



Alterations of circadian expressions of clock genes in Dahl salt-sensitive rats fed a high-salt diet

毛利, 貴生

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2003-09-30

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲2905

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1002905>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



【 78 】

氏 名・(本 籍) 毛利 貴生 (兵庫県)
博士の専攻分野の名称 博士 (医学)
学 位 記 番 号 博い第1538号
学位授与の 要 件 学位規則第4条第1項該当
学位授与の 日 付 平成15年9月30日

【 学位論文題目 】

Alterations of Circadian Expressions of Clock Genes in
Dahl Salt-Sensitive Rats Fed A High-Salt Diet
(高食塩食を負荷されたダール食塩感受性ラットにおける
時計遺伝子の概日性発現の変化)

審 査 委 員

主 査 教 授 横山 光宏
教 授 岡村 均
教 授 秋田 穂束

(緒言)

哺乳類の持つ行動や生理現象の約 24 時間周期のリズム (サーカディアンリズム) は、体内時計の働きによって作られている。これまでに哺乳類において *mPer1*, *mPer2*, *mPer3*, *mCry1*, *mCry2*, *Clock*, *Bmal1* といった遺伝子が単離されている。時計発振の分子的基盤として時計遺伝子群のフィードバックループが根底に存在していることが明らかにされている。*dbp* のような時計関連遺伝子も同様のフィードバックループによって制御されている。

体内時計は脳視床下部の視交叉上核 (SCN) に存在するが、最近になって末梢組織にも時計が存在することが明らかになった。哺乳類のサーカディアンリズム発振機構は、SCN を頂点とする階層構造をなしていると想定されている。つまり自律振動時計である SCN からのシグナルが末梢の減衰振動時計に同調させている。同調因子には種々の体液神経因子があるとされている。

一方心拍数や血圧等の血行動態は日内変動を示す。さらに様々な心事故の発症にも日内変動が認められる。血圧日内変動の異常は心血管合併症のハイリスクをもたらす。例えば夜間血圧の低下しない non-dipper は高血圧性臓器障害の進行と関連がある。このことは内因性のサーカディアンリズムと心血管系の生理現象との間には機能的な相関があることが強く示唆される。そこで我々は心血管系の異常が末梢組織における時計遺伝子の発現に変化を及ぼすという仮説を提唱した。本研究で Dahl 食塩感受性ラットを用いて末梢組織の時計遺伝子の発現について検討し、この高血圧モデルで時計遺伝子の発現に変化があることを認めた。さらに高食塩食を負荷された Dahl 食塩感受性ラットの心臓において、時計遺伝子の制御下にあるとされているプラスミノゲンアクチベーター 1 (PAI-1) の発現のリズムが減弱していた。反対に肝臓においてはリズム的な発現は見出せなかった。このことから時計に制御された遺伝子の発現は組織によって異なるということが考えられる。

(方法)

4 週齢雄の Dahl 食塩感受性ラットに血圧測定用送信器を植え込み、テレメトリーシステムを用いて自由行動下に血圧、心拍数、行動のモニタリングを行った。ラットは通常食 (0.3%NaCl) で 1 週間飼育した後、高食塩食群 (4%NaCl) と通常食群 (0.3%NaCl) とに分け 12 時間周期の明暗条件下で 6 週間飼育した。各パラメーターの測定は 1 分毎に 3 日間連続で行い、10 分間の平均値を解析した。

食塩負荷前後で経胸壁心臓超音波検査を施行し、拡張末期左室内径 (EDD)、収縮末期左室内径 (ESD)、左室後壁壁厚を測定し、内径短縮率 (%FS) を算出した。

時計遺伝子発現を検討する目的で 72 匹の 4 週齢雄の Dahl 食塩感受性ラットを 12 時間周期の明暗条件下で通常食 (0.3%NaCl) を与え 1 週間飼育した後、高食塩食群 (4%NaCl) と通常食群 (0.3%NaCl) とに分け 6 週間飼育した。その後 2 日間恒暗条件下に置き 4 時間毎に屠殺した。再現性の確認のため、同様の作業を 2 回行った。

RNA は心臓、腎臓、肝臓から単離し、ノーザンプロット法または定量的 RT-PCR 法にて *mPer2*, *Bmal1*, *dbp*, 及び PAI-1 の発現について検討した。各組織間で発現レベルを比較するために通常食群の心臓のサンプルを基準においた。

サーカディアンリズムの解析に single cosinor 法が用いられた。

(結果)

自由行動下における血圧の連続測定の結果、血圧は高食塩食群および通常食群ともに明期に低く暗期に高い日内変動が観察された。そのうえ、通常食群と比較して高食塩食群における日内変動の振幅は有意に増高していることが確認された。

心重量比、腎重量比は高食塩食群において有意に大きかった。さらに心臓超音波検査の結果、高食塩食群において有意に壁厚の増加が認められたが、左室内径と内径短縮率に有意差は認められなかった。また解剖にて肺うっ血や肝うっ血の所見はなかった。

次に時計遺伝子の発現を検討したところ、心臓、腎臓、肝臓において高食塩食群および通常食群ともに全ての時計遺伝子のリズム的な発現を認め、*mPer2* と *dbp* の発現の振幅が高食塩食群において有意に抑制されていることが認められた。*Bmal1* については心臓、腎臓では高食塩食群において有意に抑制されていることが認められ、肝臓では有意ではなかったが軽度に抑制されていた。

時計遺伝子の発現の振幅が減弱している結果の意義を調べるため、体内時計に制御されているとされている PAI-1 の発現を、心臓と腎臓ではノーザンプロット法、肝臓では定量的 RT-PCR 法にて検討した。PAI-1 は心臓で高食塩食群および通常食群ともにリズム的な発現を認め、さらに発現の振幅が高食塩食群において有意に抑制されていることが認められた。腎臓では高食塩食群にお

いてリズム的な発現を認めたが、通常食群では認められなかった。肝臓では高食塩食群、通常食群ともにリズム的な発現は認められなかった。

(考察)

以前我々は大動脈や平滑筋細胞において体内時計を発振することを提示したが、末梢時計を制御する機構や生理的な機能については解明されていない。末梢組織に時計を発振させる遺伝子は心血管の機能にも影響を及ぼすことから、心血管系の異常が末梢の時計遺伝子の発現に変化をもたらすとの仮説を立てた。我々は高食塩食を負荷された Dahl 食塩感受性ラットでは末梢組織の時計遺伝子の発現の振幅が抑制され、さらに心臓では PAI-1 の発現の振幅も抑制されることを示した。高食塩食で血圧の変動幅が増大した Dahl 食塩感受性ラットの末梢の時計遺伝子の発現が抑制されたという報告は本研究が最初である。

当初 Dahl 食塩感受性ラットは血圧日内変動の消失が末梢の時計遺伝子の発現に及ぼす影響を検討するのに適したモデルと考えられたが、実際は高食塩食で高血圧となった Dahl 食塩感受性ラットの日内変動の幅は大きいことが示された。しかしその結果により、末梢の時計遺伝子の発現パターンは血圧の日内変動とは一致しないことが証明された。

この研究で重要なことは高食塩食群で末梢時計の発現の振幅が抑制されたことである。圧負荷で心肥大をきたしたモデルで *dbp* のような時計関連遺伝子の発現が抑制されている報告がある。また心肥大の状態で活性化されるアンジオテンシンⅡ、エンドセリン-Ⅰが培養細胞において時計遺伝子の発現を誘導する。このことから高血圧による肥大に引き続く心筋や腎のリモデリングが結果として時計遺伝子の発現の変化をもたらしていると推察される。

しかし肝臓についてはこれはあてはまらないと考えられる。一つの可能性として、高血圧が圧受容器反射により交感神経、副交感神経に影響を及ぼし時計遺伝子の発現が変化したことが考えられる。というのも自律神経系が中枢時計と末梢時計との伝達に関連していると考えられるからである。もう一つの可能性として、食塩負荷や血圧の上昇によって SCN の時計遺伝子の発現が変化し末梢への伝達経路に影響を与えているということが挙げられる。SCN における発現レベルの定量、さらに末梢時計の発現の機序を解明するのに他の高血圧モデルや降圧薬を用いた研究が必要である。

また PAI-1 は内皮細胞や心臓で時計遺伝子によって制御されていることから、

高食塩食群の Dahl 食塩感受性ラットの心臓で PAI-1 の発現の振幅が抑制されているということは、PAI-1 が心臓においては時計の出力遺伝子として機能することが示唆される。しかしながら時計遺伝子が PAI-1 の発現を直接に、あるいはレニン-アンジオテンシン系などを介して間接的に制御しているのかは不明である。この点を明白にするためにノックアウトモデルによる研究が必要である。肝臓における PAI-1 の発現の結果からは、時計によって制御されている遺伝子には組織特異性があることが示唆される。また腎臓における PAI-1 の発現の結果からはアンジオテンシンⅡのような時計遺伝子以外の因子の影響がより強力であると考えられる。すなわち各臓器に特異的な時計による出力遺伝子の同定が、末梢時計の機能を解明するのに重要である。

食塩負荷された Dahl 食塩感受性ラットの時計遺伝子の発現が変化した生物学的意義は不明だが、今後の循環器の病理における時計についての研究に役立つと思われる。循環器疾患と時計遺伝子との関連性を理解することは、時間医療の発展に重要である。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲第 / 539 号	氏名	毛利 貴生
論文題目	<p>Alterations of Circadian Expressions of Clock Genes in Dahl Salt-Sensitive Rats Fed A High-Salt Diet 高食塩食を負荷されたダール食塩感受性ラットにおける時計遺伝子の概日性発現の変化</p>		
審査委員	<p>主 査 橋山 光宏 副 査 岡村 均 副 査 秋岡 穂菜</p>		
審査終了日	平成 15 年 7 月 29 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

哺乳類の持つ行動や生理現象のサーカディアンリズムは、体内時計の働きによって作られている。体内時計は脳視床下部の視交叉上核 (SCN) に存在するが、最近になって末梢組織にも時計が存在することが明らかになった。哺乳類のサーカディアンリズム発振機構は、SCN を頂点とする階層構造をなしていると想定されている。つまり自律振動時計である SCN からのシグナルが末梢の減衰振動時計に同調させている。同調因子には種々の体液神経因子があるとされている。

一方心拍数や血圧等の血行動態は日内変動を示す。さらに様々な心事故の発症にも日内変動が認められる。血圧日内変動の異常は心血管合併症のハイリスクをもたらす。例えば夜間血圧の低下しない non-dipper は高血圧性臓器障害の進行と関連がある。このことは内因性のサーカディアンリズムと心血管系の生理現象との間には機能的な相関があることを強く示唆している。そこで我々は心血管系の異常が末梢組織における時計遺伝子の発現に変化を及ぼすという仮説を提唱した。本研究では Dahl 食塩感受性ラットを用いて末梢組織の時計遺伝子の発現と時計遺伝子の制御下にあるとされているプラスミノ-ゲンアクトベータ・インヒビター 1 (PAI-1) の発現について検討した。

ラットに血圧測定用送信器を植え込み、テレメトリーシステムを用いて自由行動下に血圧、心拍数、行動のモニタリングを行った。各パラメーターの測定は1分毎に3日間連続で行い、10 分間の平均値を解析した。72 匹の4週齢雄の Dahl 食塩感受性ラットを 12 時間周期の明暗条件下で通常食(0.3%NaCl)を与え1週間飼育した後、高食塩食群(4%NaCl)と通常食群(0.3%NaCl)とに分け6週間飼育した。その後2日間恒暗条件下に置き4時間毎に屠殺した。RNA は心臓、腎臓、肝臓から単離し、ノーザンブロット法または定量的 RT-PCR 法にて *mPer2*, *Bmal1*, *dbp*, 及び PAI-1 の発現について検討した。各組織間で発現レベルを比較するために通常食群の心臓のサンプルを基準においた。サーカディアンリズムの解析に single cosinor 法が用いられた。

以下の結果を得た。

自由行動下の血圧は高食塩食群および通常食群ともに明期に低く暗期に高い日内変動が観察された。そのうえ、通常食群と比較して高食塩食群における日内変動の振幅は有意に増高していた。心重量比、腎重量比は高食塩食群において有意に大きかった。さらに経胸壁心臓超音波検査の結果、高食塩食群において有意に壁厚の増加が認められたが、左室内径と内径短縮率に有意差は認められなかった。また解剖にて肺うっ血や肝うっ血の所見はなかった。

次に時計遺伝子の発現を検討したところ、心臓、腎臓、肝臓において高食塩食群および通常食群ともに全ての時計遺伝子のリズム的な発現を認め、*mPer2* と *dbp* の発現の振幅が高食塩食群において有意に抑制されていた。*Bmal1* については心臓、腎臓では高食塩食群において有意に抑制され、肝臓では有意では

なかったが軽度に抑制されていた。

時計遺伝子の発現の振幅が減弱している結果の意義を調べるため、体内時計に制御されているとされている PAI-1 の発現を、心臓と腎臓ではノーザンブロット法、肝臓では定量的 RT-PCR 法にて検討した。PAI-1 は心臓で高食塩食群および通常食群ともにリズムミクな発現を認め、さらに発現の振幅が高食塩食群において有意に抑制されていた。腎臓では高食塩食群においてリズムミクな発現を認めたが、通常食群では認められなかった。肝臓では高食塩食群、通常食群ともにリズムミクな発現は認められなかった。

我々は高食塩食を負荷された Dahl 食塩感受性高血圧ラットでは末梢組織の時計遺伝子の発現の振幅が抑制され、さらに心臓では PAI-1 の発現の振幅も抑制されることを示した。高食塩食で血圧の日内変動幅が増大した Dahl 食塩感受性ラットの末梢の時計遺伝子の発現が抑制されたという報告は本研究が最初であり、その機序として高血圧によるアンジオテンシン II, エンドセリン I 活性化に引き続く心筋や腎のリモデリングの結果として時計遺伝子の発現の変化をもたらしていると推察される。一つの可能性として、高血圧が圧受容器反射により交感神経、副交感神経に影響を及ぼし時計遺伝子の発現が変化したことが考えられる。もう一つの可能性として、食塩負荷や血圧の上昇によって SCN の時計遺伝子の発現が変化し末梢への伝達経路に影響を与えるということが挙げられる。

また高食塩食群の Dahl 食塩感受性ラットの心臓で PAI-1 の発現の振幅が抑制されているということは、PAI-1 が心臓においては時計の出力遺伝子として機能することが示された。しかし時計遺伝子が PAI-1 の発現を直接に、あるいはレニン-アンジオテンシン系などを介して間接的に制御しているのかは不明である。肝臓における PAI-1 の発現の結果からは、時計によって制御されている遺伝子には組織特異性があることが示唆される。また腎臓における PAI-1 の発現の結果からはアンジオテンシン II のような時計遺伝子以外の因子の影響がより強力であると考えられる。

本研究は Dahl 食塩感受性ラットを用いて末梢組織の時計遺伝子の発現とその制御下にあるとされるプラスミノーゲンアクチベータ・インヒビター I(PAI-1) の発現について研究したものであるが、従来ほとんど行なわれなかった血圧の日内変動幅が増大した Dahl 食塩感受性ラットの心臓の時計遺伝子の発現が抑制され、PAI-1 の発現も抑制されたが、一方腎臓などの他臓器には時計遺伝子以外の PAI-1 発現調節機構が存在することを明らかにし、重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、本研究者は博士 (医学) の学位を得る資格があると認める。