

PER:CRY複合体は、CLOCK:BMAL1によって活性化された自らの転写を抑制するネガティブフィードバックを形成する。一方、同様にCLOCK:BMAL1の制御下にある核内受容体であるROR α とREV-ERB α は、*Bmal1*プロモーター上に存在するRORE配列に結合し、ROR α は*Bmal1*の転写を活性化しREV-ERB α は抑制して、その転写を拮抗的に制御することが知られている(図1)。

2. 概日リズム睡眠障害

概日リズム睡眠障害は、睡眠覚醒リズムに異常をきたし、望ましい時刻に睡眠・覚醒することが困難となる疾患で、患者の多くは社会生活に支障をきたしている。これらの睡眠障害は、概日リズムを制御する生物時計機能の障害により生じると考えられている⁷⁾。

a. 家族性睡眠相前進型

家族性睡眠相前進型は、睡眠相前進型の常染色体優性遺伝疾患であり、分子遺伝学的研究により発症分子機序が最も明らかになっている。家族性睡眠相前進型の家系解析により、この家系に時計遺伝子*PER2*の662番目のアミノ酸セリンがグリシンに置き換わる変異(S662G)が見つかった¹⁶⁾。その変異はPER2蛋白のリン酸化酵素CKI ϵ 結合部位と予測されている領域に存在し、変異S662Gをもつトランスジェニックマウスは短い活動リズム周期を示した²⁰⁾。また、別の家系では、CKI δ の44番目のアミノ酸スレオニンがアラニンに置き換わる変異(T44A)が見つかり、この変異はCKI δ のリン酸化酵素活性を下げ、その標的蛋白であるPER2のリン酸化状態を低くしている¹⁹⁾。PER2(S662G)と同様にこの変異をもつトランスジェニックマウスの活動リズム周期も短いことが明らかになっている。当初、PERのリン酸化状態が減少することで、PER蛋白が安定化して核内での蓄積が早まり、周期が短くなると考えられていたが、その後、PER2蛋白はリン酸化されないと不安定化し分解されることも明らかとなった。以上の結果から、上記のいずれかのメカニズムにより核内のPER2ターンオーバーが促進することで生物時計の内因性周期が短くなり、睡眠相前進型の病因となっていると考えられている。実際、患者の生理機能リズム周期は短いことがわかっており⁵⁾、さまざまな*in vitro*実験によりCKIなどのリン酸化酵素による時計遺伝子蛋白のリン酸化状態は、生物時計の周期を決定する上で非常に重要な役割を担っていることが報告されている⁴⁾。

睡眠相後退型は、睡眠相前進型とは反対に睡眠時間帯が非常に後退している睡眠障害である。その睡眠覚醒リズム位相が遅れていることから、生物時計内因性周期が長いこと、位相前進相が狭いこと、位

b. 睡眠相後退型

睡眠相後退型は、睡眠相前進型とは反対に睡眠時間帯が非常に後退している睡眠障害である。その睡眠覚醒リズム位相が遅れていることから、生物時計内因性周期が長いこと、位相前進相が狭いこと、位

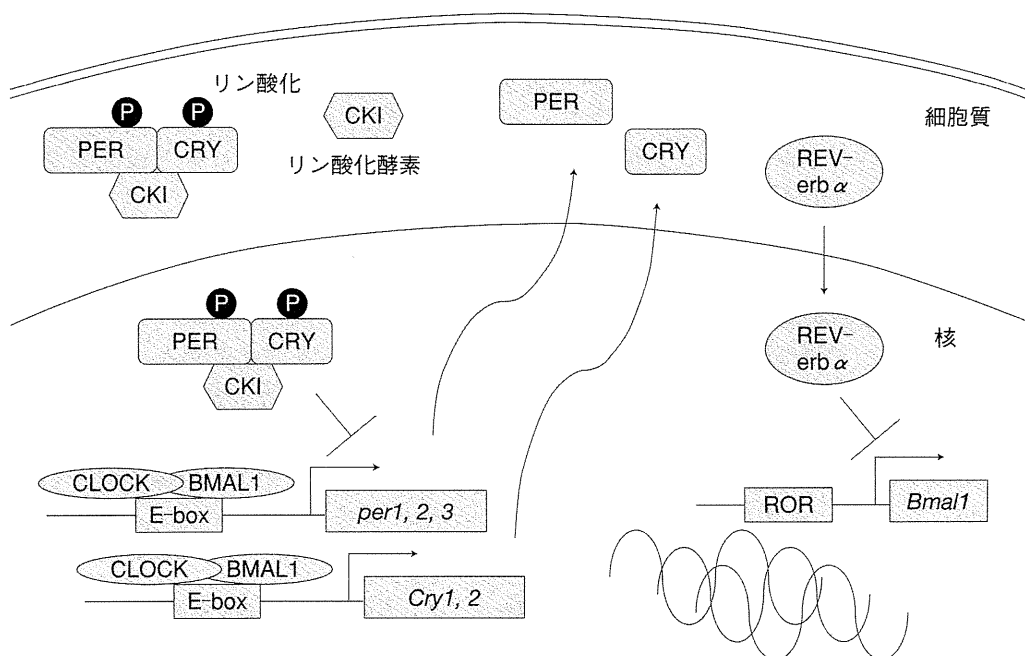


図1 哺乳類における生物時計分子メカニズム

相前進能が弱いこと、さらに、光に対する感受性が低いことなどが病因と推測されている。また、生物時計の異常だけではなく睡眠恒常性維持機能に関する問題も指摘されている。しかし、厳密な実験データに基づいた発症機序の解明には至っていない。疾患の遺伝的要因としては、睡眠相後退型のケース・コントロール関連解析により、ヒト *PER3* 遺伝子の4つのハプロタイプのうちの1つが睡眠相後退型と有意に関連していることが知られている³⁾。マウス *Per3* 遺伝子は、そのノックアウトマウスが野生型マウスより30分短い周期を示すのみで、SCNにおける時計遺伝子群発現パターンに大きな変化が認められなかったため、生物時計システムにおいて重要な役割を担っていないと考えられていた¹³⁾。しかし、最近になって、マウス *Per3* が末梢組織における時計遺伝子発現リズムの周期や位相の決定に関与していること⁹⁾、また、生物時計の光入力系に関与していること¹⁸⁾が報告された。さらに、ヒト *PER3* 多型解析により、睡眠恒常性維持機能による睡眠欲求、睡眠潜時、徐波睡眠活動などの睡眠特性とも関連していることが示されている²⁾。このような所見から、ヒト *PER3* 遺伝子は睡眠制御と密接な関わりを持っていると考えられ、その機能変化が睡眠相後退型の病因となっている可能性がある。

c. 非同調型

非同調型は、睡眠時間帯が毎日30分から1時間ずつ遅れていく概日リズム睡眠障害である。睡眠時間帯は常にずれ続け、昼夜の生活が逆転する期間が生じ、社会生活への適応が著しく困難になる。また、無理に社会生活スケジュールに合わせると、不眠や過眠、自律神経症状などの身体的不調を呈するようになり、うつ症状や気分障害を合併することも多い。一般集団では稀な疾患である一方、視覚障害者の多くが非同調型と同様に睡眠時間帯がずれ続ける睡眠覚醒リズムを示すことが知られている^{12, 17)}。彼らは光の刺激を受けず外界に同調しないと考えられていることから、非同調型の病因は、内因性周期が長いということだけではなく、外界環境への同調能に大

きな問題があると疑われている。同調の異常には、位相前進能が低いことや位相前進能が強すぎることで、睡眠覚醒リズムと生物時計内因性リズムのずれにより位相前進相がマスクされてしまっていることなど様々な原因が考えられる。

d. 不規則型

不規則型は、睡眠覚醒リズムが不規則に起こり、1日に3回以上の睡眠時間帯が現れる。睡眠の持続時間も一定せず、1日のうちどのような時間帯にも眠ってしまい、覚醒時刻も予測不可能である。有病率は低く、脳腫瘍、頭部外傷、脳循環障害、神経変性疾患など広範かつ重度の脳器質障害を患っている人や施設に入所している認知症高齢者などが社会同調の乏しい環境下で生活している場合に高頻度で出現することが知られている。脳循環障害患者、重症脳障害児では、睡眠覚醒や生物時計の制御核・神経投射路が存在する視床下部・脳幹に広範かつ重度の器質障害を有しており、生理機能リズムに多様な障害が認められる⁶⁾。また、アルツハイマー型認知症ではSCNの変性・脱落のためその容積および総細胞数が著しく減少することが組織病理学的に明らかにされている¹⁴⁾。

3. 生物時計機能の評価法

概日リズム睡眠障害は、生物時計システムの発振・入力・出力に関わる複数の機能障害により生じると考えられている。特に、内因性リズム周期の異常が主要な発症基盤と予想されており、睡眠相前進型は短周期、睡眠相後退型や非同調型は長周期、不規則型は無周期であることが疑われている。しかしながら、内因性周期をはじめとする生物時計の機能特性を評価するためには、従来の方法では、概日リズム調節に影響を及ぼす攪乱因子を最小限に統制した条件下で数週間にわたって患者の睡眠覚醒、自律神経、神経内分泌リズム等を測定する必要がある、その煩雑さと負担の大きさから一般診療で行うことは非常に難しい。そこで、皮膚生検由来線維芽培養

表1 時計遺伝子に関連する疾患・機能

時計遺伝子	関連する疾患・機能	変異・多型
<i>PER2</i>	家族性睡眠相前進型	S662G
<i>PER3</i>	睡眠相後退型	P864A
	睡眠恒常性維持機能	4/5-repeat (exon18) 4/5-repeat (exon18)
<i>CKI-delta</i>	家族性睡眠相前進型	T44A

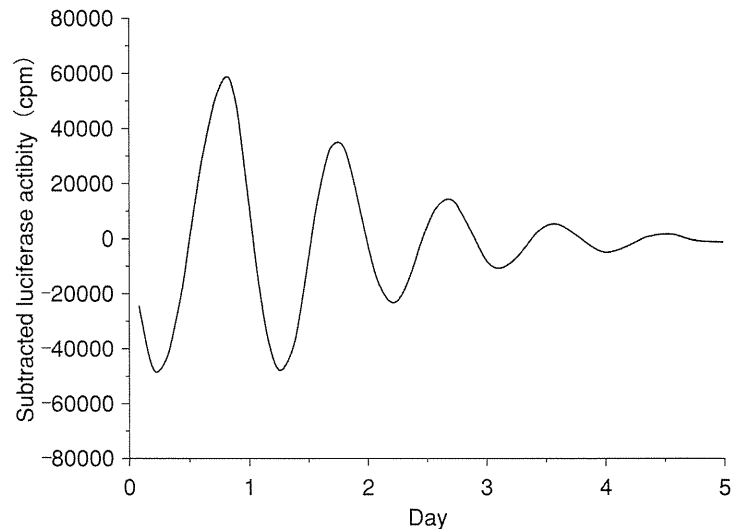


図2 初代線維芽培養細胞における *Bmal1::Luc* 発光リズム

細胞中の時計遺伝子発現リズムを測定することで個人の生物時計機能を評価する試みが行われている。

Brownらは、ヒトの皮膚切片から樹立した初代線維芽培養細胞にレンチウイルスを利用してリポーター遺伝子 *Bmal1::Luc* (時計遺伝子 *Bmal1* プロモーター-ルシフェラーゼ遺伝子) を導入し、培養細胞におけるルシフェラーゼ発光量変化の測定し、朝型の人では夜型の人より短い末梢リズム周期を示すことを明らかにしたり。また、同グループは、最近になって、同一被験者の生理リズム周期と末梢リズム周期に正の相関性が存在することを報告している。彼らは3ヵ国で5つの実験を行った。健常被験者に対して2ヵ国で行った4つの実験で、それぞれ異なるプロトコル下で唾液を採取し、そのメラトニン分泌リズムを決定して、各被験者の生理リズム周期を決定した。また、光感受性のない視覚障害者に自宅で自由に生活してもらい、尿中の6-sulphatoxymelatoninを測定して、生理機能リズムを評価した。視覚障害者で観察された生理機能リズム周期の延長は、末梢リズム周期には認められなかった⁸⁾。彼らは、最も精確に内因性周期を評価できると考えられている脱同調実験は行っていない。また、レンチウイルスを用いたりポーター遺伝子導入法は、ゲノム中の不特定な位置に取り込まれるため、インスレーター配列をつけたとしてもシス効果の影響を完全に除外できるとは限らない。さらに、ウイルスは操作エリアが限定されるため操作工程が煩雑となる。そこで、我々は、1日28時間周期の脱同調実験により生理機能リズム周期を決定し、さらに、同一被験者の皮膚由来初代線維芽培養細胞中にエレクトロポレーション法によりリポーター遺伝子を導

入して末梢リズム周期を決定している(図2)。両者のリズム特性を比較・検討し、個人の生物時計機能を評価することに取り組んでいる。

睡眠相後退型に認められる非常に遅れた睡眠時間帯や、非同調型のような遅れ続ける睡眠覚醒リズム、また、不規則型の特徴である分断された睡眠覚醒パターンなどは、著しい社会的引きこもりや制止の強いうつ状態により、対人接触が乏しい生活に陥っている統合失調症やうつ病患者でも認められることがある。睡眠覚醒リズムを伴う睡眠障害の病態を精確に把握し、正しい診断ならびに有効な治療を提供するためには、患者の生物時計機能を評価する必要があり、生体組織を利用した代替測定法は非常に有用な手段となることが期待されている。

文 献

- 1) Brown SA, Fleury-Olela F, Nagoshi E, et al (2005) The period length of fibroblast circadian gene expression varies widely among human individuals. *PLoS Biol*, 3 : e338.
- 2) Dijk DJ and Archer SN (2009) PERIOD3, circadian phenotypes, and sleep homeostasis. *Sleep Med Rev*, 14 : 151-160.
- 3) Ebisawa T, Uchiyama M, Kajimura N, et al (2001) Association of structural polymorphisms in the human period3 gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Rep*, 2 : 342-346.
- 4) Isojima Y, Nakajima M, Ukai H, et al (2009) CKIepsilon/delta-dependent phosphorylation is a temperature-insensitive, period-determining process in the mammalian circadian clock. *Proc Natl*

- Acad Sci U S A, 106 : 15744-15749.
- 5) Jones CR, Campbell SS, Zee SE, et al (1999) Familial advanced sleep-phase syndrome : A short-period circadian rhythm variant in humans. *Nat Med*, 5 : 1062-1065.
 - 6) Mishima K, Okawa M, Hozumi S, et al (2000) Supplementary administration of artificial bright light and melatonin as potent treatment for disorganized circadian rest-activity, and dysfunctional autonomic and neuroendocrine systems in institutionalized demented elderly persons. *Chronobiol Int*, 17 : 419-432.
 - 7) Okawa M and Uchiyama M (2007) Circadian rhythm sleep disorders : characteristics and entrainment pathology in delayed sleep phase and non-24-h sleep-wake syndrome. *Sleep Med Rev*, 11 : 485-496.
 - 8) Pagnani L, Semenova EA, Moriggi E et al (2010) The physiological period length of the human circadian clock in vivo is directly proportional to period in human fibroblasts. *PLoS One*, 5 : e13376.
 - 9) Pendergast JS, Friday RC and Yamazaki S (2010) Distinct functions of Period2 and Period3 in the mouse circadian system revealed by in vitro analysis. *PLoS One*, 5 : e8552.
 - 10) Pittendrigh CS (1993) Temporal organization : reflections of a Darwinian clock-watcher. *Annu Rev Physiol*, 55 : 16-54.
 - 11) Reppert SM and Weaver DR (2002) Coordination of circadian timing in mammals. *Nature*, 418 : 935-941.
 - 12) Sack RL, Brandes RW, Kendall AR, et al (2000) Entrainment of free-running circadian rhythms by melatonin in blind people. *N Engl J Med*, 343 : 1070-1077.
 - 13) Shearman LP, Jin X, Lee C, Reppert SM, et al (2000) Targeted disruption of the mPer3 gene : subtle effects on circadian clock function. *Mol Cell Biol*, 20 : 6269-6275.
 - 14) Swaab DF, Fliers E and Partiman TS (1985) The suprachiasmatic nucleus of the human brain in relation to sex, age and senile dementia. *Brain Res*, 342 : 37-44.
 - 15) Takahashi JS, Hong HK, Ko CH, et al. : (2008) The genetics of mammalian circadian order and disorder : implications for physiology and disease. *Nat Rev Genet*, 9 : 764-775.
 - 16) Toh KL, Jones CR, He Y, et al (2001) An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome. *Science*, 291 : 1040-1043.
 - 17) Uchiyama M, Okawa M, Ozaki S, et al (1996) Delayed phase jumps of sleep onset in a patient with non-24-hour sleep-wake syndrome. *Sleep*, 19 : 637-640.
 - 18) van der Veen DR and Archer SN (2010) Light-dependent behavioral phenotypes in PER3-deficient mice. *J Biol Rhythms*, 25 : 3-8.
 - 19) Xu Y, Padiath QS, Shapiro RE, et al (2005) Functional consequences of a CK1delta mutation causing familial advanced sleep phase syndrome. *Nature*, 434 : 640-644.
 - 20) Xu Y, Toh KL, Jones CR, et al (2007) Modeling of a human circadian mutation yields insights into clock regulation by PER2. *Cell*, 128 : 59-70.
 - 21) Yamazaki S, Numano R, Abe M, et al (2000) Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. *Science*, 288 : 682-685.

