

## 時計遺伝子欠損に伴う食塩感受性高血圧マウスにおける病態解析および 新規治療法の開発

江本 憲昭, 八木 敬子, 中山 和彦

神戸薬科大学薬学部

**概要** 1. 研究目的 本研究では、アルドステロン産生過剰を示す時計遺伝子欠損マウスを用いて、生体リズムの回復によって臓器障害を抑制することができるという私たちの仮説を証明することにより新規治療法を開発することを目的とするものである。

2. 研究方法 本研究では、8-12 週齢の Cry1 および Cry2 を欠損したマウス(以下 Cry KO マウス)を用いた。皮膚のリンパ管密度およびマクロファージ数をそれぞれのマーカーである LYVE-1 抗体および F4/80 抗体を用いた免疫組織学的手法を用いて比較・検討した。また、Cry KO マウスを埋込型無線血圧測定機であるテレメトリーを用いて 24 時間連続血圧・脈拍および活動量を測定し、さらに心臓の線維化を組織学的手法で検討した。

3. 研究結果 8 週間の食塩摂取により野生型マウスおよび Cry KO マウスともに皮膚組織中のリンパ管の密度が上昇し、F4/80 によって評価されるマクロファージ数の増加を認めた。テレメトリーによる計測の結果、Cry KO マウスでは、血圧、脈拍、身体活動量に統計学的に有意な日内変動を認めなかった。次に、12 時間ごとの明暗サイクルにおいて Cry KO マウスは、生体時計機能を消失しているにもかかわらず、血圧、脈拍、身体活動に有意な日内変動を認めた。恒暗条件で 16 週間飼育した Cry KO マウスの心臓では血管周囲ならびに間質に著明な線維化を認めた。一方、明暗条件で飼育した Cry KO マウスは恒暗条件での Cry KO マウスと比べて明らかに線維化が抑制されていた。

4. 考察 最近食塩の過剰摂取時には皮膚組織中の塩分貯留によりリンパ管密度の上昇をきたし、血圧の調節に関与している可能性が報告された。そこで、今回内因性のアルドステロン過剰モデルである Cry KO において塩分過剰摂取時の皮膚組織中のリンパ管密度を検討した。その結果、野生型マウスと Cry KO マウスの間に有意な差はなかった。これはアルドステロンが皮膚におけるリンパ管密度に関与していないことを示している。次に、私たちは Cry KO マウスの血圧日内変動と高血圧に伴う臓器障害について検討し、生体時計機能が消失していても、適切に光を照射することによって生体リズムを生み出すことができる可能性を示した。Cry KO マウスでは、明暗条件において光によって見かけ上のリズムを生み出すことによって、リズムのない恒暗条件と比較して明らかに心筋線維化は軽度であった。この結果はアルドステロンが高値の場合、生体リズムの有無によって臓器障害に差が出ることを示唆しており、また光によって生体リズムを回復することにより臓器障害が軽減される可能性を示している。

5. 今後の課題 光を用いた日内リズムの誘導が食塩感受性高血圧に対してこれまでと全く異なる概念の新しい治療法を提供することが期待される。

### 1. 研究目的

24 時間の生体リズムを刻む体内時計の乱れによって、疾病の発症や進展につながる可能性が注目を浴びている。しかし、これまでの報告は観察研究によるものが大部

分であり、その理由は生体リズムを遺伝子レベルで解析する方法がなかったからである。ところが、1997 年の時計遺伝子の発見に伴い分子レベルで生体リズムを解明することが可能となり、科学的なアプローチが可能となった。

私たちはこれまでに、体内時計を遺伝子レベルで解析し、生体リズムと疾病の関係について発表してきた<sup>(1,2,3)</sup>。そして、ごく最近、私たちは時計遺伝子を欠損したマウスが食塩感受性高血圧を来し、その分子機構として副腎におけるアルドステロンの産生が亢進していることを明らかにした<sup>(4)</sup>。このマウスは、人間の食塩感受性高血圧症のモデルと考えられ、時計遺伝子がアルドステロン生合成を調節していることを世界で初めて報告したものである。

そこで、本研究では、上記の発見を基盤として、生体リズムの消失による食塩感受性高血圧がアルドステロンおよび塩分を介して臓器障害を引き起こすメカニズムを明らかにし、生体リズムの回復によって臓器障害を抑制することができるという私たちの仮説を証明することにより新規治療法を開発することを目的とするものである。

## 2. 研究方法

本研究では、生体リズムを消失し、アルドステロン過剰産生による食塩感受性高血圧を呈する Cry1 および Cry2 欠損したマウス(以下 Cry KO マウス)を用いる。このマウスでは高食塩負荷により 3 日以内に著明な高血圧きたすことがすでに示されている<sup>(4)</sup>。

### 2.1 アルドステロン過剰産生マウスの食塩感受性高血圧の機序の解明

8-12 週齢の野生型マウスおよび Cry KO マウスを通常食群、高食塩食群、高食塩群+アルドステロン拮抗薬群の 3 群に分ける。高食塩群には餌に 3.15% の食塩を添加し、8 週間飼育後、屠殺する。2 週目および 8 週目に代謝ケージを用いて飲水量、尿量を測定するとともに血中および尿中電解質を測定した。皮膚のリンパ管密度およびマクロファージ数をそれぞれのマーカーである LYVE-1 抗体および F4/80 抗体を用いた免疫組織学的手法を用いて比較・検討した。

### 2.2 光を介した生体リズム回復による臓器障害の抑制

Cry KO マウスを恒暗条件で飼育する群と 12 時間ごとに明暗条件で飼育する群の 2 群において、埋込型無線測定機であるテレメトリーを用いて 24 時間連続血圧・脈拍および活動量の測定を行った。またそれぞれの条件で 16 週間飼育後の心臓の線維化をマッサントリクローム法を用いた組織学的手法で検討した。心臓から調製した RNA を用いて、TGF- $\beta$  および CTGF の発現をリアルタイム PCR で定

量化した。

## 3. 研究結果

### 3.1 食塩摂取による皮膚リンパ管への影響

食塩摂取時の皮膚におけるリンパ管の増生を組織学的に検討した。野生型マウスでは 8 週間の食塩摂取によりリンパ管の密度が上昇し、F4/80 によって評価されるマクロファージ数の増加を認めた (Figure 1)。また、Cry KO マウスでも同様にリンパ管の密度の上昇ならびにマクロファージ数の増加を認め、野生型マウスと有意な差を認めなかった。これらの上昇は抗アルドステロン薬であるスピロノラクトンによって抑制された。これらの結果、Cry KO マウスにおいては塩分摂取による皮膚リンパ管密度の上昇ならびにマクロファージ数に野生型マウスとの間に明らかな差はなく、食塩摂取による血圧上昇の機構に皮膚の関与はないと考えられる。

### 3.2 光を介した生体リズム回復による臓器障害の抑制

#### 3.2.1 生体時計を消失したマウスは血圧の日内変動を消失する

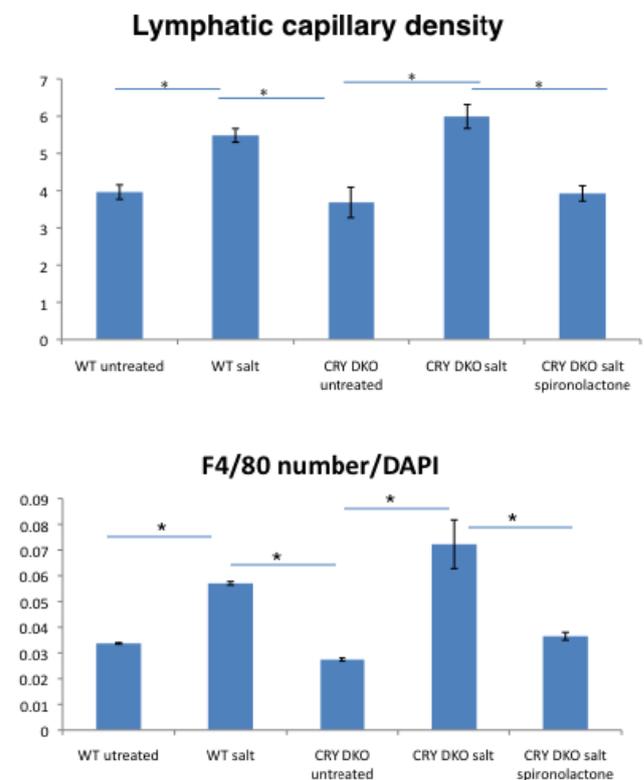


Figure 1. Lymphatic capillary density and macrophage quantification on skin of mice treated for 8 weeks

野生型マウスと Cry KO マウスを恒暗条件で飼育し、血圧、脈拍、身体活動量をテレメトリーシステムで記録した (Figure 2)。野生型マウスでは、血圧、脈拍、身体活動量に明確な日内変動を認めた。これは、野生型マウスでは生体時計の存在により、光の情報があっても日内リズムを形成することを示している。一方、Cry KO マウスでは、血圧、脈拍、身体活動量に統計学的に有意な日内変動を認めなかった。これは、生体時計機能の消失により日内リズムが消失した結果と考えられる。

### 3. 2. 2 光により血圧日内変動が回復する

次に、上記マウスを 12 時間ごとの明暗サイクルで飼育することにより、光が血圧、脈拍、身体活動に及ぼす影響について検討した (Figure 3)。野生型マウスでは、恒暗条件と同じく上記指標において明確な日内変動を認めた。Cry KO マウスでは、生体時計機能を消失しているにもかかわらず、血圧、脈拍、身体活動に有意な日内変動を認めた。この日内変動は生体時計を介さない光による、いわゆるマスキング効果によるものと考えられた。

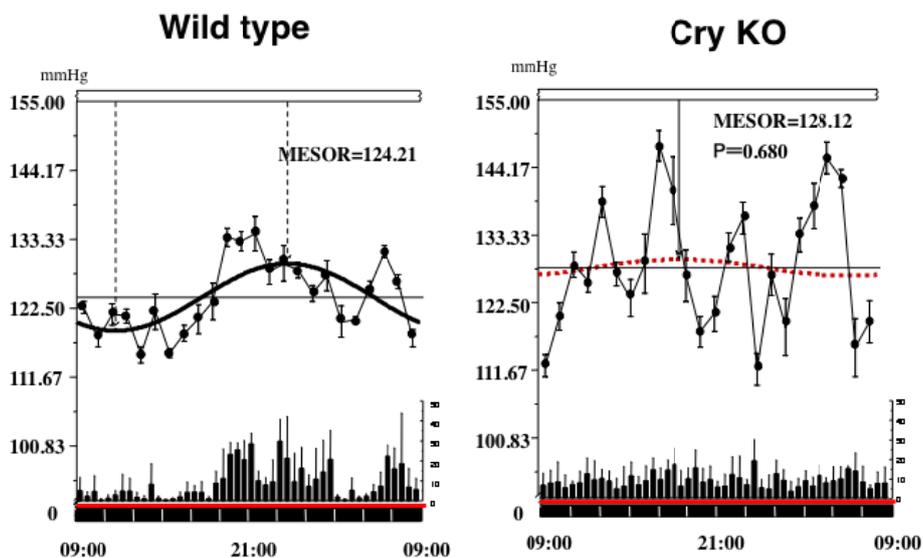


Figure 2. Diurnal variation of systolic blood pressure of mice under the constant darkness

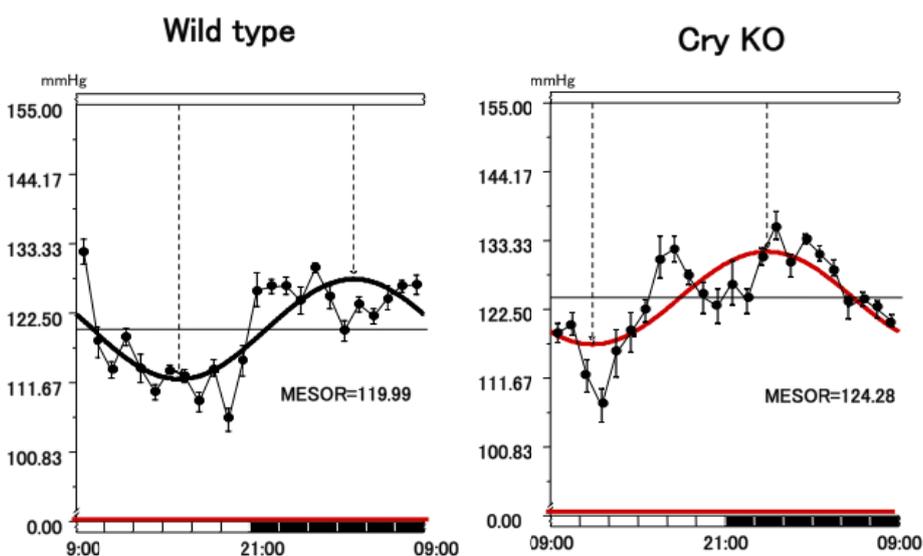


Figure 3. Diurnal variation of systolic blood pressure of mice under 12-hour light and dark cycle

### 3. 2. 3 血圧の日内変動の回復は心筋線維化の改善をもたらす

Cry KO マウスでは生体時計機能を消失しているにもかかわらず、12 時間ごとに光を照射することにより、見かけ上の生体リズムを回復することが明らかとなった。そこで、この生体リズムの回復が、個体に及ぼす影響について検討した。

野生型マウスおよび Cry KO マウスを恒暗条件もしくは明暗条件で 16 週間飼育し、屠殺後に心臓の線維化を指標として病理組織を解析した (Figure 4)。野生型マウスではいずれの群においても血管周囲ならびに間質に線維化を認めなかった。恒暗条件で飼育した Cry KO マウスでは血管周囲ならびに間質に著明な線維化を認めた。これは線維化をきたすことが知られている分子である TGF- $\beta$  および CTGF の発現が Cry KO では野生型マウスに比べて高いことから確認された (Figure 5)。ところが、明暗条件で飼育した Cry KO マウスは野生型に比して線維化を認めたものの、恒暗条件での Cry KO マウスと比べて明らかに線維化が抑制されていた。

### 4. 考 察

本研究において私たちは内因性アルドステロンの分泌が亢進している時計遺伝子欠損マウスを用いて、食塩感受性高血圧の新たな発症機序の解明について検討した。

アルドステロンが食塩感受性高血圧をきたす作用機序はこれまでアルドステロンによる腎、集合管でのナトリウムおよび水分の再吸収によるものとされていた。しかし、最近食塩の過剰摂取時には皮膚組織中の塩分貯留によりリンパ管密度の上昇をきたし、血圧の調節に関与している可能性が報告された<sup>(5)</sup>。そこで、今回内因性のアルドステロン過剰モデルである Cry KO において塩分過剰摂取時に皮膚組織中のリンパ管密度を検討した。その結果、食塩摂取による皮膚リンパ管密度およびマクロファージ数は野生型と Cry KO ともに上昇したが、その両者に有意な差はなかった。これはアルドステロンが皮膚におけるリンパ

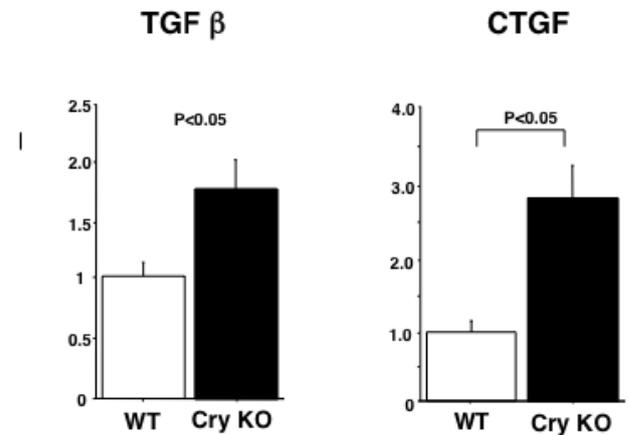


Figure 5. Increased expression of TGF- $\beta$  and CTGF in the heart in Cry KO mice

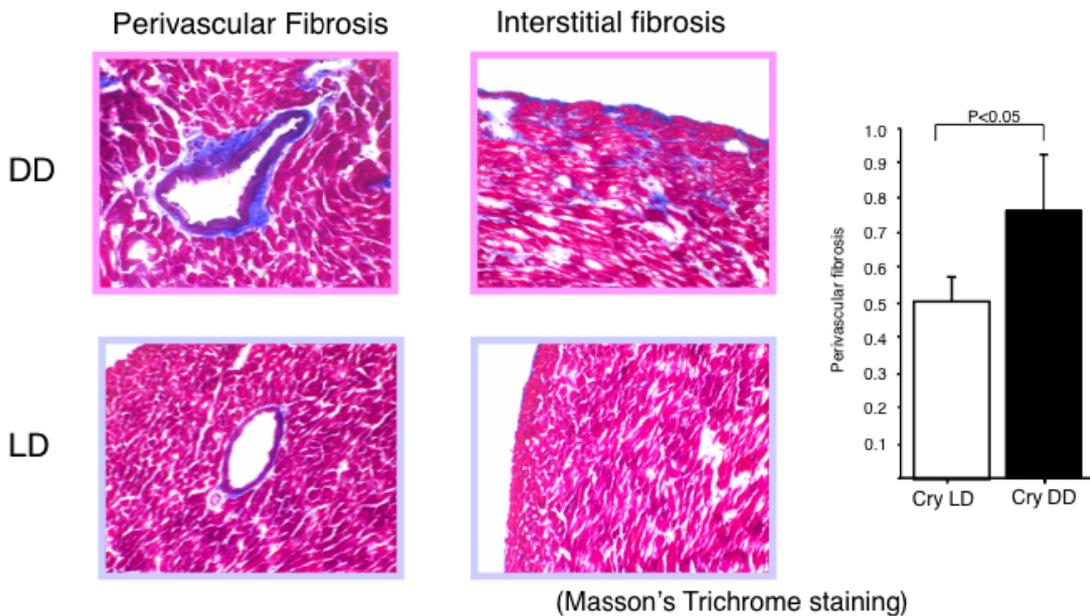


Figure 4. Increased perivascular and interstitial fibrosis in the heart in Cry KO mice in constant dark condition

管密度に関与していないことを示している。

次に、私たちは Cry KO マウスの血圧日内変動と高血圧に伴う臓器障害について検討した。Cry KO マウスの心臓では、高血圧に伴う臓器障害の指標とされる血管周囲ならびに間質の線維化が認められた。これらは野生型マウスではほとんど認められないこと、塩分負荷をした Cry KO マウスでも認められないことから、内因性アルドステロンにより引き起こされたものと考えられる。すなわち、心臓の線維化では塩分や高血圧による影響よりも、アルドステロンの直接的影響によるものと考えられる。

このことはヒトの臨床病態に重要な示唆を与える。すなわち、アルドステロン症においては、たとえ血圧がコントロールされていようともアルドステロン過剰の状態では心臓の線維化が進行する可能性があり、アルドステロン作用を遮断するスピロラクトンやエプレレノンなどの抗アルドステロン薬による治療が望ましいと考えられる。

Cry KO マウスの血圧日内変動の解析は興味深い結果をもたらした。Cry KO マウスは光の情報のない恒暗条件で飼育すると血圧、脈拍、行動の日内リズムを消失した。これはCry KOマウスの生体時計機能の消失を示している。一方、Cry KOマウスを12時間ごとの明暗条件で飼育すると弱いながらも有意な日内リズムが出現した。これは、生体時計を介さない光によるマスキング現象によって引き起こされたと考えられる。すなわち、生体時計機能が消失していても、適切に光を照射することによって生体リズムを生み出すことができる可能性が示唆された。

光によって産生された生体リズムが臓器に及ぼす影響を解析した。前述のように Cry KO マウスでは心臓に著明な線維化をきたす。この線維化の程度を恒暗条件と明暗条件で比較した。その結果、明暗条件において光によって見かけ上のリズムを生み出すことによって、リズムのない恒暗条件と比較して明らかに心筋線維化は軽度であった。このことは、アルドステロンが高値の場合、生体リズムの有無によって臓器障害に差が出ることを示唆しており、また光によって生体リズムを回復することにより臓器障害が軽減される可能性を示している。

## 5. 今後の課題

光を用いた日内リズムの誘導が食塩感受性高血圧に対してこれまでと全く異なる概念の新しい治療法を提供する

ことが期待される。

しかし、これらで得られた結果はすべて動物モデルによって得られたものであり、これらをただちにヒトの臨床病態に当てはめることはできない。今後、ヒトアルドステロン症の臨床症例において、生体リズムをモニターし、さらに生体リズムを調整する手段を開発することが重要になる。

これらの研究成果は、認知症患者の昼夜逆転や国際化社会で問題となる時差に対する治療にも応用される可能性があり、今後の進展が期待される。

## 文献など

1. Nonaka, H., Emoto N., Ikeda K., Fukuya, H., Saifur R. M., Raharjo, S. B., Yagita, K., Okamura, H., and Yokoyama, M. (2001) Angiotensin II induces circadian gene expression of clock genes in cultured vascular smooth muscle cells. *Circulation* 104, 1746-1748.
2. Mohri T., Emoto N., Nonaka H., Fukuya H., Yagita K., Okamura H., Yokoyama M. (2003) Alterations of circadian expressions of clock genes in Dahl salt-sensitive rats fed a high-salt diet. *Hypertension* 42, 189-194.
3. Rohman MS, Emoto N, Nonaka H, Okura R, Nishimura M, Yagita K, van der Horst GTJ, Matsuo M, Okamura H, Yokoyama M. (2005) Circadian Clock Genes Directly Regulate Expression of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> Exchanger NHE3 in the Kidney. *Kidney International* 67, 1410-1419.
4. Doi M, Takahashi Y, Komatsu R, Yamazaki F, Yamada H, Haraguchi S, Emoto N, Okuno Y, Tsujimoto G, van der Horst GTJ, Okamura H. Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6. (2010) *Nature Med.* 16, 67-74.
5. Machnik A, Neuhofer W, Jantsch J, Dahlmann A, Tammela T, Machura K, Park JK, Beck FX, Müller DN, Derer W, Goss J, Ziemer A, Dietsch P, Wagner H, van Rooijen N, Kurtz A, Hilgers KF, Alitalo K, Eckardt KU, Luft FC, Kerjaschki D, Titze J. Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism. (2009) *Nat Med.* 15:545-552

## Molecular Analysis of Mice with Salt-Sensitive Hypertension Due to Lack of Biological Clock

Noriaki Emoto, Keiko Yagi, Kazuhiko Nakayama

Kobe Pharmaceutical University

### Summary

**Background:** Cry-deficient (Cry KO) mice are known to have high aldosterone levels which present salt-sensitive hypertension. We aimed to investigate our hypothesis that we could prevent the organ damage by restoring the circadian rhythm using Cry-deficient mice that present salt-sensitive hypertension due to increased endogenous aldosterone.

**Methods:** We used 8-12 week Cry-deficient mice and wild type littermates. Lymphatic capillary density and macrophage number in the skin were measured by immunostaining using LYVE-1 and F4/80 antibodies, respectively. Telemetry system was used to monitor blood pressure, heart rate, and activity for 24 hours continuously. Histological analysis was performed using heart samples to observe the cardiac fibrosis. Real-time PCR analysis for TGF- $\beta$  and CTGF was done by using RNA prepared from heart samples.

**Results:** Both wild-type and Cry-KO mice showed increased lymphatic capillary density and macrophage number. Telemetry analysis revealed that wild-type mice showed clear circadian variation in blood pressure, heart rates, and activities. Diurnal variations of blood pressure, heart rates and activities in Cry KO mice were not observed in constant darkness condition. However, when Cry KO mice were kept in 12-hour light-dark cycles, weak but statistically significant circadian rhythm in blood pressure was observed. Histological analysis showed that apparent cardiac fibrosis was noted in Cry KO mice. Interestingly, cardiac fibrosis in constant darkness condition is more severe as compared with that in light-dark cycle. These results suggest that circadian rhythm induced by the light in Cry KO mice is beneficial for preventing the cardiac damages.

**Conclusion:** Our results suggest that restoring the circadian rhythm by light could prevent the cardiac damage, and that it may provide novel therapeutic approach for human pathology.