

令和元年6月18日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19411

研究課題名(和文)血管病変におけるSirt7の機能解析

研究課題名(英文) the role of sirt7 in the vascular disease

研究代表者

荒木 智 (Araki, Satoshi)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教

研究者番号：20706717

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：血管病変におけるSirt7の役割を解明するために、Sirt7ノックアウトマウスを用いてワイヤー挿入による血管内皮障害モデルを作成し、28日後の新生内膜増生がSirt7ノックアウトマウスにて有意に抑制されることを見出した。Sirt7の血管病変に及ぼす影響の分子機序を解明するために新生内膜や動脈硬化巣の形成の中心的役割を果たす血管平滑筋細胞を用いた検討を行った。血管平滑筋細胞(VSMCs)を用いた実験ではSirt7ノックアウトマウス由来VSMCsは野生型マウス由来VSMCsと比較し血清刺激による細胞増殖および遊走能が低下しており、それにmiRNAの発現変化の関与が疑われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サーチュインはいわゆる「長寿遺伝子」として知られており、なかでもSirt7は近年飛躍的に機能解析が進みつつある。「ヒトは血管とともに老いる」と言われるように、血管機能障害や動脈硬化は老化の一つの表現型であり、血管病変におけるSirt7の機能を本研究で明らかにすることで、新たな血管障害に対する治療法の解明につながると考えられる。実際、Sirt7の欠如は血管内皮障害モデルにおける血管新生内膜の造成を抑制しており、Sirt7を抑制することで、冠動脈治療後などの血管内再狭窄の予防につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Sirt7 expression was increased in various vascular disease mouse models. To identify the role of Sirt7 in vascular diseases, we created a mouse model of vascular wire injury. Sirt7^{-/-} mice showed significant reduced in neointimal formation compared to wild type (WT) mice. In vitro experiments, lack of Sirt7 attenuated serum-induced proliferation and migration of vascular smooth muscle cells (VSMCs). These changes were accompanied by increasing of miRNA 290-295 cluster.

研究分野：循環器内科

キーワード：Sirt7 血管内皮障害 新生内膜

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Sirt2 遺伝子は酵母や線虫の寿命を延ばす遺伝子として発見され、広く注目を集めた遺伝子である(Nature 2001)。Sirt2 は NAD 依存性にヒストンを脱アセチル化することにより遺伝子の転写抑制を行うとされており、哺乳類ではそのホモログとして Sirt1 から Sirt7 までの 7 つが報告されている。Sirtuin 蛋白に関しては多くの研究がなされており、ヒストンの脱アセチル化のみならず、転写因子などのタンパクも脱アセチル化することで、老化や代謝、さらには血管新生、炎症などの様々な生体反応を制御していることが明らかとなっている。

なかでも Sirt2 遺伝子と哺乳類での相同性を持ったもっとも盛んに研究がなされている Sirtuin 蛋白が Sirt1 である。血管新生の促進や、炎症抑制、代謝改善効果を持つとされており、その活性を上げる可能性がある健康食品が発売されたまたカロリー制限によるマウスの寿命延長には Sirt1 が必要であることや Sirt6 過剰発現マウスは寿命が野生型に比べ長いなど、酵母や線虫のみならず哺乳類でも Sirtuin 蛋白の寿命への関与が報告されている。

一方、**Sirt7** は主に核小体に存在し、RNA ポリメラーゼ I の活性を制御することが報告されていたが、その生体内での役割は長く不明であった。2008 年に我々の共同研究者である Bober らにより、世界初の Sirt7 ノックアウトマウスが作成され、野生型マウスに比較しノックアウトマウスでは寿命が短縮することが報告されており、p53 のアセチル化による心筋細胞のアポトーシス増加が一因と報告されている。(Circulation Research 2008) 梗塞後の創傷治癒において必須の分子であることを明らかにし *Circulation* 誌に報告した (Araki et.al *Circulation*.2015)。心疾患における Sirt7 の重要性が明らかになった一方で、Sirt7 の血管機能障害や動脈硬化に与える影響は全く分かっていない。

2. 研究の目的

我々は予備検討において、siRNA を用いて Sirt7 をノックダウンすると血管平滑筋細胞の増殖や遊走が有意に抑制され、その機序として細胞周期制御タンパクの減少が関与している可能性を見出ししている。本研究では Sirt7 の血管疾患における役割を in vivo で明らかにするため、血管平滑筋特異的 Sirt7 ノックアウトマウス及び動脈硬化マウスと Sirt7 ノックアウトマウスのダブルノックアウトマウスを作成し病態モデルにおける細胞応答を比較検討し、その分子機序を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

1)血管障害モデルでの検討

カテーテルによる血管内治療後の再狭窄は、薬剤溶出性ステントの使用が一般的になった現在でも大きな問題のひとつである。本研究では野生型マウスと Sirt7 ノックアウトマウスに対してワイヤー挿入による内膜剥離モデルを作成する。次に血管障害後の病変形成において、いずれの細胞の Sirt7 が最も寄与しているかを明らかにするため、血管平滑筋特異的 Sirt7 ノックアウトマウスの作成し、それらのマウスに対して上記の血管障害モデルを作成し比較検討する。また病理組織学的検討にて、炎症細胞の浸潤や細胞増殖マーカーの発現について比較検討する。さらに大動脈の組織から mRNA を抽出し、細胞増殖、炎症、細胞周期関連遺伝子の発現を検討する。

2)血管平滑筋細胞を用いた Sirt7 の役割の検討

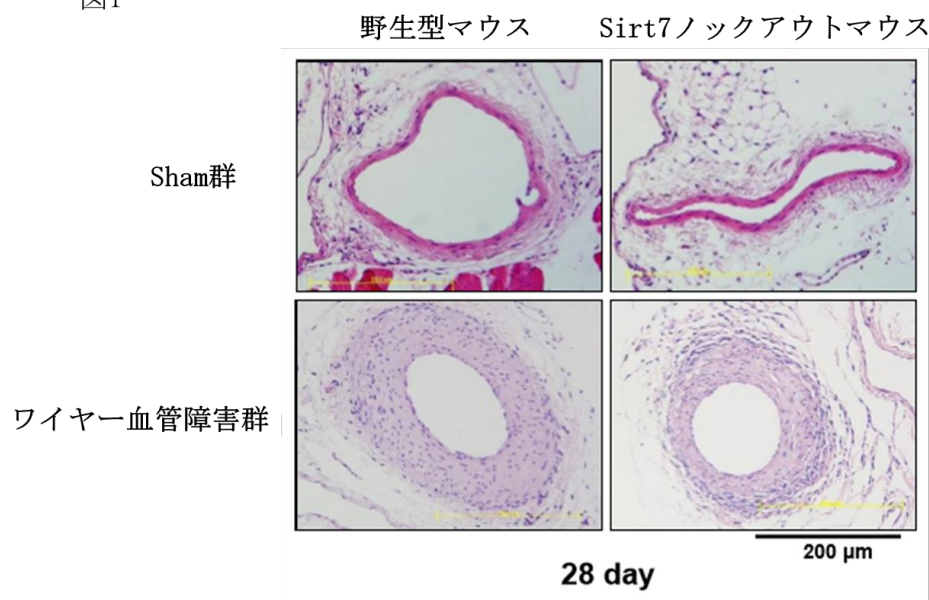
新生内膜や動脈硬化巣の形成の中心的役割を果たす血管平滑筋細胞を用いて Sirt7 の役割お

よびその分子メカニズムを検証する。野生型マウスおよびSirt7ノックアウトマウス由来の初代培養平滑筋を用いる。われわれは予備検討で、Sirt7 が細胞周期制御タンパクである Cyclin D1 やCDK4 の発現に影響を与える可能性を見出している。また小胞体ストレス応答がSirt7の欠如にて減弱することも見出しており、細胞周期および小胞体ストレス応答におけるSirt7の役割を解析する。

4. 研究成果

血管病変において増加している Sirt7 の役割を解明するために、Sirt7 ノックアウトマウスを用いて血管障害モデルを作成し研究を行った。野生型マウスおよびSirt7 ノックアウトマウスに対してワイヤー挿入による大腿動脈内膜剥離を行い、血管内皮障害モデルを作成した。28 日後に新生内膜増生を HE 染色にて評価した。その結果、Sirt7 ノックアウトマウスでは野生型マウスに比較し、新生内膜の増生が有意に抑制されていた(図 1)。

図1

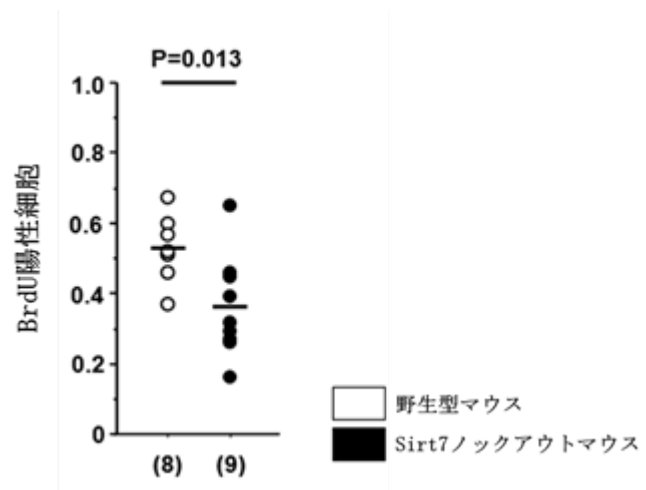


また BrdU 染色による評価では、Sirt7 ノックアウトマウスの新生内膜では野生型マウスと比較して細胞増殖が抑制されていることを見出した(図 2)。さらに Sirt7 の血管病変に

及ぼす影響の分子機序を解明するために、新生内膜や動脈硬化巣の形成の中心的役割を果たす血管平滑筋細胞を用いた検討を行った。野生型マウス、Sirt7 ノックアウトマウスよりそれぞれ初代培養した血管平滑筋細胞 (VSMCs) を用いた実験において、野生型マウス由来の VSMCs に比較して、Sirt7 ノックアウトマウス由来 VSMCs は血清刺激による細胞増殖が低下していた。

またボイデンチャンバーを用いた評価では Sirt7 由来 VSMCs では野生型マウス由来 VSMCs に比べ、遊走能が低下していた。これらの所見は Sirt7 が細胞増殖を制御することにより新生内膜増生を制御することを示唆する所見である。

図2



その機序として細胞増殖に関与する miRNA の解析を行って所 miR290-miR295 が Sirt7 ノックアウトマウス由来血管平滑筋細胞において増加することを見出した。さらに小胞体ストレスが動脈硬化や平滑筋の増殖を亢進させることに注目し、Sirt7 による平滑筋の増殖や遊走能制御に小胞体ストレス応答が関与すると仮説を立て検証を行った。小胞体ストレスを誘導するツニカマイシンの投与で増加する XBP1s の発現は Sirt7 ノックアウトマウス由来の VSMCs にて有意に減少することを見出した。これらの所見により Sirt7 が miRNA や小胞体ストレス応答を制御することにより血管平滑筋増殖を制御すること考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 2 件)

2016 年 日本循環器学会総会

演題名: Sirt7 Deficiency Attenuates Vascular Smooth Muscle Cells Function and Neointimal Hyperplasia in Response to Vascular Injury.

発表者: 泉家 康宏、木村 優一、荒木 智

2017 年 第 122 回日本循環器学会九州地方会

演題名: Sirt7 は血管平滑筋細胞の細胞周期と炎症応答を制御し血管病変形成に寄与する

発表者: 木村 優一、泉家 康宏、荒木 智、山村 智、石田 俊史、尾上 喜郎、花谷 信介、海北 幸一、辻田 賢一

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年:
国内外の別:

取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年:
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者 該当なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者 該当なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。