR1 は FMR1 Protein (FMRP) をコードしており、FMRP は RNA binding protein として mRNA を結合し、mRNA を核内から核外へ移送している。脳内においては、FMRP はシナプスの発達、可塑性、樹状突起の伸長などの神経発達に関係する蛋白の mRNA と結合

することが知られている。加えて、FMR1 Knock-out ショウジョウバエは活動の周期性が消失し、生体リズムに関連する蛋白の周期的変動に異常が見られるという報告があり、着目されている。

Anterior pharynx defective 1 homolog B (APH-1B)は the γ -secretase enzyme の構成因子の一つで、Notch pathway を始めとする多くの神経発達経路に関与しているタンパクである。Notch pathway はシナプス可塑性に関与し、この経路が障害される常染色体優勢遺伝疾患である cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL) の患者では気分障害の発症率が高いことが報告されている。近年、apomorphine に強い感受性を示すラットの系列では APH-1B 遺伝子の発現が有意に低下していることが示され、また、これらのラットでは視床下部下垂体副腎皮質系のリズム性の異常やストレス反応性の過剰が報告されている。

Circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK) は下等動物から人間に到るまでの時計遺伝子機構の中心的役割を果たす時計遺伝子の一つであり、これまでも既に mRNA の発現に関与する 3111T>C 多型が朝型・夜型傾向、うつ病の睡眠障害あるいはその SSRI への反応性、双極性障害の再発性に関与することが報告されており、リズム障害と気分障害への双方への関与が強く示唆される。

セロトニン受容体は不安・気分の双方に直接関与が想定されるほか、生体時計の主座である視交叉上核(SCN)にも発現しており、現在 7 まであるサブタイプの内、1A、1B 受容体は SCN において生体リズムの調節に関与することが動物実験から示されている。

Glycogen synthase kinase 3- β (GSK3 β) は中枢神経発達に関わる様々な情報伝達系

に関与する一方、SCN の時計遺伝子機構への調節、双極性障害の治療薬であるリチウムの作用点となること、双極性障害の発症年齢・全断眠への反応に関与が報告されていることなどから、生体リズムと双極性障害の双方に関与することが示唆されている。

以上の知見から我々は、a) FMR1、APH-1B、CLOCK、GSK3 β と双極性障害との関連解析 b) HTR1A、1B とうつ病の早朝覚醒ならびに日内気分変動との関連解析を行った。

B. 研究方法

対象：DSM-IV に従って診断された以下の被験者を対象とし、文書による同意を得た上で抹消血を採取し、DNA を抽出した。

a) 272 名の双極性障害患者と 384 名の健常者

b) 151 名のうつ病性障害患者：初診時の HAM-D において、早朝覚醒の項目で 0 点の群と 1 点以上の群に分割、また気分日内変動の項目で 0 点の群と 1 点以上の群に分割して解析した。

遺伝子解析：各遺伝子座位に関して HapMap data、あるいは自験 data をもとに LD mapping を行い haplotype tagging SNPs を選定した。それぞれの SNPs を PCR-RFLP 法、TaqMan 法、ダイレクトシーケンス法にてタイプを行った。

統計解析：アレル頻度、ハプロタイプ頻度を HAPLOVIEW version 3.0, cochaphase version 2.403, PowerMaker version 3.25 を用いて比較した。多重比較の補正には、SNPSpD software または 10,000 permutation tests を用いた。

倫理的配慮

本研究は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ならびに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

a)

1) FMR1, CLOCK, GSK3 β

Single-marker 解析、Haplotype 解析ともに、FMR1 遺伝子多型と双極性障害との間には有意な関連は見られなかった。

2) APH1B

APH1B 遺伝子は 2 つの LD ブロックを形成していた。intron1 に存在する rs7166881 の変異アレルが双極性障害患者で有意に多く観察され ($P = 0.033$)、この SNP を含むブロックのハプロタイプ頻度にも症例対象間で有意な差が見られた ($P = 0.00009$)。

b) HTR1A, 1B

HTR1A について、早朝覚醒 (+: 86 名 -: 65 名)、気分日内変動 (+: 53 名 -: 32 名データ欠損 66 名) いずれの間にも有意な関連が認められなかった。HTR1B と早朝覚醒の間には有意な関連は認められなかったが、気分日内変動との関連は marginally significant であった (rs20000292 $p = 0.059$ (allele))。

D. 考察と結論

本研究の結果はより、以下の結論を得た。1) 日本人における双極性障害の発症に、APH1B 遺伝子が関与していることが示唆された。本研究において有意な関連を示した SNP はアミノ酸置換を伴わない SNP であるが、exon 領域に近いイントロンに存在することから、この遺伝子の splicing に影響を与える可能性がある。2) HTR1B と大うつ病性障害の気分日内変動との関連について marginally significant であったが、サンプル数が少ないため $\alpha \cdot \beta$ error いずれの可能性もある。

さらなるサンプルを用いた追試、およびこれらの遺伝子の機能解析が望まれる。

G. 研究発表

1. 論文発表

-Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Inada T, Ozaki N: No association of haplotype-tagging SNPs in TRAR4 with schizophrenia in Japanese patients. Schizophr Res 2005

-Nishiyama T, Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada M, Sora I, Ujike H, Inada T, Furukawa T, Ozaki N: Haplotype association between GABAA receptor gamma2 subunit gene (GABRG2) and methamphetamine use disorder. Pharmacogenomics J 5 (2):89-95, 2005

-Saito S, Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Takahashi N, Inada T, Ozaki N: No association was found between a functional SNP in ZDHHC8 and schizophrenia in a Japanese case-control population. Neurosci Lett 374 (1):21-24, 2005

-Hakamata Y, Takahashi N, Ishihara R, Saito S, Ozaki N, Honjo S, Ono Y, Inada T: No association between monoamine oxidase A promoter polymorphism and personality traits in Japanese females. Neurosci Lett 389 (3):121-3, 2005

-Ikeda M, Iwata N, Kitajima T, Suzuki T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N:

Positive Association of the Serotonin 5-HT(7) Receptor Gene with Schizophrenia in a Japanese Population. *Neuropsychopharmacology* 2005

-Iidaka T, Ozaki N, Matsumoto A, Nogawa J, Kinoshita Y, Suzuki T, Iwata N, Yamamoto Y, Okada T, Sadato N: A variant C178T in the regulatory region of the serotonin receptor gene HTR3A modulates neural activation in the human amygdala. *J Neurosci* 25 (27):6460-6, 2005

-Kinoshita Y, Suzuki T, Ikeda M, Kitajima T, Yamanouchi Y, Inada T, Yoneda H, Iwata N, Ozaki N: No association with the calcineurin A gamma subunit gene (PPP3CC) haplotype to Japanese schizophrenia. *J Neural Transm* 2005

-Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshiya Y, Sekine Y, Iyo M, Harano M, Komiyama T, Yamada

M, Sora I, Ujike H, Inada T, Ozaki N: Positive association of AKT1 haplotype to Japanese methamphetamine use disorder. *Int J Neuropsychopharmacol* 1-5, 2005

-Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Inada T, Ujike H, Ozaki N: Association Analysis of Chromosome 5 GABA(A) Receptor Cluster in Japanese Schizophrenia Patients. *Biol Psychiatry* 58 (6):440-5, 2005

-Ikeda M, Iwata N, Suzuki T, Kitajima T, Yamanouchi Y, Kinoshita Y, Ozaki N: No association of GSK3beta gene (GSK3B) with Japanese schizophrenia. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2005

H. 知的財産権の出願。登録状況
 双極性感情障害、統合失調症等の精神病性障害の予防・治療剤、そのスクリーン具方法、及び該疾患の発症リスクの判定方法：特願2005-150215、出願中

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ーラーメイド治療法開発に

関する基盤的研究

分担研究者 海老澤 尚

東京大学大学院医学系研究科 睡眠障害解析学 客員助教授

研究要旨：

Period2 (*Per2*) 遺伝子の全エクソンを対象に遺伝子多型解析を進め、非 24 時間睡眠覚醒症候群のうち 1 例のみが保有し、睡眠相後退症候群や健常対象者には認められない遺伝子変異を見つけた。また、既に *Casein kinase I epsilon* (*CK1ε*) 遺伝子から見出した概日リズム睡眠障害発症の抑制因子である S408N 多型を導入したモデルマウスを作成するため、targeting vector を作成した。

A. 研究目的

睡眠は、体内時計に支配される概日リズム性の要素と、覚醒が続くと疲労が蓄積し、眠ると疲労が解消するという恒常性維持機構との相互作用に制御されていると考えられている。このうち概日リズム性の要素を調べ、その異常が睡眠に与える影響を明らかにし、より良い睡眠ととる方策を立てる材料を提供するのがこの研究の目的である。具体的には体内時計の異常によって生じると考えられている概日リズム睡眠障害を対象とし、遺伝子レベルでの解析を行なう。ここで見出された遺伝子多型は健常者にも存在するため、健常者での睡眠の特徴の個体差の把握や、将来的にはその個体差に合った生活スケジュールの確立にも役立つと考えられる。

B. 研究方法

1. ゲノム DNA サンプル

睡眠相後退症候群 (Delayed sleep phase

syndrome:DSPS) 患者 106 名、非 24 時間睡眠覚醒症候群 (Non-24-hour sleep-wake syndrome: N-24) 患者 40 名及び 140 名の健常被験者から静脈血を採取し、ゲノム DNA を抽出した。また、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから 400 例の一般日本人集団のゲノム DNA を購入し、コントロールサンプルとして使用した。

DSPS, N-24 患者のゲノム DNA を用いて *Per2* 遺伝子を対象に遺伝子多型解析を行ない、遺伝子多型を検出してその頻度を疾患群と健常被験者群とで比較することで疾患発症に関わる遺伝子多型を抽出した。遺伝子多型の検出には PCR-SSCP (Polymerase chain reaction/single strand conformation polymorphism) 法や denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) 法を用いた。多型が存在すると思われる領域はさらに別のプライマーを用いて PCR で増幅し、その産物を直接シーケンスして多型の位置を

決定した。

2. 時計遺伝子多型を導入したマウスを樹立するためのベクターの作成

C57BL/6J 系雌マウス由来の BAC clone RP23-120A4 を Children's Hospital Oakland Research Institute (CHORI, USA) から購入し、以下に述べる手順で pBlueScriptKS+ (pBS) に挿入し、Neomycin 耐性遺伝子やヒトの S408N 多型に相当する遺伝子多型を導入した。(図 1)

まず、pBS を制限酵素 EcoRV と PstI で切断し、ベクター部分をアガロースゲルで電気泳動して QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて抽出してから 2 本鎖 DNA (`attaattaagaattctgatcactgca` と `gtgatcagaattcttaattaagat` をアニールさせたもの) を DNA Ligation Kit Ver. 2.1 (Takara) で挿入し、PacI/EcoRI/BclI の各制限酵素切断部位を持つベクターを作成した (pBS-PacEcoBcl)。そのベクターを SalI で切断してから DNA 末端を DNA Blunting Kit (Takara) で平滑にして結合させ、SalI 切断部位を消した (pBS-PacEcoBcl-SalX)。

RP23-120A4 は DH10B electrocompetent cells で増幅してから QIAGEN Large-Construct Kit (Qiagen) で精製した。RP23-120A4 及び pBS-PacEcoBcl-SalX を KpnI, SpeI で切断し、アガロースゲルで電気泳動してからそれぞれ 7.1 kbps, 3 kbps の DNA 断片を抽出した後、結合させた (120A4/KpnI, SpeI in pBS)。120A4/KpnI, SpeI in pBS と pBS-PacEcoBcl-SalX を大腸菌株 SCS110 Competent Cells (Stratagene) で増幅して dam/dcm メチル化を欠く DNA を作成してから精製し、メチル化感受性酵素 BclI で切断できるようにした。次に 120A4/KpnI, SpeI in pBS を BclI で、pBS-PacEcoBcl-SalX を BclI/BamHI で切断し、それぞれ 3.9 kbps, 3.0 kbps の断片を抽出し、互いに結合させた (120A4/BclI in

pBS)。120A4/BclI in pBS と RP23-120A4 を PacI で切断し、それぞれ 4.5 kbps, 10.7 kbps の断片を抽出した (120A4/BclI in pBS/PacI, RP23-120A4/PacI)。120A4/BclI in pBS/PacI を Alkaline Phosphatase (BAP) で脱リン酸化し、RP23-120A4/PacI と結合させた (120A4/BclI+PacI in pBS)。120A4/BclI+PacI in pBS を SCS110 Competent Cells で増幅し、dam/dcm メチル化を欠く DNA を作成し、BclI で切断し、脱リン酸化処理した (120A4/BclI+PacI in pBS/BclI, BAP)。

理研から分与された LoxP/PGK-Neo-pA/loxP (PGK プロモーターに制御された Neomycin 耐性遺伝子を、loxP 配列ではさんだもの) を MluI/NotI で切断し、末端を平滑化してから BglII リンカー、BclI リンカーをそれぞれの端に結合させ、120A4/BclI+PacI in pBS/BclI, BAP と結合させた (loxP-Neo-120A4)。

次に、loxP-Neo-120A4 を Sac2 で切断し、脱リン酸化した (loxP-Neo-120A4/Sac2, BAP)。また、理研から分与された pMCDT-A-cassetteA (MC1 プロモーターに制御された Diphtheria toxin-A fragment) を XhoI, SalI で切断し、平滑化してから Sac2 リンカーを結合させ、loxP-Neo-120A4/Sac2, BAP に挿入し、野生型 (S408) アリル導入用 targeting vector (loxP-Neo-120A4-DT-S408) を作成した。

pBS-PacEcoBcl を SCS110 Competent Cells で増幅し、BclI/SalI で切断した。120A4/BclI+PacI in pBS も BclI/SalI で切断した。それぞれベクター、1.4 kbps の断片を抽出し、結合させた (120A4/BclI, SalI)。120A4/BclI, SalI を Af12 で切断して脱リン酸化処理してから電気泳動し、3.7 kbps の DNA 断片を抽出した (120A4/BclI, SalI/Af12)。

RP23-120A4 を鋳型としてヒトの S408N 多型に相当する多型を導入したプライマーで PCR 増幅し、S408N 多型を持つ DNA 断片を作成した。その DNA 断片を Af12 で切断し、660 bps の断片を抽出し、120A4/Bcl1, Sal1/Af12 と結合させた (120A4/Bcl1, Sal1-N408)。

loxP-Neo-120A4-DT, 120A4/Bcl1, Sal1-N408 を SCS110 Competent Cells で増幅し、Bcl1/Sal1 で切断してからそれぞれ 16.7 kbps, 1.4 kbps の DNA 断片を抽出し、その断片同志を結合させ、変異型 (N408) アリル導入用 targeting vector (loxP-Neo-120A4-DT-N408) を作成した。

Control vector の作成

pBS, RP23-120A4 を Sal1/Kpn1 で切断し、それぞれ 3kbps, 3.2 kbps の断片を抽出した。その2つを結合させ、増幅し、精製してから Sal1/Kpn1 で切断し、3.2 kbps の断片を抽出した (120A4/Sal, Kpn)。

loxP-Neo-120A4 を Aat2/Cla1 で切断し、平滑化して結合させた。次に Kpn1 で切断して平滑化し、自己結合させて Kpn1 切断部位を消した。Sac2 で切断し、平滑化して脱リン酸化してから Kpn1 リンカーを結合させた。Kpn1/Sal1 で切断して 10.4 kbps の断片を抽出し、120A4/Sal, Kpn と結合させて Control vector とした。

PCR の確認

Neomycin 耐性遺伝子の配列に対応したプライマー 5組と、マウスCK1ε に特異的な配列 5組とをそれぞれ組み合わせ、鋳型とする control vector をマウスのゲノムDNA存在下でも増幅できる組み合わせを検討した。DNA polymerase には LA-Taq DNA polymerase

(Takara) を用い、control vector を 0, 0.5 fg, 1 fg, 5 fg, 10 fg 加えて PCR 反応を行った。その結果、control vector が 0.5 fg でも良好に増幅できる条件が見出された。

(倫理面への配慮)

この研究は、東京大学医学部ならびに各共同研究施設の倫理委員会の承認を得、被験者には研究内容を説明し、書面による承諾を得た上で実施された。

C. 研究成果

Per2 遺伝子の全翻訳領域を含む 23 エクソンについて多型解析を行ない、ミスセンス多型 6 個を含む計 15 個の遺伝子多型を見出した。その多型を対象に全被験者を対象に頻度を調べたが、健常被験者と疾患群との間で頻度に有意差があるものは見出されなかった。

しかし、ミスセンス多型のうち 2 個は N-24 患者のそれぞれ一例のみから見出され、DSPS 群や control 群からは見出されなかった。このミスセンス多型のうち一つはほとんどの脊椎動物の PER1/2/3 蛋白間で保存されているアミノ酸の変化をもたらし、また、PER2 蛋白の機能領域のすぐ近傍に存在した。そこで、ヒューマンサイエンス研究資源バンクから購入した 400 例の一般日本人集団のゲノム DNA を対象に上記 2 個のミスセンス多型の有無を検索したところ、2 つの変異のうち 1 つは 400 例のうち 1 例のみが保有していたが、他の一つは 400 例の中に保有者は全く見出されなかった。

マウスに CK1ε 遺伝子の S408N 多型を導入するために用いる targeting vector、及び targeting vector が相同組換えによりマウスゲノムに挿入されたか否かを調べるための PCR の条件設定をするための control vector の作成を終了した (図 1)。また、control vector を用いて、PCR 条件の設定を行った。

D. 考察

Per2 遺伝子の全エクソンにわたって遺伝子変異解析を進めたが、概日リズム睡眠障害の多くの発症にかかわっている多型は見出されなかった。しかし、DSPS 106 例、N-24 40 例、健常被験者 140 例の中で N-24 の一例のみに見出された変異が 2 個見つかった。うち 1 個は更に 400 名の一般人口に検索対象を広げても他に保有者が見出せなかった。この変異は、PER2 蛋白の機能領域のすぐ近傍にあり、各脊椎動物間でよく保存されているアミノ酸の変化をもたらす多型だった。従って頻度は稀だが、概日リズム睡眠障害の発症に関わっている可能性があり、更なる解析が必要である。現在、当該多型を持つ *Per2* 遺伝子を培養細胞で発現させ、機能変化が生じているか確認中である。

また、既に見出した概日リズム睡眠障害発症の抑制因子となる CK1ε の S408N 多型を導入したマウスを樹立するため、遺伝子多型導入用ベクターを樹立した。今後、他施設と共同で S408N 多型を持つマウスを作成し、この多型が概日リズムに及ぼす影響を調べる予定である。

この研究は以下の研究者との共同研究である。

埼玉医科大学精神医学教室；豊嶋良一、山内俊雄

国立精神神経センター；高橋清久

同・精神保健研究所；内山真、渋井佳代

同・国府台病院；亀井雄一

同・武蔵病院；梶村尚史、加藤昌明、渡辺剛、堀達

滋賀医科大学精神医学教室；尾関祐二、大川匡子

名古屋大学医学部精神医学教室；尾崎紀夫

藤田保健衛生大学精神医学教室；北島剛司

財団法人神経研究所；井上雄一

秋田大学精神医学教室；三島和夫

杏林大学医学部精神科；中島亨

(順不同)

E. 結論

Per2 遺伝子から、稀だが概日リズム睡眠障害の発症に深く関与している可能性がある遺伝子変異を見出した。今後機能解析を行う予定である。また、概日リズム発症の抑制因子である *CK1ε* 遺伝子の S408N 多型を導入したマウスを作成するためのベクターを構築し終えた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- a) 海老澤尚、概日リズム睡眠障害の分子生物学、医学のあゆみ、215(3)、196-200、2005.
- b) 海老澤尚、ナルコレプシーと自己免疫、精神科、7(6)、539-543、2005.
- c) 海老澤尚、睡眠障害・リズム障害の遺伝子、メディカル・サイエンス・ダイジェスト、32(2)、26-29、2006.
- d) 海老澤尚、時計遺伝子、呼吸、25(2)、132-136、2006.
- e) 海老澤尚、ゲノム医学とリズム異常—時計遺伝子多型はヒトに何をもちたらずか、医学のあゆみ、216(3)、233-237、2006.
- f) 海老澤尚、ヒトの睡眠障害と時計タンパク質のリン酸化異常、実験医学、24(4)、479-483、2006.

2. 学会発表

- a) Ebisawa T, Takano A, Uchiyama M, Kajimura N, Mishima K, Inoue Y, Ozaki N, Okawa M, Takahashi K, Isojima Y. Inverse association between S408N variation of human casein kinase I epsilon gene and circadian rhythm sleep disorders. 19th Annual Associated Professional Sleep Societies Meeting, Denver, USA, 2005. 6. 18-23.
- b) 海老澤尚、内山真、梶村尚史、三島和夫、

- 井上雄一、亀井雄一、北島剛司、渋谷佳代、中島亨、尾関祐二、堀達、渡辺剛、加藤昌明、山田尚登、尾崎紀夫、大川匡子、豊嶋良一、高橋清久 (2005年6月30日) 概日リズム障害と *Per2* 遺伝子多型、日本睡眠学会第30回定期学術集会、宇都宮
- c) 海老澤尚、内山真、梶村尚史、渋谷佳代、三島和夫、井上雄一、亀井雄一、北島剛司、尾崎紀夫、中島亨、尾関祐二、大川匡子、豊嶋良一、高橋清久 (2005年7月7日) 概日リズム睡眠障害と *Per2* 遺伝子多型、第27回日本生物学的精神医学会・第35回日本神経精神薬理学会合同年会、大阪
- d) 海老澤尚、睡眠覚醒リズム障害の遺伝子解析、大阪大学蛋白質研究所セミナー「体内時計と体内恒常性維持機構」(講演)、大阪、2005年10月24日
- e) 海老澤尚、ヒトの睡眠覚醒リズムと時計遺伝子、第12回日本時間生物学会ワークショップ「睡眠リズムと発達」、つくば、2005年11月25日
- f) 海老澤尚、ヒトゲノム医学とリズム異常、

第28回日本分子生物学会年会ワークショップ「生物時計の動きの分子機構：リズム研究に未来はあるか?」、福岡、2005年12月9日

- g) 海老澤尚、ヒトの睡眠障害と時計遺伝子、第79回日本薬理学会年会シンポジウム「体内時計遺伝子が持つ多彩な機能—疾病発現から治療薬まで」、横浜、2006年3月10日
- h) 海老澤尚、睡眠覚醒リズムと時計遺伝子、第83回日本生理学会大会シンポジウム、「The circadian timing system: from clock gene expression to physiology」、前橋、2006年3月28日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
なし

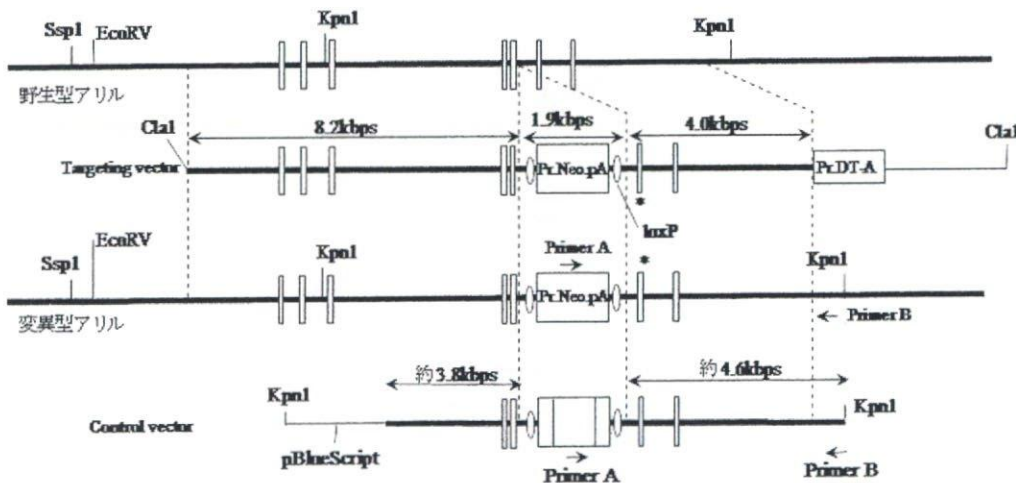


図1. Targeting vector, control vector の構造及び PCR プライマーの位置

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 精神科学分野 助教授

研究要旨 朝型夜型指向性に及ぼす遺伝的要因および環境的要因の関与を検討する目的で、第一次調査対象である健常成人 1030 人（平均年齢 36.0 歳，18 - 77 歳）及びその同居家族 784 名（平均年齢 43.4 歳，10 - 97 歳），計 1814 名（平均年齢 39.2 歳，M/F = 732/1082，有効回答回収率：85.7%）を対象として、Horne-Ostoberg スコア表、Pittsburg Sleep Quality Index、CES-D スケール（Center for Epidemiological Studies Depression Scale）を用いて朝型夜型指向性、睡眠状態、気分に関する質問紙調査を行った。その結果、入眠及び覚醒時刻に共通して強い影響を及ぼす要因として本人の日周指向性が抽出された。またそのほか、入眠時刻には本人の不眠傾向（強）と配偶者の入眠時刻（弱）が、覚醒時刻には本人の性別（弱）と配偶者の覚醒時刻（弱）が影響していた。年齢、交代勤務の有無、同居年数、寝室の共有、食事共有回数、配偶者の日周指向性は影響因子として抽出されなかった。夜型指向性の強いものは、総睡眠時間が短く、入眠困難があり、高い睡眠障害スコアを示した。同時に日中の眠気が強く、抑うつ傾向を示した。

A. 研究目的

ヒトの朝型夜型指向性は遺伝的要因と環境的要因の両者により規定されている。遺伝的側面については概日リズム睡眠障害の責任遺伝子に関する分子遺伝学的研究が精力的に行われてきた。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デル型遺伝様式で発症する家系についての連鎖解析研究や、幾つかの候補遺伝子上の多型等についての相関研究が行われ、*hPer2* (Homo sapiens period homolog 2), *hPer3*, Casein kinase I ϵ (CKI ϵ), *hClock*, などの点突然変異、ハプロタイプ、SNP などが概日リズム睡眠障害や朝型夜型指向性の責任領域として、もしくは関連を有していることが示されている。これらの変異の一部は時計タンパクのリン酸化を修飾することで概日リズムのフリーラン周期 τ を修飾すると推定されている。 τ の長短は朝型夜型指向性に有意に関連することがヒトを対象とした生理研究から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。また、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。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進める必要がある。

一方で、朝型夜型指向性は加齢・性差のほか、職業や同居家族などの環境要因の影響を受けることが示唆されている。就床起床時刻、食事時刻を含めた家庭内での生活習慣は家族構成員の睡眠及び朝型夜型指向性に影響を及ぼすと想像されるが、実際の影響度を調査した研究はこれまでほとんど行われていない。そこで本研究では、ヒトの朝型夜型指向性の形成における遺伝および環境要因の寄与を明らかにするため、健常一般成人（第一次調査対象者）及びその血縁および非血縁同居家族を対象として、朝型夜型指向性、睡眠状態、気分水準、生活同調因子の共有度に関する調査を行うとともに、第一次調査対象からゲノム検索用の血液検体を採取した。なお、本研究は秋田大学医学部倫理委員会の審査を通過している。

B. 研究対象と方法

研究への同意が得られた第一次調査対象者 1030 人（平均年齢 36.0 歳，18 - 77 歳，

M/F = 309/721) 及びその同居家族 784 名 (10 歳以上, 平均年齢 43.4 歳, 10 - 97 歳, M/F = 423/361), 計 1814 名 (平均年齢 39.2 歳, M/F = 732/1082, 有効回答回収率: 85.7%) を対象とした. 調査項目は, 朝型夜型指向性の指標として Horne 及び Ostoberg による Morningness- Eveningness Questionnaire (MEQ) を, 睡眠状態評価の指標として Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI) を, 気分状態評価の指標として CES-D (Center for Epidemiological Studies Depression) スコアを用いた. 同時に, 第一次調査対象者の同居家族に対して, 第一次調査対象者との生活同調因子の共有度, 家族構成, 同居年数, 食事共有回数, 就寝環境, 勤務形態, に関する質問紙調査を施行した.

C. 研究結果と考察

1) 本研究での対象者における MEQ スコアのヒストグラムを図 1 に示す. 1814 名全体での ME スコアは平均 53.5 ± 0.24 (SEM) 点, 範囲 21 - 82 点の正規分布を示した.

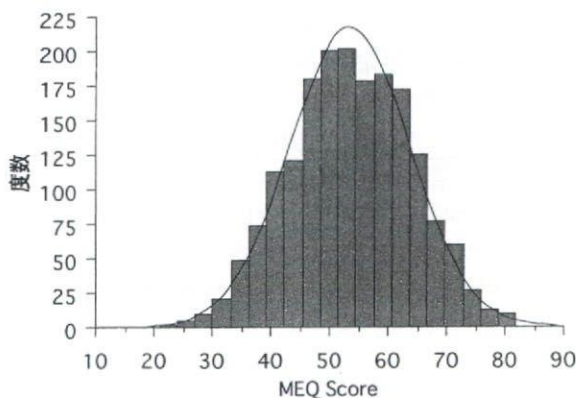


図 1 : MEQ スコアの正規分布 (横軸がスコアを, 縦軸が度数を示す)

2) 本研究での対象者においても MEQ の一般的な特徴である加齢に伴うスコアの増加が認められた ($r = 0.585, p < 0.0001$) (図 2).

3) MEQ スコアと PSQI から算出した就床時刻 ($r = 0.649, p < 0.0001$; 図 3), 起床時刻 ($r = 0.538, p < 0.0001$; 図 4) 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, 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 MEQ スコアが有用であることを示している.

ただし, MEQ スコアと起床時刻との相関は就床時刻とのそれに比較して弱かった. これは MEQ スコアが低得点の (すなわち夜型指向性の強い) 被験者の一部に極めて遅い起床時刻がみられたためである (図 4).

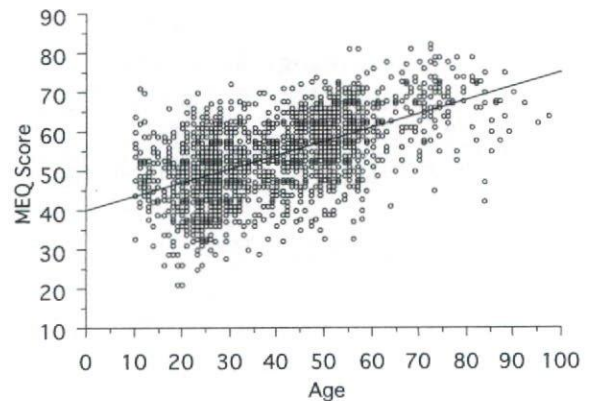


図 2 : MEQ スコアと年齢との相関 (横軸が年齢を, 縦軸がスコアを示す)

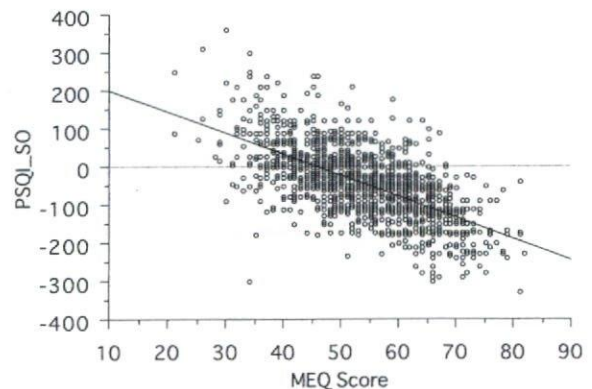


図 3 : MEQ スコアと就床時刻との相関 (横軸がスコアを, 縦軸が入眠時刻を示す. 入眠時刻は午前 0 時を起点 0 分として算出した)

3) 各調査対象者の朝型夜型指向性 (MEQ スコア) を以下の基準に従って 5 グループに分類した. この際, 加齢の影響を考慮して, 図 2 で示した直線回帰式 $Y = 39.767 + 0.351 * X$ で年齢補正を行った (図 5).

- Excessive Eveningness (EE) グループ: 16 点以上 30 点以下

- Eveningness (E)グループ : 31 点以上 41 点以下
- Neutral (N)グループ : 42 点以上 58 点以下
- Morningness (M)グループ : 59 点以上 69 点以下
- Excessive Morningness (MM)グループ : 70 点以上 86 点以下

これら朝型夜型指向性を有する各群における就床時刻, 起床時刻を図6に示した. 先に示したように, MM, M, N, E, EE群と夜型指向性が強まるにつれて就床, 起床時刻が遅れてゆくことが明瞭に示されている.

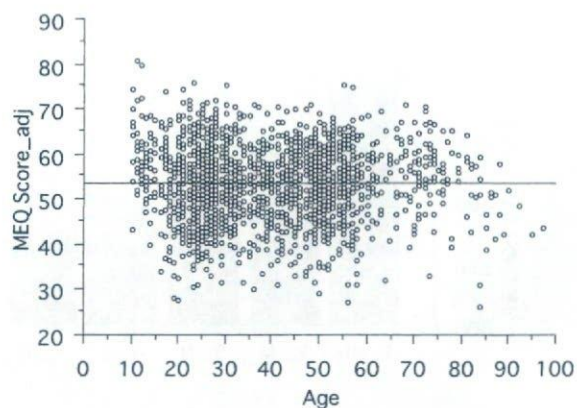


図5: 年齢による補正後のMEQスコアと年齢との相関(横軸が年齢を, 縦軸が補正後スコアを示す)

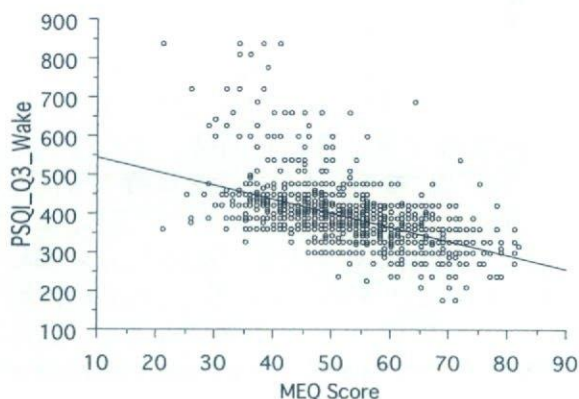


図4: MEQスコアと起床時刻との相関(横軸がスコアを, 縦軸が入眠時刻を示す. 起床時刻は午前0時を起点0分として算出した)

また, 夜型指向性が強まるにつれて総睡眠時間の短縮及び入眠潜時の延長傾向が認められた(図7). 夜型指向性群での総睡眠時間の短縮は, 就床時刻が朝型夜型指向性に準じて恣意的に決定できる一方で, 起床時刻は出勤, 登校などの社会活動による制約を受けることによると推測される. また夜型指向性群では結果的に睡眠負債が増大するにもかかわらず入眠困難があり, 入床・

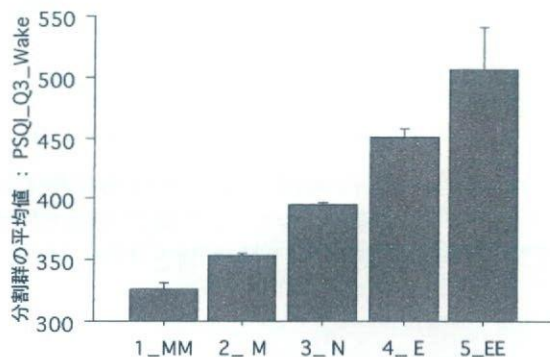
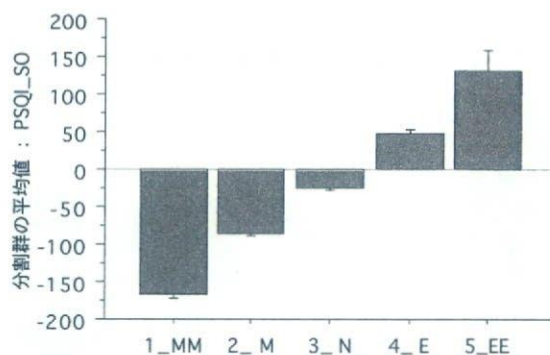


図6: 朝型夜型指向性5群における就床(上)及び起床時刻(下). 平均値±SEM. 縦軸は深夜0時を指す.

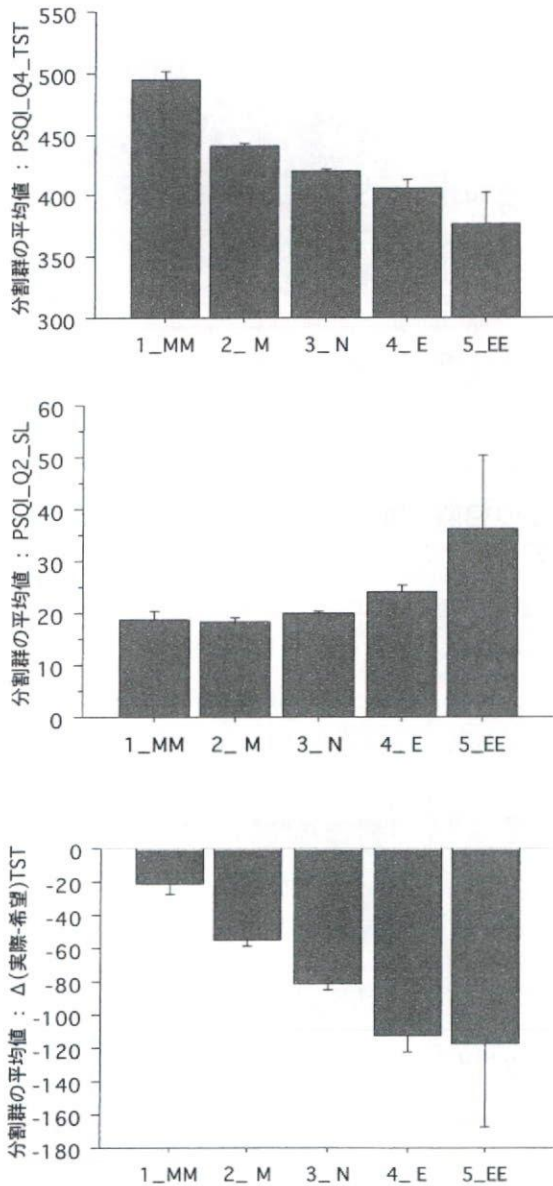


図 7：朝型夜型指向性 5 群における総睡眠時間（上）、入眠潜時（中）、及び睡眠不足感（希望睡眠時間と実際の睡眠時間との差分）

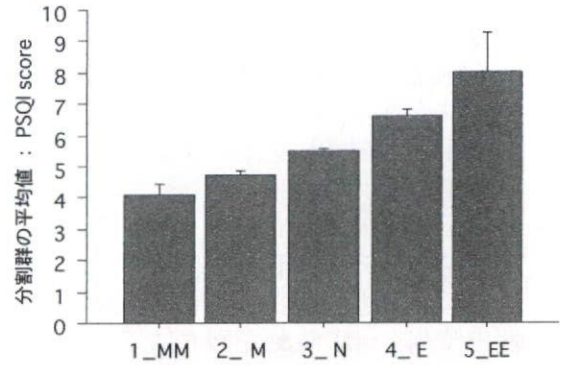


図 8：朝型夜型指向性 5 群における PSQI スコア

入眠時刻が生物時計に強く規定されていることが示唆される。

結果的に、夜型指向性群ほど、睡眠不足感が強いことが明らかにされた。すなわち、夜型指向性群は単に睡眠時間帯が後方にシフトするのではなく、社会生活を維持するために生理的な睡眠欲求を恒常的に抑圧し、また他群に比較してより大きい適応努力を求められていることを示している。これらの睡眠状況から、PSQI による睡眠障害度の群間比較では、夜型傾向が強まるにつれて睡眠障害スコアが増大していた（図 8）

4) 入眠時刻・覚醒時刻が決定される際の内的要因（日周指向性）及び外的要因（同居家族の睡眠習慣・生活状況等）の関与を明らかにするために、ライフスタイルの共有度が高い同居配偶者間での睡眠特性の相互干渉を検討した。

解析対象者は、同居配偶者を有する一次調査対象者 237 人とその配偶者（計 474 人）である。

- ・ 平均年齢：42.8 歳（配偶者 44.2 歳）
- ・ 同居年数：17.1 年
- ・ 食事共有回数：（朝）3.4 回（昼）1.2 回（夕）4.9 回 / 週
- ・ 交代勤務者：54.8%（配偶者 21.5%）
- ・ 同寝室 86.9%

Stepwise 重回帰分析で入眠時刻、覚醒時刻に影響を及ぼす外的および内的要因を抽出した。

その結果、

i) 入眠時刻に影響を及ぼす要因として以下の要因が抽出された（ $R = 0.595$ 、

F(3, 233)=42.5, p<0.0001)

- A) 強い影響力=本人の日周指向性
($\beta = -0.359$)・内因(朝型夜型)
- B) 強い影響力=内因(本人の不眠傾向)
($\beta = 0.353$)・PSQI
- C) ごく弱い影響力 = 配偶者の入眠時刻
($\beta = 0.176$)・環境因

ii) 覚醒時刻に影響を及ぼす要因として以下の要因が抽出された (R = 0.559, F(3, 233)=35.34, p<0.0001)

- A) 強い影響力 = 本人の日周指向性
($\beta = -0.429$)・内因(朝型夜型)
- B) 弱い影響力 = 本人の性別
($\beta = -0.263$)・内因(女性が早起き)
- C) ごく弱い影響力 = 配偶者の覚醒時刻
($\beta = 0.178$)・環境因

iii) 影響を及ぼさない因子: 本人および配偶者の年齢, 交代勤務の有無, 同居年数, 寝室の共有, 食事共有回数, 配偶者の日周指向性

すなわち, 個人の睡眠習慣を最も強く規定しているのは本人の日周指向性であり, 同居家族のライフスタイルを含めた環境要因の影響は限定的であることが示唆された。



G. 研究発表

論文発表

1. Mishima K, Tozawa T, Satoh K, Saitoh H, Mishima Y. The 3111T/C polymorphism of *hClock* is associated with evening preference and delayed sleep timing in a Japanese population sample. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet.* 2005;133:101-4.
2. Mishima Y, Hozumi S, Shimizu T, Hishikawa Y, Mishima K. Passive body heating ameliorates sleep

disturbances in patients with vascular dementia without circadian phase-shifting. *Am J Geriatr Psychiatry* 2005;13:369-76.

3. Mizuno K, Inoue Y, Tanaka H, Komada Y, Saito H, Mishima K, Shirakawa S. Heart rate variability under acute simulated microgravity during daytime waking state and nocturnal sleep: Comparison of horizontal and 6 degrees head-down bed rest. *Neurosci Lett* 2005;383:115-20.
4. Nakamura W, Yamazaki S, Takasu NN, Mishima K, Block GD. Differential response of *Period1* expression within the suprachiasmatic nucleus. *J Neurosci* 2005;25:5481-7.
5. 三島和夫. 高齢者の睡眠障害とその背景因子. *メディカル・サイエンス・ダイジェスト* 2006;32:30-4.
6. 三島和夫. 睡眠・生物時計機能の加齢変化とその調整法に関する時間生物学的研究. *秋田医学* 2005;32:81-7.
7. 草薙宏明, 三島和夫. 睡眠覚醒リズム障害(概日リズム睡眠障害). *臨床と研究* 2005;82:803-7.
8. 三島和夫, 不眠症: 内科疾患および精神疾患に伴う不眠. 上島国利, 市橋秀夫, 保坂隆, 朝田隆編, *精神科臨床ニューアプローチ8: 睡眠障害・物質関連障害*, メディカルビュー社, 東京, 2006, pp. 84-95.

学会発表

1. 草薙宏明, 佐藤浩徳, 加藤倫紀, 安部俊一郎, 清水徹男, 三島和夫, 多様な内的脱同調を呈した非24時間睡眠・覚醒症候群の一例, 第12回日本時間生物学会学術大会, つくば, 2005年11月.
2. 草薙宏明, 佐藤浩徳, 加藤倫紀, 松本康宏, 越前屋勝, 清水徹男, ヒト末梢循環単核球における時計遺伝子転写リズム-若年健常成人-, 第12回日本時間生物学会学術大会, つくば, 2005年11月.
3. 草薙宏明, 佐藤浩徳, 加藤倫紀, 松本康宏, 越前屋勝, 清水徹男, ヒト末梢循環単核球における時計遺伝子転写リズム-加

- 齢変化-, 第12回日本時間生物学会学術大会, つくば, 2005年11月.
- 4 安部俊一郎, 三島和夫, 佐藤浩徳, 加藤倫紀, 松本康宏清水徹男, 秋田大学医学部付属病院におけるせん妄治療の実態, 第59回東北精神神経学会, 盛岡, 2005年9月.
 - 5 佐藤浩徳, 三島和夫, 銀谷翠, 関根篤, 松渕浪子清水徹男, イミプラミンが全身痛及び睡眠障害に対して用量依存的に効果的であった線維筋痛症の一例, 第59回東北精神神経学会, 盛岡, 2005年9月.
 - 6 加藤倫紀, 越前屋勝, 佐藤浩徳, 草薙宏明, 清水徹男三島和夫, 向精神薬服用時の自覚的及び客観的眠気の実態とその評価法, 日本睡眠学会第30回定期学術集会, 宇都宮, 2005年6月.
 - 7 加藤倫紀, 越前屋勝, 佐藤浩徳, 草薙宏明, 清水徹男三島和夫, 高齢者はジアゼパム服用後、客観的な精神運動機能の低下に比較して主観的な眠気を低く評価する, 日本睡眠学会第30回定期学術集会, 宇都宮, 2005年6月.
 - 8 佐藤浩徳, 三島和夫, 越前屋勝, 草薙宏明, 松本康宏, 戸沢琢磨清水徹男, 高齢者では熱放散リズムに対して相対的に入床入眠が遅れている, 日本睡眠学会第30回定期学術集会, 宇都宮, 2005年6月.
 - 9 三島由美子, 穂積慧, 清水徹男, 菱川泰夫三島和夫, 半身浴は生物時計の位相変位を伴わずに睡眠維持能を改善する -脳血管性痴呆患者を対象としたOPEN TRIAL-, 日本睡眠学会第30回定期学術集会, 宇都宮, 2005年6月.
 - 10 草薙宏明, 三島和夫, 佐藤浩徳, 松本康宏, 戸沢琢磨, 越前屋勝, 佐々木道基, 加藤倫紀清水徹男, ヒト末梢循環単核球における時計遺伝子転写リズム -10遺伝子での検討-, 日本睡眠学会第30回定期学術集会, 宇都宮, 2005年6月.
 - 11 三島和夫, 市民公開講座: 高齢者の睡眠問題について考える -その背景にあるもの・生活習慣からみた対策-, 第45回日本呼吸器学会, 千葉, 2005年4月.
 - 12 Matsumoto Y, Mishima K, Satoh K, Tozawa T, Mishima Y, Shimizu T, Hishikawa Y, Chronobiological properties of cellular immune activities under sleep and sleep deprived conditions, 4th international congress of the World Federation of Sleep Research Societies, Dehli, India, September, 2005.
 - 13 Mishima K, Fujiki N, Yoshino F, Yoshida Y, Sakurai T, Nishino S, Hypocretin receptor expressions in hypocretin neuron ablated (orexin/ataxin-3 transgenic) narcoleptic mice, 19th Anniversary Meeting of the Associated Professional Sleep Societies, Denver, USA, June, 2005.
 - 14 Mishima Y, Hozumi S, Shimizu T, Hishikawa Y, Mishima K, Passive body heating ameliorates sleep disturbances in patients with vascular dementia without circadian phase-shifting, 19th Anniversary Meeting of the Associated Professional Sleep Societies, Denver, USA, June, 2005.
 - 15 Mishima Y, Hozumi S, Shimizu T, Hishikawa Y, Mishima K, Accelerating heat loss by passive body heating: effective, safety and convenient tool for deteriorated sleep maintenance in demented patients, 4th international congress of the World Federation of Sleep Research Societies, Dehli, India, September, 2005.
 - 16 Nishino S, Shiba T, Mishima K, Fujiki N, REM sleep enhancing effect of thalidomide is dependent on the availability of TNFalpha, 19th Anniversary Meeting of the Associated Professional Sleep Societies, Denver, USA, June, 2005.

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)

平成17年度 分担研究報告書

ヒト睡眠・覚醒リズムの分子生物学的成因解明と

テーラーメイド治療法開発に関する基盤的研究

分担研究者 角谷寛

京都大学大学院医学研究科 先端領域融合医学研究機構 助教授

研究要旨 職域を対象として、睡眠障害及び睡眠に影響を与えられられる疾患の有病割合を調査したところ、睡眠障害の頻度が従来考えられていたよりも高く、特に睡眠呼吸障害は生活習慣病と関係していることが明らかになった。

A. 研究目的

睡眠に関連した健康問題が、近年重要視されつつある。しかし、日本では多くの睡眠障害において、有病割合は明らかにされていない。また、睡眠障害がもたらす影響はほとんど報告されていないのが現状である。

そこで、睡眠時無呼吸症候群とともに、頻度の高い睡眠異常であるむずむず脚症候群(RLS: Restless Legs Syndrome)・周期性四肢運動障害(異常症)・季節性感情障害・概日リズム睡眠障害等の睡眠障害および睡眠に影響を与えうる疾患として精神神経科的疾患・慢性閉塞性肺疾患(COPD)などについて調査し、睡眠障害がもたらす影響を明らかにすることが本研究(KSHS: Kyoto Sleep and Health Cohort Study)の目的である(図1)。

B. 研究方法

大阪府下に散在する某企業の支店・営業部に勤務している、23~59歳の男性職員を対象として、睡眠と健康の縦断的調査を実施した。その際に、質問票だけでなく、呼吸器内科・神経内科・睡眠の専門医による診察、ならびに、簡易睡眠 PSG(睡眠呼吸障害モニター)・行動量モニター装置などによる睡眠検査も施行した。アクチグラフより睡眠時間を推定し、簡易睡眠 PSGより無呼吸および3%以上のSPO₂低下を伴った低呼吸を判定した。AHI(Apnea-hypopnea index: 睡眠一時間あ

たりの無呼吸・低呼吸数)5以上30未満を睡眠呼吸障害の軽症、15以上30未満を中等症、30以上を重症と診断した。睡眠呼吸障害があり、かつ、ESS(エプワース睡眠尺度)が11点以上の場合に睡眠時無呼吸症候群とした。精神神経科的疾患に関しては DMS-IV に基づいた構造面接(SCID: Structured Clinical Interview for DMS-IV axis I Disorders)により診断した。スパイロメトリーによる一秒率(FEV₁/FVC)が70%未満を慢性閉塞性肺疾患(COPD)と診断した。

同時に健康診断の結果および体重、体脂肪率、ウエスト周囲径、血圧なども調査し、それを元に生活習慣病について解析した。

(倫理面への配慮)

京都大学大学院医学研究科・医学部 医の倫理委員会に「睡眠の疫学的調査研究(承認番号: E-37)」、「睡眠に関する遺伝子多型の解析(承認番号: G-73)」、「睡眠に影響をもたらす遺伝子の解明に関する研究(承認番号: G-161)」として既に承認を受けている。ヘルシンキ宣言の趣旨を十分に尊重し、「疫学研究に関する倫理指針」、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」および「臨床研究に関する倫理指針」に従い、承認された内容に従って、対象者より書面によるインフォームドコンセントを得て調査研究を実施している。プライバシーの保護のために個人を特定可能なデータは、NPO 法人(iHOPE)に管理を委託し、デ

一夕解析担当者に渡していない。

C. 研究結果

対象者の背景を表1に示す。平均年齢は 43.8 ± 8.36 歳、324 人の男性を対象としている。60歳未満の全男性従業員 472名の内、10名は異動のため対象者から除外した結果、参加率は 70.1%であった。閉塞性睡眠時無呼吸症候群は睡眠呼吸障害の中核をなし、また、最も頻度の高い睡眠障害である。睡眠呼吸障害に眠気などの症状を伴えば睡眠時無呼吸症候群と診断できる。この集団において中程度以上の睡眠呼吸障害の有病割合は 24.7%、睡眠時無呼吸症候群の有病割合は 11.5%であった(表2)。大うつ病性障害の有病割合は 0%で生涯有病率(調査時点までの経験率)は 5.9%であった(表3)。また、むずむず脚症候群は 6.5%、概日リズム睡眠障害の疑いは 3.1%、季節性感情障害は 1.2%、精神病性障害 0%、摂食障害 0%、不安障害 4.0%、COPD は 6.8%に認められた。

収縮期血圧 ≥ 130 mmHg、拡張期血圧 ≥ 85 mmHg かつ/あるいは降圧剤服用者を「高血圧」とすると、ロジスティック回帰分析により年齢および BMI を調整後も、睡眠呼吸障害が中等症あるいは重症の者において、軽症以下の者と比べて高血圧の有病割合が有意に上昇していた ($P < 0.05$) (図2)。また、中性脂肪 ≥ 150 mg/dl、HDL コレステロール < 40 mg/dl、あるいは、薬物治療中を「脂質代謝異常」とすると、睡眠呼吸障害が重症の者は、中等症以下の者と比べて脂質代謝異常の有病割合が有意に上昇していた ($P < 0.05$) (図3)。一方、空腹時血糖 ≥ 110 mg/dl あるいは糖尿病薬物治療中を「耐糖能異常」とすると、睡眠呼吸障害が重症になるほど耐糖能異常の有病割合は増加する傾向は見られたが、その間に有意な相関は認められなかった ($\chi^2 = 7.47$, $p = 0.058$) (図4)。

2005年に日本内科学会など8学会より報告された診断基準にしたがい、ウエスト周囲径 ≥ 85 cm であり、かつ、上記の高血圧、脂質代謝異常、耐

糖能異常のうち2項目以上を持つときにメタボリックシンドロームと診断すると、メタボリックシンドロームの有病割合は睡眠呼吸障害が重症になるほど高かった(図5)。BMI とウエスト周囲径は非常に高い相関があるため(相関係数=0.858)、年齢のみを調整したロジスティック回帰分析を行ったところ、睡眠呼吸障害の中等症および重症では睡眠呼吸障害が無い場合よりも有意にメタボリックシンドロームの有病割合が高いことが明らかとなった ($p = 0.027$ および $p < 0.001$)。このように、生活習慣病と睡眠呼吸障害が関係することが明らかとなってきた。

D. 考察

睡眠呼吸障害および睡眠時無呼吸症候群は従来考えられていたよりも高頻度に認められた。一方、米国の大規模な睡眠と循環器疾患に関する疫学研究(Sleep Heart and Health Study)において対象者全例に在宅ポリソムノグラフ(PSG)を施行したところ、われわれとほぼ同様の有病割合であったことが報告されている(Baldwin ら 2004、Kapur ら 2005)(表3)。したがって、従来との有病割合の違いは、従来は有病割合を求める際には2段階法を用いて一部の対象者のみに対して機器を用いた夜間睡眠の検査が行われてきたが、我々および SHHS においては全対象者に検査を行なっているという手法の違いから生じている可能性がある。

今回の調査において、脳波も含めた PSG の代わりに、アクチグラフにより睡眠時間を推定し、簡易 PSG(睡眠呼吸モニター)を用いて無呼吸および低呼吸の判定を行ってきた。簡易 PSG では脳波による睡眠のステージ分類はできないが、最新の睡眠障害の国際分類(ICSD-2)において、REM/NREM にかかわらず睡眠呼吸障害を診断することが明記されている。また、生活習慣病や休業というアウトカムに対して、睡眠呼吸障害の重症度が影響を与えていることは明らかであり、われわれの判定法に大きな問題はないと考えている。

この結果は、ある職域の男性のみを対象とした