

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460316

研究課題名(和文) 時計遺伝子Bmal1ノックアウトマウスを用いた慢性心不全発症メカニズムの解明

研究課題名(英文) The circadian clock maintains cardiac function by regulating mitochondrial metabolism in mice

研究代表者

向阪 彰 (Kohsaka, Akira)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00458051

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：慢性心不全は、その病態について多くの研究がなされてきたが、発症メカニズムについて十分に理解されているとは言えない。本研究では、今までの研究とは異なった視点から心不全発症のメカニズムを解明するために時計遺伝子Bmal1と心機能の関係について調べた。その結果、Bmal1は心筋細胞のミトコンドリア機能にとって必須であり、Bmal1の機能異常はミトコンドリア機能の低下を引き起こして心不全を発症させることが明らかになった。本研究の成果により、心不全について、時計遺伝子という新しい視点からの病態解明への発展が期待される。

研究成果の概要(英文)：Dysfunction of the circadian system has been shown to induce a malfunction of many organs including the heart. However, little is known about how the circadian clock regulates heart function. In the present study, we found that a heart-specific knockout of Bmal1, a core circadian clock gene, leads to age-dependent cardiomyopathy in mice. DNA microarray analysis revealed that expression levels of genes controlling energy metabolism such as mitochondrial biogenesis and ATP production are altered in the heart tissue of knockout animals. In addition, both function and morphology of mitochondria in cardiomyocytes are disrupted in heart-specific Bmal1 knockout mice. Together, our results indicate that the circadian clock in the heart plays an important role in regulating mitochondrial energetics, and thereby maintains heart function in mammals.

研究分野：循環生理学、時間生物学、内分泌代謝学

キーワード：心不全 時計遺伝子 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

心不全死は、人口の高齢化に伴い増加傾向にあり、その病態を分子レベルで解明することは喫緊の課題と言える。慢性心不全の発症メカニズムは、さまざまな角度から研究がなされており、アポトーシス、血管新生、心筋カルシウム調節、慢性炎症等多くの因子の関与が報告されてきた。しかしながら、慢性心不全の病態解明は未だ十分とは言えず、治療に結びつくような新たな視点からの研究が望まれてきた。

近年、生体リズムの異常が心臓を含めたさまざまな臓器の機能障害を引き起こすことが報告されるようになった。しかしながら、生体リズム、あるいはそれを支配する体内時計が、臓器の生理機能とどのように結びついているのかは現時点でも不明な点が多い。時計遺伝子と心機能との結びつきについても同様で、研究開始当初、時計遺伝子の異常が心機能の低下を引き起こすことは報告され始めていたが、その分子メカニズムは全く明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、心不全発症の分子メカニズムをこれまでとは違った角度で研究するために“時計遺伝子の機能異常と心不全発症の関わり”を探索した。とくに、心臓特異的な時計遺伝子 *Bmal1* ノックアウト (*H-Bmal1*^{-/-}) マウスを用いることで、慢性心不全発症に関わる新規の分子メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

(実験動物について)

以下の実験(1)と(2)では *H-Bmal1*^{-/-} マウス、そして実験(3)では C57BL/6J マウスを用いた。*H-Bmal1*^{-/-} マウスは、米国ジャクソン研究所より購入した心臓特異的に Cre recombinase を発現するマウスおよび floxed *Bmal1* マウスを交配して作成した。コントロールマウス(対照群)には、floxed *Bmal1* をもつが Cre recombinase は発現していないものを用いた。実験には、特に断りがなければ自由摂食・自由飲水および12時間毎の明暗周期下で飼育した12週齢のオスのマウスを使用した。また、すべての動物実験は「和歌山県立医科大学における動物実験等の実施に関する規定」を遵守して行った。

(1) *H-Bmal1*^{-/-} マウスの心臓の表現型解析

(1)- 心臓の肉眼的・組織学的観察

まず、*H-Bmal1*^{-/-} マウスの心臓の形態学的評価のために、肉眼的観察、そして HE 染色による心臓組織切片の観察を行った。また、体重と心臓重量の測定も行い、

心臓重量/体重比の算出も行った。

(1)- 心機能解析

形態学的評価のつぎに、超音波画像診断装置を用いて *H-Bmal1*^{-/-} マウスの心機能解析を行った。心機能は、左室内径短縮率(FS)の評価により行った。また、心臓における心不全マーカー(*ANP* および *BNP*)の遺伝子発現レベルも定量 PCR にて解析した。

(1)- 遺伝子発現の網羅的解析

H-Bmal1^{-/-} マウスの心臓における形態学的そして機能的な異常の原因を調べるために、心臓における遺伝子発現レベルをマイクロアレイ解析によって網羅的に調べた。

(2) *H-Bmal1*^{-/-} マウスの心筋ミトコンドリアの形態学的評価および機能解析

(2)- ミトコンドリアの形態観察

H-Bmal1^{-/-} マウスの心筋ミトコンドリアの形態学的評価を行うために、電子顕微鏡による心筋細胞の観察を行った。

(2)- 心筋ミトコンドリアの機能解析

心筋ミトコンドリア機能の評価は、ミトコンドリアの電子伝達系に存在する複合体 I および IV の酵素活性を測定することで行った。また、心臓組織の NAD および NADH の含有量も併せて測定した。

(3) 明暗周期を乱して飼育した C57BL/6J マウスの心機能および心筋ミトコンドリア機能解析

ここでは、C57BL/6J マウスを使用したが、明暗周期の乱れに伴う心機能の変化を顕在化させるためにマウスに軽度の心不全を引き起こした状態で実験を行った。軽度の心不全は、マウスの皮下に浸透圧ポンプを埋め込んで phenylephrine (PE) を持続投与(30 mg/kg/day) することで惹起した。

明暗周期を乱す方法として、12時間毎の明暗周期を3日毎に逆転させて、これを18日間継続した。

(3)- 心機能解析

実験(1) - と同様に、FS を求めることで心機能の評価を行った。

(3)- 心筋ミトコンドリアの機能解析

実験(2) - と同様の方法で行った。

4. 研究成果

(1) *Bmal1* 遺伝子の機能異常は心機能の低下を引き起こす

肉眼的な観察により、12週齢の *H-Bmal1*^{-/-} マウスにおいて心臓サイズの増大を認めた。心臓重量および心臓重量/体重比についても、コントロールマウスに比べて *H-Bmal1*^{-/-} マウスで有意な増加を認めた。HE染色による組織学的な検討の結果、*H-Bmal1*^{-/-} マウスの心臓のサイズおよび重量の増加は、心室壁の肥厚に伴うものであることが分かった。

超音波画像診断装置を用いた心機能解析では、*H-Bmal1*^{-/-} マウスのFSはコントロールマウスに比べて有意に低下しており、*H-Bmal1*^{-/-} マウスの心機能が低下していることが示唆された。これを裏付けるように、*H-Bmal1*^{-/-} マウスの心臓におけるANPおよびBNP遺伝子の発現レベルは有意に上昇していた。

H-Bmal1^{-/-} マウスでみられた心臓の形態学および機能的異常の原因を検索するために、心臓における遺伝子発現レベルをDNAマイクロアレイを用いて網羅的に解析した。興味深いことに、*H-Bmal1*^{-/-} マウスの心臓では、多くの遺伝子の発現レベルに変化が認められたが、それらの中でもとくにエネルギー代謝に関連した遺伝子において変化が著明であった。

(2) 心臓の *Bmal1* 遺伝子は心筋ミトコンドリアの機能維持に必須である

マイクロアレイの結果により、*H-Bmal1*^{-/-} マウスの心臓ではエネルギー代謝異常が起きている可能性が示唆されたことから、エネルギー代謝を担う細胞内小器官ミトコンドリアの形態学的観察そして機能解析を行った。電子顕微鏡を用いた形態学的な評価の結果、*H-Bmal1*^{-/-} マウスの心筋細胞内のミトコンドリアはコントロールマウスに比べて数が著明に減少していることが分かった。さらに、コントロールマウスの心筋細胞内のミトコンドリアのサイズが比較的均等なのに対して、*H-Bmal1*^{-/-} マウスのミトコンドリアでは大小不同が認められた。

ミトコンドリア機能については、電子伝達系内の複合体IおよびIVの酵素活性を測定することで評価したが、*H-Bmal1*^{-/-} マウスの心臓では複合体IとIVの両方の酵素活性の有意な低下を認めた。さらに、心臓組織中のNADとNADH含有量を測定したが、*H-Bmal1*^{-/-} マウスの心臓組織における含有量はNAD、NADHともに有意に低下していることが分かった。

(3) 生体リズムの乱れは心機能および心筋ミトコンドリア機能を低下させる

遺伝子改変動物 (*H-Bmal1*^{-/-} マウス) を用

いた実験にて、体内時計の異常が心機能および心筋ミトコンドリア機能の低下を引き起こすことが明らかになった。そこで、環境変化に伴う体内時計の異常でも *H-Bmal1*^{-/-} マウスでみられたような心機能の変化が見られるのかを調べた。PEの持続投与により軽い心不全を起こした C57BL/6J マウスを一定の明暗周期、あるいは明暗周期を3日毎に逆転させて飼育したところ、明暗周期逆転群では、超音波画像診断装置による心機能解析にてFSの有意な低下を認めた。さらに、明暗周期の乱れが心筋ミトコンドリアの機能に影響を与えるのかどうかを調べるために、心臓組織の複合体IおよびIVの酵素活性を解析した。複合体IVの酵素活性には明暗周期一定群と逆転群の間に差は認められなかった。しかしながら、複合体Iの酵素活性は、明暗周期逆転群において有意に低下していた。

本研究の成果を要約すると以下のようになる。心臓における時計遺伝子 *Bmal1* の欠損は、心筋ミトコンドリア機能および心機能の低下を引き起こす。このことから、*Bmal1* はミトコンドリア機能維持に必須であり、*Bmal1* 機能の異常は、心筋のミトコンドリア機能を障害することで心不全を引き起こしているのではないかと考えられた。また、明暗周期の変化という環境要因による体内時計の異常によっても、心臓のミトコンドリア機能や心機能は影響を受けることも示唆された。

本研究の成果により、規則正しい生活を送り体内時計の機能を正常に保つことは、心臓のミトコンドリア機能維持に重要であり、逆に、生活リズムの乱れは、ミトコンドリア機能を障害することで心機能を悪化させる可能性があるのではないかと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Kohsaka A, Das P, Hashimoto I, Nakao T, Deguchi Y, Gouraud SS, Waki H, Muragaki Y, Maeda M. The circadian clock maintains cardiac function by regulating mitochondrial metabolism in mice.

PLoS One (査読有) 9:e112811, 2014.

DOI: 10.1371/journal.pone.0112811

〔学会発表〕(計15件)

向阪 彰、前田正信. 「体内時計と心筋ミトコンドリア機能」 シンポジウム「概日リズム研究におけるトランスレーショナル・リサーチ」 第93回日本生理学会大会. 於 札幌市 札幌コンベンションセンター 2016年3月22日~24日

中尾友美、向阪 彰、大塚剛司、レイ フォエ、前田正信。「心臓特異的な *Bmal1* 遺伝子の機能欠損と糖代謝調節の関係」第 93 回日本生理学会大会。於 札幌市 札幌コンベンションセンター 2016 年 3 月 22 日～24 日

Kohsaka A, Nakao T, Otsuka T, Le HT, Maeda M. 「Effects of heart-specific disruption of the circadian clock on systemic glucose metabolism in mice」8th FAOPS congress, Bangkok, Thailand, November 22-25, 2015

向阪 彰、中尾友美、大塚剛司、レイ フォエ、前田正信。「マウス心筋の体内時計異常はインスリン抵抗性を引き起こす」第 51 回高血圧関連疾患モデル学会学術総会 於 豊中市 千里ライフサイエンスセンター 2015 年 10 月 30 日～31 日

中尾友美、向阪 彰、大塚剛司、レイ フォエ、前田正信。「心臓の分子時計異常が与える全身の糖代謝調節への影響」第 108 回近畿生理学談話会。於 東大阪市 近畿大学東大阪キャンパス 39 号館 2015 年 10 月 24 日

向阪 彰、中尾友美、グホ サビン、和気秀文、前田正信。「心臓の時計遺伝子機能と耐糖能異常の関係」第 88 回日本内分泌学会学術総会。於 東京 ホテルニューオータニ東京 2015 年 4 月 23 日～25 日

中尾友美、向阪 彰、北内真理子、小形光、グホ サビン、和気秀文、前田正信。「心臓の時計遺伝子の機能異常は糖尿病発症に關与する」第 92 回日本生理学会大会。於 神戸市 神戸国際会議場 2015 年 3 月 21 日～23 日

中尾友美、向阪 彰、北内真理子、小形光、グホ サビン、和気秀文、前田正信。「糖尿病発症における心臓の時計遺伝子の関与について」第 107 回近畿生理学談話会。於 神戸市 兵庫医療大学 M 講堂 2014 年 10 月 25 日

向阪 彰、前田正信。「体内時計による心機能制御」第 71 回和歌山内分泌代謝研究会。於 和歌山市市 和歌山県立医科大学 生涯研修・地域医療センター 2014 年 9 月 4 日

向阪 彰、橋本いずみ、ダス パルタ、中尾友美、グホ サビン、和気秀文、村垣泰光、前田正信。「概日時計は心筋ミトコンドリア機能および心機能維持に關与す

る」第 87 回日本内分泌学会学術総会。於 福岡市 福岡国際会議場・福岡サンパレス 2014 年 4 月 24 日～26 日

橋本いずみ、向阪 彰、ダス パルタ、中尾友美、グホ サビン、和気秀文、前田正信。「生体リズムの異常は心筋ミトコンドリア機能を低下させる」第 91 回日本生理学会大会。於 鹿児島市 鹿児島大学 郡元キャンパス 2014 年 3 月 16 日～18 日

向阪 彰、前田正信。「心血管機能調節における生体リズムの重要性」シンポジウム「サーカディアンリズムと栄養学」第 17 回日本病態栄養学会年次学術集会。於 大阪市 大阪国際会議場 2014 年 1 月 11 日～12 日。

橋本いずみ、向阪 彰、ダス パルタ、中尾友美、グホ サビン、和気秀文、村垣泰光、前田正信。「生体リズムの異常が心機能に及ぼす影響の解析」第 106 回近畿生理学談話会。於 橿原市 奈良県立医科大学 基礎医学校舎 1 階 2013 年 11 月 2 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/igakubu/160414/index.html>

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・准教授
研究者番号：00458051

(2) 研究分担者

和気 秀文 (Waki Hidefumi)
順天堂大学・スポーツ健康科学部・准教授
研究者番号：50274957
グホ サビン (Gouraud Sabine)
お茶の水女子大学・理学部・研究員
研究者番号：30453179
大塚 剛司 (Otsuka Tsuyoshi)
和歌山県立医科大学・医学部・学内助教
研究者番号：60760395

(3) 連携研究者

該当者なし