

平成21年 4月 30日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590853

研究課題名（和文） 循環器疾患発症における体内時計の役割の解明と治療戦略の開発

研究課題名（英文） The Role of Internal Biological Clock in the Cardiovascular Diseases and the Development of New Therapeutic Strategy

研究代表者 前村 浩二(MAEMURA KOJI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授

研究者番号：90282649

研究成果の概要：循環器疾患の発症には概日リズムが認められる。本研究は循環器疾患発症の概日リズムを体内時計の観点で明らかにし、時間を考慮した視点からの循環器疾患の予防法、治療法の開発をめざして遂行した。まず末梢の体内時計によりコントロールされている遺伝子群の候補として転写因子、分泌タンパク、膜受容体など28個の遺伝子が同定され、体内時計がこれらの遺伝子発現を通じて循環器疾患発症に関与していることが示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：循環器、高血圧、体内時計、概日リズム

1. 研究開始当初の背景

血圧や心拍数などの心血管系機能や糖代謝機能には明らかな日内変動が見られる。また、循環器疾患の発症頻度にも明らかな日内変動が見られ、例えば心筋梗塞、不安定狭心症などの急性冠症候群、脳梗塞あるいは冠動脈スパズムは早朝に多く発症する。従って生活習慣病の発症と体内時計は密接に関連していると予測される。一方、最近体内時計の分子メカニズムが急速に明らかにされ、CLOCK、BMAL、PERIODなどの転写因子相互の positive 及び negative feedback ループから形成されていることが判明し、さらに心臓や血管などの末梢組織にも体内時計が存在することが示された。このように体内時

計の分子メカニズムはほぼ解明されたにもかかわらず、それが疾患とどのように結びついているかはほとんどわかっていない。

2. 研究の目的

血圧や心拍数などの心血管系機能や循環器疾患の発症頻度には明らかな日内変動が見られ、循環器疾患の発症と体内時計は密接に関連していると予測される。本研究では、臨床的に知られている循環器機能、生活習慣病のサーカディアンリズムの現象を、体内時計の分子メカニズムの観点で明らかにし、時間を考慮した全く新しい視点からの循環器疾患の予防法、時間治療の開発をめざした。

3. 研究の方法

まず、末梢体内時計の標的となっている遺伝子群を同定し、高血圧、心肥大、動脈硬化などの際に体内時計や、これらの遺伝子群の発現がどのように変調を来すのかをマウスで観察する。また逆に、体内時計が変調したマウスにおいて寿命や高血圧、心肥大、糖尿病、動脈硬化などの発症が影響を受けるかを検討する。具体的には以下のような方法で研究を遂行した。

1) 心血管組織の末梢体内時計の下流のアウトプット遺伝子の同定と機能解析

Clock と **Bmal** を発現するアデノウイルスを培養血管内皮細胞に感染させ、発現が上昇する遺伝子群を **cDNA Microarray** にて解析した。さらにこれらの遺伝子群の中で、その発現が概日リズムを呈するものを選別した。この手法により末梢体内時計によってコントロールされている遺伝子群を網羅的に同定し、その生理的意義を循環器疾患との関連で明らかにする。

2) 高血圧、心不全、動脈硬化の病態における体内時計の変調

SHR などの高血圧モデルラットでは、末梢体内時計の振幅や位相がずれ、その下流にあると考えられるエネルギー代謝や、細胞増殖に関連する遺伝子群発現の日内変動が変化していることが報告されている。本研究では末梢体内時計が、心肥大、心筋梗塞、高血圧、動脈硬化などの際にどのように障害されるか検討するために、マウスにアンジオテンシン II による心肥大や血管障害を作成し、各組織で体内時計遺伝子の発現パターンを解析する。

3) 体内時計失調が高血圧、心不全、動脈硬化形成に及ぼす影響

体内時計の変異が高血圧、心不全、動脈硬化形成に影響を及ぼすかを検討する。今までに **Clock** 遺伝子変異マウスや **Cry1/Cry2** 遺伝子ダブルノックアウトマウスを暗所で飼育すると体内時計の周期が延長または完全に日内変動が失われることが知られている。我々は、**Cry 1** を過剰発現させることにより体内時計が変調すると考えた。**CAG** や α **MHC** をプロモーターとして使用して **Cry1** を全身または心筋特異的に発現させたトランスジェニックマウスを作成し、これらのマウスで、心肥大、腎障害、動脈硬化の形成にどのように関与するのか検討した。

4. 研究成果

1) 本研究は、臨床的に知られている循環器機

能、生活習慣病のサーカディアンリズムの現象を、体内時計の分子メカニズムの観点で明らかにし、時間を考慮した全く新しい視点からの循環器疾患の予防法、時間治療の開発をめざすことを目的に遂行した。アデノウイルスを用いて、**Clock** と **Bmal** を培養血管内皮細胞で過剰発現させ、発現が上昇し、なおかつ発現が日内変動を呈することがわかっている遺伝子を選別すると転写因子、分泌タンパク、膜受容体など28個の遺伝子が体内時計の標的遺伝子の候補として同定された。まずその中でトロンボモジュリン (TM) について解析した。TM mRNA の発現は、マウスの心臓および肺において明確な日内変動を示していた。TM プロモーターを用いたプロモーターアッセイおよびゲルシフトアッセイにより、**CLOCK/BMAL** が TM プロモーター内の E-box 配列に直接結合し、プロモーターを活性化することを明らかにした。**Clock** 変異マウスは体内時計に異常を来すことが知られているが、この **Clock** 変異マウスでは TM mRNA 発現の日内変動は消失していたことから、TM 発現は *in vivo* においても時計遺伝子により調節されていることが明らかになった。以上より、本研究において血管内皮細胞に存在する末梢時計により、TM 発現が制御されることが確認された。TM 発現の日内変動は、心筋梗塞発症の日内変動に関わっている可能性が高く、より詳細にその発現を検討することにより、心血管疾患の発症およびその予防に向けて新しいアプローチができる可能性が示唆された。

2) まず 高血圧、心不全、動脈硬化などの際に発現が変調する遺伝子 X (未発表のため公開できず) を同定した。2008 年度はさらに遺伝子 X について体内時計との関連で解析した。培養細胞に 50% 血清負荷を行うと個々の細胞の時計遺伝子発現の位相が同期することが知られている。この *in vitro* の系を用いて遺伝子 X を欠損した培養線維芽細胞に 50% 血清負荷を行うと、野生型の細胞に比較して時計遺伝子発現の日内変動が障害されていることが示された。さらに遺伝子 X のノックアウトマウスでは、光刺激による体内時計のリセット機能に障害があることも示された。遺伝子 X は血管新生や心不全に関与することが知られており、これらの病態での様々な遺伝子発現や生理機能のサーカディアンリズムの障害に遺伝子 X が関与していることを示している。現在この遺伝子 X の血管新生や心不全における発現パターン、時計遺伝子との直接の interaction について解析中である。今後遺伝子 X の発現動態を指標とした、循環器疾患の予防法、時間治療の開発に結びつけられると考えられる。

3) 全身に **Cry** を過剰発現する **CAG-Cry1** マウスと心筋特異的に発現する α **MHC-Cry1** マ

ウスを樹立できたが、予想に反して時計遺伝子群の発現や、行動の概日リズムには変調は認められなかった。Cry1 の過剰発現では何らかの代償機構が働いて体内時計の変調が抑制されているものと考えられる。現在 Clock 変異マウスを入手して様々な負荷を加えた際の心血管系の臓器障害を解析する準備中である。

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 20 件)

英文

1. Wang G, Watanabe M, Imai Y, Hara K, Manabe I, Maemura K, Horikoshi M, Kohro T, Amiya E, Sugiyama T, Fujita T, Kadowaki T, Yamazaki T, Nagai R. Genetic variations of Mrf-2/ARID5B confer risk of coronary atherosclerosis in the Japanese population. *Int Heart J*. 2008;49:313-327. 査読有
2. Son BK, Akishita M, Iijima K, Kozaki K, Maemura K, Eto M, Ouchi Y. Adiponectin antagonizes stimulatory effect of tumor necrosis factor-alpha on vascular smooth muscle cell calcification: regulation of growth arrest-specific gene 6-mediated survival pathway by adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase. *Endocrinology*. 2008;149:1646-1653. 査読有
3. Oishi Y, Manabe I, Tobe K, Ohsugi M, Kubota T, Fujiu K, Maemura K, Kubota N, Kadowaki T, Nagai R. SUMOylation of Kruppel-like transcription factor 5 acts as a molecular switch in transcriptional programs of lipid metabolism involving PPAR-delta. *Nat Med*. 2008;14:656-666. 査読有
4. Takeda N, Maemura K, Horie S, Oishi K, Imai Y, Harada T, Saito T, Shiga T, Amiya E, Manabe I, Ishida N, Nagai R. Thrombomodulin is a clock-controlled gene in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 2007;282:32561-32567. 査読有
5. Maemura K, Takeda N, Nagai R. Circadian rhythms in the CNS and peripheral clock disorders: role of the biological clock in cardiovascular diseases. *J Pharmacol Sci*. 2007;103:134-138. 査読有
6. Takeda N, Maemura K. Chronobiology of acute myocardial infarction-molecular biology-. *Biol Rhythms Res*.

2007;38:233-245. 査読有

和文

7. 前村浩二:サーカディアンリズムを考慮した心血管イベントの発症抑制 *Pharma Medica* 27: 153-156, 2009 査読無
8. 網谷英介, 前村浩二: 動脈硬化の診断法としての血液マーカー. *内分泌・糖尿病科* 27: 407-416, 2008 査読無
9. 渡辺昌文, 前村浩二: 心房細動の抗凝固療法と出血性疾患. *medicina* 45: 1673-1677, 2008 査読無
10. 前村浩二: 動脈硬化のトータルマネジメント. *medicina* 44: 1441, 2007. 査読無
11. 前村浩二: Editorial 動脈硬化の病態と臨床像. *medicina* 44: 1442-1444, 2007. 査読無
12. 前村浩二, 志賀太郎: 急性冠症候群の診断 血液生化学検査の解釈. *Current Therapy* 25: 22-26, 2007. 査読無
13. 前村浩二: 生活リズムとストレス-生活リズムとメタボリックシンドロームの関係について. *肥満と糖尿病* 6:797-798, 2007. 査読無
14. 前村浩二: 血管病研究の現在と未来-冠動脈疾患急性期治療の進歩. *ACROSS*; 17:16-17, 2007. 査読無
15. 前村浩二: 時計遺伝子研究の最前線-心血管疾患と概日リズム. *Clinical Neuroscience* 25:1147-1149, 2007. 査読無
16. 前村浩二: 循環器系のサーカディアン調節オーバービュー. *血管医学* 8:337-339, 2007. 査読無
17. 前村浩二: 動脈硬化のトータル管理 くらしとからだ 54:3-5, 2007. 査読無
18. 前村浩二: 生活習慣病と体内時計. *Medical View point* 28:3, 2007. 査読無
19. 網谷英介, 前村浩二: スタチンのコレステロールを介さない細胞生物学的作用. *Journal of Integrated Medicine* 17:669-671, 2007. 査読無
20. 志賀太郎, 前村浩二: 動脈硬化の炎症マーカー (CRP, PTX3 など) *The Lipid* 18: 26-31, 2007. 査読無

[学会発表] (計 6 件)

1. 前村浩二: 心血管系の時計遺伝子の意義、第49回日本脈管学会総会、2008年10月25日、東京
2. 前村浩二: シンポジウム「動脈硬化に関与する新しい分子機構」時計遺伝子の病態への関与、第15回日本血管生物学会、2007年11月29-30日、福岡
3. 前村浩二: 生活習慣病と体内時計、第3回 Summer Vascular Conference、2007年

9月8日、東京

4. 前村浩二：血管内皮機能から見た循環器疾患—炎症、血管新生、体内時計—、第6回分子心血管カンファレンス、2007年5月25日、山形
5. Shiga T, Maemura K, Imai Y, Kawanami D, Takeda N, Ando J, Morita T, Manabe I, Hayashi D, Ohtsu H, Sugiyama A, Miyamoto K, Sagara M, Ito Y, Reid PC, Yamazaki T, Hirata Y, Kodama T, Nagai R. Long Pentraxin 3 Is More Specific Than C-reactive Protein as a Marker for Vascular Inflammation, American College of Cardiology 2007 Scientific Sessions, March 24-27, 2007, New Orleans, LO
6. Shiga T, Maemura K, Imai Y, Kawanami D, Takeda N, Ando J, Morita T, Manabe I, Hayashi D, Ohtsu H, Hashimoto H, Sugiyama A, Miyamoto K, Sagara M, Ito Y, Reid PC, Yamazaki T, Hirata Y, Kodama T, Nagai R. Long Pentraxin3 (PTX3) is More Specific than CRP as a Marker for Vascular Inflammation, American Heart Association 80 th Scientific Sessions, Nov 4-7, 2007, Orland, FL

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

なし

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前村 浩二 (MAEMURA KOJI)

長崎大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：90282649

(2) 研究分担者

渡辺 昌文 (WATANABE MASAFUMI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：60360096

永井 良三 (NAGAI RYOZO) 2008年度のみ

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：60207975

(3) 連携研究者

なし