◆平成19年度日本血栓止血学会 学術奨励賞◆

糖尿病及び肥満に起因する血栓傾向と体内時計

大石 勝隆*

Plasminogen activator inhibitor-1 and the circadian clock in metabolic disorders

Katsutaka OISHI*

Key words: fibrinolysis, circadian rhythm, clock gene, adipose tissue, diabetes, obesity, metabolic syndrome

はじめに

プラスミノゲンアクチベーターインヒビター1 (plasminogen activator inhibitor-1; PAI-1) は、繊維素溶解反応 (線溶反応) の主要な抑制因子であり、フィブリン表面においてプラスミノゲンをプラスミンに分解する組織型プラスミノゲンアクチベーター (tissue-type plasminogen activator; tPA) の活性を強力に阻害する。PAI-1 分子は、フリーの活性型、tPA やビトロネクチンと結合した安定型、tPA やウロキナーゼ型 PA (uPA) への結合能を有さない潜在 (latent) 型の3種類の構造で存在している。血漿中での PAI-1 の半減期は比較的短く、血中 PAI-1 の濃度は、*PAI-1* 遺伝子の発現量に大きく依存していると考えられる。*PAI-1* 遺伝子の発現部位は、血管内皮細胞や平滑筋細胞などの血管や、マクロファージ、心臓、肝臓、腎臓、そして脂肪組織など広範にわたっており、その発現は、TNF- α や TGF- β などの炎症性サイトカイン、インスリンやグルココルチコイド、アンジオテンシン II などのホルモン、脂肪酸やグルコースなどの代謝産物によって変

動する¹⁾⁻⁵⁾。

心筋梗塞や不安定狭心症、心臓突然死などの心血管疾患や、脳梗塞の発症頻度には早朝から午前中にかけてピークとなる日内変動が存在する (図1)⁶⁾⁻⁹⁾。心筋梗塞が午前中に多く発症する原因については、早朝の交感神経系活動の亢進に伴う心拍数や血圧の上昇、血小板凝集活性の増加などとともに、血液線溶活性の低下が考えられている。血中 PAI-1 量は、その活性とともに顕著な日内変動を示し、これが血液線溶系の日内変動の原因と考えられている。今では、*PAI-1* 遺伝子の日周発現が、体内時計を制御する時計遺伝子によって調節されていることがほぼ明らかとなっている。

一方、肥満や糖尿病などの代謝性疾患に伴う血栓傾向には、PAI-1 発現の亢進が関与していると考えられている¹⁾⁻¹⁵⁾。我々は、これらの病態に伴う PAI-1 発現の誘導と体内時計の関係に着目し、糖尿病や肥満のモデルマウスや、時計遺伝子の変異マウスを用いた検討を行った。その結果、これらの病態に伴う PAI-1 発現の誘導には、体内時計を構成する時計遺伝子が大きく関与している可能性が示された。

* 独立行政法人産業技術総合研究所・生物機能工学研究部門・生物時計研究グループ [〒305-8566 茨城県つくば市東 1-1-1 中央第6]

Clock Cell Biology Research Group, Institute for Biological Resources and Functions, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) [Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki 305-8566, Japan]

Tel: 029-861-6053 Fax: 029-861-9499 e-mail: k-ooishi@aist.go.jp

疾患発症の日内リズム

図1 ヒトの生理機能および疾患の症状や発症に見られる概日リズム

体内時計の分子機構

体内時計は、バクテリアからヒトに至るまで地球上のほとんど全ての生物に存在し、個体の行動や様々な生理機能のサーカディアンリズム(概日リズム)を制御している¹⁶⁾¹⁷⁾。哺乳類においては脳内視床下部の視交叉上核(suprachiasmatic nucleus; SCN)が時計中枢であり、活動リズムをはじめ、睡眠覚醒や、血圧、体温、心拍数などの概日リズムを支配している¹⁸⁾。近年の分子生物学的研究により、体内時計のリズム発振に中心的な役割を担っている時計遺伝子が、ショウジョウバエや哺乳類から相次いで発見された。時計遺伝子が概日リズムを刻む分子機構についても次第に明らかとなり、時計遺伝子間での転写調節を介したフィードバックループモデルが提唱されている(図2)¹⁶⁾¹⁹⁾²⁰⁾。時計分子には、転写因子として特定の時計遺伝子の転写を活性化する正の制御因子(CLOCK, BMAL1)と、正の制御因子によって発現された後、正の制御因子の転写活性を阻害することによって自身の発現を抑制する負の制御因子(PER1, PER2, CRY1, CRY2, Rev-erba)が存在する。CLOCKとBMAL1は、負

の制御因子の遺伝子上に存在する E-box 配列(CACGTG)に結合して、負の制御因子の日周発現を制御している。また、BMAL1 遺伝子上には RORE 配列が存在し、転写因子である ROR と転写抑制因子である Rev-erba によって日周発現が制御されている。このように、多くの時計遺伝子の発現には顕著な概日リズムが存在する。この約 24 時間周期のフィードバックループが、体内時計の本体であると考えられている。

我々は、時計遺伝子が脳内の時計中枢である SCN のみならず、心臓や肝臓、腎臓、骨格筋、血管内皮細胞や血球細胞に至るまで個体のほとんど全ての組織で発現していることに注目し、末梢組織における時計遺伝子の役割について研究を行ってきた²¹⁻²⁵⁾。DNA マイクロアレイを用いた網羅的な発現遺伝子解析により、末梢組織においても数%から 10%もの遺伝子が日周発現していることが報告され²⁶⁾、我々は、時計遺伝子 *Clock* の変異マウスを用いた解析から、CLOCK が、糖・脂質代謝や細胞周期、薬物代謝や免疫機能などに関わる非常に多くの遺伝子の日周発現を制御している可能性を示した²⁴⁾。これまでに明らかとなった CLOCK の転写標的

図2 体内時計の分子機構

遺伝子には、脂肪酸代謝系において中心的な役割を担っている *peroxisome-proliferator-activated receptor α* (*PPAR α*)²⁷⁾ や、転写因子である *albumin D-site binding protein* (*DBP*)²⁸⁾²⁹⁾、細胞周期を調節している *Wee1*²⁴⁾³⁰⁾、そして血液線溶系の阻害因子である *PAI-1*³¹⁾ などがある。

PAI-1 遺伝子の日周発現

心筋梗塞や脳梗塞、深部静脈血栓症などの血栓性疾患の発症頻度や、血栓溶解療法におけるヘパリンやワルファリンの薬効には、概日リズムが存在することが知られている⁶⁾⁻⁹⁾³²⁾。血栓症の時刻依存的な発症メカニズムについては、動脈血栓症と静脈血栓症で異なるものの、ともに早朝の交感神経系の活動亢進による血管トーンの変化や血小板の活性化、そして血液線溶活性の低下などが、血管壁の障害を引き金として関与しているものと考えられる。

血液の凝固線溶因子の日内変動に関する臨床研究から、フィブリノゲン濃度や第 VII 因子活性などの凝固因子が午前中に高くなり、プロテイン C やプロテイン S、アンチトロンビンなどの抗凝固因子が午前中に低値となることが報告されている⁹⁾³³⁾³⁴⁾。我々は、マウスにおけるプ

ロテイン C やアンチトロンビンの日内変動を調べ、活動リズムと同様にヒトとは昼夜が逆転したパターンでこれらが変動していることを報告した³⁵⁾。凝固線溶因子の日内変動に関する詳細は他著⁷⁾⁹⁾³⁶⁾に譲るが、最も顕著な日内変動を示すと同時に線溶反応全般を制御しているのが *PAI-1* である。ヒトにおいては、*PAI-1* の血中濃度や活性は、血栓症の発症頻度が最も高くなる時間帯に一致して、早朝から午前中にかけて最も高くなることが知られている。我々は、マウスにおいても、血中 *PAI-1* 濃度と相関して、血栓溶解時間 (euglobulin clot lysis time; *ELT*) が日内変動することを明らかにした (図 3)³⁷⁾。

2000 年になって Maemura らは、*PAI-1* 遺伝子の発現量に顕著な概日リズムが存在し、bHLH-PAS 型の転写因子である *CLIF* (*BMAL2*) が *CLOCK* とともに *PAI-1* 遺伝子の日周発現を制御している可能性を示した³¹⁾。ヒト *PAI-1* 遺伝子の転写調節領域には E-box 配列が 2 カ所存在するが、そのうち 1 カ所が 4G/5G 多型と重複しており、興味深いことに、4G/4G 型では他の多型に比べて朝の *PAI-1* 濃度が高く、夕刻の *PAI-1* 値には影響しないとの報告もある³⁸⁾。我々はヒト *PAI-1* 遺伝子に存在する

図3 マウスにおける血漿 PAI-1 濃度 (A) と血液線溶活性 (B) の概日リズム. マウスを明暗 (12 時間明: 12 時間暗) 条件下で飼育し, 3 時間毎に採血を行った. 血栓溶解時間 (ELT) は, 血中 PAI-1 濃度と相関して日内変動し, ヒトと同様に活動開始時間帯において最大となる. 白と黒の横棒は, それぞれ明期と暗期を示す.

図4 時計分子によるマウス *PAI-1* 遺伝子の転写制御. マウス *PAI-1* 遺伝子上流配列を用いたレポーターアッセイの結果, *PAI-1* 遺伝子は, 時計分子 CLOCK と BMAL1 によって E-box 依存的に転写が活性化され, 転写抑制因子 CRY1 の共発現によって活性が抑制された.

E-box がラットやマウスなどの齧歯類には存在していないことから, マウス *PAI-1* プロモーターを用いたレポーター解析を行い, ヒト *PAI-1* 遺伝子には保存されていない E-box を介して時計分子 CLOCK/BMAL1 が転写を制御している可能性を示した (図4)³⁹⁾. 実際に, マウスの心臓や腎臓, 肝臓, 脂肪などにおいて *PAI-1* 遺伝子の日周発現が確認され, 血中 PAI-1 濃度も, mRNA の発現に一致したパターンで日内変動していることが確認された³⁵⁾³⁷⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾. さらに, 転写活性化ドメインが欠

損したドミナントネガティブ型の CLOCK を発現している *Clock* 遺伝子変異マウスにおいて PAI-1 の発現を調べると, mRNA 発現量とともに血中 PAI-1 濃度が低下し (図5), ELT も恒常的に短縮していた³⁷⁾. また, CLOCK/BMAL1 (BMAL2) の転写活性を強力に抑制する CRY1 と CRY2 がともに欠失した *Cry1/Cry2* ダブルノックアウトマウスにおいては, PAI-1 発現の恒常的亢進とともに, ELT の延長が認められた³⁷⁾. これらの知見は, ヒトにおいても齧歯類においても体内時計が *PAI-1* 遺伝子の

図5 *Clock* 変異マウスにおける *PAI-1* 遺伝子発現量 (A) と血漿 PAI-1 濃度 (B) の日内変動。野生型マウス (WT) で見られる *PAI-1* mRNA 発現量と血中 PAI-1 濃度の概日リズムは, *Clock* 変異マウス (*Clk/Clk*) では消失しており, 恒常的に低値となっていた。白と黒の横棒は, それぞれ明期と暗期を示す。

図6 糖尿病及び肥満モデルマウスにおける血漿 PAI-1 濃度の日内変動。streptozotocin を投与した糖尿病モデルマウス (A) やレプチン遺伝子の欠損した肥満モデルマウス (B) では, 血漿 PAI-1 濃度の時刻依存的な増加が認められた。

日周発現を介して血液線溶系の概日リズムを制御している可能性を示している。

糖尿病および肥満に起因する 血栓傾向と時計遺伝子

糖尿病や肥満などの代謝異常に起因する血栓傾向は, 心筋梗塞などの心血管イベント発症の危険因子であり, 血中 PAI-1 の増加が関与していると考えられている^{1)10)~15)}。我々は, 代謝性疾患時における PAI-1 発現と体内時計との

関連性を解明する目的で, streptozotocin (STZ) 投与による糖尿病モデルマウス⁴⁰⁾およびレプチン欠損による肥満モデルマウス (*ob/ob* マウス)⁴²⁾を用いて検討を行った。その結果, これらの病態モデルマウスでは, 心臓や肝臓, 腎臓, 脂肪組織などにおいて時刻依存的な *PAI-1* 発現の増加が認められ, 血中 PAI-1 値も有意に増加していることが判明した (図6)。糖尿病や肥満モデルマウスにおいて時刻依存的な PAI-1 発現の誘導が観察されたことから, これらの病態に伴う血栓傾向には, 体内時計が関与

図7 *Clock* 遺伝子の変異は、糖尿病に起因する PAI-1 発現の誘導を抑制した。*Clock* 変異マウスにストレプトゾトシン (STZ) を投与すると、野生型マウスと同様の高血糖状態となるが、STZ 依存的な PAI-1 mRNA の発現亢進や血中 PAI-1 の増加は顕著に抑制されていた。

している可能性が考えられた。そこで、*PAI-1* 遺伝子の日周発現を直接転写制御している時計分子 CLOCK の関与について検討を行った^{41) 42)}。*Clock* 遺伝子変異マウスに STZ を投与したところ、インスリン分泌の低下に伴って、野生型マウスと同様の高血糖状態となり、野生型マウスと同様に糖尿病が誘発されることを確認した (図 7)⁴¹⁾。この *Clock* 遺伝子が変異した糖尿病モデルマウスにおいて *PAI-1* mRNA 発現を調べたところ、野生型マウスで見られるような時刻依存的な発現誘導は認められず、血中 PAI-1 の増加も顕著に抑制されていた。従って、糖尿病モデルマウスにおける PAI-1 発現の亢進には、時計分子 CLOCK が関与しているものと考えられる。

肥満に起因した血中 PAI-1 の増加は、ヒトや肥満モデルマウスを対象とした研究によって既によく知られている。脂肪細胞に分化させた 3T3-L1 細胞を用いた実験により、脂肪細胞において PAI-1 が比較的多く発現、分泌されていることが明らかとなった⁴³⁾。実際に、肥満者における血中 PAI-1 値は、body mass index (BMI) や内臓脂肪の蓄積量に比例しているこ

図8 レプチン欠損マウス (*ob/ob*) 各組織における *PAI-1* 遺伝子発現。*ob/ob* マウスでは、特に脂肪組織において *PAI-1* mRNA 発現量の増加が認められ、肥満に起因した血中 PAI-1 の増加には、脂肪組織の関与が大きいと考えられてきた。野生型マウス (WT) の心臓における発現量を 100% として、相対値を示した。

とが報告されている^{3) 44)}。また、低カロリー食による減量によって血中 PAI-1 値が低下するのみならず^{3) 5)}、再度の体重増加によって PAI-1 値が有意に増加することや、外科的な脂肪組織の切除によって PAI-1 の値が低下することも報告されている¹⁾。AT₁ 受容体のアンタゴニスト、糖尿病の治療薬であるチアゾリジン誘導体やメトフォルミンによって、脂肪組織における PAI-1 の発現量が低下するとの報告もある³⁾。さらに *ob/ob* マウスを用いた研究から、脂肪組

図9 *Clock* 遺伝子の変異した肥満モデルマウス (*Clk/Clk; ob/ob*) における PAI-1 の発現. (A) X 線 CT 解析による脂肪分布の比較. 脂肪組織の分布 (赤色) を調べると, *Clock* の変異によって内臓脂肪の増加が認められ, *Clk/Clk; ob/ob* マウスでは, *ob/ob* マウスよりもさらに内臓脂肪の沈着が促進していた. (B) 精巣上体の脂肪組織像. *Clock* の変異は, 脂肪細胞の肥大化を引き起こし, *Clk/Clk; ob/ob* マウスでは, *ob/ob* マウスよりもさらに肥大化が促進していた. (C) 脂肪組織における PAI-1 mRNA 発現. 脂肪細胞の肥大化 (B) から予測されたように, *Clk/Clk; ob/ob* マウスでは, *ob/ob* マウスに比べてさらに PAI-1 遺伝子の発現が亢進していた. (D) 血中 PAI-1 濃度. 肥満に起因する血中 PAI-1 の増加は, 脂肪組織での PAI-1 発現の亢進によるものだと考えられてきた (図 8). *Clk/Clk; ob/ob* マウスでは, *ob/ob* マウスに比べて肥満が促進し (A, B), 脂肪組織での PAI-1 発現が亢進しているにもかかわらず (C), 血中 PAI-1 濃度は, 野生型マウスのレベルにまで正常化していることが判った.

組織での PAI-1 mRNA 発現が, 血中 PAI-1 濃度とともに週齢依存的に増加することが示された⁴⁵⁾. ヒト由来の組織培養実験からは, 非肥満者に比べて肥満者の脂肪組織で PAI-1 の発現量が増加していることや, 内臓脂肪と皮下脂肪では PAI-1 の発現量が異なっていることが報告されている³⁾. いずれにしても, 脂肪組織に

おける PAI-1 の発現量が高く, 肥満の程度に応じて脂肪組織での PAI-1 発現量とともに血中 PAI-1 濃度が増加することから, 肥満に伴う血中 PAI-1 の増加には, 脂肪組織が大きく関与していると考えられてきたし, 我々の実験結果も当初これを支持していた (図 6B, 図 8).

我々は, 肥満に起因する PAI-1 発現の増加

図10 体内時計による血液線溶系の制御。糖尿病や肥満症などの病態では、ホルモンや脂質、代謝産物などのバランスが崩れ、様々な組織でPAI-1の発現が誘導される。また、代謝性疾患は、炎症に類似した状態であり、免疫細胞からの種々のサイトカインの分泌を介してPAI-1の発現が誘導される。体内時計は、時計分子によってPAI-1遺伝子の日周発現を制御するのみならず、これらの代謝異常に伴うPAI-1発現の亢進にも大きく関与しているものと思われる。また、時計遺伝子と脂質代謝の関係も最近になって明らかとなり、体内時計が、脂質代謝系に影響することにより、間接的にPAI-1の発現調節に関与している可能性も考えられる。

に時計遺伝子 *Clock* が関与している可能性について検討するために、*ob/ob* マウスと *Clock* 変異マウスとの交配を行い、*Clock* の変異した肥満モデルマウス (*Clk/Clk ; ob/ob*) を作成した (図9)⁴²⁾。この *Clk/Clk ; ob/ob* マウスは、*ob/ob* マウスに比して体重の増加、血中コレステロール及び中性脂肪の増加、内臓脂肪及び皮下脂肪の蓄積、脂肪細胞の肥大化などが促進しており、*Clock* の変異が肥満を促進する可能性が示された。組織におけるPAI-1発現を調べると、脂肪の蓄積や脂肪細胞の肥大化から予測されたように、脂肪組織でのPAI-1発現量が *ob/ob* マウスに比べて *Clk/Clk ; ob/ob* マウスで顕著に増加していることが判明した。従って、*Clk/Clk ; ob/ob* マウスでは、*ob/ob* マウスに比べて血中PAI-1の増加が予想されたが、驚いたことに、*Clk/Clk ; ob/ob* マウスにおける血中PAI-1濃度は、野生型マウスのレベルにまで低下（正常化）していることが判明した。これらの結果

は、時計遺伝子 *Clock* が、肥満に起因する血中PAI-1の増加に大きく関わっている可能性とともに、肥満に伴う脂肪組織でのPAI-1発現の亢進が、必ずしも血中PAI-1の増加をもたらす訳ではないことを示している。心臓や肺、肝臓におけるPAI-1発現は、*ob/ob* マウスと比べて *Clk/Clk ; ob/ob* マウスで低値となっており、これらの組織でのPAI-1発現が血中レベルに反映されているものと考えられる。現在我々は、肥満に起因して血中で増加するPAI-1の由来について、肝臓でのPAI-1発現の亢進が主に関与しているのではないかと考えている⁴⁶⁾。

糖尿病や肥満モデルマウスにおけるPAI-1発現の誘導にCLOCKが関与している可能性が示されたが、CLOCKがPAI-1遺伝子の転写調節に直接的に関与しているのか、それとも、インスリン抵抗性や脂質合成など、これらの病態に起因する代謝変化に関与しているのか、につ

いては今のところ不明である。最近の研究から、脂質代謝系の制御に時計分子が関与していることが明らかとなってきた²⁴⁾²⁷⁾⁴²⁾⁴⁷⁾⁻⁵⁰⁾。我々の研究では、*Clock* 変異によってレプチン欠損に伴う肥満が促進されることが示されたが、その一方で、脂肪酸合成に関わる *sterol regulatory element binding protein-1 (SREBP-1)* や、*fatty acid synthase (FAS)*、*acetyl-CoA carboxylase (ACC)*、*ATP-citrate lyase (ACL)* などの発現量が *Clock* 変異マウスで低下していることも見出している⁴⁹⁾。これらの知見から、*CLOCK* が *de novo* の脂肪酸合成やこれに伴うインスリン抵抗性の増大を抑制することにより、肥満に伴う血中 *PAI-1* の増加を抑制している可能性も考えられる。

その一方で、*CLOCK* が転写因子として肥満に伴う *PAI-1* 発現の誘導に直接関与している可能性も考えられる。我々の一連の研究から、STZ 投与による糖尿病モデルマウスや肥満モデルマウス (*ob/ob*) において、*PAI-1* 遺伝子の時刻依存的な発現誘導が見られ、これは *CLOCK* に依存していることが明らかとなったが、興味深いことに、*PAI-1* 遺伝子と同様に *CLOCK* によって転写調節されている *Per1* や *Per2*、*DBP* などの遺伝子の日周発現にはほとんど影響が認められなかった⁴⁰⁾⁴¹⁾⁵¹⁾⁵²⁾。最近になって、時計遺伝子を含めた多くの日周発現遺伝子の時刻依存的な転写制御に、転写コアクチベーターのリズミクな集積や histone acetyltransferase (HAT) によるクロマチンのリモデリングが重要であると考えられている⁵³⁾。さらに、*CLOCK* が HAT 活性を有していることも報告され⁵⁴⁾、*CLOCK* による *PAI-1* 発現の制御には、*PAI-1* 遺伝子特異的な複雑なメカニズムが存在している可能性がある。

おわりに

生物は、地球の自転周期に合致した概日リズムを獲得することにより、より生存に有利なシ

ステムを構築してきたものと考えられる。血液線溶活性は、昼行性のヒトでも、夜行性の齧歯類でも、活動期に低下し、休息期に高く維持されている。生物が長い進化の過程で絶えず捕食者からの攻撃を受けてきたことを考えれば、攻撃を受ける危険性の高い活動期に線溶活性を下げ、休息期には深部静脈血栓症などの血栓症のリスクを下げる意味で、線溶活性を高く保つことは、合理的なシステムなのかも知れない。時計分子による *PAI-1* 遺伝子の日周発現制御機構が、齧歯類からヒトに至るまで種を越えて保存されていることは、血液線溶系の概日リズムの重要性を意味しているものと思われる。

我々の一連の研究から、体内時計による血液凝固線溶系の制御は、血栓症の発症や血栓溶解療法の治療効果にみられる時刻依存性のみならず、糖尿病や肥満症などの代謝性疾患に起因する血栓傾向にも関与している可能性が示された(図10)。最近になって我々は、時計分子が、*PAI-1* 遺伝子の転写調節を介して血液線溶系を制御する一方で、血管内皮細胞に発現する抗血栓性タンパク質であるトロンボモジュリン(thrombomodulin; TM)の時刻依存的な発現にも直接関わっている可能性を明らかにした⁵⁵⁾。さらに、血小板機能の概日リズムにも、時計遺伝子が関与している可能性が考えられる。体内時計による血液凝固線溶系の制御機構を分子レベルで解明することにより、時刻依存的な血栓症の予防や治療のみならず、メタボリックシンドロームに象徴される代謝性疾患に起因した血栓傾向の改善や予防法の開発に結びついてゆくものと期待される。

謝辞：本研究は、帝京大学の大藏直樹先生、厚味厳一先生、松田重三先生、そして女子栄養大学の堀江修一先生のご指導ご協力を得て、産業技術総合研究所の石田直理雄先生のご支援のもと行われたものであり、この場をお借りして、厚く御礼申し上げます。X線CT解析については、株式会社ツムラの鈴木亘先生、武蔵野

大学の油田正樹先生のご協力を頂きました。実験動物の繁殖維持に携わっていただきました、産業技術総合研究所の笠松真珠さん、雨貝則子さん、柴崎いづみさん他、生物時計研究グループの皆様に感謝いたしております。今回の受賞を励みに、血栓止血分野に貢献できるよう、今後とも研究に邁進してゆきたいと考えております。

私は今、曲がりなりにも一端の研究者として家族を養ってゆけることを、大変幸せだと感じております。それは、一にも二にも、これまで常に愛情深く育ててくれた両親のお陰だと確信しております。今回の受賞を誰よりも喜んでくれた両親に対して、心から感謝いたしております。

文 献

- Mutch NJ, Wilson HM, Booth NA : Plasminogen activator inhibitor-1 and haemostasis in obesity. *Proc Nutr Soc* **60** : 341-347, 2001.
- Eren M, Painter CA, Gleaves LA, Schoenhard JA, Atkinson JB, Brown NJ, Vaughan DE : Tissue- and agonist-specific regulation of human and murine plasminogen activator inhibitor-1 promoters in transgenic mice. *J Thromb Haemost* **1** : 2389-2396, 2003.
- Skurk T, Hauner H : Obesity and impaired fibrinolysis : role of adipose production of plasminogen activator inhibitor-1. *Int J Obes Relat Metab Disord* **28** : 1357-1364, 2004.
- Vaughan DE : PAI-1 and atherothrombosis. *J Thromb Haemost* **3** : 1879-1883, 2005.
- Mertens I, Van Gaal LF : Visceral fat as a determinant of fibrinolysis and hemostasis. *Semin Vasc Med* **5** : 48-55, 2005.
- Muller JE, Tofler GH, Stone PH : Circadian variation and triggers of onset of acute cardiovascular disease. *Circulation* **79** : 733-743, 1989.
- Andreotti F, Kluft C : Circadian variation of fibrinolytic activity in blood. *Chronobiol Int* **8** : 336-351, 1991.
- Cohen MC, Rohtla KM, Lavery CE, Muller JE, Mittleman MA : Meta-analysis of the morning excess of acute myocardial infarction and sudden cardiac death. *Am J Cardiol* **79** : 1512-1516, 1997.
- Manfredini R, Boari B, Smolensky MH, Salmi R, la Cecilia O, Maria Malagoni A, Haus E, Manfredini F : Circadian variation in stroke onset : identical temporal pattern in ischemic and hemorrhagic events. *Chronobiol Int* **22** : 417-453, 2005.
- Yamamoto K, Saito H : A pathological role of increased expression of plasminogen activator inhibitor-1 in human or animal disorders. *Int J Hematol* **68** : 371-385, 1998.
- Aronson D : Impaired modulation of circadian rhythms in patients with diabetes mellitus : a risk factor for cardiac thrombotic events? *Chronobiol Int* **18** : 109-121, 2001.
- Anand SS, Yi Q, Gerstein H, Lonn E, Jacobs R, Vuksan V, Teo K, Davis B, Montague P, Yusuf S : Relationship of metabolic syndrome and fibrinolytic dysfunction to cardiovascular disease. *Circulation* **108** : 420-425, 2003.
- Trost S, Pratley R, Sobel B : Impaired fibrinolysis and risk for cardiovascular disease in the metabolic syndrome and type 2 diabetes. *Curr Diab Rep* **6** : 47-54, 2006.
- Alessi MC, Juhan-Vague I : PAI-1 and the metabolic syndrome : links, causes, and consequences. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26** : 2200-2207, 2006.
- Alessi MC, Poggi M, Juhan-Vague I : Plasminogen activator inhibitor-1, adipose tissue and insulin resistance. *Curr Opin Lipidol* **18** : 240-245, 2007.
- Reppert SM, Weaver DR : Molecular analysis of mammalian circadian rhythms. *Annu Rev Physiol* **63** : 647-676, 2001.
- Wijnen H, Young MW : Interplay of circadian clocks and metabolic rhythms. *Annu Rev Genet* **40** : 409-448, 2006.
- Richter HG, Torres-Farfan C, Rojas-Garcia PP, Campino C, Torrealba F, Seron-Ferre M : The circadian timing system : making sense of day/night gene expression. *Biol Res* **37** : 11-28, 2004.
- Reppert SM, Weaver DR : Coordination of circadian timing in mammals. *Nature* **418** : 935-941, 2002.
- Dardente H, Cermakian N : Molecular circadian rhythms in central and peripheral clocks in mammals. *Chronobiol Int* **24** : 195-213, 2007.
- Sakamoto K, Nagase T, Fukui H, Horikawa K, Okada T, Tanaka H, Sato K, Miyake Y, Ohara O, Kako K, Ishida N : Multitissue circadian expression of rat period homolog (rPer2) mRNA is governed by the mammalian circadian clock, the suprachiasmatic nucleus in the brain. *J Biol Chem* **273** : 27039-27042, 1998.
- Oishi K, Sakamoto K, Okada T, Nagase T, Ishida N : Humoral signals mediate the circadian expression of rat period homologue (rPer2) mRNA in peripheral tissues. *Neurosci Lett* **256** : 117-119, 1998.
- Oishi K, Sakamoto K, Okada T, Nagase T, Ishida N : Antiphase circadian expression between BMAL1 and period homologue mRNA in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues of rats. *Biochem Biophys Res Commun* **253** : 199-203, 1998.
- Oishi K, Miyazaki K, Kadota K, Kikuno R, Nagase T, Atsumi G, et al. : Genome-wide expression analysis of mouse liver reveals CLOCK-regulated circadian output genes. *J Biol Chem* **278** : 41519-41527, 2003.
- Oishi K, Amagai N, Shirai H, Kadota K, Ohkura N, Ishida N : Genome-wide Expression Analysis Reveals 100 Adrenal Gland-dependent Circadian Genes in the Mouse Liver. *DNA Res* **12** : 191-202, 2005.
- Panda S, Antoch MP, Miller BH, Su AI, Schook AB, Straume M, Schultz PG, Kay SA, Takahashi JS, Hogenesch JB : Coordinated transcription of key pathways in the mouse by the circadian clock. *Cell* **109** : 307-320, 2002.
- Oishi K, Shirai H, Ishida N : CLOCK is involved in the circadian transactivation of peroxisome-proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) in mice. *Biochem J* **386** (Pt 3) : 575-581, 2005.
- Oishi K, Fukui H, Ishida N : Rhythmic expression of BMAL1 mRNA is altered in Clock mutant mice : differential regulation in the suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues. *Biochem Biophys Res Commun* **268** : 164-171, 2000.
- Ripperger JA, Schibler U : Rhythmic CLOCK-BMAL1 binding to multiple E-box motifs drives circadian Dbp transcription and chromatin transitions. *Nat Genet* **38** :

- 369-374, 2006.
- 30) Matsuo T, Yamaguchi S, Mitsui S, Emi A, Shimoda F, Okamura H : Control mechanism of the circadian clock for timing of cell division *in vivo*. *Science* **302** : 255-259, 2003.
- 31) Maemura K, de la Monte SM, Chin MT, Layne MD, Hsieh CM, Yet SF, Perrella MA, Lee ME : CLIF, a novel cycle-like factor, regulates the circadian oscillation of plasminogen activator inhibitor-1 gene expression. *J Biol Chem* **275** : 36847-36851, 2000.
- 32) Braunwald E : Morning resistance to thrombolytic therapy. *Circulation* **91** : 1604-1606, 1995.
- 33) Kapiotis S, Jilma B, Quehenberger P, Ruzicka K, Handler S, Speiser W : Morning hypercoagulability and hypofibrinolysis. Diurnal variations in circulating activated factor VII, prothrombin fragment F1+2, and plasmin-plasmin inhibitor complex. *Circulation* **96** : 19-21, 1997.
- 34) Undar L, Ertugrul C, Altunbas H, Akca S : Circadian variations in natural coagulation inhibitors protein C, protein S and antithrombin in healthy men : a possible association with interleukin-6. *Thromb Haemost* **81** : 571-575, 1999.
- 35) Ohkura N, Oishi K, Sakata T, Kadota K, Kasamatsu M, Fukushima N, Kurata A, Tamai Y, Shirai H, Atsumi G, Ishida N, Matsuda J, Horie S : Circadian variations in coagulation and fibrinolytic factors among four different strains of mice. *Chronobiol Int* **24** : 651-669, 2007.
- 36) Haus E : Chronobiology of hemostasis and inferences for the chronotherapy of coagulation disorders and thrombosis prevention. *Adv Drug Deliv Rev* **59** : 966-984, 2007.
- 37) Ohkura N, Oishi K, Fukushima N, Kasamatsu M, Atsumi GI, Ishida N, Horie S, Matsuda J : Circadian clock molecules CLOCK and CRYs modulate fibrinolytic activity by regulating the PAI-1 gene expression. *J Thromb Haemost* **4** : 2478-2485, 2006.
- 38) van der Bom JG, Bots ML, Haverkate F, Kluft C, Grobbee DE : The 4G5G polymorphism in the gene for PAI-1 and the circadian oscillation of plasma PAI-1. *Blood* **101** : 1841-1844, 2003.
- 39) Oishi K, Shirai H, Ishida N : Identification of the circadian clock-regulated E-box element in the mouse plasminogen activator inhibitor-1 gene. *J Thromb Haemost* **5** : 428-431, 2007.
- 40) Oishi K, Ohkura N, Kasamatsu M, Fukushima N, Shirai H, Matsuda J, Horie S, Ishida N : Tissue-specific augmentation of circadian PAI-1 expression in mice with streptozotocin-induced diabetes. *Thromb Res* **114** : 129-135, 2004.
- 41) Oishi K, Ohkura N, Amagai N, Ishida N : Involvement of circadian clock gene Clock in diabetes-induced circadian augmentation of plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression in the mouse heart. *FEBS Lett* **579** : 3555-3559, 2005.
- 42) Oishi K, Ohkura N, Wakabayashi M, Shirai H, Sato K, Matsuda J, Atsumi G, Ishida N : CLOCK is involved in obesity-induced disordered fibrinolysis in ob/ob mice by regulating PAI-1 gene expression. *J Thromb Haemost* **4** : 1774-1780, 2006.
- 43) Samad F, Loskutoff DJ : The fat mouse: a powerful genetic model to study elevated plasminogen activator inhibitor 1 in obesity/NIDDM. *Thromb Haemost* **78** : 652-655, 1997.
- 44) Shimomura I, Funahashi T, Takahashi M, Maeda K, Kotani K, Nakamura T, Yamashita S, Miura M, Fukuda Y, Takemura K, Tokunaga K, Matsuzawa Y : Enhanced expression of PAI-1 in visceral fat : possible contributor to vascular disease in obesity. *Nat Med* **2** : 800-803, 1996.
- 45) Samad F, Loskutoff DJ : Tissue distribution and regulation of plasminogen activator inhibitor-1 in obese mice. *Mol Med* **2** : 568-582, 1996.
- 46) Oishi K, Ohkura N, Matsuda J, Ishida N : Food deprivation induces adipose plasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) expression without accumulation of plasma PAI-1 in genetically obese and diabetic db/db mice. *Thromb Haemost* **98** : 864-870, 2007.
- 47) Shimba S, Ishii N, Ohta Y, Ohno T, Watabe Y, Hayashi M, Wada T, Aoyagi T, Tezuka M : Brain and muscle Arnt-like protein-1 (BMAL1), a component of the molecular clock, regulates adipogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102** : 12071-12076, 2005.
- 48) Turek FW, Joshu C, Kohsaka A, Lin E, Ivanova G, McDearmon E, Laposky A, Losee-Olson S, Easton A, Jensen DR, Eckel RH, Takahashi JS, Bass J : Obesity and metabolic syndrome in circadian Clock mutant mice. *Science* **308** : 1043-1045, 2005.
- 49) Oishi K, Atsumi G, Sugiyama S, Kodomari I, Kasamatsu M, Machida K, Ishida N : Disrupted fat absorption attenuates obesity induced by a high-fat diet in Clock mutant mice. *FEBS Lett* **580** : 127-130, 2006.
- 50) Kudo T, Tamagawa T, Kawashima M, Mito N, Shibata S : Attenuating Effect of Clock Mutation on Triglyceride Contents in the ICR Mouse Liver under a High-Fat Diet. *J Biol Rhythms* **22** : 312-323, 2007.
- 51) Oishi K, Kasamatsu M, Ishida N : Gene- and tissue-specific alterations of circadian clock gene expression in streptozotocin-induced diabetic mice under restricted feeding. *Biochem Biophys Res Commun* **317** : 330-334, 2004.
- 52) Yanagihara H, Ando H, Hayashi Y, Obi Y, Fujimura A : High-fat feeding exerts minimal effects on rhythmic mRNA expression of clock genes in mouse peripheral tissues. *Chronobiol Int* **23** : 905-914, 2006.
- 53) Curtis AM, Seo SB, Westgate EJ, Rudic RD, Smyth EM, Chakravarti D, FitzGerald GA, McNamara P : Histone acetyltransferase-dependent chromatin remodeling and the vascular clock. *J Biol Chem* **279** : 7091-7097, 2004.
- 54) Doi M, Hirayama J, Sassone-Corsi P : Circadian regulator CLOCK is a histone acetyltransferase. *Cell* **125** : 497-508, 2006.
- 55) Takeda N, Maemura K, Horie S, Oishi K, Imai Y, Harada T, Saito T, Shiga T, Amiya E, Manabe I, Ishida N, Nagai R : Thrombomodulin is a clock-controlled gene in vascular endothelial cells. *J Biol Chem* **282** : 32561-32567, 2007.