



Role of angiotensin and the clock system in the circadian regulation of plasminogen activator inhibitor-1

Masuda, Yoko

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2009-03-25

(Date of Publication)

2011-12-05

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4659

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004659>

※ 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。



氏 名 増田 陽子
博士の専攻分野の名称 博士（医学）
学 位 記 番 号 博い第 4659 号
学位授与の 要 件 学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付 平成 21 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

Role of angiotensin and the clock system in the circadian regulation of plasminogen activator inhibitor-1(PAI-1 発現の日内リズムに対する生体時計及びレニン・アンジオテンシン系の役割の解析)

審 査 委 員

主 査 教 授 中村 俊一
教 授 伊藤 光宏
教 授 深川 雅史

【背景・目的】

循環器疾患の発症時間に日内変動が認められることは以前よりよく知られている。急性心筋梗塞や脳梗塞などの発症は早朝に多いことが大規模臨床試験で示されているが、その分子機構の一つとして、早朝の血液凝固系の亢進が挙げられる。特に血液線溶系の制御因子である PAI-1 活性に日内リズムが認められ早朝に PAI-1 の発現が亢進し線溶系が低下することが、その原因の一つではないかと考えられている。

哺乳類の概日リズムは時計遺伝子によるフィードバックループにより形成されている。すなわち、転写因子である CLOCK と BMAL が複合体を形成し E-box に結合することにより、同じく転写因子である PER および CRY の転写を活性化する。ここで形成された PER:CRY 複合体が CLOCK、BMAL の抑制を介して PER、CRY の転写を抑制する。また、概日リズムの中核は視床下部の視交叉上核にあり、あらゆる末梢組織においてリズムを同調させている。

PAI-1 の発現制御に時計遺伝子が関与していることを示唆する報告がある。まず、最初に、マウスの末梢臓器において、PAI-1 の発現に日内リズムが認められ、それが CLOCK:BMAL 2 複合体によって制御を受けることが報告された。その後、CLOCK:BMAL 2 同様に CLOCK:BMAL 1 複合体も PAI-1 の発現を誘導することや、Clock 変異マウスでは、心臓における PAI-1 発現の日内リズムが消失することも報告されている。

一方、レニン・アンジオテンシン系による PAI-1 遺伝子の発現についても様々な報告がされている。アンジオテンシン II 投与により、PAI-1 の発現が誘導される報告や、アンジオテンシン受容体拮抗薬、ACE 阻害薬により PAI-1 の発現が抑制される報告がある。しかし、アンジオテンシン受容体拮抗薬投与で PAI-1 が抑制されないという報告も散見され、アンジオテンシン作用の阻害による PAI-1 発現への影響については意見の一致を見ないのが現状である。

さらに、私たちは以前にアンジオテンシン II が時計遺伝子の日内リズムを誘発することを報告した。

以上のように、時計遺伝子と PAI-1、レニン・アンジオテンシン系と PAI-1、レニン・アンジオテンシン系と時計遺伝子との発現調節の関係が報告されているが、生体において時計遺伝子とレニン・アンジオテンシン系どちらが上流となって PAI-1 を制御するのかが解明されていない。そこで、今回私たちは、遺伝学的手法を用いて、時計遺伝子及びレニン・アンジオテンシン系のいずれが PAI-1 発現の日内リズム形成に生体において意味のある関与をしているのかを検討した。

【方法】

6 週齢の mCry1/mCry2 ダブルノックアウトマウス、AT1 受容体欠損マウスと野生型マウス (C57/BL6j) を 12 時間毎の明暗条件で約 2 週間飼育した。約 2 週間の明暗条件での飼育に続いて、2 日間の恒暗条件にした後、4 時間毎にマウスを屠殺し検体を調整した。そして、末梢臓器 (肺、肝臓、腎臓、心臓) における時計遺伝子 (mper2, Bmal-1, dbp) 及び PAI-1 遺伝子の発現をノザンプロット法、定量的 RT-PCR 法にて、血漿中 PAI-1 を ELISA キットにて測定した。

【結果】

末梢臓器における各種時計遺伝子 (mper2, Bmal-1, dbp) の発現

野生型マウスと AT1 受容体欠損マウスにおいて、時計遺伝子発現に日内リズムを認めた。AT1 受容体を介した情報伝達経路は生体においては時計遺伝子の発現に関与しないことが明らかとなった。一方、生体リズムを消失している mCry1/mCry2 ダブルノックアウトマウスでは末梢臓器において時計遺伝子の日内リズムを認めなかった。

末梢臓器における PAI-1 発現

野生型マウスの肺、肝臓、腎臓 PAI-1 mRNA 発現に日内リズムを認めたが、mCry1/mCry2 ダブルノックアウトマウスでは、すべての臓器において、PAI-1 mRNA 発現に日内リズムを認めなかった。AT1 受容体欠損マウスにおいて、肺、肝臓では PAI-1 mRNA 発現に日内リズムを認めたが、腎臓では認めなかった。

心臓、腎臓、肝臓では、mCry1/mCry2 ダブルノックアウトマウスの PAI-1 発現量は野生型マウスと AT1 受容体欠損マウスに比べて多くなった。

血漿 PAI-1 濃度の日内変動

野生型マウスにおいて、日内リズムを認めたが、AT1 受容体欠損マウス、mCry1/mCry2 ダブルノックアウトマウスにおいては、日内リズムを認めなかった。一方、mCry1/mCry2 ダブルノックアウトマウスの血漿 PAI-1 は野生型マウスと AT1 受容体欠損マウスに比べて高値になった。

【考察】

これまで、CLOCK:BMAL 1 複合体や CLOCK:BMAL 2 複合体が PAI-1 の発現に関与することや、Clock 変異マウス心臓において PAI-1 発現の日内リズムが消失すること等が報告されており、時計遺伝子が PAI-1 日内リズムを

形成するのに必要であると考えられている。今回、mCry1/mCry2 ダブルノックアウトマウスでは、すべての臓器において、PAI-1mRNA 発現に日内リズムを認めなかったことより、CRY 遺伝子も PAI-1mRNA の日内リズム発現には必要と考えられ、時計遺伝子が PAI-1 日内リズム形成には必須であることが確認された。

AT1 受容体欠損マウスにおいて、肺、肝臓では PAI-1mRNA 発現に日内リズムを認めたが、腎臓では認めなかった。従って、レニン・アンジオテンシン系の PAI-1mRNA 日内リズムに対する関与は臓器により異なることが考えられた。肺、肝臓での PAI-1mRNA 発現の日内リズム形成には、AT1 受容体を介した系よりも、時計遺伝子が関与していると考えられ、腎臓の PAI-1 発現の日内リズム形成には時計遺伝子のみならず、AT1 受容体も重要な役割を担っていると考えられた。

レニン・アンジオテンシン系による PAI-1 遺伝子の発現についていくつかの報告がされているが、アンジオテンシン受容体拮抗薬の PAI-1 の発現に対する抑制効果は、意見の一致を見ていない。今回、AT1 受容体欠損マウスにおいて、肺、肝臓の PAI-1mRNA 発現に日内リズムを認めたが、腎臓 PAI-1mRNA、血漿 PAI-1 では日内リズムを認めなかった。すなわち、レニン・アンジオテンシン系の PAI-1 日内リズムに対する関与の程度は臓器により異なり、アンジオテンシン受容体拮抗薬の PAI-1 発現に対する評価の違いはこの臓器間の差に起因している可能性がある。

血漿 PAI-1 は血液線溶系の制御にかかわり、急性心筋梗塞や脳梗塞などの発症に関与しているとされている。今回、mCry1/mCry2 ダブルノックアウトマウスの血漿 PAI-1 は、野生型マウスと AT1 受容体欠損マウスに比べて高値になったことより、時計遺伝子の異常が心血管イベントの発症につながることを示唆される。

末梢臓器の PAI-1 は炎症、繊維化に関与していることが示されている。例えば、肺における PAI-1 は肺繊維症、腎臓における PAI-1 は糸球体硬化の病態に関与していると報告されている。mCry1/mCry2 ダブルノックアウトマウスの心臓、腎臓、肝臓 PAI-1mRNA 発現は、野生型マウスと AT1 受容体欠損マウスに比べて高値になったことより、PAI-1 を制御する時計遺伝子が上記の病態に関与することが示唆される。

【結語】

日内リズムを有した PAI-1 発現は時計遺伝子及びレニン・アンジオテンシン系のいずれによっても制御を受け、その発現調節機構は臓器によって異なる可能性が示唆された。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第1997号	氏名	増田 陽子
論文題目 Title of Dissertation	Role of angiotensin and the clock system in the circadian regulation of plasminogen activator inhibitor-1 PAI-1 発現の日内リズムに対する生体時計及びレニン・アンジオテンシン系の役割の解析		
審査委員 Examiner	主 査 中 村 俊 一 Chief Examiner 副 査 深 川 雅 史 Vice-examiner 副 査 伊 藤 光 宏 Vice-examiner		
審査終了日	平成 21 年 2 月 17 日		

(要旨は1,000字~2,000字程度)

循環器疾患の発症時間に日内変動が認められることは以前よりよく知られている。急性心筋梗塞や脳梗塞などの発症は早朝に多いことが大規模臨床試験で示されているが、その分子機構の一つとして、早朝の血液凝固系の亢進が挙げられる。特に血液線溶系の制御因子である PAI-1 活性に日内リズムが認められ、早朝に PAI-1 の発現が亢進し線溶系が低下することが、その原因の一つではないかと考えられている。

一方、これまでに時計遺伝子と PAI-1、レニン・アンジオテンシン系との発現調節の関係が報告されているが、生体において時計遺伝子とレニン・アンジオテンシン系どちらが上流となって PAI-1 を制御するのかが不明である。そこで、今回申請者は、遺伝学的手法を用いて、時計遺伝子及びレニン・アンジオテンシン系のいずれが PAI-1 発現の日内リズム形成に生体において意味のある関与をしているのかを検討した。

野生型マウスと AT1 受容体欠損マウスにおいて、時計遺伝子発現に日内リズムを認めた。AT1 受容体を介した情報伝達経路は生体においては時計遺伝子の発現に関与しないことが明らかとなった。一方、生体リズムを消失している mCry1/mCry2 ダブルノックアウトマウスでは末梢臓器において時計遺伝子の日内リズムを認めなかった。野生型マウスの肺、肝臓、腎臓 PAI-1mRNA 発現に日内リズムを認めたが、mCry1/mCry2 ダブルノックアウトマウスでは、すべての臓器において、PAI-1mRNA 発現に日内リズムを認めなかった。AT1 受容体欠損マウスにおいて、肺、肝臓では PAI-1mRNA 発現に日内リズムを認めたが、腎臓では認めなかった。心臓、腎臓、肝臓では、mCry1/mCry2 ダブルノックアウトマウスの PAI-1 発現量は野生型マウスと AT1 受容体欠損マウスに比べて多くなった。野生型マウスにおいて、日内リズムを認めたが、AT1 受容体欠損マウス、mCry1/mCry2 ダブルノックアウトマウスにおいては、日内リズムを認めなかった。一方、mCry1/mCry2 ダブルノックアウトマウスの血漿 PAI-1 は野生型マウスと AT1 受容体欠損マウスに比べて高値になった。

これまで、CLOCK:BMAL 1 複合体や CLOCK:BMAL 2 複合体が PAI-1 の発現に関与することや、Clock 変異マウス心臓において PAI-1 発現の日内リズムが消失すること等が報告されており、時計遺伝子が PAI-1 日内リズムを形成するのに必要であると考えられている。今回、mCry1/mCry2 ダブルノックアウトマウスでは、すべての臓器において、PAI-1mRNA 発現に日内リズムを認めなかったことより、CRY 遺伝子も PAI-1mRNA の日内リズム発現には必要と考えられ、時計遺伝子が PAI-1 日内リズム

形成には必須であることが確認された。AT1 受容体欠損マウスにおいて、肺、肝臓では PAI-1mRNA 発現に日内リズムを認めたが、腎臓では認めなかった。従って、レニン・アンジオテンシン系の PAI-1mRNA 日内リズムに対する関与は臓器により異なることが考えられた。肺、肝臓での PAI-1mRNA 発現の日内リズム形成には、AT1 受容体を介した系よりも、時計遺伝子が関与していると考えられ、腎臓の PAI-1 発現の日内リズム形成には時計遺伝子のみならず、AT1 受容体も重要な役割を担っていると考えられた。レニン・アンジオテンシン系による PAI-1 遺伝子の発現についていくつかの報告がされているが、アンジオテンシン受容体拮抗薬の PAI-1 の発現に対する抑制効果は、意見の一致を見ていない。今回、AT1 受容体欠損マウスにおいて、肺、肝臓の PAI-1mRNA 発現に日内リズムを認めたが、腎臓 PAI-1mRNA、血漿 PAI-1 では日内リズムを認めなかった。すなわち、レニン・アンジオテンシン系の PAI-1 日内リズムに対する関与の程度は臓器により異なり、アンジオテンシン受容体拮抗薬の PAI-1 発現に対する評価の違いはこの臓器間の差に起因している可能性がある。血漿 PAI-1 は血液線溶系の制御にかかわり、急性心筋梗塞や脳梗塞などの発症に関与しているとされている。今回、mCry1/mCry2 ダブルノックアウトマウスの血漿 PAI-1 は、野生型マウスと AT1 受容体欠損マウスに比べて高値になったことより、時計遺伝子の異常が心血管イベントの発症につながることを示唆される。末梢臓器の PAI-1 は炎症、繊維化に関与していることが示されている。例えば、肺における PAI-1 は肺繊維症、腎臓における PAI-1 は糸球体硬化の病態に関与していると報告されている。mCry1/mCry2 ダブルノックアウトマウスの心臓、腎臓、肝臓 PAI-1mRNA 発現は、野生型マウスと AT1 受容体欠損マウスに比べて高値になったことより、PAI-1 を制御する時計遺伝子が上記の病態に関与することが示唆された。

本研究は、PAI-1 発現の日内リズム形成に於ける時計遺伝子及びレニン・アンジオテンシン系の重要性及び臓器特異性を明らかにしたものであり、循環器系疾患の発症の日内変動を理解する上で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。