



Clock変異マウスの心拍数サーカディアンリズム

大山, 但

(Citation)

神戸大学医学部紀要, 63(3/4):47-54

(Issue Date)

2003-03

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/00317281>



Clock 変異マウスの心拍数サーカディアンリズム

大 山 但

神戸大学大学院医学系研究科 脳科学講座
分子脳科学分野（指導：岡村 均教授）
連絡先：大山 但
科研製薬株式会社・総合研究所薬理研究部
京都市山科区四ノ宮南河原町14番地
TEL：075-594-0787 FAX：075-594-0790

（平成15年1月20日受付）

要 約

CLOCK は時計発振遺伝子が形成するコアフィードバックループの促進因子であり、その遺伝子 *Clock* を変異させると活動量リズムが異常になることが知られている。本研究では、テレメトリー法を用いて *Clock* 変異マウスの心拍数を活動量、体温とともに連続測定し、そのリズム性や日内変動を比較検討した。*Clock* 変異マウスの心拍数サーカディアンリズムは、12時間明：12時間暗の明暗条件に同調していたが、恒常明または恒常暗条件下でフリーランさせると周期が著明に延長した。明暗条件下において、通常のマウスでは明期から暗期への移行期に心拍数が上昇するのに対して、*Clock* 変異マウスでは移行期から約2時間遅れて心拍数が上昇した。このような変動の遅延は、活動量、体温でも同様に認められた。各パラメータ間の相互相関関係から、体温は心拍数から数10分遅れて変化していることがわかった。心拍変動は *Clock* 変異マウスで減少しており、周波数解析では低周波成分、高周波成分ともにそのパワーが野性型と比べて低値を示した。これらの結果から、*Clock* 変異マウスでは自律神経活性が減弱していることが示唆された。

てきた¹⁾。時計遺伝子 *Clock* のクローニング²⁾は、このような研究成果が生まれるきっかけの一つとなった。*Clock* 遺伝子がコードする CLOCK は、BMAL1 と二量体を形成し、時計振動体遺伝子 *mPer1*, *mPer2* の転写を促進することでリズム形成に関与していると考えられている³⁾。この *Clock* 遺伝子を変異させたマウスを恒常暗条件下におくと、活動量リズムが異常になることが報告されている⁴⁾。

心拍数は、活動量や体温と同じくサーカディアンリズムを示す代表的な生理パラメータの一つである^{5, 6)}。心拍数が他の指標と大きく異なるのは、心拍数そのものに加えて心拍数変動も解析対象とすることができる点にある⁷⁾。心拍変動は交感神経活動と副交感神経活動を反映していることから、自律神経機能の評価に心拍変動解析が広く用いられている⁸⁻¹⁰⁾。このように心拍数は有用な生理的指標であるが、*Clock* 変異マウスではこの指標にどのような影響がでているのかまだ検討されていない。

本研究では、テレメトリー法を用いて *Clock* 変異マウスの心拍数、活動量および体温を種々の条件下で連続測定し、そのリズム性や日内変動を比較検討するとともに、心拍変動の解析を試みた。

緒 言

すべての哺乳動物には約24時間を周期とする概日（サーカディアン）リズムがみられる。サーカディアンリズムは視床下部の視交叉上核（suprachiasmatic nucleus；SCN）から発振される内因性（endogenous）のリズムであり、最近の多くの分子レベルでの研究から、その発振原理は時計振動体遺伝子の転写制御によるネガティブオートフィードバックループ機構であることがわかつ

方 法

1) 動物

生後 10-15週齢（体重21-48g）の動物（日本動物）を使用した。*Clock* 変異（ホモ接合体）マウス（n=3）はC57BL/6系を遺伝背景にもつ動物を用い、野性型のC57BL/6系（n=3）を対照動物とした。入荷後から測定まで1日12時間照明（6：00-18：00）の環境下で飼育した。

キーワード： *Clock* 変異マウス、サーカディアンリズム、心拍数、心拍変動、自律神経機能

2) 手術方法

マウスをケタミン (60mg/kg, i.p.) とメドミジン (0.3mg/kg, i.p.) の混合液で麻酔し、腹部を正中切開して心電図、体温、活動量測定用の送信器 Physiotel (TA10ETA-F20, Data Sciences) を腹腔内に埋め込んだ。送信器に付属する2本のステンレス製リード線は心電図第II誘導を得るために皮下に留置した。本送信器の埋め込みはマウスの行動リズムに影響しないことが確かめられている¹¹⁾。手術終了後、アチパメゾール (0.3mg/kg, i.p.) を投与して速やかに覚醒させた。

3) 測定方法

動物を個別収容したケージを受信器 (RPC-1, Data Sciences) の上に載せ、1日12時間照明 (6:00-18:00) の明暗 (LD) サイクルに設定した飼育ボックス内に入れた。飼育ボックスの照明条件は、必要に応じて恒常暗 (DD) または恒常明 (LL) 条件に変更した。手術後10日以上以上の回復期間を置き、データ取得/分析システム (Dataquest A.R.T., Data Sciences) により無麻酔無拘束状態の動物の心電図、体温および活動

量をテレメトリー法で測定した。測定期間中の餌および水は自由に摂取させた。

4) 解析方法

心拍数は1000Hzのサンプリングレートで得られた心電図R波の間隔 (RR間隔) の逆数として算出した。各パラメータは1分毎に計測し、日内変動解析のため30分間の平均値を5日間加算平均した。相互相関関係は、各パラメータの5分間の平均データ (活動量は合計値) 48時間分から求めた。自由継続周期 (フリーラン周期) は、7日間の時系列データからカイ自乗ピロドグラムを用いて95%信頼限界で算出した。

心拍変動の解析には連続心拍を用いた。周波数解析として、心拍数時系列をスプライン補間後100msecごとに再サンプリングすることで等間隔時系列にし、心拍変動解析ソフト (SPECTRUM ANALYSER, バイオテックス) を用いて高速フーリエ変換法 (FFT) によるパワースペクトル解析を行った。低周波成分は0.4-1.5Hzとし、高周波成分は1.5-5Hzとした¹⁰⁾。

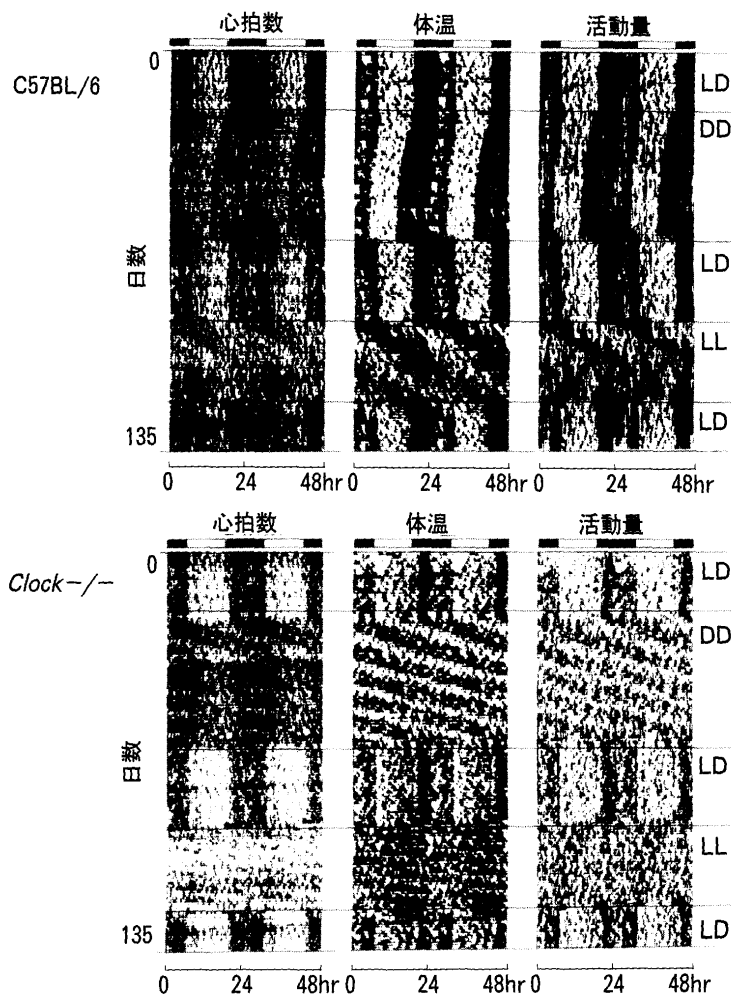


図1

野性型C57BL/6と *Clock* 変異マウスの心拍数、体温および活動量のリズム。LDは明暗条件を示し、白棒は明期を黒棒は暗期を示す。DDは恒常暗条件を、LLは恒常明条件を示す。心拍数は500beats/min以上、体温は36℃以上、活動量は10 counts/min以上のデータをそれぞれ横軸48時間にダブルプロットした。

結 果

1) *Clock* 変異マウスのサーカディアンリズム

図1に心拍数、体温、活動量の変化をダブルプロットで示した。すべてのパラメータにおいて、野性型C57BL/6、*Clock* 変異マウスともに、LDサイクル下で24時間周期のリズムが認められた。DD条件にすると、野性型では心拍数のフリーラン周期が 23.53 ± 0.18 時間と短縮したが、*Clock* 変異マウスでは反対に延長して 27.59 ± 1.58 時間となった。LL条件では、野性型のフリーラン周期が 25.54 ± 1.05 時間とわずかに延長したが、*Clock* 変異マウスは著明に延長して 31.95 ± 1.66 時間になった。体温と活動量でもほぼ同じフリーラン周期を示した。

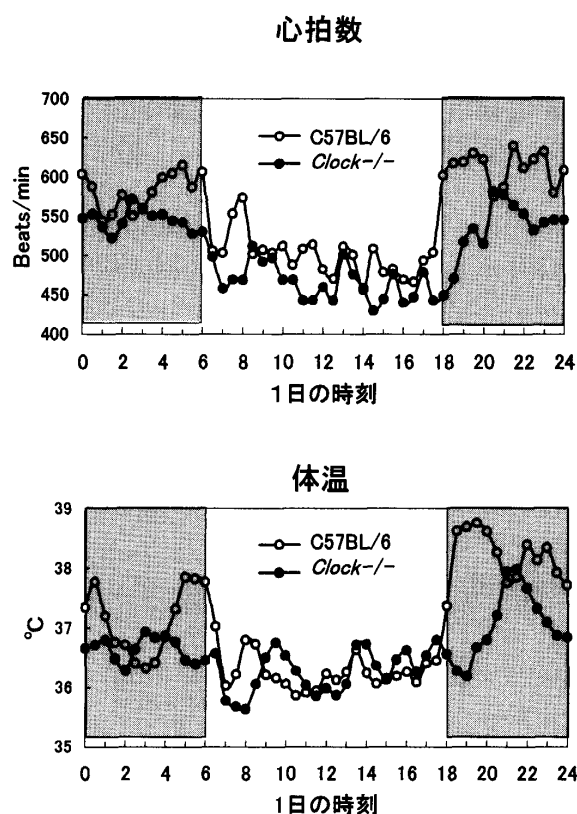


図2

心拍数と体温の日内変動。上段が心拍数、下段が体温で、0時から6時と18時から24時は暗期を、6時から18時は明期を示す。白丸は野性型C57BL/6を、黒丸は*Clock* 変異マウスを示し、30分間の平均値で表した。

2) 心拍数、体温および活動量の日内変動

図2に心拍数と体温の日内変動を代表例で示した。1日平均値は、心拍数（野性型： 527.7 ± 20.9 beats/min, *Clock* 変異マウス： 513.5 ± 14.8 beats/min）、体温（野性型： $36.8 \pm 0.3^\circ\text{C}$, *Clock* 変異マウス： $36.6 \pm 0.2^\circ\text{C}$ ）ともに群間に差はなかったが、変動パターン

に違いが認められた。対照動物の心拍数および体温は、明期から暗期への移行期に増加し、一度低下して暗期末期（3時から6時）に再び増加する二峰性の変化を示した。この二峰性の変化はすでに報告されている現象である^{6, 12)}。一方、*Clock* 変異マウスの心拍数、体温は暗期に入ってもすぐに増加することなく、約2時間遅れて増加し、また暗期の末期には明らかなピークは観察されなかった。図には示していないが、活動量においても同じ変動パターンを認めている。このように今回測定した3つの指標は同様のパターンで日内変動していることがわかった。

次にLD条件下におけるパラメータ間の時間差を調べるため、相互相関関係を求めた（図3）。その結果、対照動物、*Clock* 変異マウスともに体温は心拍数から10–25分遅れて相互相関係数が最大を示した。心拍数・活動量間に時間差はなかった。対照動物および*Clock* 変異マウスにおける体温・心拍数間の時間差はそれぞれ 16.7 ± 2.8 分、 16.7 ± 7.6 分であった。このことから体温は心拍数の変化から数10分遅れて変化していることがわかった。心拍数と体温のずれは、LDサイクルのみならず、DDおよびLL条件下でも同様の傾向を認めた。

3) 心拍変動

1日の全RR間隔をデータ取得システムで自動計測し、その逆数から瞬時心拍数を求めて2時間毎のヒストグラムを作成した（図4）。対照動物では、明期、暗期ともに緩やかなピークを描いたが、*Clock* 変異マウスでは、対照動物と比べて中央値の頻度が高く、変動幅が狭くなっており、心拍数のばらつきが少なくなっていた。

図5に瞬時心拍変動の周波数解析の結果を示した。動物が安静状態にある8時における256データを解析対象とした。副交感神経刺激に対する迅速な心拍応答と交感神経刺激に対する緩徐な応答のため生じる周波数帯の差から、スペクトル解析から得られた高周波成分は副交感神経を、低周波成分は主として交感神経を反映するとされている⁷⁾。図から明らかなように、*Clock* 変異マウスでは、低周波成分、高周波成分ともにパワースペクトル密度が低下しており、対照動物と比べてほぼ10分の1となっていた。

考 察

Clock 変異マウスの心拍数サーカディアンリズムは、LD条件下では24時間明暗サイクルに同調していたが、恒常条件下でフリーランさせると周期が著明に延長し、野性型とは明らかに異なるパターンを示した。この周

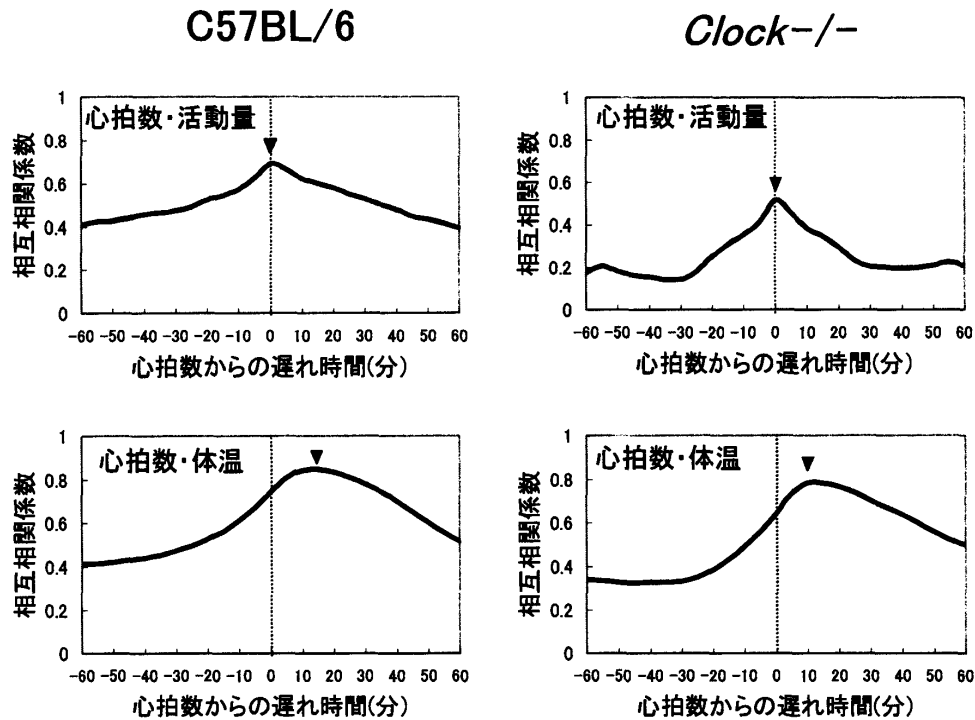


図 3

パラメータ間の相互相関関係。C57BL/6および *Clock* 変異マウスにおける心拍数と活動量（上段）、心拍数と体温（下段）の相互相関を求め、横軸を心拍数からの遅れ時間としてプロットした。矢印は相互相関係数が最大となった時点を示す。

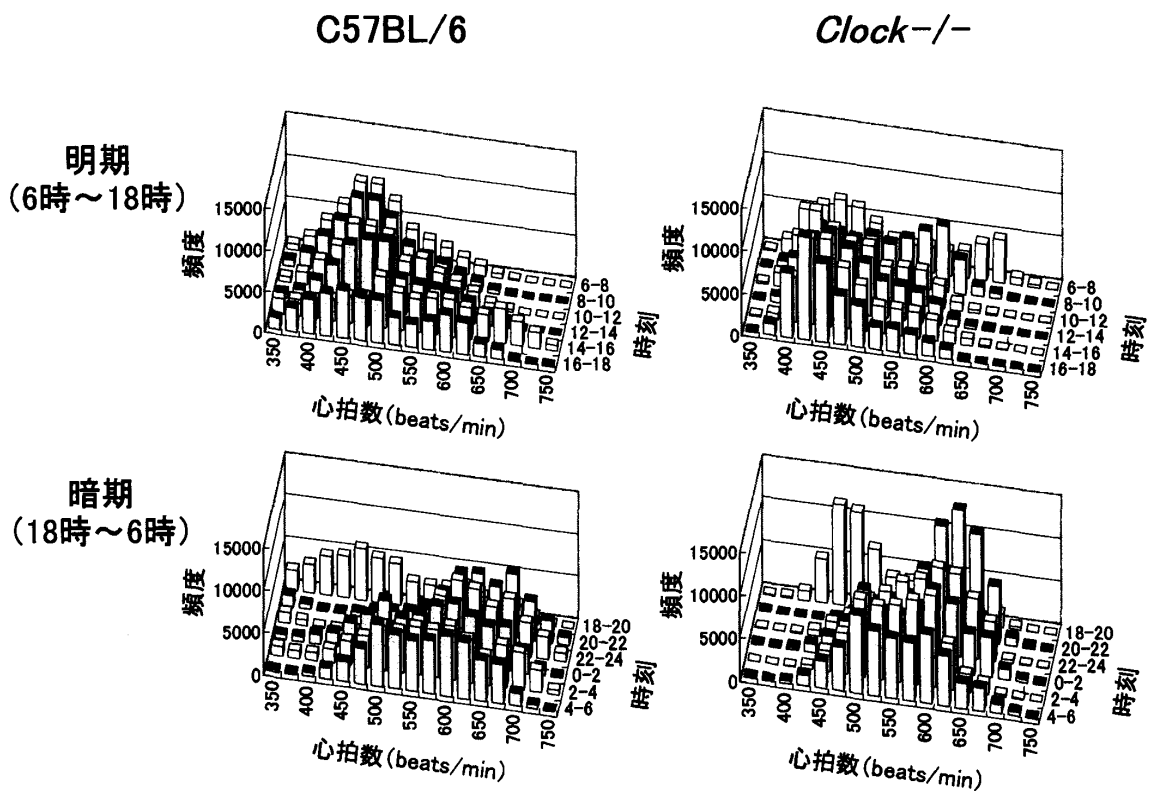


図 4

2 時間毎の心拍数ヒストグラム。C57BL/6および *Clock* 変異マウスの 1 日における全心拍数を 2 時間ごとに区切ってプロットし、さらに明期（上段、6 時から18時）と暗期（下段、18時から6時）に分けて表示した。

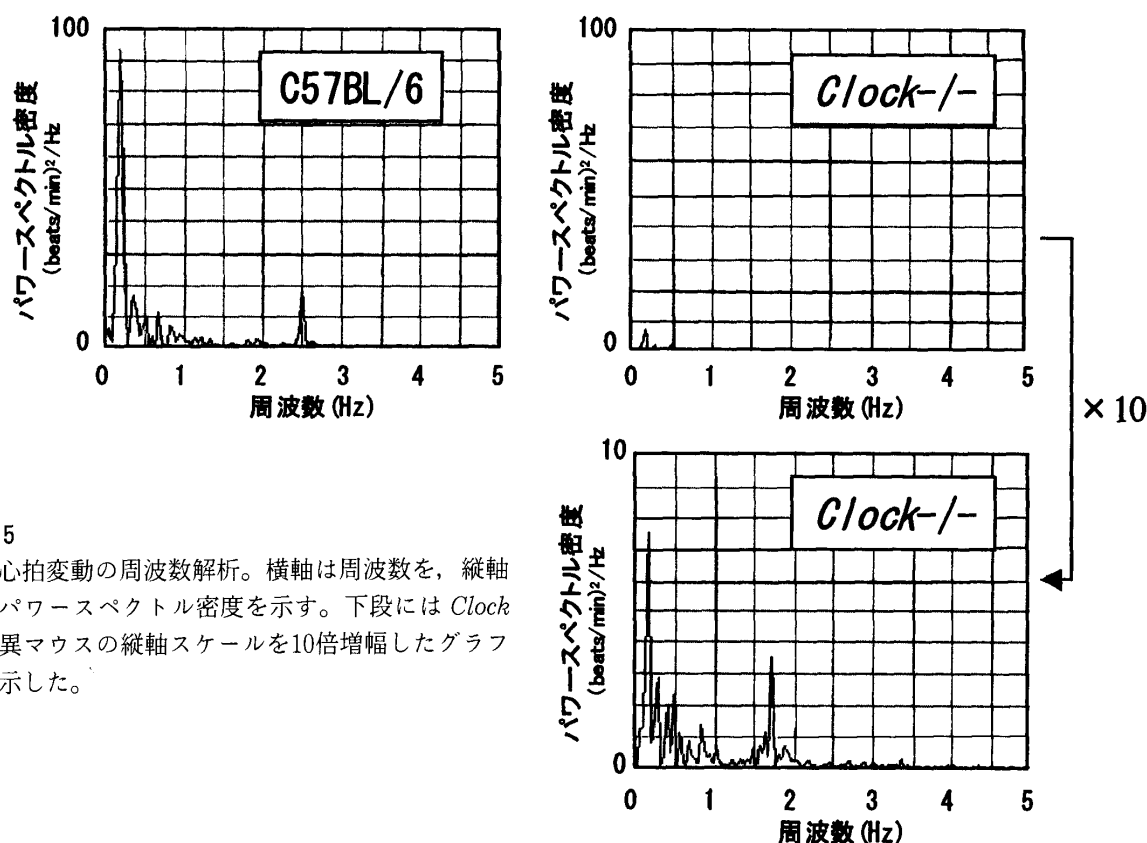


図 5

心拍変動の周波数解析。横軸は周波数を、縦軸はパワースペクトル密度を示す。下段には *Clock* 変異マウスの縦軸スケールを10倍増幅したグラフを示した。

期の延長は体温と活動量でも認められた。*Clock* 遺伝子の変異でサーカディアンリズムは消失することなく、フリーラン周期が延長するというこれらの事実は、*Clock* 遺伝子が時計発振の本体ではなく、制御因子として重要な役割を果たしていることを明白に示している。

正常動物では心拍数、体温、活動量が同調し、正の相関関係を示すことがこれまで報告されており^{13, 14)}、本研究でも同様の結果を得た。今回はさらにパラメータ間の相互相関関係を調べ、体温は心拍数から10–25分遅れて変化しているという興味深い結果を得た。この現象は、野性型のみならず*Clock* 変異マウスにおいても、また恒常条件下でも観察されたことから、マウスの体温サーカディアンリズムは、心拍数および活動量の増加にともなう熱産生による関与が大きいと考えられる。

明暗条件下において、通常のマウスでは明期から暗期への移行期に心拍数が上昇するのに対して、*Clock* 変異マウスでは約2時間遅れて心拍数が上昇した。Sei らも体温と活動量で同様の現象を観察している¹⁵⁾。彼らは同時に測定した睡眠ステージから、通常は暗期の末期に現れる REM 睡眠のピークが、暗期初期に認められることを見出し、*Clock* 変異マウスに睡眠障害が起きていることを指摘している。一方、暗期から明期への移行期の変動は変異マウスと野性型はほぼ同様

であった。これは光刺激による同調能が*Clock* 変異マウスで保存されているため⁴⁾であると考えられる。

Clock 変異マウスの心拍変動は野性型と比べて明らかに減少していた。周波数解析でも低周波成分、高周波成分のパワーともに低値を示した。これらの事実は、*Clock* 変異マウスの自律神経活動に障害が生じていることを示している。最近、SCN は自律神経系ニューロンと密接に連絡を取り合っており¹⁶⁾、室傍核を経由して心臓に影響を与えていることが報告された¹⁷⁾。*Clock* 遺伝子が SCN から自律神経系への出力になんらかの影響を及ぼしているものと考えられる。

Vitaterna らは、*Clock* 変異マウスを DD 条件下におくと、長周期を短期間示した後に無周期になると報告した⁴⁾。同じグループは SCN 神経細胞を培養し、その電気活動リズムをみた実験で、サーカディアンリズム周期が消失することを確認している¹⁸⁾。一方 Nakamura らは、同様の実験系で周期は延長させるが消失はしないとしている¹⁹⁾。今回心拍数等の測定から、周期は延長するもののリズム消失にはいたらないという Nakamura らと同様の結果が得られた。Vitaterna らと異なる結果が得られたことについて、その原因は明らかではないが、観察期間、活動量検出方法、用いたマウスの系統などが関与している可能性が考えられる。いずれにしてもこれらの知見は、*Clock* 変異マウスで認められる心拍数等のリズム異常

が SCN での電気活動リズムの異常に起因することを示している。

今回用いたテレメトリー法は、送信器の埋め込みやすさや処理能力などからこれまでイヌ、サル、ラットで最も多く使われてきた²⁰⁾。近年、送信器の小型化²¹⁾と処理速度の向上により、マウスでも使われるようになり、心拍変動解析^{10, 11)}やサーカディアンリズム観察¹³⁻¹⁵⁾などの研究成果が報告されるようになった。本研究では、テレメトリー法を用いてマウスの心拍変動解析や心拍数、体温、運動量のサーカディアンリズムを評価し、さらに新しい試みとして、パラメータ間の変動時間差を調べるために相互相関関係を求めた。本システムは無麻酔無拘束という生理的な状態で複数のパラメータを同時に、しかも長時間連続して測定できる特長を持つため、生体リズム研究において非常に有用な測定方法であるといえる。

以上、テレメトリー法を用いた検討により、*Clock* 変異マウスの心拍数は恒常条件下でフリーラン周期が延長し、明暗条件下でも明期から暗期への移行時の心拍数増加が遅延するなどのリズム異常を示すことを明らかにした。また *Clock* 変異マウスは心拍変動が減弱していたことから、*Clock* 遺伝子による自律神経系への関与が示唆された。

謝 辞

本研究にあたり、ご指導を賜りました神戸大学大学院脳科学講座分子脳科学分野 岡村 均教授に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 1) Okamura, H., Yamaguchi, S., Yagita, K.: Molecular machinery of the circadian clock in mammals. *Cell. Tissue. Res.* 309 : 47-56, 2002.
- 2) King, D.P., Zhao, Y., Sangoram, A.M., Wilsbacher, L.D., Tanaka, M., Antoch, M.P., Steeves, T.D., Vitaterna, M.H., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., Turek, F.W., Takahashi, J.S.: Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell.* 89 : 641-653, 1997.
- 3) Gekakis, N., Staknis, D., Nguyen, H.B., Davis, F.C., Wilsbacher, L.D., King, D.P., Takahashi, J.S., Weitz, C.J.: Role of the CLOCK protein in the mammalian circadian mechanism. *Science.* 280 : 1564-1569, 1998.
- 4) Vitaterna, M.H., King, D.P., Chang, A.M., Kornhauser, J.M., Lowrey, P.L., McDonald, J.D., Dove, W.F., Pinto, L.H., Turek, F.W., Takahashi, J.S.: Mutagenesis and mapping of a mouse gene, *Clock*, essential for circadian behavior. *Science.* 264 : 719-725, 1994.
- 5) Furuzawa, M., Kuwahara, M., Ishii, K., Iwakura, Y., Tsubone, H.: Diurnal variation of heart rate, locomotor activity, and body temperature in interleukin-1 alpha/beta doubly deficient mice. *Exp. Anim.* 51 : 49-56, 2002.
- 6) Tankersley, C.G., Irizarry, R., Flanders, S., Rabold, R.: Circadian rhythm variation in activity, body temperature, and heart rate between C3H/HeJ and C57BL/6J inbred strains. *J. Appl. Physiol.* 92 : 870-877, 2002.
- 7) Akselrod, S., Gordon, D., Ubel, F.A., Shannon, D.C., Berger, A.C., Cohen, R.J.: Power spectrum analysis of heart rate fluctuation: a quantitative probe of beat-to-beat cardiovascular control. *Science.* 213 : 220-222, 1981.
- 8) van ravenswaaij, Arts, C.M., Kollee, L.A., Hopman, J.C., Stoeltinga, G.B., van Geijn, H.P.: Heart rate variability. *Ann. Intern. Med.* 118 : 436-447, 1993.
- 9) Kuwahara, M., Yagou, K., Ishii, K., Hashimoto, S., Tsubone, H., Sugano, S.: Power spectral analysis of heart rate variability as a new method for assessing autonomic activity in the rat. *J. Electrocardiol.* 27 : 333-337, 1994.
- 10) Gehrmann, J., Hammer, P.E., Maguire, C.T., Wakimoto, H., Friedman, J.K., Berul, C.I.: Phenotypic screening for heart rate variability in the mouse. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 279 : H733-740, 2000.
- 11) Ishii, K., Kuwahara, M., Tsubone, H., Sugano, S.: The telemetric monitoring of heart rate, locomotor activity, and body temperature in mice and voles (*Microtus arvalis*) during ambient temperature changes. *Lab. Anim.* 30 : 7-12, 1996.
- 12) Li, P., Sur, S.H., Mistlberger, R.E., Morris, M.: Circadian blood pressure and heart rate rhythms in mice. *Am. J. Physiol.* 276 : R500-504, 1999.
- 13) Johansson, C., Thoren, P.: The effects of

- triiodothyronine(T3) on heart rate, temperature and ECG measured with telemetry in freely moving mice. *Acta. Physiol. Scand.* 160 : 133–138, 1997.
- 14) Buttner, D., Wollnik, F.: Spontaneous short-term fluctuations in the daily pattern of heart rate, body temperature and locomotor activity in the laboratory rat. *Lab. Anim.* 16 : 319–326, 1982.
 - 15) Sei, H., Oishi, K., Morita, Y., Ishida, N.: Mouse model for morningness/eveningness. *Neuroreport.* 12 : 1461–1464, 2001.
 - 16) Ueyama, T., Krout, K.E., Nguyen, X.V., Karpitskiy, V., Kollert, A., Mettenleiter, T.C., Loewy, A.D.: Suprachiasmatic nucleus: a central autonomic clock. *Nat. Neurosci.* 2 : 1051–1053, 1999.
 - 17) Scheer, F.A., Ter, Horst, G.J., van Der, Vliet, J., Buijs, R.M.: Physiological and anatomic evidence for regulation of the heart by suprachiasmatic nucleus in rats. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 280 : H1391–1399, 2001.
 - 18) Herzog, E.D., Takahashi, J.S., Block, G.D.: Clock controls circadian period in isolated suprachiasmatic nucleus neurons. *Nat. Neurosci.* 1 : 708–713, 1998.
 - 19) Nakamura, W., Honma, S., Shirakawa, T., Honma, K.: Clock mutation lengthens the circadian period without damping rhythms in individual SCN neurons. *Nat. Neurosci.* 5 : 399–400, 2002.
 - 20) Kramer, K., Kinter, L., Brockway, B.P., Voss, H.P., Remie, R., Van, Zutphen, B.L.: The use of radiotelemetry in small laboratory animals: recent advances. *Contemp. Top. Lab. Anim. Sci.* 40 : 8–16, 2001.
 - 21) Kramer, K., van acker, S.A., Voss, H.P., Grimbergen, J.A., van der Vijgh, W.J., Bast, A.: Use of telemetry to record electrocardiogram and heart rate in freely moving mice. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 30 : 209–215, 1993.

Circadian rhythm of heart rate in *Clock* mutant mouse

Tadashi Ohyama

Division of Molecular Brain Science, Department of Brain Sciences,
Kobe University Graduate School of Medicine

CLOCK is a positive factor for driving core feedback loop of the *Clock* genes, and its mutation is known to exhibit abnormal circadian rhythm of locomotor activity. In the present study, we measured a circadian variability of heart rate in *Clock* mutant mice. Heart rate was recorded continuously from *Clock* mutant mice using telemetry system, and the rhythmicity and diurnal variation of heart rate were compared to that of body temperature and locomotor activity. Circadian rhythm of heart rate in *Clock* mutant mice was entrained to 12hr light: 12hr dark (LD) conditions, but under constant light or constant dark conditions the free-running period was severely extended. In the LD conditions, heart rate of wild-type mice began to increase just before the transitional time from light to dark, whereas the increase of heart rate of *Clock* mutant was delayed for 2hr. This delay was also observed in body temperature and locomotor activity. Cross-correlation between parameters demonstrated that phase of body temperature was about 10 min delayed from that of heart rate. A variability of the heart rate decreased in the *Clock* mutant in comparison to the wild type. The frequency analysis of the heart rate has demonstrated that the power in *Clock* mutant was lower in both low frequency and high frequency than that in wild type. These findings suggest that the autonomic nervous activity is suppressed in *Clock* mutant mice.