

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08236

研究課題名（和文）概日リズムによるMR活性化と高血圧発症機構の解明

研究課題名（英文）Defining the impact of the circadian MR activation on hypertension

研究代表者

横田 健一（Kenichi, Yokota）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・講師（非常勤）

研究者番号：50424156

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：生体の概日リズムが血圧調節や高血圧発症に関わることはよく知られているが、そのメカニズムについてはなお不明な点が多い。本研究では、MR活性化の振動の高血圧への関与を検討した。野生型マウスでは腎臓、大腸とも、時計遺伝子は頑健に24時間周期で振動していたほか、MRの標的遺伝子にも振動が見られた。大腸上皮細胞では腸管特異的MR欠損により、MR遺伝子発現が低下するとともに、MR標的遺伝子の発現低下や振幅の減弱が観察された。大腸上皮細胞では腸管特異的Bmal1欠損により、Bmal1遺伝子発現が低下するとともに、Bmal1標的遺伝子の発現低下や振幅の減弱が遺伝子、タンパク質ともに観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血圧は日中に高く、夜間に低下するが、時計遺伝子Cry1,2欠損マウスは血圧やアルドステロンの日内リズムが消失し、塩分感受性高血圧を呈することが示されている。これらの報告より、塩分摂取のタイミングにより、腸管における塩分吸収や尿中ナトリウム排泄の日内変動を介して、血圧への影響が異なる可能性が考えられる。高食塩食、低食塩食の時間制限食の実験から、non-dipper型の高血圧の一因を明らかにするとともに、塩分摂取量や塩分摂取のタイミングが大腸や腎臓、血圧の日内変動へ与える影響を明らかにすることで、塩分摂取が与える血圧への影響をより詳細に理解し、高血圧の病態理解や食事療法に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：The mechanisms by which organismal circadian rhythms govern blood pressure regulation and relate to hypertension are not fully understood. This study investigated how rhythmic activation of the mineralocorticoid receptor (MR) engages in hypertension. The circadian clock as well as the MR-target genes oscillated with a 24-hour period in the kidney and colon of the wild-type mice. The gut-specific MR ablation reduced the expression and amplitude of MR-target genes in the intestinal epithelial cells in the colon. On the other hand, the gut-specific Bmal1 deletion decreased the expression and amplitude of Bmal1-target genes in the intestinal epithelial cells in the colon.

研究分野：内分泌内科

キーワード：アルドステロン MR 概日リズム

## 1. 研究開始当初の背景

近年、先進国成人人口の4人に1人までもが高血圧症に罹患していると報告されているが、高血圧症発症のメカニズムは十分に解明されていない。MRは腎尿管や大腸上皮細胞に発現し、アルドステロンにより活性化されると上皮性ナトリウムチャネル(ENaC)やSGK-1などの標的遺伝子の発現促進を介して腎尿管でのナトリウム再吸収や大腸上皮細胞でのナトリウム吸収を促進し血圧を上昇させるリガンド依存性の核内受容体型転写因子である。MR活性化は高血圧発症に重要な役割を果たすのみならず、RALES研究やEPHESUS研究などの近年の研究から心不全や心血管疾患などの病態生理にも重要な役割を担うことが明らかとなり、分子メカニズム解明の重要性は増しているが、その詳細についてはなお不明の点が多い。そこで、我々はMRの新規標的遺伝子を探索する目的で、野生型マウスにアルドステロンないしvehicle投与を行い、得られた腎組織からmRNAを回収し、マイクロアレイ解析を行った。その結果、大変興味深いことに、アルドステロン投与群ではvehicle群と比較して時計遺伝子Per1~3、Bmal1など複数の遺伝子で有意な変動を認めた。

哺乳類では複数の遺伝子群の制御からなる概日リズムという精巧なシステムにより起床、摂食や睡眠などの行動が約24時間周期で時間的に規定されている。そして概日リズムの乱れは単に時差ボケなどによる疲労感のみならず、高血圧や糖尿病、喘息、冠攣縮性狭心症など多くの疾患発症と関わることが知られている。概日リズム制御機能の中心的役割を果たすコアグループといわれる機構は遺伝子発現のリズムを24時間で形成しており、それらはBMAL1とCLOCK、PER、CRYの4つの因子から構成されている。また、インターロッキンググループはコアグループ遺伝子の作用発現の調整を行っており、代表的なものとしてREV/ERB、ROR、DBP、E4BP4遺伝子がある。これまでの多くの疫学研究の結果から、昼夜交代勤務者に高血圧罹患率が高いことが知られている。そして概日リズム異常による高血圧発症の分子メカニズムについては、Bmal1やClock、Cryなどの時計遺伝子異常と関連することが示唆されており、Cryノックアウトマウスで副腎球状層から過剰アルドステロン産生を生じ、食塩感受性高血圧と夜間高血圧を呈することが報告されている<sup>1)</sup>。さらに心筋細胞を用いたvitroの研究から、MR活性化がPerやBmal1の発現調節を介して概日リズムを調節することが報告されている<sup>2)</sup>。また、副腎球状層でのアルドステロンの産生はレニンとACTHによって制御されるが、日内変動を示すACTHに連動してアルドステロンも日内変動パターンを示す。従ってMR活性化も常時一定ではなく日内変動を示すことが予想される。これらの事実から、時計遺伝子群が血圧調節にも重要な役割を果たしており、その一部にアルドステロン-MRの活性化が関与している事が示唆されるが、MR活性化自身の振動について解析した先行研究はこれまで存在せず、MRと時計遺伝子の振動間のクロストークが存在するのかなどについても未知のままである。

## 2. 研究の目的

本研究では、MR活性化が生み出す概日リズムおよび時計遺伝子との振動間のクロストーク、MR活性化振動がどのような環境要因(いつ塩分摂取をするのか)によって調節されるのか、MR活性化の振動は高血圧にどのように関与するのか、を問いとする。高血圧発症において、本研究のようなMRそのものの時間的活性化機構と概日リズムのクロストークに着目した研究の試みはほとんど報告がなく独創的である。臨床においても、本研究により原発性アルドステロン症などMR活性化時における高血圧発症に概日リズム異常が果たす役割や、反対に概日リズム異常による高血圧においてMR活性化が及ぼす役割についての詳細が解明されれば、概日リズム障害による高血圧治療におけるMR拮抗薬の有効性や、1日24時間のうち適切な食塩摂取時刻の解明などにも繋がり、心血管疾患の撲滅に繋がる研究と考えられる。

## 3. 研究の方法

まずMR自身の活性化における概日リズムの存在を明らかにするために野生型マウスにおいて通常条件下の飼育、および明期のみ、暗期のみ飼育を行い、MRやMR標的遺伝子のmRNA定量や蛋白定量を行う。次に、MR活性化と概日リズムのクロストークに関わる遺伝子を明らかにするためにMR活性化と概日リズムのクロストークに関わる遺伝子を明らかにするためにKsp-1-CreマウスとMR floxマウスを交配させ腎尿管特異的MRノックアウトマウスを作成したが、腎臓の一部の細胞でのみMRが欠損しているためか、腎臓組織におけるMRの十分な欠損を確認することが出来ず、研究の目的を評価するモデル動物として使用することが困難と考え、Villin-CreマウスとMR floxマウスを交配させ腸管上皮特異的MRノックアウトマウスを作成し、各種概日リズム遺伝子やMR標的遺伝子の発現量を遺伝子、タンパク質レベルで解析した。また、血漿中のアルドステロン、コルチコステロンの日内変動もELISAで測定を行った。

## 4. 研究成果

### 4.1 大腸におけるMRおよび標的遺伝子の概日発現リズムの検討

副腎皮質からのアルドステロン分泌には概日リズムが存在するが、大腸 MR の発現および活性が概日リズムを示すか、明らかになっていない。そこで、8~12 週齢の雄腸管特異的 MR 欠損マウス、及び雄対照群マウスの大腸組織を 4 時間毎 24 時間 (ZT0, 4, 8, 12, 16, 20, ZT: Zeitgeber Time, ZT0 は明期の始まり、ZT12 は暗期の始まり) にわたり採取する。血清中のアルドステロン濃度を測定するとともに、大腸より RNA、タンパク質を抽出し、MR のタンパク質発現をウェスタンブロット法で解析するとともに、MR 標的遺伝子発現の概日リズムを Real-time qPCR にて検討した。大腸に時計遺伝子が発現し、肝臓などの他臓器と同様の位相で概日リズムがあることが分かった (図 1)。また、MR の標的遺伝子発現や血清中のアルドステロン濃度やコルチコステロン濃度にも日内変動が見られたが、MR タンパク質発現の日内変動は観察されなかった (図 1)。

・野生型雄マウスより、6 time point 大腸上皮細胞を単離し、qPCR、WBを行った。

また血漿アルドステロン、コルチコステロンをELISAで測定した。

< IEC : 時計遺伝子、MR 標的遺伝子 > ※Data are ±SE

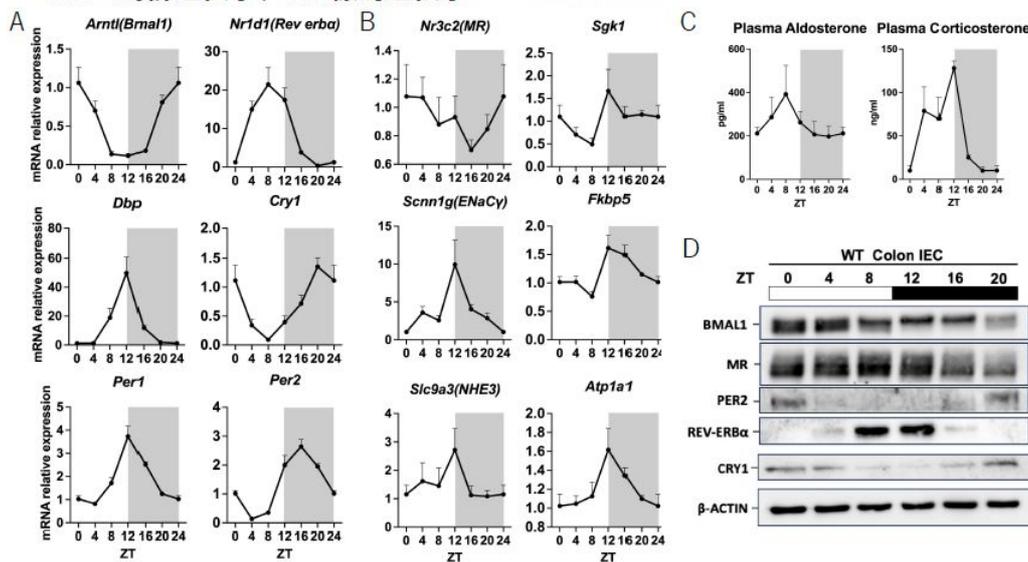


図 1

#### 4.2 大腸における MR による概日遺伝子発現リズムの検討

上記の検討より、MR 標的遺伝子に概日発現リズムが存在する可能性が示唆されたが、塩分吸収に関わる遺伝子の概日リズムが MR によってどのように制御されているのかを検討するため、8~12 週齢の雄腸管特異的 MR 欠損マウス、ならびに雄対照群マウスの大腸組織、血清を 4 時間毎 24 時間 (ZT0, 4, 8, 12, 16, 20) にわたり採取した。腸管特異的 MR 欠損マウスでは時計遺伝子発現の変化はほとんど見られなかったが、Sgk1、Fkbp5、Enac などの、MR 標的遺伝子発現のリズムが消失あるいは減弱していたことから、MR 活性に日内変動がある可能性が示唆された (図 2)。

・腸管上皮特異的 MR KO (MR flox/flox-Villin-Cre; IEC-MR KO)、MR flox/flox マウス (8-12 週齢 ♂)

を 6 time point n=4 で解剖し、大腸上皮細胞 (IEC) を単離して、qPCR、WB を行った。

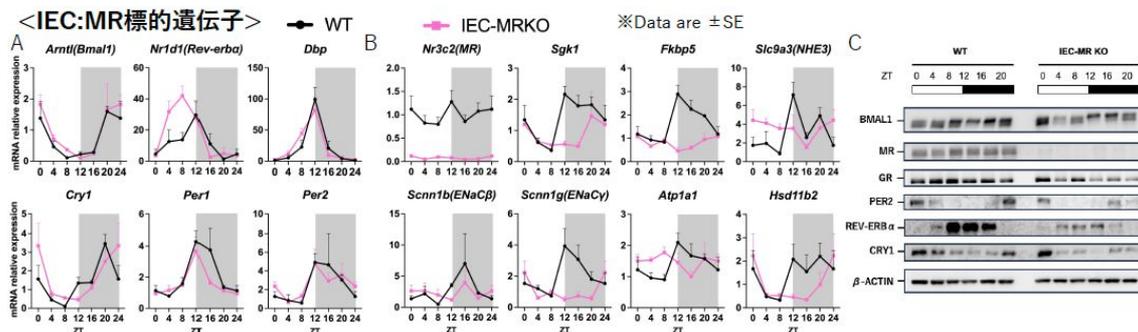


図 2

#### 引用文献

- 1 Doi, M. *et al.* Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. *Nature medicine* **16**, 67-74, doi:10.1038/nm.2061 (2010).

- 2 Tanaka, K. *et al.* Aldosterone induces circadian gene expression of clock genes in H9c2 cardiomyoblasts. *Heart Vessels* **22**, 254-260, doi:10.1007/s00380-006-0968-3 (2007).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yokota Kenichi, Shibata Hirotaka, Kurihara Isao, Itoh Hiroshi, Sone Masakatsu	4. 巻 46
2. 論文標題 CASZ1: a promising factor modulating aldosterone biosynthesis and mineralocorticoid receptor activity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 417 ~ 420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-022-01131-8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Jo Rie, Shibata Hirotaka, Kurihara Isao, Yokota Kenichi, Kobayashi Sakiko, Murai-Takeda Ayano, Mitsuishi Yuko, Hayashi Takeshi, Nakamura Toshifumi, Itoh Hiroshi	4. 巻 46
2. 論文標題 Mechanisms of mineralocorticoid receptor-associated hypertension in diabetes mellitus: the role of O-GlcNAc modification	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 19 ~ 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-022-01036-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kohata Nao, Kurihara Isao, Yokota Kenichi, Kobayashi Sakiko, Murai-Takeda Ayano, Mitsuishi Yuko, Nakamura Toshifumi, Morisaki Mitsuha, Kozuma Takahide, Torimitsu Takuto, Kawai Miki, Itoh Hiroshi	4. 巻 45
2. 論文標題 Lysine-specific demethylase 1 as a corepressor of mineralocorticoid receptor	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Hypertension Research	6. 最初と最後の頁 641 ~ 649
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41440-022-00859-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yokota Kenichi, Kurihara Isao, Nakamura Toshifumi, Nakatsuka Seishi, Miyashita Kazutoshi, Kobayashi Sakiko, Murai-Takeda Ayano, Sone Masakatsu, Itoh Hiroshi	4. 巻 61
2. 論文標題 Remission of Angiographically Confirmed Minocycline-induced Renal Polyarteritis Nodosa: A Case Report and Literature Review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Internal Medicine	6. 最初と最後の頁 103 ~ 110
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2169/internalmedicine.7340-21	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------