

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2008～2009

課題番号：20890198

研究課題名（和文） 時計出力分子 Prokineticin 2 による中枢性血圧調節機構の解明

研究課題名（英文） Role of Prokineticin 2 in the Neural Regulation of Blood Pressure in Rats

研究代表者

向坂 彰 (KOHSAKA AKIRA)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00458051

研究成果の概要（和文）：ヒトの血圧には、睡眠時に低下し覚醒とともに上昇する日内リズムがある。血圧の日内リズムは、体内時計によって調節されていることが知られている。しかし、体内時計が生み出すリズムが、どのように血圧のリズムに変換されているのかは分かっていない。本研究では、ラットの延髄孤束核に発現する Prokineticin 2 という分子に着目し、この分子が体内時計の発振するリズムを血圧の日内リズムに変換している可能性を見出した。

研究成果の概要（英文）：The blood pressure rhythm is subject to diurnal variation governed by the circadian clock system. However, little is known about how the circadian system transmits the timing signals to the cardiovascular system. In the present studies, we found that prokineticin 2, a target molecule of the circadian clock, is abundantly expressed in the nucleus tractus solitarius and regulates rhythms and levels of blood pressure in rats.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,340,000	402,000	1,742,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,540,000	762,000	3,302,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・環境生理学（含体力医学・栄養生理学）

キーワード：中枢性血圧調節、生体リズム、体内時計、血圧日内リズム

### 1. 研究開始当初の背景

近年、哺乳類の体内時計の分子メカニズム、すなわち、分子時計の構造が大いに解明された。それにともない、体内時計が単に概日リズムを刻むだけではなく、生体リズムとは関係がないように思われる生理機能の調節に

も関与していることが明らかになった。たとえば、分子時計を構成する時計遺伝子の異常が、癌、代謝異常等のさまざまな疾患の発症に関与することが報告されるようになった。体内時計と疾患のかかわりにおいて、高血圧症は古くから生体リズム異常の観点から研究されてきた領域といえる。これは、血圧が

明暗周期にあわせて日内リズムがあること、また、血圧日内リズムの異常が脳卒中などの危険因子であることが知られていたからである。このように、生理学的にも病態生理学的にも「血圧日内リズムの制御機構」を解明することは古くから重要な課題であった。しかしながら、血圧日内リズムが、実際にどのように生み出されているのかはほとんど分かっていないのが現状であった。

## 2. 研究の目的

本研究課題では、生体内で血圧日内リズムを生み出している分子メカニズムを解明することを目指した。とくに、本研究課題では、体内時計と循環調節という別々の生体システムをつないでいる分子メカニズムに焦点を当てた。すなわち、体内時計のリズムの情報をさまざまな生理機能に伝えている何らかの分子機構に注目した。近年、分泌性タンパク prokineticin 2 (PK2) が、体内時計のリズムを生理機能に出力する分子として注目されてきた。PK2 はその発現調節が分子時計の下流にあり、さらに中枢神経系において循環調節中枢の一つである延髄孤束核 (nucleus tractus solitarius; NTS) に RNA レベルで強く発現していることが報告された。このことから、本研究課題では、「PK2 が NTS において血圧日内リズムの制御に関わっている」のではないかという仮説を立て、この仮説を証明するための実験を行った。

## 3. 研究の方法

### (1) ラット NTS における PK2 の日内リズムの解析 (実験 1)

PK2 が NTS において何らかの生体リズムの調節に関与しているならば、その発現には日内リズムがある可能性が高い。そのため、本研究では、まず PK2 の NTS における発現リズムの有無を mRNA レベルで調べた。本研究では後述するように、本態性高血圧モデルラット (Spontaneously Hypertensive Rat : SHR) の血圧日内リズムの破たんにおける PK2 の関与を調べることを最終目的としたこと。このことから、ここでは SHR のコントロールラットである Wistar-Kyoto rat (WKY) を用いた。すなわち、8 週齢の雄の WKY ラットから 4 時間毎 (計 24 時間分) に NTS を解剖採取し、NTS 中の PK2 の mRNA レベルをリアルタイム PCR にて確認した。本研究で用いるラットはすべて 12 時間ごとの明暗周期下で管理した。

### (2) ラット NTS における PK2 タンパク発現の確認 (実験 2)

現在までのところ、in situ hybridization 法にて NTS における PK2 の mRNA 発現が報告されているが (Br J Pharmacol 142 181 2004)、PK2 タンパクの延髄での局在については知られていない。このため、本研究では、免疫組織化学的手法を用いて、PK2 のラット延髄内での局在をタンパクレベルで解析した。上記実験 1 と同様に動物は 8 週齢の雄の WKY を用いた。

### (3) ラット NTS における PK2 の時間薬理的な循環調節作用の検討 (実験 3)

PK2 には自発行動や摂食行動に対する中枢性の作用がこれまで報告されているが、中枢性の循環調節作用については知られていない。本研究では、循環調節中枢のひとつである NTS において、PK2 が血圧や心拍数にどのような作用があるのか調べた。8 週齢の雄の WKY ラットを用いて、ウレタン麻酔下および人工呼吸管理下にて、大腿動脈から挿入したカテーテルを通して血圧および心拍数を測定し、NTS に PK2 タンパクを微量注入 (マイクロインジェクション) した場合の循環動態の変化について検討した。さらに、PK2 投与の循環動態への効果が時間依存的であるのかどうかを投与時間を変更することによって検討した。ここでは、12 時間ごとの明暗周期下で点灯 2 時間後 (ZT2) および消灯 2 時間後 (ZT14) の 2 群で比較した。

### (4) 高血圧モデルラットにおける PK2 の循環調節作用の異常の有無を検討 (実験 4)

SHR は 4 週齢頃から対照群である WKY ラットと比較して、著明な血圧上昇を示すだけでなく、血圧の日内リズムにも異常を来すことが以前より報告されている。実験 4 では、まず、テレメトリーシステムを用いて、SHR における血圧の日内リズムにどのような異常がみられるのかを評価した。さらに、SHR の NTS における PK2 の mRNA 発現の日内リズムをリアルタイム PCR にて解析し、血圧変動と PK2 発現の日内リズムが両群間でどのように違うのかを検討した。最後に PK2 を NTS に投与した場合の循環動態に与える影響を SHR と WKY ラット間で比較した。

## 4. 研究成果

### (1) ラット NTS における PK2 の発現には日内リズムがある

血圧日内リズムの制御が、NTS に発現する PK2

によってなされているならば、PK2 の発現にも日内リズムがある可能性が高い。そこで本研究では、WKY の NTS における PK2 発現の日内リズムについてリアルタイム PCR を用いて mRNA レベルで検討した。その結果、PK2 の NTS における発現には、明期に頂値、そして暗期に底値となる明瞭な日内リズムが認められることを見出した。

(2) PK2 はタンパクレベルでもラット NTS に発現する

これまでのところ、PK2 の NTS における発現は、本研究も含めて mRNA レベルでしか報告されていない。転写レベルで発現が認められたとしても、実際に翻訳されてタンパクとして機能しているとは限らないことから、本研究ではラット NTS における PK2 タンパクの発現の有無を調べた。免疫組織化学的手法を用いて検討したところ、ラット NTS には PK2 タンパクが豊富に発現していることを見出した (図 1)。また、PK2 は、中枢神経系に存在する細胞のなかでもニューロンに発現していることが判明した (図 1)。

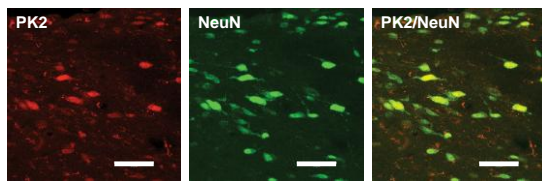


図 1 NTS ニューロンにおける PK2 の発現

(3) PK2 の NTS への投与は血圧および心拍数を低下させる

ここまでの実験結果により、PK2 が NTS に発現し、何らかの生理的機能をもっている可能性があることが分かった。NTS が中枢性循環調節の中核のひとつであることから、本研究では、PK2 が血圧および心拍数の調節に関わっているのではないかと考えた。この可能性を証明するために、麻酔下でラット NTS に PK2 を投与した時の循環動態の変化について調べた。その結果、PK2 の NTS への投与が、ラットの血圧および心拍数を低下させることを発見した。さらに、PK2 の循環動態に対する効果が時間依存的であることを見出した。すなわち、PK2 の投与による血圧および心拍数の低下の程度は、明期 (ZT2) での投与が暗期 (ZT14) に投与した場合よりも明らかに大きなものであることが分かった。興味深いことに、明期での PK2 の効果増大は、PK2 の転写レベルでの発現の頂値に一致していた。このことは、PK2 を中心とした循環調節システ

ムが明期において機能が高まるようにプログラムされている可能性を示唆していた。

(4) 高血圧モデルラットの血圧日内リズム異常には、PK2 による循環調節異常が関与している可能性がある

ここまでで、PK2 が NTS において血圧日内リズムの調節に重要な役割をはたしている可能性を示した。本研究ではさらに、本態性高血圧モデル動物である SHR を用いて、高血圧症の血圧日内リズムの破たんにおける PK2 の関与を調べた。まず、SHR および WKY の血圧日内リズムをテレメトリーシステムにて無麻酔・非拘束下で検討した。コントロール群の WKY の血圧は、活動期の暗期で高く、非活動期である明期に入ると間もなく低下するという明暗周期に合わせた日内リズムが認められた。しかしながら、SHR では、明期に入ってから血圧低下に時間がかかり、すなわち、非活動期の十分な血圧低下が認められなかった。本研究ではさらに、SHR での血圧日内リズムの異常の背景に PK2 の発現異常が関与していないかを調べた。その結果、NTS における PK2 発現の日内リズムは、WKY と SHR 間で大きく異なっており、WKY では明期に頂値が認められたのに対して SHR では頂値が暗期にシフトしていた (図 2)。さらに、時計遺伝子 *Bmal1* と *Per2* の発現リズムも SHR の NTS においては異常があることを見出した (図 2)。

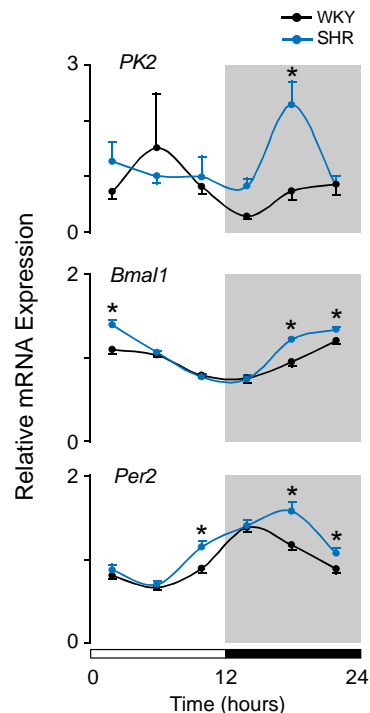


図 2 SHR における PK2 遺伝子と時計遺伝子発現の日内リズムの異常

本研究ではさらに、PK2 を SHR の NTS に投与した時の効果についてコントロール群の WKY と差があるのかどうかを検討した。その結果、PK2 の NTS への投与による血圧低下作用は、SHR が WKY よりも大きいことが分かった (図 3)。さらに、SHR では WKY で認められた PK2 の時間依存的な効果はなく、明期、暗期に関係なく同程度の血圧低下作用があることを見出した (図 3)。PK2 の心拍数に対する効果については、有意差はみとめられなかったものの、WKY と比較して SHR での低下作用が弱い傾向にあり、また、時間依存的な作用も SHR で小さい傾向にあった (図 3)。

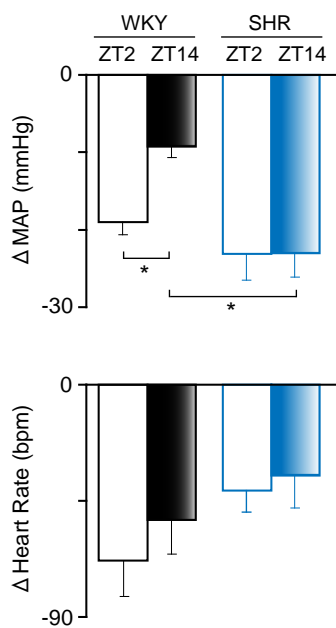


図 3 NTS への PK2 投与による循環動態変化における WKY と SHR での比較

本研究の成果は以下の 3 点に集約される。  
 (i) PK2 はラットの NTS において明暗周期に従って周期的に発現し、(ii) 血圧および心拍数の日内リズムの調節にかかわっている。そして、(iii) 本態性高血圧モデル動物でみられる血圧日内リズムの異常には、NTS における PK2 発現異常がかかわっている可能性がある。血圧日内リズムの異常は、高血圧症例における予後不良徴候であることから、血圧日内リズム異常のメカニズムを解明することは高血圧の病態および予後を考える上で非常に重要な課題である。本研究では、分子生物学的には PK2 という分子、そして解剖学的には延髄の NTS という部位が、血圧日内リズムの制御機構に大きく関わっている可能性を示した。今後、本研究の成果が、血圧日内リズムが破たんする病態生理の解明につながっていくことが期待される。

## 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)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 向坂 彰、Mohammad ER Bhuiyan、和気秀文、Sabine Gouraud、高岸三和、崔 鶴、Lucia Negri、前田正信. 「ラットの血圧日内リズム調節における Prokineticin 2 の役割」  
第 102 回近畿生理学談話会 於 豊中市 大阪大学基礎工学部 B 棟 2009 年 12 月 13 日
- ② 向坂 彰、前田正信. 「血圧日内リズムの中枢性調節」 シンポジウム「生体リズム研究の新展開—時計遺伝子のジェネティクス、エピジェネティクス、そして臨床応用まで—」  
第 62 回日本自律神経学会総会. 於 和歌山市 ダイワロイネットホテル和歌山 2009 年 11 月 8 日～9 日
- ③ Akira Kohsaka, Mohammad E. R. Bhuiyan, Hidefumi Waki, Miwa Takagishi, Sabine Gouraud, He Cui, Hideki Arakawa, Lucia Negri, Masanobu Maeda. Prokineticin 2 as a key molecule that regulates the cardiovascular rhythm in rats.  
The 6th Congress of Asian Sleep Research Society, The 34th Annual Meeting of Japanese Society of Sleep Research and The 16th Annual Meeting of Japanese Society for Chronobiology Joint Congress. October 25 - 27, 2009. Osaka, Japan
- ④ Akira Kohsaka, Mohammad Eliusur Rahman Bhuiyan, Hidefumi Waki, Miwa Takagishi, Sabine Gouraud, He Cui, Lucia Negri, Masanobu Maeda. Role of Prokineticin 2 in the Neural Regulation of the Cardiovascular Rhythm in Rats.  
36th International Congress of Physiological Science (IUPS). July 27 - August 1, 2009. Kyoto, Japan.
- ⑤ 向坂 彰、和気秀文、Mohammad ER Bhuiyan、高岸三和、崔 鶴、Sabine Gouraud、山崎寿也、前田正信. 「ラット延髄孤束核における時計出力分子 Prokineticin 2 の血圧調節作用」  
第 101 回近畿生理学談話会 於 吹田市 国立循環器病センター 2008 年 9 月 13 日

[その他]

和歌山県立医科大学・医学部・生理学第二講座 ホームページ：  
<http://www.wakayama-med.ac.jp/dept/igak>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

向阪 彰 (Kohsaka Akira)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：00458051

### (2) 研究分担者

該当者なし

### (3) 連携研究者

該当者なし

### (4) 研究協力者

前田正信 (Maeda Masanobu)  
和歌山県立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80181593  
和気秀文 (Waki Hidefumi)  
和歌山県立医科大学・医学部・講師  
研究者番号：50274957  
崔 鶴 (Cui He)  
和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員  
研究者番号：50551371  
モハマド ブイア (Mohammad Bhuiyan)  
和歌山県立医科大学・医学部・大学院生  
研究者番号：なし