

## 塩分摂取のタイミングと概日血圧リズム

木内 謙一郎<sup>1</sup>, 鳥光 拓人<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 慶應義塾大学医学部腎臓内分泌代謝内科, <sup>2</sup> 慶應義塾大学予防医療センター

### 概要

塩分吸収に関わる遺伝子の概日リズムが鉱質コルチコイド受容体(MR)と時計遺伝子 *Bmal1* によってどのように制御されているのかを検討するため, 8~12 週齢の雄腸管特異的 *Bmal1* 欠損マウス, 雄腸管特異的 MR 欠損マウス, ならびに雄対照群マウスの大腸組織, 血清を 4 時間毎 24 時間(ZT0, 4, 8, 12, 16, 20, ZT:Zeitgeber Time, ZT0 は明期の始まり, ZT12 は暗期の始まり)にわたり採取した。

大腸に時計遺伝子が発現し, 肝臓などの他臓器と同様の位相で概日リズムがあることが分かった。*Bmal1* 標的遺伝子発現に概日リズムが観察され, 腸管特異的 *Bmal1* 欠損マウスではリズムが消失あるいは減弱していた。更に, MR 標的遺伝子発現が, 腸管特異的 *Bmal1* 欠損マウスではリズムの減弱や発現の低下が認められたことから, MR 標的遺伝子の一部は *Bmal1* によっても調節されている可能性が示唆されている。一方で, 腸管特異的 MR 欠損マウスでは時計遺伝子発現の変化はほとんど見られず, MR 標的遺伝子発現のリズムが消失あるいは減弱していた。

血清中のアルドステロン濃度やコルチコステロン濃度には日内変動が見られたが, MR タンパク質発現の日内変動は観察されなかった。以上のことから, MR 標的遺伝子の日内変動は, アルドステロンの日内変動や大腸上皮細胞局所の末梢時計によって駆動されている可能性が示唆された。現在, 腸管特異的 *Bmal1* 欠損, 腸管特異的 MR 欠損, 対照群マウスの腸管上皮細胞の RNA を用いて RNA-seq を行い, 腸管 *Bmal1* および MR が駆動する腸管遺伝子発現リズムを JTK Cycle 解析(統計学的に振動を解析する手法)を用いて, 網羅的に解析を行っている。*Bmal1* と MR による協調的な転写調節が, 光と塩分摂取のタイミングによってどのように制御されているのかを明らかにするため, 8~12 週齢の雄野生型マウス(C57BL/6)に対して高食塩食と低食塩食を用いて, night time feeding(暗期のみ食餌を与える)と day time feeding(明期のみ食餌を与える)を今後行う予定である。

### 1. 研究目的

内分泌学における重要な概念の一つとして, 臓器間ネットワークによる恒常性の維持が挙げられる。昼夜の変化に対する予測的適応機構として, 概日時計は概日リズムの制御に重要な分子であり, 地球の自転に伴う光の明暗による調節を受けながら, 約 24 時間の行動, 代謝, 生理反応のリズムを生み出している。哺乳類では, 視床下部の視交叉上核に存在する中枢時計が光に同調し, 液性因子や神経因子を介して末梢組織の概日時計を同調する。一方で, 末梢組織の概日リズムは中枢時計による制御の

他に, 食事にも同調する。概日時計は時計遺伝子による転写翻訳フィードバックループにより機能しており, 明期に CLOCK/BMAL1 が自らの抑制因子である Period(Per) や Cryptochrome(Cry)を含む標的遺伝子の転写を促進し, 暗期に PER, CRY タンパク質により転写が抑制される。*Cry1,2* 欠損マウスは塩分感受性高血圧を呈する<sup>1)</sup>。

本研究者は *Bmal1* を全身で欠損した概日リズムをもたないマウスに, 肝臓特異的に内因性 *Bmal1* を再構築し, 末梢組織の概日リズムは組織固有の概日時計の自律的な振動だけでなく, 他臓器の概日時計が駆動する非自律

的な振動により生じることを見出し、臓器連関における概日リズム同調の重要性を報告した<sup>2)</sup>。また、本研究者は空腹により概日時計の転写活性が抑制され、空腹に関わる転写因子が活性化し、概日時間特異的に空腹に応答する遺伝子発現調節が達成されることを明らかにした<sup>3)</sup>。これらの知見から、代謝関連転写因子と概日時計の振動が協調的に転写調節を行うことで、クロマチン上で組織の時間情報と遠隔臓器の空間的代謝環境情報が統合され、栄養環境に適応することが示唆されている。そこで、概日時計と鉱質コルチコイド受容体(MR)により形成される大腸概日リズムが、血圧の日内変動や塩分代謝調節へもたらす意義を検討する本研究の着想に至った。腸管特異的にMRを欠損すると、食塩感受性高血圧が抑制されることから、腸管における塩分吸収や全身の血圧調節において、腸管MRが重要であることが分かっている<sup>4)</sup>。腸管のナトリウム輸送体発現には概日時計の関与も示唆されており、塩分摂取のタイミングや塩分感受性高血圧の病態を理解する上で、腸管における概日時計とMRの協調性の探索は重要であると考えられる。副腎におけるアルドステロン合成酵素である3 $\beta$ -HSDも副腎局所の概日時計により調節されており、血中アルドステロン濃度にも概日リズムがあることが知られている。したがって、大腸におけるMRの活性化にも概日リズムが存在することが想定される。一方で、概日時計とホルモン応答転写因子であるMRによる、クロマチンでの協調的な遺伝子発現調節の詳細な機序は明らかになっていない。本研究では、大腸概日リズムを介した血圧・塩分調節機構の探索と臓器障害への関与の解明を目標とする。

## 2. 研究方法

### 2.1 大腸におけるMRおよび標的遺伝子の概日発現リズムの検討

副腎皮質からのアルドステロン分泌には概日リズムが存在するが<sup>1)</sup>、大腸MRの発現および活性が概日リズムを示すか、明らかになっていない。そこで、8~12週齢の雄腸管特異的MR欠損(*Villin-Cre;Nr3c2<sup>fllox/fllox</sup>*)マウス、及び雄対照群マウスの大腸組織を4時間毎24時間(ZT0, 4, 8, 12, 16, 20, ZT:Zeitgeber Time, ZT0は明期の始まり

り、ZT12は暗期の始まり)にわたり採取する。血清中のアルドステロン濃度を測定するとともに、大腸よりRNA、タンパク質を抽出し、MRのタンパク質発現をウェスタンブロット法(N=3)で解析するとともに、MR標的遺伝子発現の概日リズムをReal-time qPCR(N=4)にて検討する。我々の予備検討において、大腸に時計遺伝子が発現し、肝臓などの他臓器と同様の位相で概日リズムがあることが分かっている(Fig. 1)。また、*Sgk1*, *Enac $\beta$* , *Enac $\gamma$* といった、MR標的遺伝子発現にも概日リズムが観察され、腸管特異的MR欠損マウスではリズムが消失あるいは減弱していたことから、MR活性に概日リズムが存在する可能性が示唆されている(Fig. 2)。本検討で大腸MR発現および機能に概日リズムが存在するかどうかを明らかにする。

### 2.2 大腸におけるMRと概日時計による概日遺伝子発現リズムの検討

2.1の検討より、MR標的遺伝子に概日発現リズムが存在する可能性が示唆されたが、塩分吸収に関わる遺伝子の概日リズムがBMAL1によっても制御されている可能性がある。腸管における概日時計の振動が、どのように標的遺伝子の概日遺伝子発現リズムを駆動するのかが検討するため、8~12週齢の雄腸管特異的*Bmal1*欠損(*Villin-Cre;Bmal1<sup>fllox/fllox</sup>*)マウス、ならびに雄対照群マウスの大腸組織、血清を4時間毎24時間(ZT0, 4, 8, 12, 16, 20)にわたり採取する。血清中のアルドステロン濃度を測定するとともに、腸管特異的*Bmal1*欠損マウスの腸管上皮細胞(IEC)核分画のBMAL1およびMR蛋白発現の概日リズムを検討し、大腸におけるMRおよびBMAL1の相互作用の可能性について検討する。次に、腸管特異的*Bmal1*欠損、腸管特異的MR欠損、対照群マウスのIECのRNAを用いてRNA-seq(N=3)を行い、腸管BMAL1およびMRが駆動する腸管遺伝子発現リズムをJTK Cycle解析(統計学的に振動を解析する手法)を用いて、網羅的に解析する。また、BMAL1とMRによるChIP-seq(N=2)をZT8, ZT20の2つのタイムポイントで行い、BMAL1とMRの腸管上皮細胞のクロマチン結合を網羅的に解析する。RNA-seqの結果と合わせてBMAL1とMRによる転写調節の協調性を明らかにする。

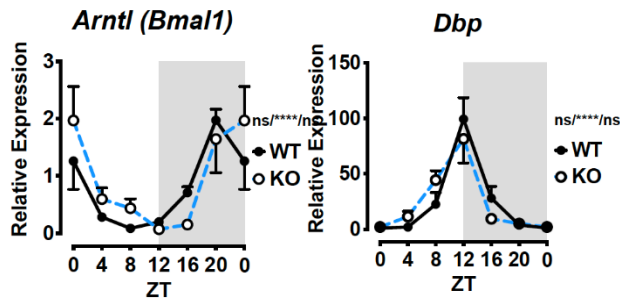


Fig. 1

### 2. 3 光や塩分摂取のタイミングに対する大腸 MR と概日時計の応答性の検討

上記より明らかとなった BMAL1 と MR による協調的な転写調節が、光と塩分摂取のタイミングによってどのように制御されているのかを明らかにするため、8~12 週齢の雄性野生型マウス (C57BL/6) に対して高食塩食と低食塩食を用いて、night time feeding (暗期のみ食餌を与える) と day time feeding (明期のみ食餌を与える) を 4 週間行い、マウスの副腎、腸管組織、血清を 4 時間毎 24 時間 (ZT0, 4, 8, 12, 16, 20) にわたり採取する。血清中のアルドステロン濃度の日内変動を検討するとともに、大腸より RNA、タンパク質を抽出し、IEC 核分画 BMAL1 と MR のタンパク質発現の概日リズムをウェスタンブロット法 (N=3) で解析する。また、RNA-seq (N=3) を行い、BMAL1 と MR 標的遺伝子発現の概日リズムが、光や塩分摂取のタイミングによってどのように変化するのか、JTK Cycle 解析を用いて、網羅的に解析する。以上の検討から、副腎のアルドステロン、大腸の概日時計および MR の光や塩分摂取のタイミングに対する応答性を明らかにする。

### 2. 4 大腸概日時計の臓器自律性と塩分調節の検討

臓器に発現する概日リズムは、臓器固有の概日時計の自律的な振動によりもたらされるだけでなく、他臓器由来の他律的な振動により生じることを本研究者は報告した<sup>2)</sup>。大腸概日時計が臓器自律的に駆動する振動と塩分調節について検討するため、8~12 週齢の腸管特異的 *Bmal1* 再構築マウス (*Villin<sup>Cre/+</sup>;Bmal1<sup>stopFL/stopFL</sup>*)、*Bmal1* 全身欠損マウス (*Villin<sup>+/+</sup>;Bmal1<sup>stopFL/stopFL</sup>*)、雄性対照群マウス (*Villin<sup>Cre/+</sup>;Bmal1<sup>+/+</sup>*) の大腸組織、副腎、血清を 4 時間毎 24 時間 (ZT0, 4, 8, 12, 16, 20) にわたり採取する。血清中のアルドステロン濃度の日内変動を検討するとともに、大腸より RNA、タンパク質を抽出し、IEC 核分画 BMAL1 と

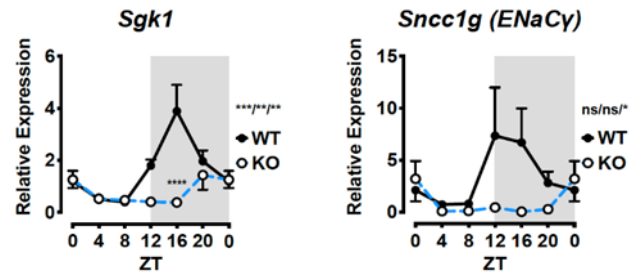


Fig. 2

MR のタンパク質発現の概日リズムをウェスタンブロット法 (N=3) で解析する。また、RNA-seq (N=3) を行い、大腸概日時計が自律的に駆動する概日リズムにおける塩分調節の意義を検討する。以上の検討から、大腸の塩分調節と、概日リズムの自律性と他律性の分界を明らかにする。

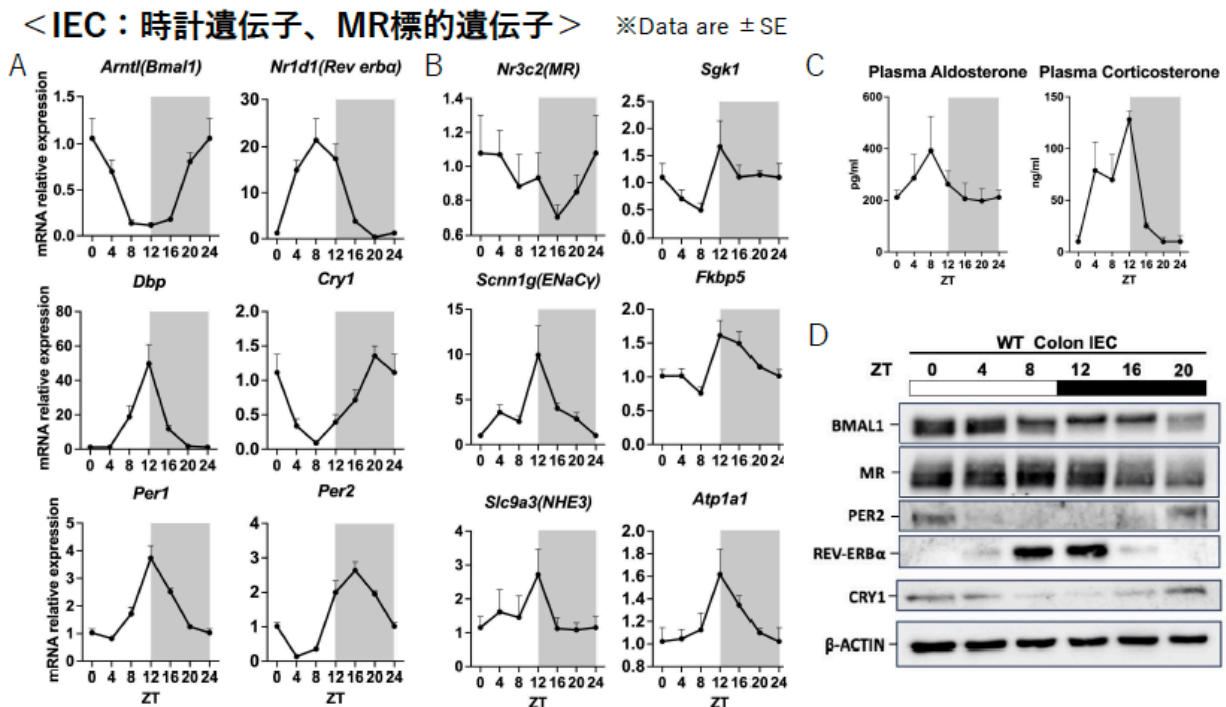
### 2. 5 食塩摂取のタイミングと高血圧の検討

BMAL1 と MR による腸管概日リズム制御が、どのように食塩摂取のタイミングと血圧調節に関与するのかを検討するため、8~12 週齢の雄性腸管特異的 MR 欠損マウス、及び雄性対照群マウスに対して、DOCA (酢酸デオキシコルチコステロン) を皮下埋込み型ポンプより投与する。8% 高食塩食負荷を 4 週間、自由摂食群、night time feeding 群と day time feeding 群に分けて血圧を比較検討する。血圧は、テレメトリーを頸動脈より挿入し、連続的に測定する。以上の検討から、塩分摂取のタイミングが、腸管における塩分吸収を介して、血圧へ影響することを明らかにする。

## 3. 研究結果

### 3. 1 大腸における MR および標的遺伝子の概日発現リズムの検討

副腎皮質からのアルドステロン分泌には概日リズムが存在するが、大腸 MR の発現および活性が概日リズムを示すか、明らかになっていない。そこで、8~12 週齢の雄性腸管特異的 MR 欠損マウス、及び雄性対照群マウスの大腸組織を 24 時間 (ZT0, 4, 8, 12, 16, 20, ZT:Zeitgeber Time; ZT0 は明期の始まり, ZT12 は暗期の始まり) にわたり採取した。血清中のアルドステロン濃度を測定するとともに、大腸より RNA、タンパク質を抽出し、MR のタンパク質発現をウェスタンブロット法で解析するとともに、MR 標的遺伝子発現の概日リズムを Real-time qPCR にて検討した。大腸に時計遺伝子が発現し、肝臓などの他臓器と同様の位相で概日リズムがあることが分かった (Fig. 3)。



**Fig. 3**

雄性野生型マウスより、6 time point にて大腸上皮細胞 (IEC) を単離し、qPCR, WB (Western blotting) を行った。また、血漿アルドステロン、コルチコステロンを ELISA で測定した。

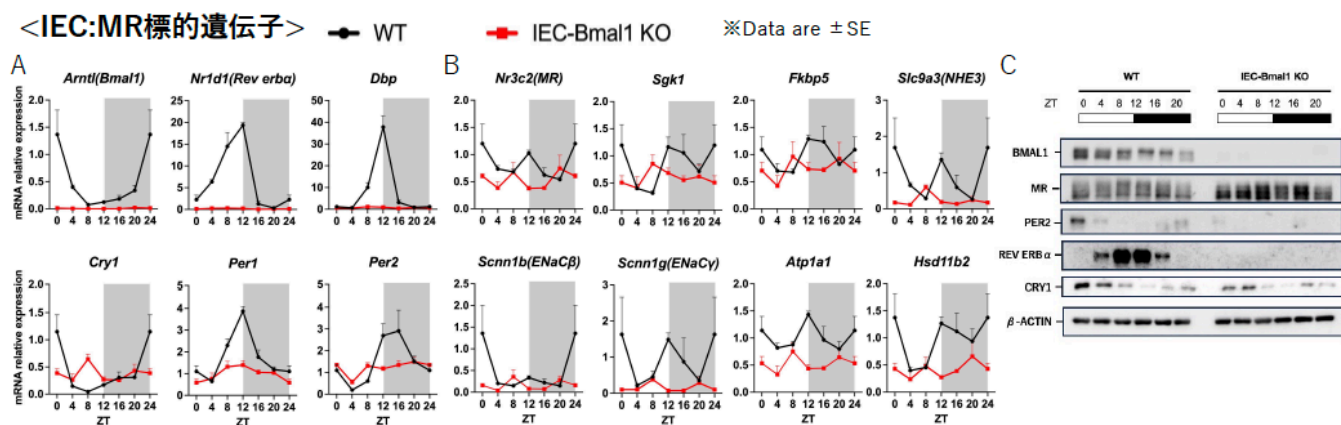
### 3. 2 大腸における MR と概日時計による概日遺伝子発現リズムの検討

3. 1 の検討より、MR 標的遺伝子に概日発現リズムが存在する可能性が示唆されたが、塩分吸収に関わる遺伝子の概日リズムが MR と BMAL1 によってどのように制御されているのかを検討するため、8~12 週齢の雄性腸管特異的 *Bmal1* 欠損マウス、雄性腸管特異的 *MR* 欠損マウス、ならびに雄性対照群マウスの大腸組織、血清を 4 時間毎 24 時間 (ZT0, 4, 8, 12, 16, 20) にわたり採取した。*Dbp*, *Nr1d1* といった、BMAL1 標的遺伝子発現に概日リズムが観察され、腸管特異的 *Bmal1* 欠損マウスではリズムが消失あるいは減弱していた (Fig. 4)。更に、*Sgk1*, *Fkbp5*, *Enacy* といった、MR 標的遺伝子発現が、腸管特異的 *Bmal1* 欠損マウスではリズムの減弱や発現の低下が認められたことから、MR 標的遺伝子の一部は BMAL1 によっても調節されている可能性が示唆された (Fig. 4)。一方で、腸管特異的 *MR* 欠損マウスでは時計遺伝子発現の変化はほとんど見られず、*Sgk1*, *Fkbp5*, *Enacy* などの、MR 標的遺伝子発現のリズムが消失あるいは減弱してい

た (Fig. 5)。血清中のアルドステロン濃度やコルチコステロン濃度には日内変動が見られたが (Fig. 3), MR タンパク質発現の日内変動は観察されなかった (Fig. 3-5)。

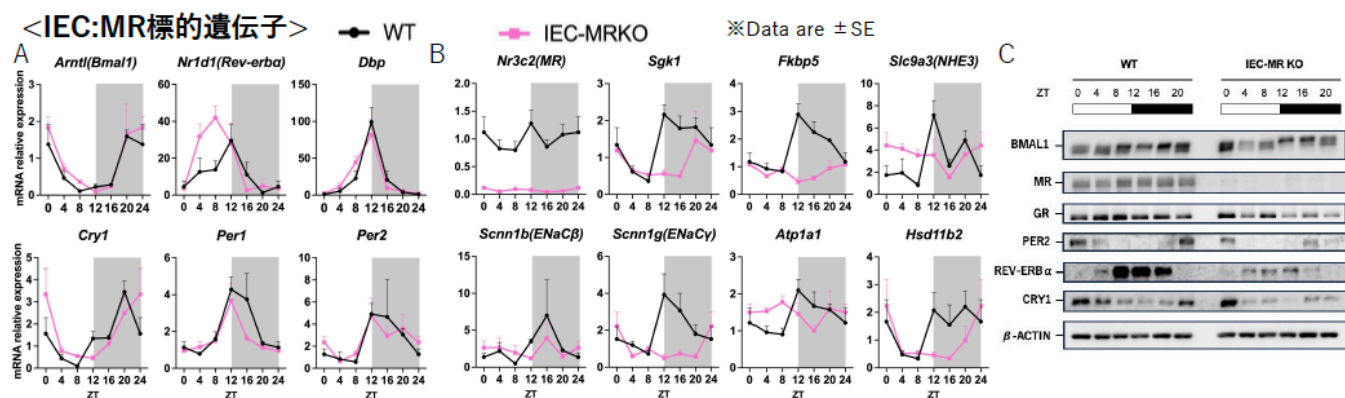
以上のことから、MR 標的遺伝子の日内変動は、アルドステロンの日内変動や大腸上皮細胞局所の末梢時計によって駆動されている可能性が示唆された。次に、腸管特異的 *Bmal1* 欠損、腸管特異的 *MR* 欠損、対照群マウスの IEC の RNA を用いて RNA-seq (N=3) を行い、腸管 BMAL1 および MR が駆動する腸管遺伝子発現リズムを JTK Cycle 解析 (統計学的に振動を解析する手法) を用いて、網羅的に解析を行った (Fig. 6)。対照群と *MR* 欠損 IEC では 4000 程度の遺伝子に日内変動が認められたのに対し、*Bmal1* 欠損 IEC では 11000 程度の遺伝子の日内変動が有り、そのほとんどが暗期の発現が低下していたことから、IEC 局所の時計が多くの遺伝子発現に関与する可能性が示唆された。今後 gene ontology 解析などを進めていく予定である。また、BMAL1 と MR による ChIP-seq を行い、BMAL1 と MR の腸管上皮細胞のクロマチン結合を網羅的に解析する予定である。





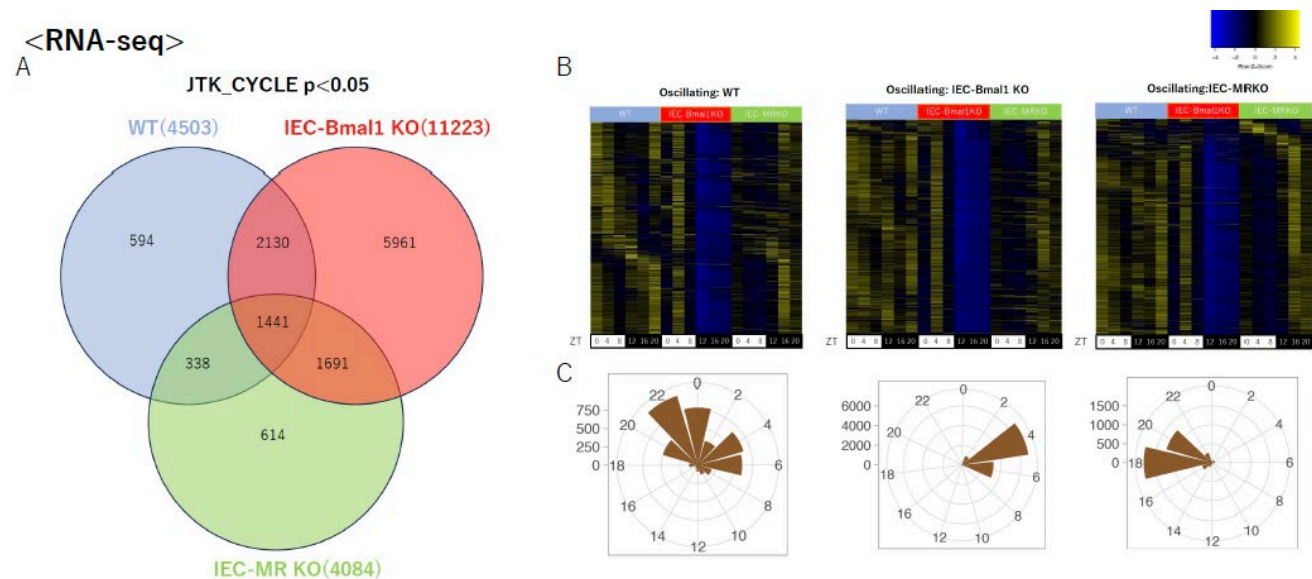
**Fig. 4**

腸管上皮特異的 *Bmal1* KO (*Bmal1* flox/flox-Villin-Cre; IEC-Bmal1 KO), *Bmal1* flox/flox マウス (8-12 週齢; 雄) を 6 time point, n = 4 で解剖し, 大腸上皮細胞 (IEC) を単離して, qPCR, WB を行った。



**Fig. 5**

腸管上皮特異的 *MR* KO (*MR* flox/flox-Villin-Cre; IEC-MR KO), *MR* flox/flox マウス (8-12 週齢; 雄) を 6 time point, n = 4 で解剖し, 大腸上皮細胞 (IEC) を単離して, qPCR, WB を行った。



**Fig. 6**

腸管上皮特異的 *Bmal1* KO (IEC-Bmal1 KO), 腸管上皮特異的 *MR* KO (IEC-MR KO), 野生型 (WT) 大腸上皮細胞 (IEC) より RNA を抽出して, RNA-seq を行った。

### 3. 3 光や塩分摂取のタイミングに対する大腸 MR と

#### 概日時計の応答性の検討

上記より明らかとなった BMAL1 と MR による協調的な転写調節が、光と塩分摂取のタイミングによってどのように制御されているのかを明らかにするため、8~12 週齢の雄性野生型マウス(C57BL/6)に対して高食塩食と低食塩食を用いて、night time feeding (暗期のみ食餌を与える)と day time feeding (明期のみ食餌を与える)を 4 週間行い、マウスの腸管組織、血清を 4 時間毎 24 時間(ZT0, 4, 8, 12, 16, 20)にわたり採取した。血清中のアルドステロン濃度の日内変動を検討するとともに、大腸より RNA、タンパク質を抽出し、RNA-seq (N = 3) を行い現在解析中である。今後、BMAL1 と MR 標的遺伝子発現の概日リズムが、光や塩分摂取のタイミングによってどのように変化するのか、JTK Cycle 解析を用いて、網羅的に解析する。

#### 4. 考察

今回の研究から、大腸の塩分吸収に関わる遺伝子発現に概日リズムが存在し、そのリズムは BMAL1 と MR の両者によって調節されていることが明らかとなった。ピークの時刻が明暗移行期であり、BMAL1 の転写活性やアルドステロン分泌のピーク時刻と近いことから、2 つの転写因子の関与が示唆される。活動期には大腸における塩分吸収が高く、非活動期には低いことが遺伝子発現リズムから示唆される。食塩摂取と血圧恒常性に概日時間依存性が存在するのか、については十分に解明されていない。血圧調節に関わるレニン、アルドステロン、ノルアドレナリンの血漿中濃度は早朝に高く就寝時に低い概日リズムがあるほか<sup>5,6)</sup>、尿中ナトリウム、カリウム排泄も活動期に増加し、睡眠時に低下する概日リズムがあることが分かっている<sup>7)</sup>。血圧は日中に高く、夜間に低下するが、時計遺伝子 *Cry1,2* 欠損マウスは血圧やアルドステロンの日内リズムが消失し、塩分感受性高血圧を呈することが示されている<sup>1)</sup>。これらの報告より、塩分摂取のタイミングにより、腸管における塩分吸収や尿中ナトリウム排泄の日内変動を介して、血圧への影響が異なる可能性が考えられる。

### 5. 今後の課題

現在進めている高食塩食、低食塩食の時間制限食の実験から、non-dipper 型の高血圧の一因を明らかにするとともに、塩分摂取量や塩分摂取のタイミングが大腸や腎臓、血圧の日内変動へ与える影響を明らかにすることで、各食事の塩分摂取が与える血圧への影響をより詳細に理解し、高血圧の病態理解や食事療法に貢献できる可能性がある。

### 6. 文献

- 1 Doi, M. *et al.* Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient *Cry*-null mice involves dysregulated adrenal *Hsd3b6*. *Nature medicine* **16**, 67-74, doi:10.1038/nm.2061 (2010).
- 2 Koronowski, K. B. *et al.* Defining the Independence of the Liver Circadian Clock. *Cell* **177**, 1448-1462 e1414, doi:10.1016/j.cell.2019.04.025 (2019).
- 3 Kinouchi, K. *et al.* Fasting Imparts a Switch to Alternative Daily Pathways in Liver and Muscle. *Cell reports* **25**, 3299-3314 e3296, doi:10.1016/j.celrep.2018.11.077 (2018).
- 4 Nakamura, T. *et al.* Intestinal Mineralocorticoid Receptor Contributes to Epithelial Sodium Channel-Mediated Intestinal Sodium Absorption and Blood Pressure Regulation. *J Am Heart Assoc* **7**, doi:10.1161/JAHA.117.008259 (2018).
- 5 Broussard, J. L. *et al.* Sleep restriction increases free fatty acids in healthy men. *Diabetologia* **58**, 791-798, doi:10.1007/s00125-015-3500-4 (2015).
- 6 Hurwitz, S., Cohen, R. J. & Williams, G. H. Diurnal variation of aldosterone and plasma renin activity: timing relation to melatonin and cortisol and consistency after prolonged bed rest. *J Appl Physiol (1985)* **96**, 1406-1414, doi:10.1152/jappphysiol.00611.2003 (2004).
- 7 Hilfenhaus, M. Circadian rhythm of the renin-angiotensin-aldosterone system in the rat. *Arch Toxicol* **36**, 305-316, doi:10.1007/BF00340536 (1976).

## Temporal Pattern of Salt Intake and Circadian Blood Pressure Rhythm

Kenichiro Kinouchi<sup>1</sup>, Takuto Torimitsu<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Division of Endocrinology, Metabolism, and Nephrology, Department of Internal Medicine, Keio University School of Medicine., <sup>2</sup> Center for Preventive Medicine, Keio University.

### Summary

To explore how the circadian expression of genes regulating salt absorption is controlled by the mineralocorticoid receptor (MR) and circadian clock, the large intestine and serum of the male gut-specific *Bmal1* knockout mice, gut-specific MR knockout mice, and control mice aged from eight to twelve weeks-old was collected every four hours over the circadian cycle (zeitgeber time [ZT] 0, 4, 8, 12, 16, 20, wherein the light phase starts from ZT0 and the dark phase begins from ZT12). The circadian clock was expressed in the large intestine and in phase with the clock in other tissues such as the liver. The *Bmal1* target gene expression displayed circadian oscillation, which was disrupted in the gut-specific *Bmal1* knockout mice. Additionally, the circadian variation of the MR-target gene expression was attenuated in the gut-specific *Bmal1* knockout mice, suggesting that the considerable portion of the MR target genes are controlled by BMAL1. On the other hand, the clock gene expression was unaffected in the gut-specific MR knockout mice, while the oscillation of the MR-target gene expression was perturbed by the MR deletion. The serum aldosterone and corticosterone abundance exhibited daily fluctuations, whereas the MR protein levels did not. Thus, the circadian rhythms of the MR-target genes were likely driven by the daily aldosterone variations and the gut-intrinsic circadian clock. The transcriptomic analysis is performed in the intestinal epithelial cells of the gut-specific *Bmal1* knockout, gut-specific MR knockout, and control mice to decipher the gut genomic rhythms driven by the BMAL1 and MR using the RNA-seq and JTC-Cycle analysis, a statistical analysis through which the oscillatory expression is determined. Nighttime- and daytime-restricted feeding of the high and low salt diet will be conducted in the control mice aged from eight to twelve weeks-old to establish the impact of the concerted transcriptional dynamics of BMAL1 and MR on time-of-day salt intake.