

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591060

研究課題名(和文)循環器病における時計遺伝子の解析

研究課題名(英文)The role of clock gene in cardiovascular disease

研究代表者

野出 孝一 (Node, Koichi)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：80359950

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)：運動の体内リズムへの作用の検討の為、毛包細胞を使い時計遺伝子活性を測定した。就寝前の過度の運動により、PER3の位相が有意に偏位した。一方、PER3の振幅は有意差がなかった。過剰な夜間の運動がPER3の位相の変化をもたらし、睡眠の質に影響を与えることが示唆された。運動療法がリズム異常による病気の治療になる可能性と、アスリートが体内リズムを正常に維持し、適正な運動効率を保つためには厳格な運動時間のスケジュール管理が必要である。

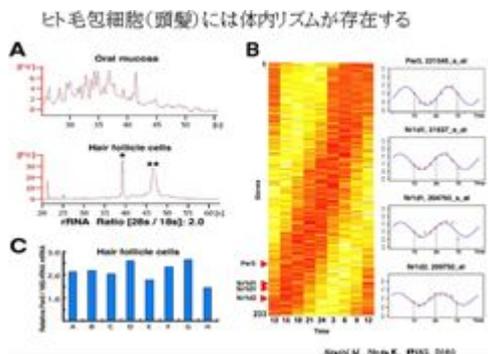
研究成果の概要(英文)：In this research, we measured the clock gene expression in hair follicle cells for the purpose of assessing the effect of exercise on circadian rhythm. Intensive exercise before sleep significantly shifted the phase of PER3. On the other hand, there was no significant difference in the amplitude of the PER3 rhythm. Nighttime excessive exercise results the change of the phase of PER3, and eventually influence the quality of sleep. There is a possibility that exercise therapy could be the treatment for disorders caused by dysrhythmia, and in order to maintain normal circadian rhythm in the body, athletes need to manage the schedule for exercise hours to obtain efficient results from exercise.

研究分野：循環器内科学

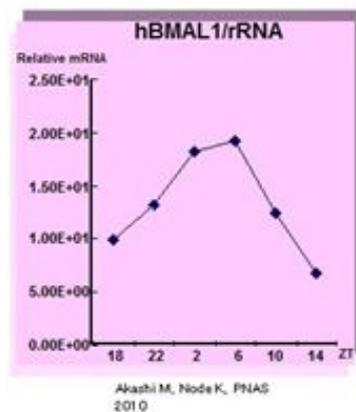
キーワード：時計遺伝子 運動 体内リズム 生活習慣 循環器病

1. 研究開始当初の背景

(1)疫学的に体内時計と生活習慣病との関連が示されているが、その分子メカニズムについての知見は乏しかった。日内変動は体内時計ペースメーカーが生み出すと考えられており、この体内時計は「時計遺伝子」によって制御される。我々は時計遺伝子(PER2)活性調節に MAP キナーゼ (J Neuroscience 2008) やカゼインキナーゼ (CK2) (Science Signaling 2009)によるリン酸化が関与することを明らかにした。また遊離脂肪酸が ROR α を介し時計遺伝子(BMAL-1)の遺伝子発現を誘導することも報告されている(Nat St Biology 2005)。一方で我々は臨床での毛根細胞を用いた時計遺伝子活性測定法も開発し、高血圧や癌発症が多いとされる交代勤務(シフトワーカー)群はデイワーカー群と比較して可逆的な時計遺伝子活性の位相偏位が生じることも明らかにした (PNAS 2010)。



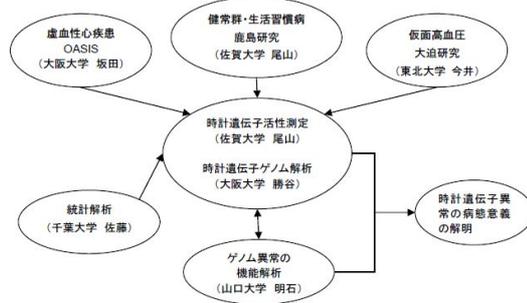
ヒト時計遺伝子の測定システム開発



本研究では上記の時計遺伝子活性測定対象を高年齢者、女性に広げ、性差や加齢による変化、肥満、高血圧、糖尿病等の生活習慣病、睡眠障害群、仮面高血圧や食後高血糖など、日内変動異常、心筋梗塞など種々の疾患における時計遺伝子活性測定と体内時計異常の素因としての時計遺伝子多型解析を行った。

(2)体内時計と高血圧・循環器疾患の因果関係が確立され、これら疾病に対する新しい予防概念が生まれる事が期待される。生活習慣病予防マーカーとして臨床での時計遺伝子発現を検出する簡便システムの構築により、新しい生活習慣病の診断・治療マーカーになると期待される。体内時計は生活習慣の体内

中枢であり、生活習慣そのものを生み出す生体システムであることから時計遺伝子発現を指標に検診しその正常化に努める事は、生活習慣病の初期段階で予防を行う事が可能になる。



2. 研究の目的

生活習慣病の病態や進展・発症に体内リズム異常の関与が示唆されている。本研究では仮面高血圧における血圧変動や心筋梗塞の発症時間における体内時計遺伝子の意義を明らかにするために、各疾患群での時計遺伝子の活性測定や時計遺伝子多型解析を行う。また、時計遺伝子欠損マウスを用い動脈硬化や心不全等の生活習慣病発症解析を行い体内リズム異常と循環器病の関連を検討する。さらに、広く臨床に展開するための低侵襲で簡便な時計遺伝子活性測定法の開発を行う。

3. 研究の方法

健常群、仮面高血圧や心筋梗塞患者等の生活習慣病での時計遺伝子活性測定と一遺伝子多型 (SNP) 解析を行い、生活習慣病・循環器病のリズム異常における時計遺伝子の関与を明らかにする。また臨床の遺伝子解析の検討で明らかにされた遺伝子多型と、生理的活性の関連をプロモーター解析や時計遺伝子 (PER2) 欠損マウスを用いた動脈硬化モデルを作成することで時計遺伝子異常と生活習慣病発症の関連を検討する。

1)時計遺伝子の臨床的検討

時計遺伝子 (PERIOD-1、PERIOD-2、CRYPTOCHROME、BMAL-1、NPAS2、ROR α 、CLOCK) の健常群・高血圧・虚血性心疾患における活性測定とゲノム解析を行う。

大迫研究は、24 時間自動血圧計を用いた血圧の日内変動とその後の予後が解析されているコホート研究である。横断的に採血された 500 名の DNA から上記の時計遺伝子の一塩基多型 (SNP) 解析を行う。早朝高血圧や non-dipper タイプの高血圧は、大血管障害のリスクとして確立していることから血圧の日内リズム異常に時計遺伝子の活性異常とゲノム異常がどのように関与しているかを解析する。一部の症例で時計遺伝子活性測定を行い、ゲノム異常と活性変化との関連も解析する。(研究分担者：今井潤、勝谷)

大阪大学を中心とする関連病院で急性冠症候群を対象とした予後追跡調査である

大阪急性冠症候群研究会 (Osaka Acute Coronary Insufficiency Study:OACIS)が進行している。同研究ではこれまでに男性の心筋梗塞発症は月曜日に、女性の場合は土曜日に多いなど、心筋梗塞とバイオリズムとの関連について報告してきたが、時計遺伝子活性異常と遺伝的背景に関する検討は行われていない。そこで、OACIS 遺伝子データベースを用いて、時計遺伝子多型の一塩基を対象として、時計遺伝子多型の心筋梗塞の発症時間、および再発を含めた予後に対する影響を検討する。(研究分担者：坂田)

来年度より、OASIS 研究に佐賀大学病院も参加する。我々が報告した方法 (PNAS2010) で佐賀大学病院に入院した心筋梗塞患者を対象に 30 例で毛包細胞を用いた上記の時計遺伝子の mRNA の測定を行う(研究分担者：尾山)

鹿島研究では 1000 名弱の住民健診者を対象にコホート研究を行っており、現在 5 年目の心血管イベント発症を解析している。鹿島研究では、通常の検診データに加え、動脈硬化、糖代謝、心不全のバイオマーカー(高分子量アディポネクチン、ペントラキシン 3、NT-PRO BNP 等)を全例測定しており、血液バイオマーカーと生活習慣病発症の関係を解析している。来年度より、同意取得の上、ゲノム解析を行い、時計遺伝子多型と高血圧、糖尿病、脂質異常症の進展、発症との関連の解析を行う。(研究分担者 尾山)

2)時計遺伝子の基礎的検討

A. プロモーター解析 (研究分担者：尾山、研究連携者：明石真)

上記の ~ の検討で明らかになった各時計遺伝子ゲノム多型が生理的な意義を有するか否かを検討するために、以下の実験を実施する。

(1)プロモーター多型：遺伝子発現調節領域であるプロモーターに多型が存在する場合、同遺伝子における転写レベルにおける影響を調べる。プロモーターとレポーター遺伝子を融合したコンストラクトを作成し、細胞に導入後レポーターアッセイを行う。概日リズムにおいて、周期・振幅・位相等を詳細に比較検討するために、プロモーター活性の長期リアルタイムモニタリングを行う。

(2)イントロン多型：多型がイントロンに存在する場合、多型間で表現系が異なる原因として最も考えやすいのは、スプライシングの違いである。まず、多型間でスプライシングバリエーションの発現パターンに変化が生じていないか検討する。違いがあるならば、各バリエーションの産物(タンパク質)間での機能の違いを検討し、個体における表現系発生の機序を予測する。

(3)エキソン多型：エキソン内に多型が存在する場合、その多型が mRNA の配列における違いのみを起すのか、もしくは産物であるタンパク質のアミノ酸配列にも違いをも

たらすものなのか判別する。

B. 時計遺伝子改変マウスを用いた解析(研究分担者：尾山純一)

(1)時計遺伝子(PER2)欠損マウスと LDL 受容体欠損マウスをかけあわせ、コレステロール負荷の条件下で、大動脈の動脈硬化進展度を評価し、対照群と比較し時計遺伝子異常の動脈硬化進展に対する関与を検討する。

(2)PER2 欠損マウスで冠動脈結サツによる心筋梗塞を作成し、対照群と心筋梗塞サイズを比較することで、時計遺伝子の虚血再灌流障害における生理学的意義について検討する。

(3)PER2 欠損マウスで大動脈縮索による心肥大を作成し、縮索後 4 週間後の心筋重量や心エコーによる壁肥厚と心筋収縮能を測定し、対照群と比較し、時計遺伝子異常の圧負荷による心筋肥大、心不全発症における役割について検討する。

4. 研究成果

運動が体内リズムへどう作用するか検討する為に、毛包細胞を使い時計遺伝子活性を測定した。起床時間や食事時間を試験期内は一定にしておき、4 時間おきに毛包細胞の時計遺伝子発現を測定した。

同意を得たボランティアの健常人において、20 時から 22 時までの間に、過度な運動を行った群と行わなかった群を対象にして、4 時間おきに毛包細胞を採取し、PER3、Nr1d2 の三種類の時計遺伝子の mRNA を定量評価した。

就寝前の過度の運動により、運動を行わなかった群に比較し、PER3 の位相の偏位が有意に存在することが明らかとなった。一方、PER3 の振幅は有意差がなかった。

過剰な夜間の運動が PER3 の位相の変化をもたらし、それが体内リズムに影響を与え、睡眠の質に影響を与えることが示唆された。その機序は明らかではないが、二つの可能性が考えられる。一つは運動が体温を上昇させ、時計遺伝子の位相偏位を生じた可能性、二つ目は過度の運動がコーチゾールの分泌を上昇させたことである。

以上の結果より、強力な運動は時計遺伝子発現の位相に影響を与えることが明らかになった。運動療法がリズム異常による病気の治療になる可能性と、アスリートが体内リズムを正常に維持し、適正な運動効率を保つためには厳格な運動時間のスケジュール管理が必要であることが本研究から明らかになった。

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 9 件)

Kadomatsu T, Uragami S, Akashi M,

Tsuchiya Y, Nakajima H, Nakashima Y, Endo M, Miyata K, Terada K, Todo T, Node K, Oike Y. A molecular clock regulates angiopoietin-like protein 2 expression. PLoS One. 8(2):e57921, 2013. doi: 10.1371/journal.pone.0057921. (査読有)

Sakamoto Y, Oyama J, Ikeda H, Kuroki S, Gondo S, Iwamoto T, Uchida Y, Kodama K, Hiwataishi A, Shimomura M, Taguchi I, Inoue T, Node K; S-DOG investigators. Effects of sitagliptin beyond glycemic control: focus on quality of life. Cardiovasc Diabetol. 12:35, 2013. doi: 10.1186/1475-2840-12-35. (査読有)

Kotooka N, Komatsu A, Takahashi H, Nonaka M, Kawaguchi C, Komoda H, Asaka M, Abe S, Taguchi I, Toyoda S, Nishiyama M, Inoue T, Node K. Predictive value of high-molecular weight adiponectin in subjects with a higher risk of the development of metabolic syndrome: from a population based 5-year follow-up data. Int J Cardiol. 167(3):1068-70, 2013. doi: 10.1016/j.ijcard.2012.10.066. (査読有)

Matsumura R, Matsubara C, Node K, Takumi T, Akashi M. Nuclear receptor-mediated cell-autonomous oscillatory expression of the circadian transcription factor, neuronal PAS domain protein 2 (NPAS2). J Biol Chem. 288(51):36548-53, 2013. doi: 10.1074/jbc.M113.517235. (査読有)

Okamoto A, Yamamoto T, Matsumura R, Node K, Akashi M. An out-of-lab trial: a case example for the effect of intensive exercise on rhythms of human clock gene expression. J Circadian Rhythms. 11(1):10, 2013. doi: 10.1186/1740-3391-11-10. (査読有)

Matsumura R, Tsuchiya Y, Tokuda I, Matsuo T, Sato M, Node K, Nishida E, Akashi M. The mammalian circadian clock protein period counteracts cryptochrome in phosphorylation dynamics of circadian locomotor output cycles kaput (CLOCK). J Biol Chem. 289(46):32064-72, 2014. doi: 10.1074/jbc.M114.578278. (査読有)

Sato M, Murakami M, Node K, Matsumura R, Akashi M. The role of the endocrine system in feeding-induced tissue-specific circadian entrainment. Cell Rep. 8(2):393-401, 2014. (査読有)

doi: 10.1016/j.celrep.2014.06.015.

Akashi M, Okamoto A, Tsuchiya Y, Todo T, Nishida E, Node K. A positive role for PERIOD in mammalian circadian gene expression. Cell Rep. 22;7(4):1056-64, 2014. doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.072. (査読有)

Matsumura R, Okamoto A, Node K, Akashi M. Compensation for intracellular environment in expression levels of mammalian circadian clock genes. Sci Rep. 4:4032, 2014. doi: 10.1038/srep04032. (査読有)

〔学会発表〕(計7件)

野出孝一、高血圧と時計遺伝子、日本高血圧学会第1回臨床高血圧フォーラム、2012年5月12日、千里ライフサイエンスセンター(大阪府・豊中市)

野出孝一、心血管不全と体内時計、第12回日本抗加齢医学会総会、2012年6月24日、パシフィコ横浜会議センター(神奈川県・横浜市)

野出孝一、体内時計と心血管疾患、2012年12月2日、全社協・灘尾ホール(東京都・千代田区)

野出孝一、体内時計と生活習慣病治療、第56回日本当脳病学会年次学術集会、2013年5月16日、熊本

野出孝一、体内時計と循環疾患、第61回日本心臓病学会学術集会、2013年9月20日、ホテル日航熊本(熊本県熊本市)

野出孝一、高血圧と時計遺伝子、第21回日本血管生物医学会学術集会、2013年9月28日、千里阪急ホテル(大阪府・豊中市)

野出孝一、Time is Life-体内時計制御でアンチエイジング、脳心血管抗加齢研究会、2014年12月7日、梅田スカイビル(大阪府・大阪市)

〔図書〕(計10件)

江本憲昭、野出孝一、メディカルビュー社、動脈硬化症の新しい診断・治療標の時計遺伝子。2012、149-156.

野出孝一、メディカルビュー社、Heart View 体内リズムと循環器病、2012、6-7. 明石真、野出孝一、メディカルビュー社、Heart View 概日時計の振動原理、2012、39-46.

尾山純一、野出孝一、メディカルビュー社、Heart View 循環器病のバイオマーカー、2012、201-205.

兒玉和久、野出孝一、武田薬品工業、実験治療 現代型不眠と生活習慣病、2012、38-41.

野出孝一、佐藤迪夫、長友大輔、錦戸利幸、尾山純一、日本心臓病学会、日本心臓病学会誌 体内時計と循環器疾患、2013、175-175.

野出孝一、東京医学社、成人病と生活習慣病 バイオリズムと生活習慣病、2013、579-583.

錦戸利幸、野出孝一、医学書院、呼吸と循環 体内時計と心血管疾患、2014、60-66.

加藤徹、野出孝一、科学評論社、時計からみた高齢者循環器疾患、2014、256-263。
錦戸利幸、野出孝一、日本臨床社、高血圧発症にかかわる時計遺伝子の役割、2014、1350-1353。

研究者番号：30398119

(7)連携研究者

佐藤 泰憲 (Sato, Yasunori)

研究者番号：90536723

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

野出 孝一 (NODE, Koichi)

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：80359950

(2)研究分担者

勝谷 友宏 (KATSUYA, Tomohiro)

大阪大学医学系研究科・准教授

研究者番号：30311757

(3) 研究分担者

坂田 泰彦 (SAKATA, Yasuhiko)

大阪大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：90379206

(4) 研究分担者

今井 潤 (IMAI, Yutaka)

東北大学・薬学研究科・教授

研究者番号：40133946

(5) 研究分担者

尾山 純一 (OYAMA, Jun-ichi)

佐賀大学・医学部・寄附講座教授

研究者番号：30359939

(6)連携研究者

明石 真 (AKASHI, Makoto)

山口大学・時間学研究所・教授