

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 7 月 8 日現在

機関番号：14202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24621003

研究課題名(和文) 生体リズム関連遺伝子を用いたクロノタイプの同定と非薬物治療法の開発

研究課題名(英文) Identification of Chronotype and its application of non-pharmacological treatment for mood disorders

研究代表者

山田 尚登 (Yamada, Naoto)

滋賀医科大学・医学部・教授

研究者番号：50166724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：唾液中細胞を用いてクロノタイプを同定し質問紙によるクロノタイプと生物学的クロノタイプを比較検討し、臨床応用可能な生物学的時計マーカーを作成すること、およびクロノタイプと気分障害の関連性を明らかにすることを研究目的とした。

唾液は、2時間ごとに2mlを朝6時から夕方8時まで回収した。口腔内細胞から得られた時間遺伝子Per3、Nr1d1、Nr1D2の全RNAよりcDNAを作成し、リアルタイムPCRにてRNA量を計測し、各時間遺伝子のRNA量からサーカディアンリズムの指標(頂点位相、メサ-、振幅)を安定して同定する測定法を確立しようと試みた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of the study is to confirm the method for identifying a chronotype using saliva from the subjects, and to examine the validity of the method by comparing the data obtained from questionnaire. The saliva of the subjects was collected every 2 hours from 6 to 20 o'clock. After creating the cDNA from the RNA extracted from the saliva, each amount of Per3, Nr1d1, Nr1D2 was measured by the real-time PCR. Then, the index of the circadian rhythm (the acrophase, the mesa - the amplitude) was identified using the data.

研究分野：精神医学

キーワード：生体リズム 時間遺伝子 非薬物治療

## 1. 研究開始当初の背景

うつ病のみならず健康被験者においても気分や睡眠のサーカディアン変動はしばしば認められる<sup>1-2)</sup>。近年、サーカディアンリズムのクロノタイプと気分障害(うつ病)の関連性が注目され始め、夕方タイプでは抑うつが生じやすいとの仮説が報告がされているが、実証的データは少ない。また、双極性障害での病相とクロノタイプとの関連を見たものはない。

これまで、うつ病のサーカディアンリズムの研究の多くは、深部体温リズムやメラトニンなどのホルモンリズムを指標として行われてきたが、これらは外的環境の影響を受けやすく、個体のサーカディアンリズムを正確に反映しているとは言えない。生体の血液、唾液、毛根細胞を利用して、その時間遺伝子の量を測定することにより生体リズムの位相を測定することが可能になっており、これらを用いてクロノタイプを同定することが可能となっている。

申請者はこれまで、気分障害の原因・病態生理・治療に関して時間生物学的観点から検討し報告を行ってきた<sup>3-4)</sup>。また、気分障害において、時間遺伝子の SNIP に関して検討を加えてきた<sup>5)</sup>。気分障害では、生体リズムの位相が不安定になっていること、振幅の減少、メサ - の高値が病態生理として存在し、高照度光療法、断眠療法などの時間生物学的治療の有効性を報告してきた。しかし、生体リズムの指標として用いてきた深部体温、メラトニンホルモンなどは外的環境の影響を受けやすく、結果の妥当性には問題があり、その解釈には限界があった。

気分障害の成因としての位相不安定仮説を明らかにするためには、生体の時間遺伝子の活動を指標にすべきであるが、近年神経科学の進歩と共にそれが可能となってきている。また、生体リズムの操作に関しても、高照度光療法以外にメラトニン及び更に強力

なメラトニン受容体アゴニストの使用が可能となっている。これらを背景に、気分障害患者においてこれまでより更に客観的な指標を用いてクロノタイプを測定し、サーカディアンリズムを操作することで気分障害に与える影響を検討することが可能になってきている。

1. Germain A, Kupfer DJ: Circadian rhythm disturbances in depression. *Hum Psychopharmacol* 23, 571-85. 2008.
2. Yamada N: Mood disorder and biological rhythm. Recent advances in the research of affective disorder in Japan. ELSEVIER, pp107-112, 2002
3. Tsujimoto T, Yamada N, Shimoda K, et al: Circadian rhythms in depression. Part I: Monitoring of the circadian body temperature rhythm. *J. Affect. Disord.*, 18, pp 193-197, 1990
4. Yamada N, Martin-iverson MT, Daimon K, et al: Clinical and chronobiological effects of light therapy on nonseasonal affective disorders. *Biol. Psychiatry*, 37, pp 866-873, 1995
5. Shiino Y, Nakajima S, Ozeki Y, et al: Mutation screening of the human period 2 gene in bipolar disorder. *Neuroscience letters*, 338, pp82-84, 2003

## 2. 研究の目的

今回、気分障害の症状とクロノタイプの関連性を示すことを目的として研究を開始した。クロノタイプに関しては、Horne-Ostbergの朝方・夕方質問紙が既に存在しているので、客観的評価尺度としての時間遺伝子量を用いたクロノタイプ測定法を確立する。具体的には、患者の唾液から得られた時間遺伝子の RNA 量をリアルタイム PCR を用いて測定し、変動量からサーカディアン成分(メサー、アクロフェース、振幅)を求め、それを用いたバイオロジカルなクロノタイプの同定法を作成する。

### 3. 研究の方法

#### バイオリジカルなクロノタイプ測定法の確立

唾液は、2時間ごとに2mlを朝6時から夕方8時まで回収した。口腔内細胞から得られた時間遺伝子 Per3、Nr1d1、Nr1D2 の全 RNA を、キットを用いて抽出した後、cDNA を作成し、リアルタイム PCR にて RNA 量を計測した。各時間遺伝子の RNA 量からサーカディアンリズムの指標（頂点位相、メサ -、振幅）を安定して同定する測定法を確立する予定であった。

Primer 探索は、米国国立衛生研究所の実験支援ソフト、Primer-Blast を用いて、intron を挟んだ gene specific primer をデザインした。

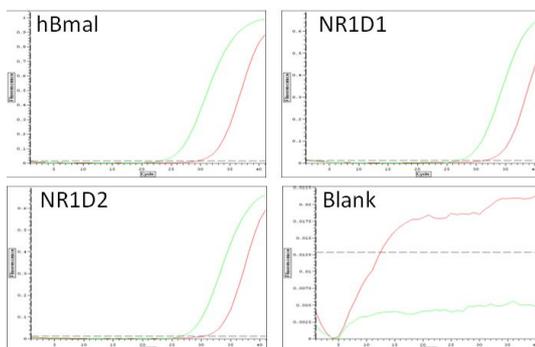
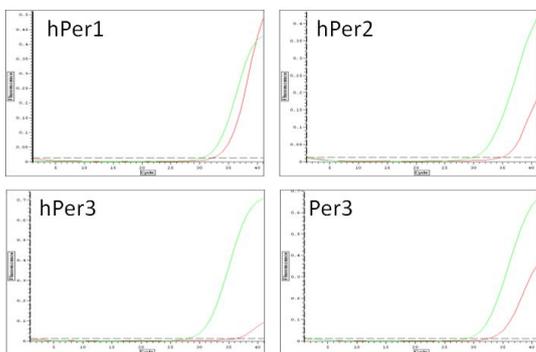


### 4. 研究成果

#### 多組織サンプルからの比較、検討

全血、唾液から cDNA 合成後 Real time PCR にて house keeping gene [18s] を検出。全血・唾液ともに“組織毎”の回収率の低下は認められなかった。

HeLa 細胞 cDNA を positive control として、全血 cDNA 中の時計遺伝子の検出能力確認



設定したプライマーが、全ての対象組織から対象遺伝子を検出できた。

唾液より、RNA を抽出し、cDNA からリアルタイム PCR で RNA の定量の再現性が Per3、Nr1d1、Nr1D2、Bmal1 でほぼ確立できたが、Per1、Per2 ではいまだ不十分であり、定量の再現性を上げるべく工夫を繰り返す必要がある。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 5 件)

1. Ookubo M, Kanai H, Aoki H, Yamada N: New perspective of antidepressant-like effects for protein expression of histone deacetylases in C57BL/6 mice: a new perspective Journal of Psychiatric Research 47(9):1204-14., 2013 (査読有)
2. Yoshimura M, Kitazawa M, Murakami J, Yamada N: Effects of a sleep hygiene Education program on Children in a sleep Japanese Elementary School Aino Journal 11: 3-6, 2013 (査読有)
3. Aoki K, Matsuo M, Takahashi M, Murakami J, Aoki Y, Aoki N, Mizumoto H, Namikawa A, Hara H, Miyagawa M, Kadotani H, Yamada N: Association of sleep-disordered breathing with decreased cognitive function among patients with dementia. Journal of Sleep Research 23(5):517-23, 2014 (査読有)

- 4 . Roberto D Pascual-Marqui, Jose Biscay Roland, Jorge Bosch-Bayard, Dietrich Lehmann, Kochi K, Yoshimura M, Kinoshita T, Yamada N: Advances in EEG methods applied to intra-cortical connectivity inference and to functional imaging: Examples in Psychiatry research International Journal of Psychophysiology 94:120-261, 2014
- 5 . Nakada Y, Murakami J, Kadotani H, Matsuo M, Itou H, Yamada N: A Cross-sectional Study on Working Hours, Sleep Duration and Depressive Symptoms in Japanese Shift Workers. A Cross-sectional Study on Working Hours, Sleep Duration and Depressive Symptoms in Japanese Shift Workers. Journal of Oral Sleep Medicine 2015

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

山田 尚登 (Yamada Naoto)  
滋賀医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50166724

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：