〈記録〉第31回 日本臨床薬理学会年会 2010年12月1~3日 京都
シンポジウム25: 時間疾患の現状

2. 体内時計システムを利用した 薬物誘発性精神疾患予測法の構築

牛 島 健太郎* 安 藤 仁* 藤 村 昭 夫*

1. はじめに

生体の各臓器には細胞レベルで「体内時計」が存在しており、体内時計の自律的な活動によりさまざまな生体機能に約24時間周期の日内リズムが認められる。1997年に哺乳動物において生体リズム制御遺伝子(Clock)が発見された後、体内時計の制御システムに関する研究が急速に進み、体内時計は3つの転写制御配列(E-box, D-boxおよびRRE)と約20種類の転写因子(時計遺伝子)による転写調節ネットワークであることが解明された¹⁾。この体内時計の転写制御ネットワークの中で、E-boxに関与する時計遺伝子の数は他の転写制御配列よりも多く、体内時計のアキレス腱と考えられている。これまでに作成された時計遺伝子改変マウスはE-boxに関連するものであり、Per2, Clock, Cry1/2の改変マウスでは体内時計が破綻し、易発がん性、過食、食塩感受性高血圧を呈している²⁻⁴⁾。

2. 生体リズム障害と精神疾患

生体リズム障害と疾患との関わりについては、おもに躁うつ病や季節性うつ病において注目されていた。このような疾患では睡眠サイクルの位相が変化しており、生体リズム障害は症状の1つとされていた。しかし近年、精神疾患の発症と時計遺伝子の遺伝子多型の関連について解析が行われた結果、大うつ病患者や統合失調症患者ではPer3やNPAS2の一塩基変異が高頻度で認められることが明らかにされた⁵⁾。

インターフェロン(IFN)や副腎皮質ホルモン薬は高頻度にうつ病を発症させるため、臨床において注意が必要な薬物である。これらをマウスに投与すると、視交叉上核(体内時計の最上位中枢)や末梢臓器において、時計遺伝子の発現リズムが破綻することが報告されている^{6,7)}。また、これらの薬物をマウスに投与し

強制水泳をさせると、抑うつ指標である無動時間が増加した。以上の成績より、体内時計の異常は精神疾患の発症要因の1つではないかと考えられる。

3. 培養細胞を用いた評価系の構築

平成20年6月、厚生労働省から重篤副作用疾患別対応マニュアルが発表され、その1つに薬物誘発性うつ病がある。うつ病などの気分障害を惹起することが疫学的に示唆されている薬物には、前述のIFNのほか一部HMG-CoA還元酵素阻害薬や禁煙補助薬のバレニクリン、HIV感染症治療薬のエファビレンツなどがあり、その種類は多岐にわたっている。したがって、薬物誘発性うつ病を予測し対処法を講じることは重要な課題である。しかしながら、適切なバイオマーカーがないために、基礎研究の段階で薬物誘発性うつ病の発症を予測することは困難である。

我々は、体内時計システムに及ぼす薬物の影響を評価することにより、薬物誘発性うつ病の発症を予測する方法を構築することが必要と考え、以下の研究を行った。なお、基礎研究の段階で短期間に複数の化合物を評価するために、*in vitro*において時計機能を自動的に測定できる実験系を用いることとした。

体内時計システムに及ぼす薬物の影響を培養細胞において評価する場合、培養環境下にある細胞内にリズムミカルな転写活性を形成する必要がある。通常の条件下では個々の細胞の体内時計が独立しているため、細胞集団に「概日リズム」は観察されない。そこに高濃度血清やデキサメタゾン(Dex)を2時間ほど曝露すると、それまで細胞ごとに独立であった転写活性リズムが同調し、培養プレートやdishの中で時計機能を評価することが可能となる⁸⁾。さらにルシフェラーゼによるルシフェリンの化学発光を指標とすることにより、体内時計を自動で測定することが可能になる。

* 自治医科大学医学部薬理学講座臨床薬理学部門
〒329-0498 下野市薬師寺 3311-1

4. mPer2-LUC に及ぼす IFN- α の影響

我々は mPer2 遺伝子の転写開始点付近から約 3 kb 上流までの領域を、pGL4 ルシフェラーゼベクターに組み込み、培養細胞 (NIH3T3) にトランスフェクションして基礎検討を行った。Dex 刺激後より培地にルシフェリンを添加し、10 分おきに 1 分間の化学発光量を測定したところ、mPer2-LUC によるルシフェリンの発光はリズムカルに変化し、既報と同様に約 24 時間の周期性が認められた。さらに、この測定条件下で IFN- α を Dex 刺激後より併用すると、mPer2-LUC による発光リズムの振幅が低下した。以上のように、*in vivo* において報告されている IFN- α による生体リズム障害を、培養細胞を用いた自動測定系において検出することができた。

5. まとめ

今回の検討に用いた mPer2 の転写活性の概日リズムは、おもに E-box により制御されている。前述のとおり、体内時計システムは 3 つの転写スイッチで制御されており、mPer2-LUC のほかに D-box-LUC と RRE-LUC を用いて評価することが重要である。さらに、この評価システムにより薬物誘発性精神疾患を予測することができるか否か明らかにすることが今後の課題である。薬物誘発性うつ病は、双極性障害や大うつ病と異なる病態であるとされており、有効な治療薬に関する基礎検討はなされていない。この評価システムを応用して薬物誘発性うつ病に対して有効な抗うつ薬のスクリーニングが可能になれば、至適な薬物療法

を確立するための有用なツールになるものと考えられる。さらに、新規化合物による精神疾患誘発の可能性の有無を、創薬の段階で評価することができるものと期待される。

文 献

- 1) Ueda HR, Hayashi S, Chen W, Sano M, Machida M, Shigeyoshi Y, et al. System-level identification of transcriptional circuits underlying mammalian circadian clocks. *Nat Genet.* 2005 ; **37** (2) : 187-92.
- 2) Fu L, Pelicano H, Liu J, Huang P, Lee C. The circadian gene Period2 plays an important role in tumor suppression and DNA damage response in vivo. *Cell.* 2002 ; **111** (1) : 41-50.
- 3) Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, et al. Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science.* 2005 ; **308** (5724) : 1043-5.
- 4) Doi M, Takahashi Y, Komatsu R, Yamazaki F, Yamada H, Haraguchi S, et al. Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. *Nat Med.* 2010 ; **16** (1) : 67-74.
- 5) Mansour HA, Wood J, Logue T, Chowdari KV, Dayal M, Kupfer DJ, et al. Association study of eight circadian genes with bipolar I disorder, schizoaffective disorder and schizophrenia. *Genes Brain Behav.* 2006 ; **5** (2) : 150-7.
- 6) Ohdo S, Koyanagi S, Suyama H, Higuchi S, Aramaki H. Changing the dosing schedule minimizes the disruptive effects of interferon on clock function. *Nat Med.* 2001 ; **7** (3) : 356-60.
- 7) Koyanagi S, Okazawa S, Kuramoto Y, Ushijima K, Shimeno H, Soeda S, et al. Chronic treatment with prednisolone represses the circadian oscillation of clock gene expression in mouse peripheral tissues. *Mol Endocrinol.* 2006 ; **20** (3) : 573-83.
- 8) Balsalobre A, Brown SA, Marcacci L, Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, et al. Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling. *Science.* 2000 ; **289** (5488) : 2344-7.