

Na⁺/Ca²⁺交換輸送体による血圧・心拍数の日内変動制御機構の解明

岩本 隆宏, 根本 隆行, 喜多 知, 篠田 康晴

福岡大学医学部薬理学

概要 ヒトを含む哺乳類の血圧や心拍数は概日リズムを示すことが知られており, このリズム異常は高血圧や虚血性心疾患などの発症要因になることが示唆されている。

最近, 我々は, 体内時計の中核である視交叉上核(SCN)の概日リズム形成には細胞内 Ca²⁺振動(オシレーション)が中心に関わっており, その Ca²⁺制御には Na⁺/Ca²⁺交換輸送体(NCX)が重要な役割を果たしていることを見出した。実際, SCN に発現する NCX 分子種の NCX2 欠損マウス(NCX2^{-/-})および NCX2/NCX3 二重欠損マウス(NCX2^{-/-};NCX3^{-/-})では概日リズムの異常により, 行動リズムの遅延や乱れが観察された。

NCX は, 3 個の Na⁺と1個の Ca²⁺を交換輸送する細胞膜トランスポーターであり, 細胞内 Ca²⁺ホメオスタシスの維持や Ca²⁺シグナルの形成に関わっている。本研究では, 各種 NCX 欠損マウス(全身性・臓器特異的)を用いて, 血圧・心拍数の概日リズム制御における NCX の役割について検討した。

NCX1^{-/-}マウスおよび NCX2^{-/-}マウスを用いて, 血圧の概日リズムを解析したところ, 野生型コントロールマウスと同等であることが分かった。また, 血管平滑筋特異的 NCX1 欠損マウスでは遺伝子欠損誘導により血圧の低下が観察されたが, 血圧の概日リズムは野生型マウスとほぼ同等であった。一方, NCX3^{-/-}マウスでは, 活動期での血圧上昇が野生型コントロールマウスに比べて抑制されており, また, 常暗条件下での活動期の開始が少し早まる傾向を示した。このように, NCX3^{-/-}マウスでは血圧の概日リズム異常が認められた。NCX3^{-/-}マウスで認められた血圧の概日リズム異常は, 体内時計の中核(視交叉上核)における NCX3 の細胞内 Ca²⁺制御の重要性を示唆している。今後さらに, NCX3^{-/-}マウスを用いた病態モデル実験より, 概日リズム異常と循環器疾患との関連性について検討していきたいと考えている。

1. 研究目的

ヒトを含む哺乳類の血圧や心拍数は概日リズムを示すことが知られており, このリズム異常は高血圧や虚血性心疾患などの発症要因になることが示唆されている。最近, 我々は, 体内時計の中核である視交叉上核(SCN)の概日リズム形成には細胞内 Ca²⁺振動(オシレーション)が中心に関わっており, その Ca²⁺制御には Na⁺/Ca²⁺交換輸送体(NCX)が重要な役割を果たしていることを見出した¹⁾。具体的には, SCN に発現する NCX 分子種の NCX2 欠損マウス(NCX2^{-/-})および NCX2/NCX3 二重欠損マウス(NCX2^{-/-};NCX3^{-/-})では概日リズムの異常により, 行動リズムの遅延や乱れが観察された¹⁾。NCX は, 3 個の Na⁺と1

個の Ca²⁺を交換輸送する細胞膜トランスポーターであり, 細胞内 Ca²⁺ホメオスタシスの維持や Ca²⁺シグナルの形成に関わっている^{2,3)}。哺乳類には 3 種の NCX 分子種が存在しており, NCX1 は心臓, 血管, 腎臓, 脳に多く発現し, NCX2 と NCX3 は主に脳, 骨格筋に発現している。近年, 特異的な NCX 阻害薬が開発され, また各種 NCX 遺伝子改変マウスが作製されて, NCX の生理機能や病態学的役割が生体・臓器レベルで明らかにされつつある^{3,4)}。我々は, NCX 研究を長期にわたり継続的に推進しており, これまでに, 食塩感受性高血圧の発症には動脈平滑筋細胞の NCX1 を介する Ca²⁺流入が主要な機序となること⁵⁾, また, 低酸素誘発肺高血圧の発症には肺小動脈の NCX1

が関与することを明らかにしてきた⁶⁾。さらに最近、心筋特異的NCX1欠損マウスを作出したところ、急性の突然死が引き起こされることを見出した。本研究では、これまでに得られた知見を発展させ、独自に作製した各種NCX1欠損マウス(全身性・臓器特異的)を用いて、血圧・心拍数の日内変動制御機構におけるNCXの役割について検討した。本研究の成果は、概日リズム異常を要因とする循環器疾患の予防・治療法の開発に繋がることが期待される。

2. 研究方法

2.1 実験動物

実験動物として、作出した各種NCX1欠損マウス(全身性・臓器特異的)および同週齢の野生型コントロールマウス(C57BL/6J系統)を用いた。マウスは、一定温度(24±1°C)および湿度(55±5%)、12時間の明暗サイクルで飼育した。餌および水は自由に摂取させた。

全身性NCX1欠損マウス(NCX1^{-/-}, NCX2^{-/-}, NCX3^{-/-})^{1,7,8,9)}および臓器特異的欠損構築用のNCX1^{fllox/fllox}マウス(Fig.1)は、ES細胞を用いた相同組換え法により作製した。臓器特異的NCX1欠損マウスとしては、2種のタモキシフェン

誘導性Creマウス(Myh11-CreERT2, Myh6-CreEsr1)をNCX1^{fllox/fllox}マウスと交配することにより、血管平滑筋特異的NCX1欠損マウス(NCX1^{fllox/fllox};Myh11-CreERT2)(Fig.1)および心筋特異的NCX1欠損マウス(NCX1^{fllox/fllox};Myh6-CreEsr1)を作出した。

2.2 テレメトリー法による血圧・心拍数の概日リズム解析

慢性実験テレメトリー自動計測システム(プライムテック株式会社)を用いて、血圧測定用送信器(TA11PA-C10)をマウス皮下に埋め込み、そのカテーテルを頸動脈に挿入して血圧(収縮期血圧(SBP), 拡張期血圧(DBP), 平均血圧(MBP))および心拍数(HR)を経時的にモニターした。外科処置したマウスを十分に回復させた後、明暗条件下(各12時間)、引き続いて恒常暗条件下(24時間)で、血圧・心拍数の概日リズムを解析した。

2.3 統計処理

実験データはmeans±SEMで表示した。有意差検定はtwo-way ANOVA (Holm-Sidak post hoc tests)を用い、P<0.05の場合に有意と判定した。

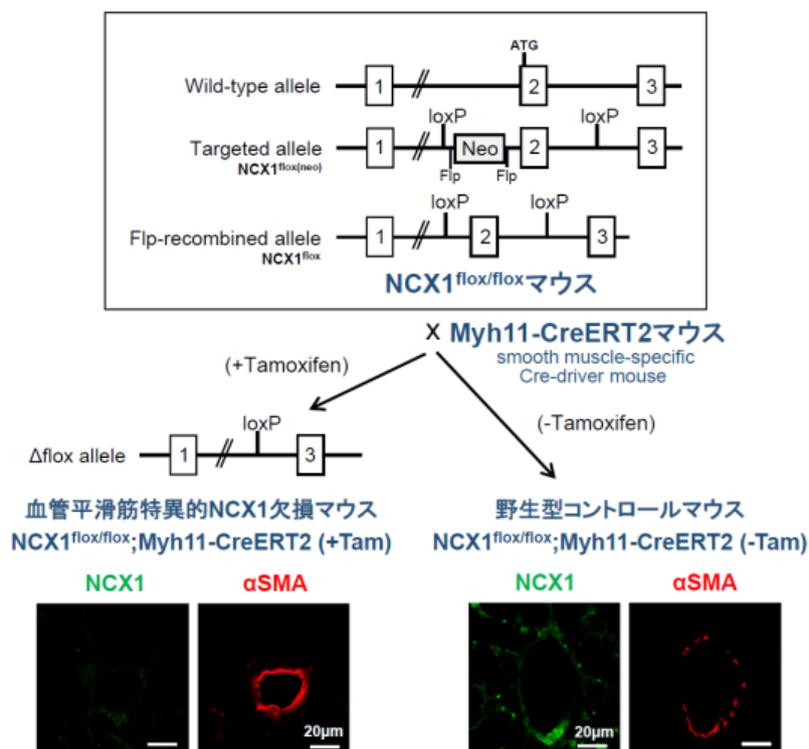


Fig.1 血管平滑筋特異的NCX1欠損マウスの作製および蛍光免疫染色(抗NCX1抗体, 抗αsmooth muscle actin抗体)による血管平滑筋特異的NCX1欠損の確認

3. 研究結果

3.1 全身性 NCX 欠損マウスの血圧・心拍数の

概日リズム解析(中枢制御の検討)

本研究では、NCX による血圧・心拍数の日内変動制御機構を解析するため、まず SCN の中枢制御の観点から、全身性 NCX1/2/3 欠損マウスの血圧・心拍数の概日リズムについてテレメトリー法により検討した。全身性 NCX1 欠損マウスおよび全身性 NCX2 欠損マウスは、ホモ欠損が胎生致死となるため、それぞれのヘテロ欠損マウス (NCX1^{+/-}, NCX2^{+/-}) を用いた。また、全身性 NCX3 欠損マウスは交配維持可能であるホモ欠損マウス (NCX3^{-/-}) を用いた。

NCX1^{+/-}マウスおよび NCX2^{+/-}マウスについて、明暗条件下・恒常暗条件下で平均血圧の概日リズムを解析したところ、野生型コントロールマウスと同等であることが分かった (Fig.2)。また、NCX1^{+/-}マウスおよび NCX2^{+/-}マウスの血圧・心拍数レベルも野生型コントロールマウスと差が認められなかった。

一方、NCX3^{-/-}マウスでは、暗条件下(活動期)での血圧上昇が野生型コントロールマウスに比べて抑制されており、また、常暗条件下での活動期の開始が少し早まる傾向を示した (Fig.3)。このように、全身性 NCX3^{-/-}マウスでは血圧の概日リズム異常が認められた。

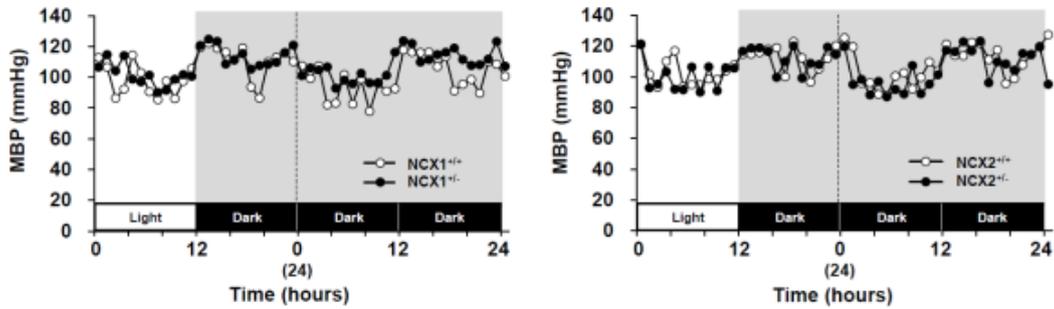


Fig. 2 NCX1^{+/-}マウスおよび NCX2^{+/-}マウスの平均血圧 (MBP) の概日リズム (代表例)
(明暗条件下・恒常暗条件下でのテレメトリー測定)

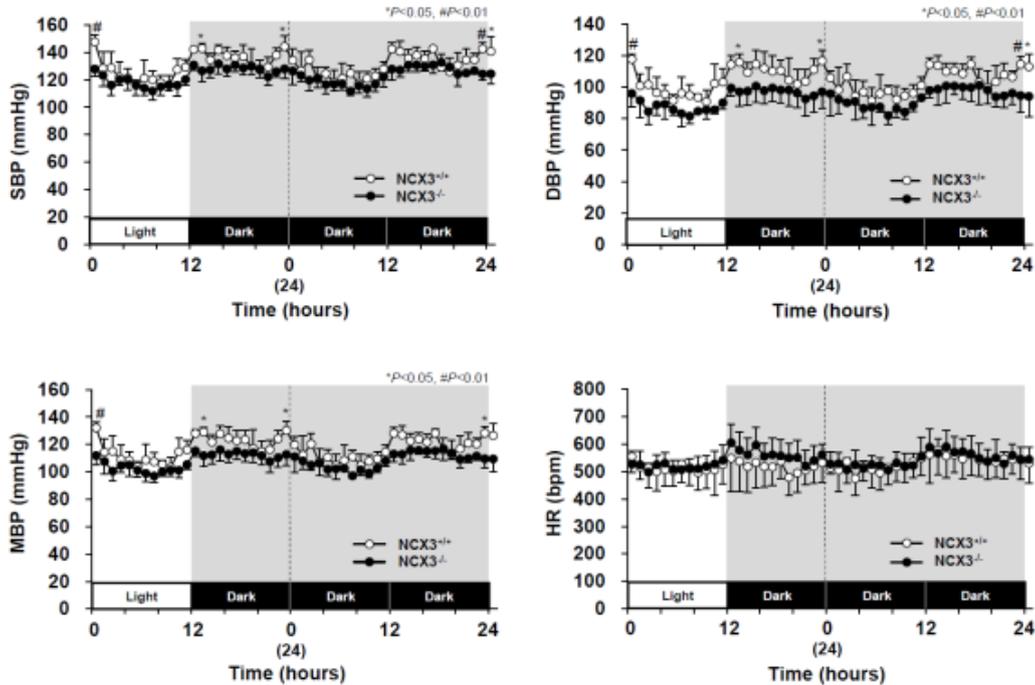


Fig. 3 NCX3^{-/-}マウスの収縮期血圧 (SBP), 拡張期血圧 (DBP), 平均血圧 (MBP) および心拍数の概日リズム (明暗条件下・恒常暗条件下でのテレメトリー測定)

3. 2 血管平滑筋・心筋特異的 NCX1 欠損マウスの 血圧・心拍数の概日リズム解析(末梢制御の検討)

NCX1 は血管平滑筋や心筋に高発現しており, SCN とは独立して末梢時計遺伝子の概日リズムを調節している可能性がある。そこで次に, 末梢制御の観点から, 血管平滑筋・心筋特異的 NCX1 欠損マウスの血圧・心拍数の概日リズムについてテレメトリー法により検討した。

なお, 心筋特異的 NCX1 欠損マウス (NCX1^{flox/flox};Myh6-CreEsr1 (+Tx)) ではタモキシフェン投与の遺伝子欠損誘導により突然死が引き起こされたため, 概日リズムの解析ができなかった。血管平滑筋特異的 NCX1 欠損マウス (NCX1^{flox/flox};Myh11-CreERT2 (+Tx)) では, タモキシフェン投与の遺伝子欠損誘導により血圧の低下が観察された。しかしながら, 明暗条件下・恒常暗条件下の血圧パラメータの概日リズムを解析

したところ, 野生型コントロールマウス (-Tx) とほぼ同等であることが分かった (Fig.4)。

3. 3 NCX1/2/3 欠損マウスの概日リズム異常と 肺高血圧発症の関連性の解析(病態機序の検討)

概日リズム異常を要因とする循環器疾患の病態機序を検討する目的で, NCX1/2/3 欠損マウスの概日リズム異常と肺高血圧症の関連性について, 低酸素誘発肺高血圧モデルを用いて解析を進めている。現時点のデータでは, 全身性 NCX1 欠損マウス (NCX1^{-/-}) および血管平滑筋特異的 NCX1 欠損マウス (NCX1^{flox/flox};Myh11-CreERT2 (+Tx)) において, 肺高血圧症の発症が抑制されるという結果が得られている。今後, 全身性 NCX3 欠損マウス (NCX3^{-/-}) を用いた病態モデル実験を検討していく予定である。

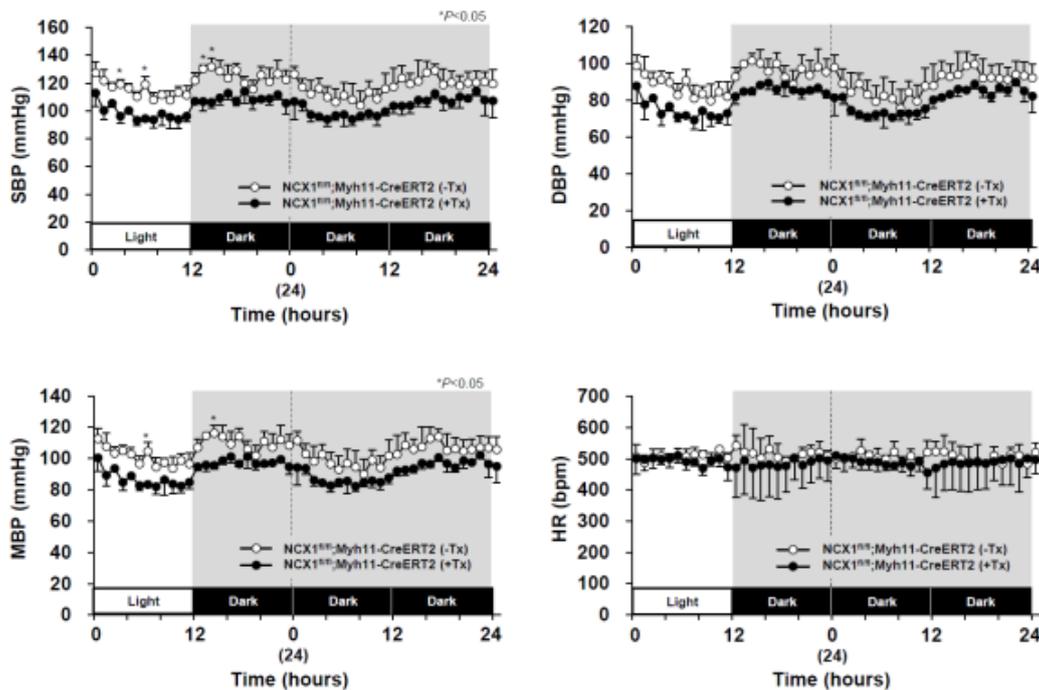


Fig. 4 血管平滑筋特異的 NCX1 欠損マウスの収縮期血圧 (SBP), 拡張期血圧 (DBP), 平均血圧 (MBP) および心拍数の概日リズム (明暗条件下・恒常暗条件下でのテレメトリー測定)

4. 考察

我々は、体内時計の中枢である SCN の概日リズム形成には細胞内 Ca^{2+} オシレーションが中心的に関わっており、その Ca^{2+} 制御には NCX が重要な役割を果たしていることを報告している¹⁾。実際、SCN に発現する NCX 分子種の NCX2 欠損マウス(NCX2^{-/-})および NCX2/NCX3 二重欠損マウス(NCX2^{-/-};NCX3^{-/-})では概日リズムの異常により、行動リズムの遅延や乱れが観察された¹⁾。したがって、本研究で観察した全身性 NCX3 欠損マウス(NCX3^{-/-})の血圧の概日リズム異常は、SCN での概日リズム異常(NCX3 機能不全による SCN の Ca^{2+} 制御異常)に基づくものと推察される。一方、全身性 NCX1/NCX2 欠損マウス(NCX1^{-/-};NCX2^{-/-})では血圧の概日リズムが正常であったが、今後、SCN 特異的な NCX1/NCX2 欠損マウスを用いた詳細な検討がさらに必要であると考えている。

NCX1 は血管平滑筋や心筋に高発現している。そこで、NCX1 の末梢時計遺伝子制御の観点から、血管平滑筋特異的 NCX1 欠損マウスの血圧の概日リズムについて検討を行ったが、血圧の概日リズムは正常であった。今回、心筋特異的 NCX1 欠損マウスの血圧の概日リズムについては解析できなかったが、NCX1 の血管系時計遺伝子による血圧の概日リズム制御は検出できなかった。したがって、NCX3 による SCN の細胞内 Ca^{2+} 調節が血圧の概日リズム制御の重要な機序であると考えられた。現在、概日リズム異常を要因とする循環器疾患の病態機序を検討する目的で、概日リズム異常を示す NCX3 欠損マウス(NCX3^{-/-})および他の概日リズム異常マウスを用いて低酸素誘発肺高血圧モデル実験を進めている。今後、これらの研究成果を基にして、概日リズム異常を要因とする循環器疾患の予防・治療法の開発に繋がることを期待している。

5. 今後の課題

本研究から、血圧の概日リズム制御における NCX3 による SCN の細胞内 Ca^{2+} 調節の重要性が示唆された。今後、SCN 特異的 NCX1/2/3 遺伝子欠損マウスを用いた *in vivo/in vitro* 実験により、この分子機序を解明していきたいと考えている。

6. 文献

1. Kon N, Wang HT, Kato YS, Uemoto K, Kawamoto N, Kawasaki K, Enoki R, Kurosawa G, Nakane T,

Sugiyama Y, Tagashira H, Endo M, Iwasaki H, Iwamoto T, Kume K, Fukada Y. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger mediates cold Ca^{2+} signaling conserved for temperature-compensated circadian rhythms. *Sci Adv.* 7(18):eabe8132, 2021.

2. Iwamoto T. Sodium-calcium exchange inhibitors: therapeutic potential in cardiovascular diseases. *Future Cardiol.* 1(4):519-529, 2005.

3. 岩本隆宏, 田頭秀章, 喜多紗斗美 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交換輸送体の構造・機能の解明から治療への応用 *医学のあゆみ* 271(1):42-48, 2019.

4. Iwamoto T, Watanabe Y, Kita S, Blaustein MP. $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange inhibitors: a new class of calcium regulators. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets* 7:188-198, 2007.

5. Iwamoto T, Kita S, Zhang J, Blaustein MP, Arai Y, Yoshida S, Wakimoto K, Komuro I, Katsuragi T. Salt-sensitive hypertension is triggered by Ca^{2+} entry via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger type-1 in vascular smooth muscle. *Nat Med.* 10(11):1193-1199, 2004.

6. Nagata A, Tagashira H, Kita S, Kita T, Nakajima N, Abe K, Iwasaki A, Iwamoto T. Genetic knockout and pharmacologic inhibition of NCX1 attenuate hypoxia-induced pulmonary arterial hypertension. *Biochem Biophys Res Commun.* 529(3):793-798, 2020.

7. Gotoh Y, Kita S, Fujii M, Tagashira H, Horie I, Arai A, Uchida S, Iwamoto T. Genetic knockout and pharmacologic inhibition of NCX2 cause natriuresis and hypercalciuria. *Biochem Biophys Res Commun.* 456(2):670-675, 2015.

8. Moriguchi S, Kita S, Fukaya M, Osanai M, Inagaki R, Sasaki Y, Izumi H, Horie K, Takeda J, Saito T, Sakagami H, Saido TC, Iwamoto T, Fukunaga K. Reduced expression of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchangers is associated with cognitive deficits seen in Alzheimer's disease model mice. *Neuropharmacology.* 131:291-303, 2018.

9. Moriguchi S, Kita S, Inagaki R, Yabuki Y, Sasaki Y, Ishikawa S, Sakagami H, Iwamoto T, Fukunaga K. Aberrant amygdala-dependent cued fear memory in $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger 1 heterozygous mice. *Mol Neurobiol.* 56(6):4381-4394, 2019.

Circadian Regulation of Blood Pressure and Heart Rate by Na⁺/Ca²⁺ Exchanger

Takahiro Iwamoto, Takayuki Nemoto, Tomo Kita, Yasuharu Shinoda

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Fukuoka University

Summary

In mammals, including humans, blood pressure and heart rate are known to exhibit a circadian rhythm, and it has been suggested that abnormal circadian rhythm is a factor in the onset of hypertension and ischemic heart disease. Recently, we have found that Na⁺/Ca²⁺ exchanger-mediated intracellular Ca²⁺ oscillation is primarily involved in the formation of circadian rhythm in the suprachiasmatic nucleus (SCN), which is the central clock. In fact, NCX2-deficient mice (NCX2^{-/-}) and NCX2/3 double-deficient mice (NCX2^{-/-};NCX3^{-/-}) exhibited disturbed behavioral rhythms due to abnormal circadian rhythms. NCX is a bidirectional transporter that is controlled by membrane potential and transmembrane gradients of Na⁺ and Ca²⁺, and is involved in the maintenance of intracellular Ca²⁺ homeostasis and the formation of Ca²⁺ signals. In this study, we examined the role of NCX in circadian rhythm control of blood pressure and heart rate using various NCX-deficient mice (systemic and organ-specific). In systemic NCX1^{+/-} and NCX2^{+/-} mice, the circadian rhythm of blood pressure was normal, comparable to wild-type control mice. In vascular smooth muscle-specific NCX1-deficient mice, a significant decrease in blood pressure was observed, but the circadian rhythm of blood pressure was normal. On the other hand, in systemic NCX3^{-/-} mice, enhanced blood pressure was significantly suppressed during the active phase compared to wild-type control mice, and the onset of the active phase under the dark condition tended to be slightly earlier. Thus, NCX3^{-/-} mice exhibited abnormal circadian rhythm of blood pressure. This result indicates that NCX3 plays an important role in maintaining normal circadian rhythm of blood pressure, suggesting the importance of NCX3-mediated Ca²⁺ signaling in the circadian clock center (SCN). Further studies on disease models using NCX3^{-/-} mice will provide new insights into the relationship between circadian rhythm abnormalities and the onset of cardiovascular diseases.