

平成 21 年 5 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590864

研究課題名（和文）メタボリックシンドローム発症・進展における生体リズムの役割解明

研究課題名（英文）Role of circadian rhythm on the development of metabolic syndrome

研究代表者

野中 英美（NONAKA HIDEMI）

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号：80372663

研究成果の概要：

本研究では既存の各種時計遺伝子ノックアウトマウスとともに、哺乳類時計遺伝子の中で最も主要な遺伝子とされる *mPer2* の臓器特異的コンディショナルノックアウトマウスを新たに作製し、末梢時計の役割を解明するとともに、臓器機能や疾患との関係を検索することを目的とした。その結果 *Cry* ダブルノックアウトマウスで、肥満時の血栓形成に関与する PAI-1 発現の日内リズムが消失していることを見だし、生体リズムの異常が心筋梗塞や脳梗塞を引き起こす可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
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：循環器内科学・血管病態学

キーワード：循環器・高血圧、生体時計、生活習慣病

1. 研究開始当初の背景

ほ乳類における生体時計発振の分子メカニズムの解明は急速に進展し、現在当該分野の研究対象は拡大を続け、肥満、発癌などでのトランスレーショナルリサーチを目指した研究が要求される段階に入ったといえる。

近年本邦では生活習慣病および生活習慣病を基盤とする心筋梗塞、脳梗塞、閉塞性動

脈硬化症などの疾患が急増し、高齢化とも相まって大きな社会問題となっている。高脂血症、糖尿病、高血圧、肥満症などの疾患は遺伝的素因に加え、食生活の欧米化と運動不足などの環境因子の変化とともに急速に増加しており、ライフスタイルの多様化により、食事、睡眠などの生活リズムはその発症に大きく関与していると考えられる。

我々はこれまでに生体時計が循環調節に直接関与しうることを示した。これらの結果から、我々は心血管系機能や循環器疾患の発症には時計遺伝子発現が強く関与していることを示してきた。

以上のことから、心血管疾患発症の主要因であるメタボリックシンドローム発症にも生体時計が大きく関与していると考えられ、メタボリックシンドローム発症において生体時計の役割を明らかにすることは、これらの分子メカニズムを明らかにするのみならず、時間を考慮した新しい視点からの病気の予防法、治療に結びつくと考えられる。

2. 研究の目的

生体時計は心血管疾患発症の主要因であるメタボリックシンドローム発症にも大きく関与していると考えられ、メタボリックシンドローム発症において生体時計の役割を明らかにすることは、これらの分子メカニズムを明らかにするのみならず、時間を考慮した新しい視点からの病気の予防法、治療に結びつくと考えられる。そこで、本研究では既存の各種時計遺伝子ノックアウトマウス (mCRY, mPer) とともに、哺乳類時計遺伝子の中で最も主要な遺伝子とされる mPer2 の臓器特異的コンディショナルノックアウトマウスを新たに作製し、末梢時計の役割を解明するとともに、臓器機能や疾患との関係を検索することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 時計振動停止マウスにおける病態解析

Cry1 および Cry2 を同時にノックアウトしたマウス (Cry ダブルノックアウトマウス) では時計の振動が停止していることが明らかにされている。Cry ダブルノックアウトマウスおよびその野生型マウスを恒暗条件、明暗条件の両条件下で飼育し、血中の代謝マーカーの測定や臓器におけるエネルギー代謝に関わる遺伝子発現を調べ、エネルギー代謝異常の有無を調べる。エネルギー代謝を評価するうえで重要な呼吸商や食餌摂取量の測定、またテレメトリーシステムを用いた行動量の測定および体温の 24 時間周期変化の測定等も行った。

(2) Per2 ノックアウトマウスにおける解析

最も主要な時計遺伝子の一つである Per2 はリズム発振のコアを形成する中心的な役割を担っている。またこれまでの報告からも、Per2 は疾患発症において、重要な遺伝子の一つであることが伺える。

そこで我々は Per2 遺伝子欠損マウス (既存) を用いて上記と同様のエネルギー代謝異常の有無を調べたのち、インスリン抵抗性モデルや糖尿病モデルマウスをはじめとした代謝異常モデルマウスや循環器疾患モデルマウスを作製し、循環器及び代謝疾患形成における Per2 の役割を解明した。

(3) 臓器特異的コンディショナルノックアウトマウスの作製

最も主要な時計遺伝子である Per2 の臓器特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製するため、遺伝子の両端に loxP 配列を挿入した Per2 flox/flox マウスの作製を試みた。

4. 研究成果

(1) 時計振動停止マウスにおける病態解析

Cry ダブルノックアウトマウスにおいて、血栓形成に関与する PAI-1 発現の日内リズムが消失していることを見いだした。また PAI-1 はレニン-アンギオテンシン系によって制御されていることが知られており、生体時計とレニン-アンギオテンシン系の関係をアンギオテンシン受容体遺伝子欠損マウスを用いて検討した。その結果、PAI-1 発現の日内リズムの制御は臓器によって異なり、生体時計とレニン-アンギオテンシン系の双方が深く関与していることが明らかとなった。以上より、生体リズムの異常が心筋梗塞や脳梗塞を引き起こす可能性が示唆され、その成果を公表した。

(2) Per2 ノックアウトマウスにおける解析

Per2 はリズム発振のコアを形成する最も重要な時計遺伝子の一つであり、これまでの報告からも、Per2 は疾患発症において、重要な遺伝子の一つであることが伺える。そこで我々は Per2 遺伝子欠損マウス（既存）およびその野生型マウスを恒暗条件、明暗条件の両条件下で飼育し、血中の代謝マーカーの測定や臓器におけるエネルギー代謝に関わる遺伝子発現を調べ、エネルギー代謝異常の有無を調べる。エネルギー代謝を評価するうえ

で重要な呼吸商や食餌摂取量の測定、またテレメトリーシステムを用いた行動量の測定および体温の 24 時間周期変化の測定等を行い、エネルギー代謝異常の有無を調べた。その結果、野生型と Per2 遺伝子欠損マウスの間に明らかな差異を認めず、Per1 遺伝子が Per2 の欠損を代償している可能性を考え、現在検討中である。

(3) 臓器特異的コンディショナルノックアウトマウスの作製

最も主要な時計遺伝子である Per2 の臓器特異的コンディショナルノックアウトマウスを作製するため、遺伝子の両端に loxP 配列を挿入した Per2 flox/flox マウスを作製する。ES 細胞の相同組み換え体を得たのち、blast cyst への導入を行い、Per2 flox/flox マウスを得た。現在、血管内皮特異的 Per2 ノックアウトマウスを作製し各臓器における Per2 遺伝子の役割を解明するとともに、疾患発症に及ぼす影響について検討を行っている。

(4) エネルギー代謝異常が生体時計に及ぼす影響

時計遺伝子及びリズム異常の側面からのみならず、疾患を発症した際の生体時計に及ぼす影響についても検討するため、代謝や循環にかかわる疾患モデルマウスを使用して、リズム異常の有無や時計遺伝子発現について現在検討中である。

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2件)

1. Anggrahini DW, Emoto N, Nakayama K, Widyantoro B, Adiarto S, Iwasa N, Nonaka H, Rikitake Y, Kisanuki YY, Yanagisawa M, Hirata KI. Vascular endothelial cell-derived endothelin-1 mediates vascular inflammation and neointima formation following blood flow cessation. (2009) **Cardiovasc Res.** 82, 143-151.
(査読有)
2. Masuda Y, Emoto N, Nonaka H, Yagita K, Todo T, Okamura H, Yokoyama M, Hirata KI. Role of angiotensin and the clock system in the circadian regulation of plasminogen activator inhibitor-1. (2008) **Kobe J. Med. Sci.** 6, 264-271.
(査読有)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野中 英美 (NONAKA HIDEMI)

神戸大学・大学院医学研究科・医学研究員

研究者番号：80372663

(2) 研究分担者

該当事項なし

(3) 連携研究者

該当事項なし