

主論文の要旨

**Adverse Effect of Circadian Rhythm Disorder on  
Reparative Angiogenesis in Hind Limb Ischemia**

〔サーカディアンリズム障害の下肢虚血における  
修復的血管新生への悪影響〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻  
病態内科学講座 循環器内科学分野

(指導：室原 豊明 教授)

都築 一仁

## 【緒言】

生命現象には周期性が確認されその中には生体内に振動性を惹起、内因性にリズムを生じるものがある。周期に関しては、年単位、季節単位、月単位、日単位のもものが報告されている。その中で最も研究されているのが「日周リズム」であり、外界からの時刻情報・刺激がない状態でも、種族・性別などでも差はあるが、約24時間前後の周期性が生じるような内在性リズムを「サーカディアンリズム(概日リズム)」という。

また、サーカディアンリズムに関しては、「中枢時計」と呼称される視床下部SCNが中心となり光刺激などで周期がリセットされる同部位の時計細胞/時計遺伝子で構成される機構だけではなく、各末梢組織/細胞レベルでも中枢時計と強調しながら約24時間周期の振動を形成する「末梢時計」という機構が存在することが知られている。そして、それを司る末梢時計遺伝子の割合は全遺伝子の約10%にも及ぶと報告されている。しかしながら、血管新生におけるその役割と詳細な分子機序に関しては未解明である。そこで本研究においては、サーカディアンリズム障害が下肢虚血モデルにおける修復的血管新生にどのような影響を及ぼすかについて検討した。

## 【対象および方法】

サーカディアンリズムと血管新生の直接的な調整を検討する目的で、2つの実験計画を立案した。1つめは環境誘導性時差ぼけマウスを用いたサーカディアンリズム障害での検討、2つめは時計遺伝子欠損マウスを用いたサーカディアンリズム障害での検討である。

環境誘導性時差ぼけマウスを用いたサーカディアンリズム障害では、「isolation box (遮光飼育箱)」を用いた。Isolation boxとは、箱内にLED電灯が取り付けられた飼育箱で任意の時間に、LED電灯の点灯消灯を行うことで光刺激による時差ぼけを起こす道具である。これを用いて、当施設の通常飼育(9時点灯21時消灯)群と時差ぼけ(4日ごとに点灯消灯時間を8時間ずつ)群の2群に分けて、野生型マウス(下肢虚血モデル未施行)および下肢虚血モデル作成野生型マウスにて各種検討を行った。

時計遺伝子欠損マウスを用いたサーカディアンリズム障害では、Cry1/Cry2遺伝子に着目し、in vivoの実験ではCry1/2ダブルノックアウトマウスを用いて野生型マウスと比較した血流回復および血管新生に対する影響を検討、in vitroの実験では、siRNAを用いてCry1/2遺伝子をノックダウンおよびKL001によりCry1/2を強発現した状態で血管新生に対する影響を検討した。

## 【結果】

まず、下肢虚血モデルを作成しない野生型マウスを通常飼育群と時差ぼけ群の2群に分けて検討すると、通常飼育群では、VEGFの血中濃度の日内変動が観察された。一方、時差ぼけ群で血中サイトカイン測定を行うと、血中濃度の日内変動が消失かつ分泌の低下が示された。(Fig 1.A)同様の検討をSDF-1で行ったが、SDF-1においては、濃度のピークがずれるだけで、VEGFのような日内変動の消失や分泌の低下は認められ

なかった。(Fig 1.B) また、循環血液中のEPC動員率を測定したところ時差ぼけ群では通常飼育群と比較して日内変動の消失およびEPC率の低下を認めた。(Fig 1.C・1D)

次に、下肢虚血モデルを作成した野生型マウスを通常飼育群と時差ぼけ群の2群に分けて検討すると、下肢虚血モデル作成後のレーザドプラによる下肢血流測定の経時的变化を確認すると、時差ぼけ群が通常飼育群と比較して血流の回復が悪いことが示された。(Fig 2.A・2B) また、下肢虚血モデル作成後28日目において、下肢脱落・下肢壊死・救肢で評価した「虚血肢重症度」を評価すると、時差ぼけ群が通常飼育群と比較して悪いことが示された。(Fig 2.C・2D) 血管新生濃度についても、時差ぼけ群が通常飼育群と比較して悪いことが示された。(Fig 2.E・2F) 下肢骨格筋組織内における、VEGFおよびSDF-1の発現は、時差ぼけ群が通常飼育群と比較して低下していることが示された。(Fig 2.G・2H) また時系列で見た血中のVEGFおよびSDF-1濃度も時差ぼけ群が通常飼育群と比較して低下していることが示された。(Fig 2.I・2J)

次に、下肢虚血モデル作成後の時計遺伝子の発現の変化を見ると、時系列および時差ぼけ群においてそれぞれ時計遺伝子発現に変化がみられた。(Fig 3)

次に、下肢虚血モデルを作成した野生型マウスとCry1/2ダブルノックアウトマウスの2群に分けて検討した。2群に対して、下肢虚血モデル作成後のレーザドプラによる下肢血流測定の経時的变化を確認すると、ノックアウトマウス群が野生型マウス群と比較して血流の回復が悪いことが示された。(Fig 4.A・4B) 血管新生密度についても、ノックアウトマウス群が野生型マウス群と比較して悪いことが示された。(Fig 4.C・4D)

In vitroの実験として、siRNAも用いてCry1/2遺伝子を細胞レベルでノックダウンした状態で、血管新生能に及ぼす影響を調べるために、細胞増殖能(Fig 5.A)・細胞遊走能(Fig 5.B・C)・管腔形成能(Fig 5.D・E)をそれぞれ測定したがいずれも低下していた。またその際に、細胞周期のストッパーとして働くWee1がノックダウン群でコントロール群と比較して有意に発現が増加(Fig 5.F)し、細胞の遊走に関係あるHOXC5遺伝子の発現がノックダウン群でコントロール群と比較して有意に発現が低下(Fig 5.G)していることが示された。

一方、Cry1/2を固定化し作用を増強するとされるKL001という物質を使い、Cry1/2を強発現すると、細胞増殖能(Fig 6.A)・細胞遊走能(Fig 6.B・C)・管腔形成能(Fig 6.D・E)をそれぞれ測定したがいずれも上昇していた。この際、Wee1がノックダウン群でコントロール群と比較して有意に発現が減少(Fig 6.F)し、HOXC5遺伝子の発現がノックダウン群でコントロール群と比較して有意に発現が増加(Fig 5.G)していることが示された。

## 【考察】

本研究では、サーカディアンリズム障害によって、全身的なメカニズムとしてVEGFの低下がEPC動員の低下を引き起こし、また局所のメカニズムとしてCry遺伝子の発現低下により、Wee1発現亢進/HOXC5発現低下を引き起こし、細胞増殖低下/遊走低下を引き起こすことで血管新生を阻害する機構が考えられる。

**【結語】**

我々のデータは、概日リズム障害が修復的虚血誘発性血管新生を悪化させ、概日リズムの維持が血管新生において重要な役割を果たすことを示唆している。