

血管内皮末梢時計からみた心臓病の治療戦略

前村浩二、武田憲彦、森田啓行、今井靖、永井良三

東京大学大学院医学系研究科 循環器内科学

血圧や心拍数などの心血管系機能や、不整脈、心筋梗塞などの循環器疾患の発症頻度には明らかな日内変動が見られるが、その分子メカニズムは十分に解明されていない。最近心血管系組織にも末梢体内時計が存在する可能性が示され、我々は、培養血管内皮細胞において体内時計関連遺伝子の発現が明らかな日内変動を呈することを示した。さらに、心筋梗塞の早朝多発の一因である PAI-1 遺伝子発現の日内変動が末梢体内時計により調節されている可能性を示した。現在、末梢体内時計により直接調節される標的遺伝子を探索する一方、自律神経系や内分泌系による調節と、末梢体内時計による調節の役割の違いについて研究中である。循環器機能は、少なくともその一部は末梢体内時計によって調節されている可能性があり、そのメカニズムを明らかにすることは、今後、循環器疾患の治療戦略を考える上で重要であると考えられる。

1. はじめに

さまざまな循環器疾患の好発時間には明らかな日内変動が見られ、既に降圧剤や狭心症薬の作用持続時間や投与時間を変えることにより、時間を考慮した循環器病の治療が行われている。一方、体内時計の中枢は視交叉上核にあることが知られていたが、最近末梢組織にも体内時計の存在が示唆された。我々は、循環器系組織にも末梢体内時計が存在することを示し、その役割を明らかにするために循環器機能の日内変動に結びつく標的遺伝子の同定を試みている。末梢体内時計の病態形成における役割を明らかにすることは、循環器疾患の新たな治療戦略の開発につながると期待される。

2. 循環器疾患における概日リズム

血圧や心拍数など循環機能には、明らかな日内変動が見られる。例えば、血圧は日中に上昇し夜間に下降し、心拍数も日中に増加し夜間に減少する。また疾患の発症頻度にも明らかな日内変動が見られる(表1)。心筋梗塞、不安定狭心症、心臓突然死などの急性冠症候群、脳梗塞あるいは冠動脈スパズムは、早朝に多く発症する(図1)^{1), 13), 14)}。さらに治療への反応性についても日内変動がみられ、例えば血栓溶解療法が朝方に効きにくいことが知られている³⁾。

血圧のタイプには夜間に血圧の低下する正常なタイプの dipper の他に、夜間血圧が低下しない nondipper、夜間過度に血圧の低下する extreme dipper、逆に夜間血圧の上昇する riser などのタイプが知られており、心血管病のリスクとの関連が示されている。心筋梗塞が午前中に多く発症する原因については、いくつか提唱されている。まず、早朝に交感神経の活動性が亢進することにより、血圧、心拍数、心筋収縮力が上昇し心筋の酸素需要が増加する一方、

表1 循環器病とサーカディアンリズム

さまざまな循環器疾患には明らかな好発時間帯が認められる。また、血圧のタイプには通常夜間に血圧の低下する dipper、夜間血圧低下しない nondipper、夜間過度に血圧の低下する extreme dipper、逆に夜間血圧の上昇する riser などのタイプが知られており、心血管病のリスクと関連している。

	疾患	好発時間
不整脈	心房細動 心室頻拍, 心室細動	夜朝
虚血性心疾患	急性冠症候群 (心筋梗塞, 不安定狭心症, 突然死) 冠攣縮性狭心症	朝 早朝
脳卒中	脳梗塞 クモ膜下出血	朝 午後
高血圧	早朝高血圧 dipper, nondipper, extreme dipper riser	

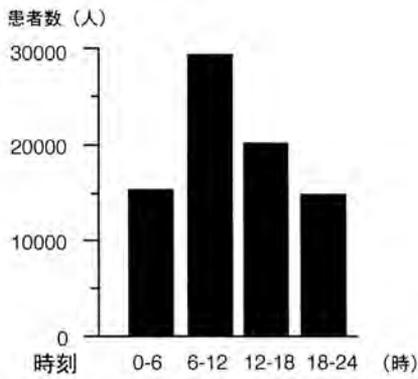


図1 急性心筋梗塞の発症時間帯 (文献4より改変して引用)
午前6時から12時の間に急性心筋梗塞は最も多く発症する。

冠動脈の血管抵抗が上がることにより、冠血流量が減少し、需要と供給のアンバランスがおこることがあげられる。次に、早朝に血液凝固能が亢進することも一因として考えられている。これは血小板凝集能の亢進と、線溶系の活性低下によることが示唆されている。さらに早朝の凝固能亢進の原因を明らかにするため、血液凝固因子、線溶系因子のタンパク量あるいは活性値の日内変動を検討した臨床研究がいくつかなされてきた。これらの結果、多くの血液凝固因子、線溶系因子の中で明らかに日内変動を呈するのは、組織型プラスミノゲンアクチベーター (tPA) の活性とプラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (PAI-1) のタンパク量あるいはその

活性値である。つまり、tPAの活性が早朝に低下し、PAI-1の活性が上昇することにより線溶系の活性が早朝に低下し、血栓ができやすい状態にあることがわかった。さらに、tPAの活性低下はPAI-1の活性上昇による二次的なものと考えられ、PAI-1活性の日内変動が、血液凝固能の日内変動を調節している一義的なものだと考えられるようになってきている¹⁾。心筋梗塞の初期治療に血栓溶解療法が行われるようになると、早朝発症の心筋梗塞は他の時間帯の心筋梗塞に比べて、血栓溶解療法が効きにくいことも気づかれるようになった²⁾。これも早朝にPAI-1の活性が亢進することにより説明可能である。しかし、PAI-1の活性がこのような日内変動を呈するメカニズムについては明らかにされていない。

3. 心血管系組織における末梢体内時計の存在

従来、体内時計は中枢に局在すると考えられていたが、体内時計を構成する遺伝子群がクロニングされると³⁾、それらは、末梢組織でも豊富に発現しており、さらにその発現パターンは日内変動を示すことが明らかになった^{16), 18)}。そこで、末梢組織にも体内時計が存在する可能性が提唱された^{5), 17), 22)}。我々は心血管系においても、末梢体内時計が存在するのではないかと考え、マウスを12時間ごとの明所と暗所で飼育し、経時的に末梢組織における体内時計構成遺伝子群の発現をノーザンプロット法で検討した。心臓や腎臓において、Bmal1、Per2、Cry1などの遺伝子発現が日内変動を呈することが明らかにな

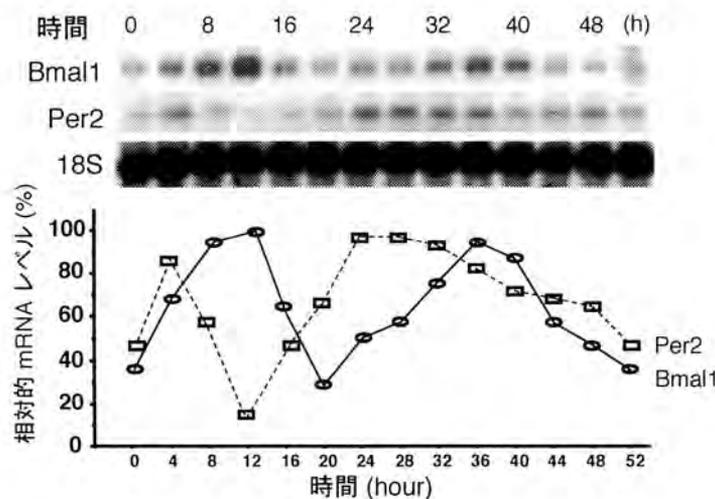


図2 培養内皮細胞での遺伝子発現の日内変動
マウス培養内皮細胞を50%血清で2時間刺激した後、経時的にRNAを抽出し、ノーザンプロットを行った。体内時計に関連する遺伝子Bmal1とPer2発現の日内変動を示す。

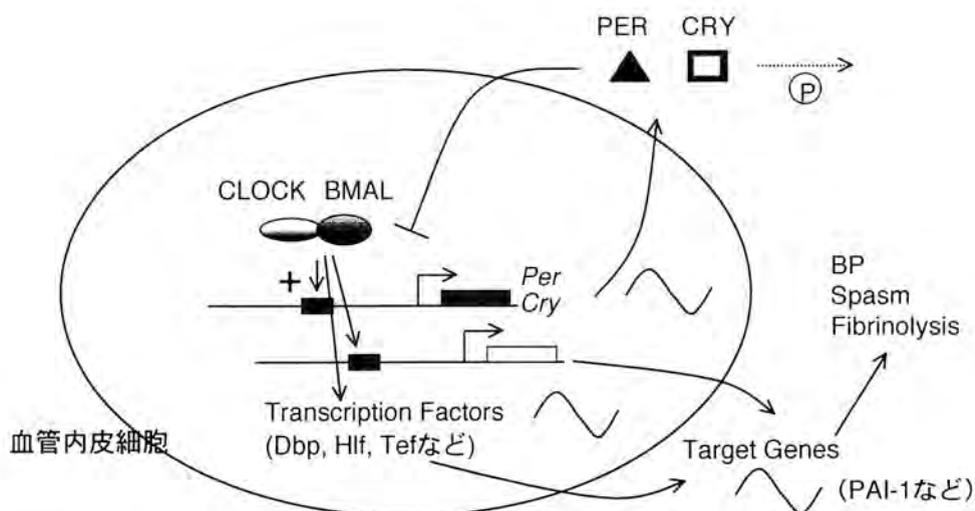


図3 CLOCK:BMAL1の標的遺伝子の探索

CLOCKとBMAL1の二量体はPerやCryのEboxに結合し、それらの遺伝子の発現を誘導する。細胞質においてPERはリン酸化を受けdegradationをおこす。残ったPERは次第に細胞内に蓄積し、核内に移行してCRYとともにCLOCKとCLIF/BMAL2による転写活性を抑制しネガティブフィードバックを形成する。この局所の体内時計が直接あるいは、Dbpなどの転写因子を介して、アウトプット遺伝子の発現の日内変動を調節していると考えられる。

った¹¹⁾。また大動脈においても同様な日内変動が見られることが確認されている¹²⁾。さらに、心血管系を構成する筋細胞や、血管内皮細胞自体が、このような末梢時計が存在するか検討した。線維芽細胞のcell lineを用いた研究では、培養細胞を50%血清にて2時間刺激することにより、体内時計を構成する遺伝子発現が日内変動を呈することが知られている²¹⁾。そこで、同様に筋細胞や血管内皮細胞を血清にて刺激すると、培養細胞において、これらの遺伝子発現が日内変動を呈することが示された(図2)。これらの結果より、心血管系においても末梢体内時計が存在することが示唆される。

4. 末梢体内時計によるPAI-1遺伝子発現の日内変動の調節

では末梢体内時計が生理的な役割をになっているかは、実際にその下流のアウトプット遺伝子があるのか、また中枢による調節と末梢による調節をどのように使い分けているのかを明らかにする必要がある。我々は、血管内皮細胞で発現している転写因子であるEndothelial PAS domain protein 1をbaitとして、Yeast two-hybrid法にてヒト臍帯静脈内皮細胞cDNAライブラリーをスクリーニングしている過程で、新規のbasic helix-loop-helix (bHLH) PASドメイン転写因子CLIF/BMAL2をクローニングし

た^{11) 13)}。この遺伝子は、体内時計遺伝子であるBMAL1とホモロジーを有しBMAL1同様、体内時計の構成因子であると考えられる^{11) 13)}。CLIF/BMAL2は、視床下部視交叉上核と血管内皮細胞で発現が確認された。前述したPAI-1は血管内皮細胞で多く発現していることより、血管内皮細胞の末梢体内時計のアウトプット遺伝子の候補としてPAI-1を考えた。ノーザンブロット法にてPAI-1遺伝子の発現が、暗相の初期にピークを有する日内変動を呈し、PAI-1活性の日内変動が遺伝子発現レベルで調節されていることが示された。次に、CLOCKとCLIF/BMAL2の二量体がPAI-1遺伝子を誘導できるかを検討した。ヒト臍帯静脈内皮細胞においてアデノウイルスを用いてCLOCKとCLIF/BMAL2を強制発現させるとPAI-1 mRNAの発現が亢進した。さらに、そのメカニズムを詳細に検討するために、PAI-1プロモーターを用いたレポーター解析を行った。その結果、CLOCKとCLIF/BMAL2の発現により、PAI-1のプロモーター活性が上昇し、これは、2カ所のCACGTGタイプのE-boxを介することが明らかになった。また、ゲルシフト解析により、CLOCKとCLIF/BMAL2の二量体はこのPAI-1遺伝子のE-boxに結合することも明らかになった。さらに前述のように体内時計の負の調節因子であるPERやCRYはCLOCKとCLIF/BMAL2によ

る PAI-1 遺伝子の誘導を抑制し、末梢組織においてもネガティブフィードバックループを形成していると考えられた。

以上の結果より末梢組織にも体内時計が存在し、少なくとも一部は局所において PAI-1 遺伝子発現の日内変動を調節していること、それが心筋梗塞発症の日内変動に寄与していることが示唆された¹²⁾。

5. 血管内皮細胞末梢体内時計により調節される遺伝子群

末梢体内時計により調節される遺伝子群は、CLOCK と BMAL により直接誘導されるか、Dbp などの転写因子を介して誘導されると考えられる (図 3)。そこで、血管内皮細胞末梢体内時計の下流遺伝子を網羅的に同定するために、cDNA マイクロアレイによる解析を行った。ヒト臍帯静脈内皮細胞に CLOCK と CLIF/BMAL2 を発現するアデノウイルスを感染させ、48 時間後に RNA を回収した。コントロールとしては、GFP を発現するアデノウイルスを感染させた細胞を用いた。CLOCK と CLIF/BMAL2 により発現が上昇した遺伝子群の中で、さらに DNA chip の解析から心臓や肝臓でその発現が日内変動を呈することが既に報告されている遺伝子を選択すると¹³⁾、その遺伝子は末梢体内時計の下流遺伝子である可能性があると考えた。それらの中には転写因子、分泌タンパク、膜受容体を含む遺伝子が含まれていた (表 2)。現在、この方法で同定された遺伝子と、血圧、血管トーン、線溶系の日内変動との関連を解析中である。さらに、その中には、最近新たな時計遺伝子として報告された Dec1 も含まれていた⁷⁾。ただし Dec1 の場合は下流遺伝子

表 2 血管内皮細胞において CLOCK と CLIF/BMAL2 により誘導されその発現が日内変動を呈する遺伝子
従来明らかなように Per の著名な誘導が認められた。さらに最近時計遺伝子として提唱された DEC1 も誘導された。その他にもいくつかの転写因子、受容体、分泌タンパクが誘導された。

	倍率
• Per1	x 28
• Per2	x 3.2
• Dec1/bHLHB2	x 6.3
• 転写因子	
• 膜受容体	
• 分泌タンパク	

としてより、コアループを形成する転写因子として働いている可能性が高いようである。

6. おわりに

末梢体内時計の役割を明らかにするためには、さらに中枢の体内時計と末梢の体内時計による調節がどのように使い分けられているのか解明するのが今後の課題であろう。そのためには食餌制限で末梢の体内時計のみシフトさせたモデルで解析するのも一つの方法であろうが¹⁰⁾、我々は現在、血管内皮細胞特異的に末梢体内時計をノックダウンしたトランスジェニックマウスの開発を行っている。

また、末梢体内時計が、心肥大や動脈硬化でどのように障害されるのか、逆に末梢体内時計の障害がこれらの病態の形成に寄与しているのかも、今後明らかにしていく必要がある²³⁾⁻²⁵⁾。これらの末梢体内時計の役割、特に病態形成における役割が明らかになれば、従来の投薬のタイミングを考慮した循環器病の治療のみでなく、末梢体内時計を正常に保つ治療が可能になるかもしれない。

組織固有の日内リズム発生のメカニズムを理解することは、心筋梗塞や冠動脈スパズムなどの病態の理解をさらに深めることにつながり、これらの疾患のタイミングを考慮した予防、さらに時間に即した治療法の開発に結びつけられることが期待される。

参考文献

- 1) Andreotti, F., and Klufft, C. *Chronobiol Int* 8, 336-351 (1991)
- 2) . Balsalobre, A., Damiola, F., and Schibler, U. *Cell* 93, 929-937 (1998)
- 3) Braunwald, E. *Circulation* 91, 1604-1606 (1995)
- 4) Cohen, M. C., Rohtla, K. M., Lavery, C. E., Muller, J. E., and Mittleman, M. A. *Am J Cardiol* 79, 1512-1516 (1997)
- 5) Dunlap, J. C. *Cell* 96, 271-290 (1999)
- 6) Hogenesch, J. B., Gu, Y. Z., Moran, S. M., Shimomura, K., Radcliffe, L. A., Takahashi, J. S., and Bradfield, C. A. *J Neurosci* 20, RC83 (2000)
- 7) Honma, S., Kawamoto, T., Takagi, Y., Fujimoto, K., Sato, F., Noshiro, M., Kato, Y., and Honma, K. *Nature* 419, 841-844 (2002)
- 8) Ikeda, M., Yu, W., Hirai, M., Ebisawa, T., Honma, S., Yoshimura, K., Honma, K. I., and

- Nomura, M. *Biochem Biophys Res Commun* 275, 493-502 (2000)
- 9) 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., and Takahashi, J. S. *Cell* 89, 641-653 (1997)
 - 10) Maemura, K., Hsieh, C. M., Jain, M. K., Fukumoto, S., Layne, M. D., Liu, Y., Kourembanas, S., Yet, S. F., Perrella, M. A., and Lee, M. E. *J Biol Chem* 274, 31565-31570 (1999)
 - 11) Maemura, K., de La Monte, S. M., Chin, M. T., Layne, M. D., Hsieh, C. M., Yet, S. F., Perrella, M. A., and Lee, M. E. *J Biol Chem* 275, 36847-36851 (2000)
 - 12) Maemura, K., Layne, M. D., Watanabe, M., Perrell, M. A., Nagai, R., and Lee, M. E. *Ann N Y Acad Sci* 947, 398-402 (2001)
 - 13) Muller, J. E., Stone, P. H., Turi, Z. G., Rutherford, J. D., Czeisler, C. A., Parker, C., Poole, W. K., Passamani, E., Roberts, R., Robertson, T., and et al. *N Engl J Med* 313, 1315-1322 (1985)
 - 14) Muller, J. E., Tofler, G. H., and Stone, P. H. *Circulation* 79, 733-743 (1989)
 - 15) Nonaka, H., Emoto, N., Ikeda, K., Fukuya, H., Rohman, M. S., Raharjo, S. B., Yagita, K., Okamura, H., and Yokoyama, M. *Circulation* 104, 1746-1748 (2001)
 - 16) Oishi, K., Sakamoto, K., Okada, T., Nagase, T., and Ishida, N. *Biochem Biophys Res Commun* 253, 199-203 (1998)
 - 17) Ripperger, J. A., and Schibler, U. *Curr Opin Cell Biol* 13, 357-362 (2001)
 - 18) Sakamoto, K., Nagase, T., Fukui, H., Horikawa, K., Okada, T., Tanaka, H., Sato, K., Miyake, Y., Ohara, O., Kako, K., and Ishida, N. *J Biol Chem* 273, 27039-27042 (1998)
 - 19) Stokkan, K. A., Yamazaki, S., Tei, H., Sakaki, Y., and Menaker, M. *Science* 291, 490-493 (2001)
 - 20) Storch, K. F., Lipan, O., Leykin, I., Viswanathan, N., Davis, F. C., Wong, W. H., and Weitz, C. J. *Nature* 417, 78-83 (2002)
 - 21) Yagita, K., Tamanini, F., van Der Horst, G. T., and Okamura, H. *Science* 292, 278-281 (2001)
 - 22) Yamazaki, S., Numano, R., Abe, M., Hida, A., Takahashi, R., Ueda, M., Block, G. D., Sakaki, Y., Menaker, M., and Tei, H. *Science* 288, 682-685 (2000)
 - 23) Young, M. E., Razeghi, P., Cedars, A. M., Guthrie, P. H., and Taegtmeier, H. *Circ Res* 89, 1199-1208 (2001)
 - 24) Young, M. E., Razeghi, P., and Taegtmeier, H. *Circ Res* 88, 1142-1150 (2001)
 - 25) Young, M. E., Wilson, C. R., Razeghi, P., Guthrie, P. H., and Taegtmeier, H. *J Mol Cell Cardiol* 34, 223-231 (2002)