

201108020A

厚生労働科学研究費補助金  
創薬基盤推進研究事業

睡眠障害・生体リズム障害の新規治療薬候補物質の  
探索に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 肥田 昌子

平成24(2012)年 5月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

睡眠障害・生体リズム障害の新規治療薬候補物質の  
探索に関する研究

平成23年度 総括研究報告書

研究代表者 肥田 昌子

平成 24 (2012) 年 5 月

# 目 次

I. 総括研究報告	
睡眠障害・生体リズム障害の新規治療薬候補物質の探索に関する研究	----- 1
肥田昌子	
II. 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 13
III. 研究成果の刊行物・別刷	----- 15

# I. 総括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（創薬基盤推進研究事業）

総括研究報告書

睡眠障害・生体リズム障害の新規治療薬候補物質の探索

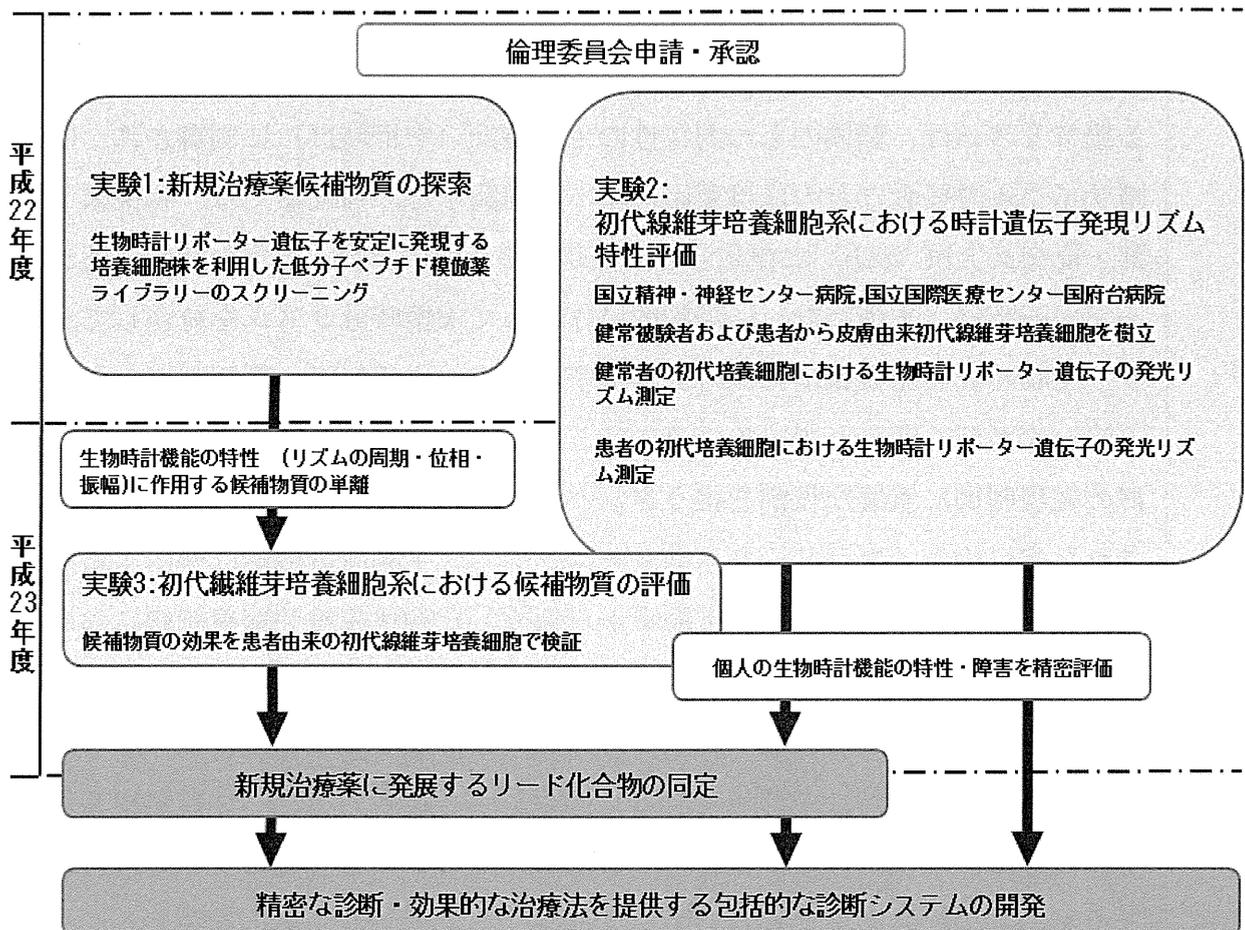
研究代表者 肥田昌子

国立精神・神経医療研究センター 精神保健研究所 精神生理研究部

研究要旨 睡眠障害・生体リズム障害は一般生活者から精神・神経疾患まで幅広く発症する。その症状は慢性化に陥りやすく患者の社会機能を著しく損なうが、根本的な治療法は確立していない。本研究は、睡眠障害・生体リズム障害の病態生理の背景に存在する生物時計機構に着目し、生物時計機能に作用する候補物質を探索する。低分子化合物ライブラリーのスクリーニング、患者由来初代線維芽培養細胞の樹立および時計機能障害の評価、初代培養細胞系における候補物質の効果の検証を通じてリード化合物を同定する。睡眠覚醒、体温、ホルモン分泌などの生理現象にみいだされる約1日を周期とする概日リズムは、個体のもつ内在性の生物時計（中枢時計）に制御され、明暗サイクルや摂食などの環境要因によって同調する。哺乳類では、脳視床下部・視交叉上核（SCN）に存在する中枢時計が、他の組織・器官の細胞に備わっている時計（末梢時計）に階層的に作用して末梢時計リズムを統合しており、生物時計の発振機構には時計遺伝子群が構成する転写・翻訳制御のネットワークが深く関与している。そこで、複雑な生命現象をつかさどる遺伝子群の発現制御に重要な役割を担うタンパク質間の相互作用を標的として構築された化合物ライブラリーをスクリーニングし、生物時計機能に作用する候補物質を探索した。さらに、被験者から樹立した初代線維芽培養細胞における時計遺伝子発現リズムを同一被験者の日周指向性や睡眠指向性と比較した結果、末梢組織の時計機能（末梢時計機能）を測定することで個人の生物時計機能特性・睡眠特性を評価できる可能性が示された。タンパク質間相互作用に働きかける候補物質が生物時計機能に与える効果を患者および健常被験者由来の初代線維芽培養細胞において検証し、生物時計機能に作用するリード化合物を同定する。これにより、睡眠障害・生体リズム障害の新規治療薬

開発への貢献が期待される。さらに、患者由来の初代線維芽培養細胞の樹立は、患者の生物時計機能の障害を評価する有用なシステムを構築することになり、精密な診断・有効な治療法の提供・効果的な治療薬の判定といった睡眠障害・生体リズム障害の包括的な診断システムの開発へ発展することが期待される。また、現代社会では、患者のみならず一般生活者の多くも生活の夜型化やシフトワークなど不規則な生活リズムに悩まされている。本研究課題はこれらの問題を解決する大きな一助となり、人々のQOL向上に貢献できると考えられる。

## 睡眠障害・生体リズム障害の新規治療薬候補物質の探索



## A. 研究目的

睡眠障害・生体リズム障害は、一般生活者から精神・神経疾患まで幅広く発症する医学上の課題の一つであるが、疾患特性に合った治療法は未だ確立していない。そこで、本研究では、睡眠障害・生体リズム障害の病態生理の背景に存在する生物時計機構に着目し、時計機能特性に作用する候補物質の探索を行い、新規治療薬へ発展するリード化合物の同定を目的とする。

(1) 低分子ペプチド模倣薬ライブラリーのスクリーニング、(2) 初代線維芽培養細胞系における時計遺伝子発現リズム特性評価、(3) 初代培養細胞系における候補物質の効果の検証、を通じてリード化合物を同定する。

睡眠覚醒、体温やホルモン分泌などの生理現象にみいだされる概日リズムは、個体のもつ内在性の生物時計（中枢時計）に制御され、環境光や摂食などの外的要因に同調される[1]。哺乳類の中枢時計は、脳視床下部・視交叉上核(SCN)に存在し、ほとんどの組織・器官の細胞にも生物時計（末梢時計）が存在しており、中枢時計SCNから発振される概日シグナルが末梢時計に階層的に作用して末梢リズムを統合している[2]。この生理現象にみいだされる概日リズムは、時計遺伝子群が構成する転写・翻訳制御ネットワークを伴う内因性の生物時計システムに制御されている[3, 4]。複雑な生命現象を司る遺伝子群の転写発現制御にはタンパク質-タンパク質の相

互作用が重要な役割を担う。そこで、タンパク質二次構造を模倣する低分子ペプチド模倣薬ライブラリー[5]を用いて、生物時計機能に作用する候補物質の探索を行う。また、健常被験者ならびに睡眠障害・生体リズム障害患者から初代線維芽培養細胞を樹立する。個人の初代培養細胞における時計遺伝子発現リズムを測定し、個人のリズム特性が睡眠覚醒パターンや日周指向性と関連するか、また、疾患特異性が存在するか検討する。さらに、患者由来の初代線維芽培養細胞において化合物ライブラリーから得られたリズム特性を調整する候補物質について検証を行う。

睡眠障害・生体リズム障害は、患者の障害特性に合った治療法が存在しないため、患者の多くは慢性的な経過をたどり睡眠薬の長期使用に依存することが問題となっている。本研究課題を通じて生物時計機構に作用するリード化合物が同定されることで、睡眠障害・生体リズム障害の新規治療薬開発への貢献が期待される。また、患者由来の初代線維芽培養細胞の樹立は、患者の生物時計機能の障害を評価する有用なシステムを構築することになり、精密な診断・有効な治療法の提供・効果的な治療薬の判定といった睡眠障害・生体リズム障害の包括的な診断システムの開発へ発展することが期待される。

統合失調症やうつ病、自閉症をはじめとする精神疾患や、認知症、パーキンソン病、ハンチントン舞踏病などの

神経疾患の多くも睡眠障害・生体リズム障害を伴うことが知られている。慢性的な不眠や昼夜逆転による生活リズムの崩壊は患者の QOL を低下させるのみならず、精神疾患の再発を助長し、介護者の負担を増大させ、在宅療養や社会復帰を阻害する要因の一つと考えられている。また、現代社会では、一般生活者の多くも生活の夜型化やシフトワークなど不規則な生活リズムに悩まされている。本研究課題はこれらの問題を解決する大きな一助となり、人々の QOL 向上に貢献できると考えられる。

## B. 研究対象と方法

### B-1. 睡眠障害・生体リズム障害の新規治療薬候補物質の探索

生物時計リポーター遺伝子 *Bmal1::Luc* (時計遺伝子 *Bmal1* プロモーター+ルシフェラーゼ遺伝子) を安定に発現する NIH3T3 不死化線維芽細胞株を、冷却 CCD カメラを使用するルミネッセンスイメージングシステムを用いて、細胞内のルシフェラーゼ発光量を多サンプル同時かつリアルタイムに測定した。得られた発光リズムは HOKAWA ソフトウェアにより解析を行い、細胞内での *Bmal1::Luc* リズム特性を決定し、溶媒存在下での *Bmal1::Luc* 発光リズム特性と比較した。この方法で、1248 個の低分子ペプチド模倣薬ライブラリーのスクリ

ーニングを行い、リズム特性を修飾する化合物を単離した。

### B-2. 初代線維芽培養細胞系における時計遺伝子発現リズム特性評価

対象者: 健常男性成人被験者 17 名 (平均年齢±SD: 22.59±4.41 歳)。睡眠障害、精神疾患もしくは重篤な身体疾患に罹患していない者、交替制勤務に従事していない者、過去半年間に海外旅行などで 6 時間以上の睡眠時間の変更のなかった者。

スクリーニングのため、被験者の睡眠覚醒パターンや日周指向性の定性・定量評価を行った。

睡眠覚醒: 自記式の睡眠日誌の記録とアクチグラフの活動量記録計による連続記録を行った。主観的評価として Pittsburg Sleep Quality Index [6] を施行した。

日周指向性: Horne-Oestberg Morningness-Eveningness Questionnaire (MEQ) [7] および Munich Chronotype Questionnaire (MCTQ) [8] を施し、朝型夜型などの日周指向性を調べた。

被験者の背部・臀部から局所麻酔下で生検トレパンを用いて皮膚切片 (直径 2mm×深さ 5mm) を採取し、皮膚生検から初代線維芽培養細胞を樹立した。健常被験者由来の初代線維芽培養細胞に生物時計リポーター遺伝子

Bmal1::Luc を導入し、微弱発光測定装置を用いて発光リズムをリアルタイムに測定し、得られた発光リズムをORIGIN ソフトウェアにより解析した。健常被験者の初代培養細胞内における時計遺伝子発現リズムの特性と被験者の日周指向性との関連性を検討した。

#### [倫理面への配慮]

本研究は、国立精神・神経医療研究センター倫理委員会で審議を受け承認を得た上で実施した。被験者の生命、健康、プライバシー及び尊厳を守ることを最優先として、ヒトを対象とする医学研究の倫理的原則である「ヘルシンキ宣言」、「臨床研究に関する倫理指針(平成20年7月31日全部改正)」に従い研究を遂行した。本研究に関する文書による説明書を作成し、研究対象者に、その目的、内容、方法、実施にあたっての危険性、不利益について十分な説明を行った。さらに、本研究に協力しなくても、また、同意を撤回しても、いかなる不利益も被らないことを保証した。対象者本人が研究内容について十分に理解し、かつ、研究協力の意思を示した者から署名入りの同意書の提出してもらい、研究協力の同意を得た。被験者の氏名等の個人情報や生体試料は、個人情報管理者による連結可能匿名化が行われ、その後、試料の解析と関連するすべての作業を行った。個人情報および解析データは国立精神・神経センター内の書類庫に施錠し

て厳重に保管している。

## C. 結果

### C-1. 睡眠障害・生体リズム障害の新規治療薬候補物質の探索

生物時計リポーター遺伝子 Bmal1::Luc を安定に発現する不死化線維芽培養細胞株 NIH3T3 を用いて、低分子ペプチド模倣薬ライブラリーのスクリーニングを完了した。培養細胞中の Bmal1::Luc リズム特性を調整する複数の化合物を単離した。

### C-2. 初代線維芽培養細胞系における時計遺伝子発現リズム特性評価

17名の健常男性被験者に対して被験者に対して皮膚生検を行い、初代線維芽培養細胞を樹立した。初代培養細胞は外来遺伝子のトランスフェクション効率が低いことから、ウイルスを用いた導入方法が利用されているが、より簡便な検査法を確立するため、新しいエレクトロポレーションシステム法を用いた。

被験者から採取した皮膚生検より樹立した初代線維芽培養細胞に生物時計リポーター遺伝子 Bmal1::Luc をエレクトロポレーション法により導入し、微弱発光測定装置を用いて培養細胞中のルシフェラーゼ発光変化量をリアルタイムに計測した。

被験者由来の初代線維芽培養細胞

における Bmal1::Luc 発現リズムの周期と同一被検者の MEQ によって評価した日周指向性と比較を行った。その結果、9 名の間中型被験者の周期は平均±SD: 23.09±0.55 時間、8 名の夜型被験者の周期は平均±SD: 23.87±0.77 時間であった。初代線維芽培養細胞中の時計遺伝子発現リズムの周期は、夜型は中間型に比べて有意に長いことがあることが明らかとなった (図 1,  $P = 0.028$ )。

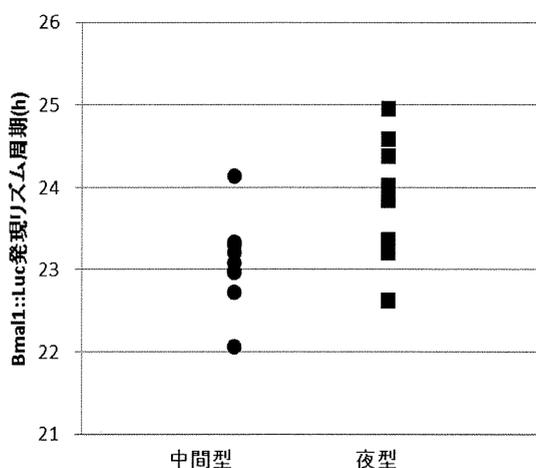


図 1 : 中間型と夜型被験者から樹立した初代線維芽培養細胞における Bmal1::Luc 発光リズム周期 ( $P = 0.028$ )

また、MCTQ を用いて評価した平日と休日の睡眠時間中点 (MSW、MSF)、日周指向性定量指標として利用されている睡眠負債調整済み休日睡眠時間中点 (MSFsc) と同一被検者の培養細胞中時計遺伝子発現リズム周期の比較を行った。その結果、平日の睡眠時間特性 (MSW) とは相関が認められ

なかったが (図 2,  $P > 0.05$ )、休日の睡眠時間中点 (MSF) と睡眠負債調整済み休日睡眠時間中点 (MSFsc) と強い相関性が認められた (図 3,  $P = 0.008$ ; 図 4,  $P = 0.012$ )。

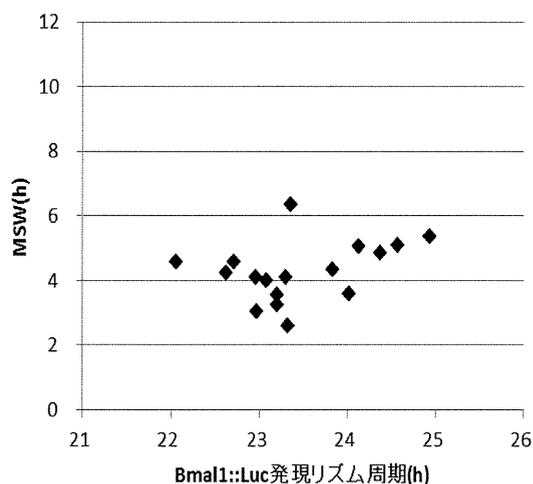


図 2 : 各被験者の初代線維芽培養細胞における Bmal1::Luc 発光リズム周期と平日睡眠時間中点 (MSW) との比較 ( $P > 0.05$ )

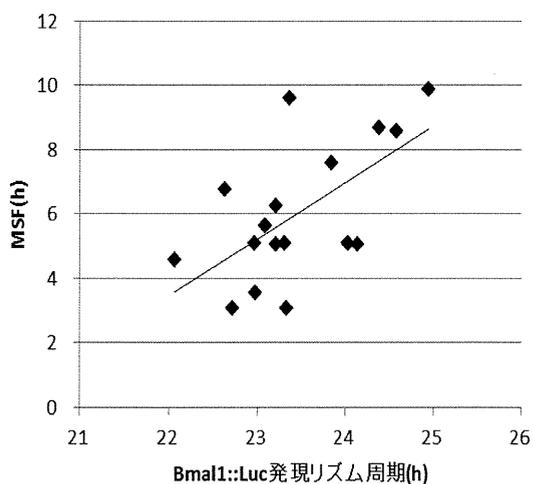


図 3 : 各被験者の初代線維芽培養細胞における Bmal1::Luc 発光リズム周期と休日睡眠時間中点 (MSF) との比較

(P = 0.008)

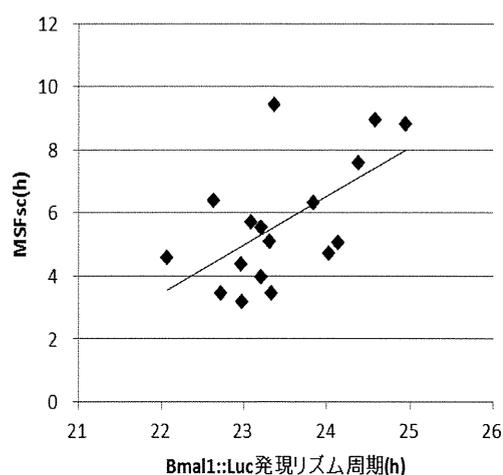


図4 : 各被験者の初代線維芽培養細胞における Bmal1::Luc 発光リズム周期と睡眠負債調整済み休日睡眠時間中点 (MSFsc) との比較 (P = 0.012)

#### D. 考察

さまざまな生理現象にみとめられる概日リズムは時計遺伝子群が構成する転写・翻訳制御ネットワークを伴う内因性の生物時計に制御されているが、複雑な生命現象をつかさどる遺伝子群の発現制御にタンパク質間の相互作用が重要な役割を担っている。本研究では、タンパク質間の相互作用を標的として構築されたタンパク質二次構造  $\alpha$ ヘリックス、 $\beta$ ストランド、リバーズ・ターンの要素を模倣する低分子ペプチド模倣薬ライブラリーを用いてスクリーニングを行い[5]、培養細胞中における時計遺伝子発現リズム特性に作用する複数の化合物

が単離された。この低分子ペプチド模倣薬ライブラリーの開発者は、胚発生に非常に重要な役割を担う Wnt シグナル経路に作用する低分子化合物を単離し、その化合物がガン細胞において細胞を増殖から分化への促進を制御することから[9]、ガン治療の候補薬として期待されている。本研究で単離された化合物がリズム特性に与える効果の厳密な検証が必要であるが、単離された化合物が時計遺伝子転写・翻訳制御ネットワークに直接作用する候補物質であることが期待される。また、遺伝子転写発現の制御に必須である蛋白質間の相互作用を標的に開発された低分子ペプチド模倣薬ライブラリーをスクリーニングすることにより、生物時計機構において重要な役割を担う時計遺伝子群の転写翻訳制御ネットワークに作用する低分子化合物が単離され、時計遺伝子群の制御に関わるシグナル経路が明らかになり、ヒト生物時計の分子制御機構の新たな面が見出される可能性がある。

被検者から採取した皮膚生検由来の初代線維芽培養細胞において導入された概日リポーター遺伝子 Bmal1::luc は非常に安定した顕著な概日リズム (平均周期 $\pm$ SD : 23.50 $\pm$ 0.75 時間) を示した。末梢リズム周期の値は生理機能リズムの値と一致しないことが報告されている[10, 11]。これは、末梢細胞は切り離された細胞群であり他の組織からのフィードバックや外界環境情報を受けな

いため、生体として統合されている個体の生理機能リズムとその周期の値が必ずしも一致しない可能性があるとして推測される。測定間におけるばらつきは大きい、独立した細胞系における時計遺伝子発現リズムの測定は、個人の遺伝情報にもとづいた概日特性を評価する上で、より適当なシステムと言えるかもしれない。

エレクトロポレーション法は適切な条件で行われる場合は、細胞膜の自己修復能力が働きダメージを回復することが可能なため、生存細胞の状態は良好である。ウイルスを用いない遺伝子導入法は、特殊エリアでの操作を行う必要がないため、検査法としてより適当であり、臨床応用への発展が期待できる。

Rat-1 線維芽細胞において非常に顕著な時計遺伝子発現リズムが存在することが報告されて以来[12]、線維芽培養細胞は生物時計分子メカニズムの研究に有用なツールとして用いられている[13, 14]。躁鬱病患者の皮膚生検から樹立した fibroblast cell line を用いて、患者群では時計遺伝子発現リズムの振幅が小さいこと、GSK3 $\beta$  のリン酸化状態が低いことが見出された報告がある[15]。

本研究の結果により、末梢リズム周期の値は、日周指向性や睡眠特性と有意に相関することが明らかとなった。このことは、生体試料を利用して患者個人の生物時計機能評価が可能となり、概日リズム睡眠障害をはじめとする生体リズム異常の病態解明に大き

く貢献することが期待される。また、さまざまな精神・神経疾患患者における生物時計機能評価の有用なツールとなることが期待され、患者の疾患特性に適した効果的な治療設計への発展を促し、テーラーメイド医療の提供を実現することが期待される。

線維芽培養細胞の樹立には主に皮膚切片が用いられるが、ヒト末梢血において時計遺伝子転写発現リズムが存在することが報告されており[16, 17]、最近では、通常生活条件下で採取した毛髪由来毛包細胞において時計遺伝子転写日周リズムを示すことが明らかとなった[18]。このことは、血液や毛髪などの体毛といった侵襲性がより低く臨床現場で採取可能な末梢組織を利用して個人の生物時計機能特性の評価を行える可能性を示唆している。

患者由来の初代培養細胞を樹立することは、患者個人の生物時計機能の評価を可能にし、個人に最適な薬やその投与時刻を判定する有用なシステムとなる。さらに、初代培養細胞から iPS 細胞を作成することで神経細胞における薬物評価が可能になり、疾患特性に合ったテーラーメイド医療の実現性が飛躍的に高まることが期待される。

## E. 結語

本研究では、タンパク質間の相互作用を標的として構築されたタンパク

質二次構造  $\alpha$ ヘリックス、 $\beta$ ストラ  
 ンド、リバース・ターンの要素を模倣  
 する低分子ペプチド模倣薬ライブラ  
 リーを用いてスクリーニングを行い、  
 培養細胞中における時計遺伝子発現  
 リズム特性に作用する複数の化合物  
 が単離された。被験者から樹立した初  
 代線維芽培養細胞における時計遺伝  
 子発現リズム特性を同一被験者の日  
 周指向性と比較した結果、末梢組織の  
 時計機能は個人の生物時計機能なら  
 びに睡眠特性を評価できる可能性が  
 示された。得られた候補物質が生物時  
 計機能に与える効果を個人個人から  
 採取した生検由来培養細胞において  
 検証し、生物時計機能に作用するリー  
 ド化合物の同定を行い、睡眠障害・生  
 体リズム障害の新規治療薬開発への  
 発展を目指す。

#### 参考文献リスト

1. Pittendrigh, C. S. (1993) Temporal organization: reflections of a Darwinian clock-watcher, *Annu Rev Physiol.* 55, 16-54.
2. Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M. & Tei, H. (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats, *Science.* 288, 682-5.
3. Reppert, S. M. & Weaver, D. R. (2002) Coordination of circadian timing in mammals, *Nature.* 418, 935-41.
4. Lowrey, P. L. & Takahashi, J. S. (2011) Genetics of circadian rhythms in Mammalian model organisms, *Advances in genetics.* 74, 175-230.
5. McMillan, M. & Kahn, M. (2005) Investigating Wnt signaling: a chemogenomic safari, *Drug Discov Today.* 10, 1467-74.
6. Buysse, D. J., Reynolds, C. F., 3rd, Monk, T. H., Berman, S. R. & Kupfer, D. J. (1989) The Pittsburgh Sleep Quality Index: a new instrument for psychiatric practice and research, *Psychiatry Res.* 28, 193-213.
7. Horne, J. A. & Ostberg, O. (1976) A self-assessment questionnaire to determine morningness-eveningness in human circadian rhythms, *Int J Chronobiol.* 4, 97-110.
8. Roenneberg, T., Wirz-Justice, A. & Mrosovsky, M. (2003) Life between clocks: daily temporal patterns of human chronotypes, *Journal of biological rhythms.* 18, 80-90.
9. Emami, K. H., Nguyen, C., Ma, H., Kim, D. H., Jeong, K. W., Eguchi, M., Moon, R. T., Teo, J. L., Kim, H. Y., Moon, S. H., Ha, J. R. &

- Kahn, M. (2004) A small molecule inhibitor of beta-catenin/CREB-binding protein transcription [corrected], *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 12682-7.
10. Pagani, L., Semenova, E. A., Moriggi, E., Revell, V. L., Hack, L. M., Lockley, S. W., Arendt, J., Skene, D. J., Meier, F., Izkovic, J., Wirz-Justice, A., Cajochen, C., Sergeeva, O. J., Cheresiz, S. V., Danilenko, K. V., Eckert, A. & Brown, S. A. (2010) The physiological period length of the human circadian clock in vivo is directly proportional to period in human fibroblasts, *PLoS one.* 5, e13376.
  11. Hasan, S., Santhi, N., Lazar, A. S., Slak, A., Lo, J., von Schantz, M., Archer, S. N., Johnston, J. D. & Dijk, D. J. (2012) Assessment of circadian rhythms in humans: comparison of real-time fibroblast reporter imaging with plasma melatonin, *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology.*
  12. Balsalobre, A., Damiola, F. & Schibler, U. (1998) A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells [see comments], *Cell.* 93, 929-37.
  13. Brown, S. A., Fleury-Olela, F., Nagoshi, E., Hauser, C., Juge, C., Meier, C. A., Chicheportiche, R., Dayer, J. M., Albrecht, U. & Schibler, U. (2005) The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals, *PLoS Biol.* 3, e338.
  14. Brown, S. A., Kunz, D., Dumas, A., Westermarck, P. O., Vanselow, K., Tilmann-Wahnschaffe, A., Herzel, H. & Kramer, A. (2008) Molecular insights into human daily behavior, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105, 1602-7.
  15. Yang, S., Van Dongen, H. P., Wang, K., Berrettini, W. & Bucan, M. (2009) Assessment of circadian function in fibroblasts of patients with bipolar disorder, *Mol Psychiatry.* 14, 143-55.
  16. Kusanagi, H., Hida, A., Satoh, K., Echizenya, M., Shimizu, T., Pendergast, J. S., Yamazaki, S. & Mishima, K. (2008) Expression profiles of 10 circadian clock genes in human peripheral blood mononuclear cells, *Neurosci Res.* 61, 136-142.
  17. Hida, A., Kusanagi, H., Satoh, K., Kato, T., Matsumoto, Y., Echizenya, M., Shimizu, T.,

- Higuchi, S. & Mishima, K. (2009) Expression profiles of PERIOD1, 2, and 3 in peripheral blood mononuclear cells from older subjects, *Life Sci.* 84, 33-7.
18. Akashi, M., Soma, H., Yamamoto, T., Tsugitomi, A., Yamashita, S., Nishida, E., Yasuda, A., Liao, J. K. & Node, K. (2010) Noninvasive method for assessing the human circadian clock using hair follicle cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107, 15643-8.
- of 225 Japanese couples. *Chronobiol Int* 2012;29 (2):220-6.
3. Gamble KL, Motesinger-Reif AA, Hida A, Borsetti HM, Servick SV, Ciarleglio CM, Robbins S, Hicks J, Carver K, Hamilton N, Wells N, Summar ML, McMahon DG, Johnson CH. Shift work in nurses: contribution of phenotypes and genotypes to adaptation. *PLoS One* 2011;6 (4):e18395.

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### G-1. 論文発表

- Hida A, Kitamura S, Mishima K. Pathophysiology and pathogenesis of circadian rhythm sleep disorders. *Journal of Physiological Anthropology* 2012;31:7.
- Hida A, Kitamura S, Enomoto M, Nozaki K, Moriguchi Y, Echizenya M, Kusanagi H, Mishima K. Individual traits and environmental factors influencing sleep timing: a study

### G-2. 学会発表

- Hida A, Kitamura S, Watanabe M, Enomoto M, Katayose Y, Aritake S, Higuchi S, Kato M, Moriguchi Y, Ikeda M, Mishima K. 【Oral】 Assessment of individual circadian phenotypes using biopsy samples. *Neuroscience* 2011. Washington, DC, 2011年11月.
- Hida A, Osawa Y, Kitamura S, Watanabe M, Enomoto M, Katayose Y, Nozaki K, Aritake S, Higuchi S, Kato M, Moriguchi Y, Ikeda M, Mishima K. 【Poster】 Assessment of individual circadian phenotypes using biopsy samples -Application to Circadian Rhythms Sleep Disorder patients-

- International symposium  
“Designing the circadian clock”.  
Nagoya, Aichi. Noyori Conference  
Hall, 2011年11月.
3. 肥田昌子, 大澤要介, 北村真吾,  
榎本みのり, 片寄泰子, 野崎健太  
郎, 守口善也, 亀井雄一, 池田正  
明, 三島和夫. 【口頭・ポスター発  
表】生体組織を利用した生物時計  
機能評価—概日リズム睡眠障害者  
への応用—. 第18回日本時間生物  
学会学術大会. 愛知 名古屋大学  
東山キャンパス, 2011年11月.
  4. Hida A. 【Plenary Symposia】  
Genetic and physiological  
phenotyping of circadian rhythm  
sleep disorders. Worldsleee2011.  
Kyoto Kyoto International  
Conference Center, 2011年10月.
  5. 肥田昌子, 北村真吾, 榎本みのり,  
野崎健太郎, 片寄泰子, 加藤美恵,  
渡邊真紀子, 有竹清夏, 樋口重和,  
守口善也, 池田正明, 三島和夫.  
【ポスター発表】末梢組織を利用  
した生物時計機能評価法. 第34回  
日本神経科学大会 —こころの脳  
科学—. 神奈川 パシフィコ横浜,  
2011年9月.
  6. Hida A, Kitamura S, Watanabe M,  
Enomoto M, Aritake S, Higuchi S,  
Nozaki K, Kato M, Moriguchi Y,  
Mishima K. 【Poster】Evaluation of  
Individual’s Circadian Clock  
Properties at Physiological and  
Molecular Levels. SLEEP 2011,  
25th Anniversary Meeting of the  
Associated Professional Sleep  
Societies, LLC (APSS).  
Minneapolis, MN, USA, 2011年6  
月.
  7. 肥田昌子, 北村真吾, 渡邊真紀子,  
榎本みのり, 片寄泰子, 野崎健太  
郎, 有竹清夏, 樋口重和, 加藤美  
恵, 守口善也, 池田正明, 三島和  
夫. 【ポスター発表】個人の生物時  
計機能の生理・分子レベルでの評価.  
第33回日本生物学的精神医学会.  
東京 ホテルグランパシフィック  
LE DAIBA, 2011年5月.
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
なし

## II. 研究成果の刊行に関する一覧表

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
Hida, A., Kitamura, S. & Mishima, K.	Pathophysiology and pathogenesis of circadian rhythm sleep disorders	Journal of Physiological Anthropology	31	7	2012
Hida, A., Kitamura, S., Enomoto, M., Nozaki, K., Moriguchi, Y., Echizenya, M., Kusanagi, H. & Mishima, K.	Individual traits and environmental factors influencing sleep timing: a study of 225 Japanese couples, Chronobiology international.	Chronobiology International	29	220-6	2012
肥田昌子、三島和夫	気分障害と生物時計システムーリズム異常をもたらす生物時計機能障害評価法	医学のあゆみ	239	907-11	2011
肥田昌子、三島和夫	概日リズム睡眠障害の病態生理研究の動向	日本生物学的精神医学会誌	22	165-70	2011
肥田昌子、三島和夫	認知症患者の概日リズムの乱れに対するメラトニン治療の効果ーせん妄に対しても効果はあるか？	Cognition and Dementia	10	62-3	2011
肥田昌子	概日リズム睡眠障害の病態生理	睡眠医療	5	11-5	2011

### III. 研究成果の刊行物・別刷

## 特集1 睡眠研究の動向

## 3. 概日リズム睡眠障害の病態生理研究の動向

肥田 昌子\*, 三島 和夫\*

抄録：睡眠覚醒にみとめられる概日リズムは内因性の生物時計システムにより制御されている。この生物時計システムは中枢である脳視床下部・視交叉上核のみならず他の組織・器官の細胞にも備わっており、生物時計発振機構には時計遺伝子群が構成する転写・翻訳制御のネットワークが深く関与している。睡眠相前進型、睡眠相後退型、フリーラン（非同調）型などの概日リズム睡眠障害は、生物時計機能の異常や不適應から生じていると考えられている。概日リズム睡眠障害の病態は徐々に明らかにされつつあるが、より精確に理解するためには、患者の生物時計機能障害を正しく評価することが必要である。既存の手法では、深部体温や神経内分泌リズムを数週間にわたって測定する必要があるため、医療現場での普及は進まず、より実用性のある評価法の開発が求められている。現在までに明らかになっている概日リズム睡眠障害の病態と生体組織を利用した時計機能代替測定法について紹介する。

日本生物学的精神医学会誌 22 (3) : 165-170, 2011

Key words : 生物時計, 概日リズム, 時計遺伝子

## 1. 生物時計システム

睡眠覚醒、自律神経系、ホルモン内分泌系、代謝系活動に見られる約24時間周期のリズムは概日リズムと呼ばれ、体内に存在する内因性の生物時計（中枢時計）によって制御されている<sup>10)</sup>。概日リズムは、光刺激や摂食などの外因性因子に修飾され、外界環境へ同調する。生物時計システムは、環境情報の変化を時計本体に伝える入力部、システムの中枢をなし自律的な24時間リズムを形成する時計本体、そして時計から発振される概日シグナルにより諸生理機能リズムを駆動する出力部から構成されている<sup>11)</sup>。哺乳類の中枢時計は、脳視床下部・視交叉上核（suprachiasmatic nucleus : SCN）に存在するが、ほとんどの組織・器官の細胞にも生物時計（末梢時計）が備わっており、中枢時計SCNから発振される概日シグナルが末梢時計に階層的に作用し、生体リズム全体を統合している<sup>21)</sup>。最も強力な同調因子である光刺激は、その入力情報を網膜から網膜視床下部路を經由してSCNへ直接伝え、中枢リズ

ムの位相を同調することで、個体の生体リズムを環境変化に順応させる。

生物時計システムに関わるほとんどの遺伝子は、中枢時計SCNにおいて約24時間の転写日周リズムを示し、この時計遺伝子群の転写・翻訳制御のフィードバックループが生物時計発振機構の中核をなす<sup>15)</sup>。また、リン酸化やユビキチネーションといった翻訳後修飾も概日リズム形成に重要な役割を担っている。bHLH (basic helix-loop-helix) -PAS (Per-Arnt-Sim) 転写因子CLOCKとBMAL1はヘテロダイマーを形成、E-box配列を介してDNAに結合し、E-boxをプロモーター上にもつ時計遺伝子群、*Per* (*Period*) 1, *Per*2, *Per*3, *Cry* (*Cryptochrome*) 1, *Cry*2やレチノイン酸関連核内受容体 *Ror*  $\alpha$ , *Ror*  $\beta$ , *Ror*  $\gamma$ , *Rev-erb*  $\alpha$ , *Rev-erb*  $\beta$  などの転写を活性化する。転写翻訳後、これらの時計遺伝子産物は細胞質に蓄積し、PERはCKI  $\epsilon$  (Casein Kinase I  $\epsilon$ ), CKI  $\delta$  などによりリン酸化修飾を受け、ある定まった量に達したところでCRYと複合体を形成し核内へと移行する。そして、

Pathophysiology of Circadian Rhythm Sleep Disorder

\* 国立精神・神経医療研究センター 精神保健研究所 精神生理研究部 (〒187-8553 東京都小平市小川東町4-1-1) Akiko Hida, Kazuo Mishima : Department of Psychophysiology, National Institute of Mental Health, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1, Ogawa-higashi, Kodaira Tokyo, 187-8553, Japan

【肥田 昌子 E-mail : hida@ncnp.go.jp】