

令和 2 年 5 月 26 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08600

研究課題名（和文）SIRT1による新規オートファジー制御機構の解明と心不全における意義

研究課題名（英文）Novel role of SIRT1 in regulation of autophagy and its role in heart failure

研究代表者

久野 篤史（Kuno, Atsushi）

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30468079

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：SIRT1によるオートファジー・ミトファジー制御機構とその意義を明らかにすることを目的として本研究を行った。

筋ジストロフィーモデルであるmdxマウスへのSIRT1活性化薬投与は、心組織のミトファジーを回復させ心機能を改善させた。また培養心筋細胞では、CCCPにより誘導されるミトファジーがSIRT1活性阻害により遮断された。SIRT1阻害により、オートファゴソームとリソソームの融合が阻害された。

以上の結果から、SIRT1はオートファゴソームとリソソームの融合に重要な役割を果たし、心保護的に作用する可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、SIRT1がオートファジーの進行に重要であるオートファゴソームとリソソームの融合に重要な役割を果たすことを見出した。心不全心筋ではオートファジー不全が心機能障害性に作用するが、オートファジーの新たな調節機構の解明は新たな心疾患治療の開発につながる。

心疾患以外にもオートファジー不全が関与する病態は数多く存在することも最近わかってきていることから、本研究の成果は様々な疾患における新しい病態の発見やSIRT1-オートファジー/ミトファジーを介した新しい治療法の開発に結び付く可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We investigated how SIRT1 regulates autophagy/mitophagy and its role in heart diseases. We found that administration of the SIRT1 activator to mdx mice, a model of muscular dystrophy, restored mitophagy in the heart and led to the improvement in cardiac function. In cardiomyocytes, knockdown of SIRT1 blocked CCCP-induced mitophagy and interrupted fusion of autophagosomes and lysosomes. These results suggest that SIRT1 is involved in autophagosome-lysosome fusion to promote autophagy/mitophagy and protects the heart via autophagy/mitophagy activation.

研究分野：循環器病学

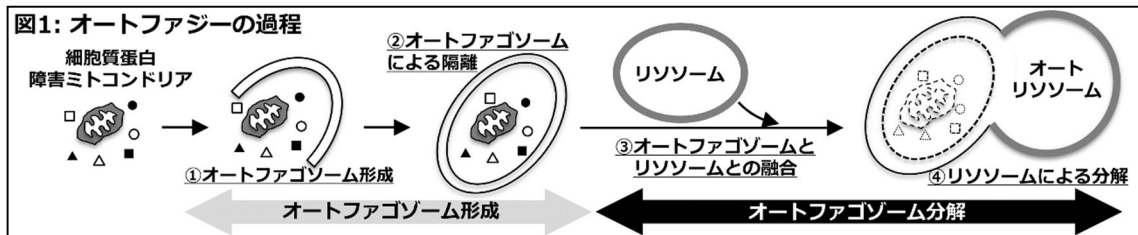
キーワード：オートファジー SIRT1 心不全

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

心不全の予後は現在の治療によっても不良である。心不全の発症は加齢に伴い増加するため、老化制御因子がその発症・進展に関わると予想される。近年サーチュインや mTOR などの老化制御因子が同定された。サーチュインの一つである SIRT1 は種々のストレス下で NAD⁺依存性に標的蛋白の脱アセチル化を行い、ストレス耐性を獲得して細胞を生存させる。サーチュイン「活性化」また mTOR「抑制」が酵母・線虫などの寿命を延長させることや、SIRT1 は mTOR のキナーゼ活性を「抑制」することが知られている。これまで我々は、心不全モデルにおいて SIRT1 活性化が心保護作用をもたらすことを報告してきた。また、SIRT1 の心臓保護機構として酸化ストレス軽減や心肥大抑制を見出してきた。一方これらでは説明できない SIRT1 の心保護作用の存在を示唆する実験結果を得ていたが、その詳細は検討されていなかった。

SIRT1 の重要な機能に「オートファジー促進」がある。オートファジーは、細胞質蛋白やミトコンドリアなどのオルガネラをオートファゴソームという隔離膜で囲みリソソームで分解する機構で、その過程はオートファゴソーム「形成」と「分解」に分かれる(図1)。



飢餓時に AMPK 活性化や mTOR 抑制を介してオートファゴソーム形成を刺激し、オートファジーによる分解産物はエネルギー源としてリサイクルされ、オートファジーは心機能維持に重要な役割を果たすと考えられている。これまで SIRT1 のオートファジー調節点としてはオートファゴソーム形成を促進することが知られていた。ところが上記のような従来の機能と異なり、我々は SIRT1 と mTOR がオートファゴソーム分解をそれぞれ促進、抑制する機構が存在することを示す実験結果を得た。しかし SIRT1 によるオートファゴソーム「分解」調節機構の報告はなく、その機序も不明である。

2. 研究の目的

これらの背景から、本研究では SIRT1/mTOR がオートファゴソーム「分解」の調節に関わるかどうか、またその分子メカニズムを明らかにすることを主な目的とした。

3. 研究の方法

(1)実験1: マウスモデルの検討

mdx マウス心筋におけるオートファジー障害と SIRT1 活性化の影響の検討: mdx マウスの心筋におけるオートファジー活性(オートファゴソームの量の指標である LC3 とオートファジー依存性に分解を受ける p62 蛋白)を評価する。

SIRT1 ノックアウトマウスの評価: オートファジーが SIRT1 ノックアウトにより障害をうけるかどうか、またその部位、そしてオートファゴソーム分解阻害によるオートファジー阻害の効果を評価する。

(2)実験2: 培養心筋細胞を用いた検討

mTORC1 阻害によるオートファジー障害に対する SIRT1 活性化の影響を、オートファゴソームを Western blot や細胞面積染色でモニターすることにより評価した。

脱共役剤である CCCP により誘導性されるマイトファジーモデルを確立する。そして、それにおける SIRT1 の役割を、siRNA で SIRT1 をノックダウンすることにより評価した。

オートファゴソーム - リソソーム融合における SIRT1 の役割解明オートファゴソームとリソソームを蛍光顕微鏡で可視化できるモデルを構築し、SIRT1 阻害の影響を評価した。

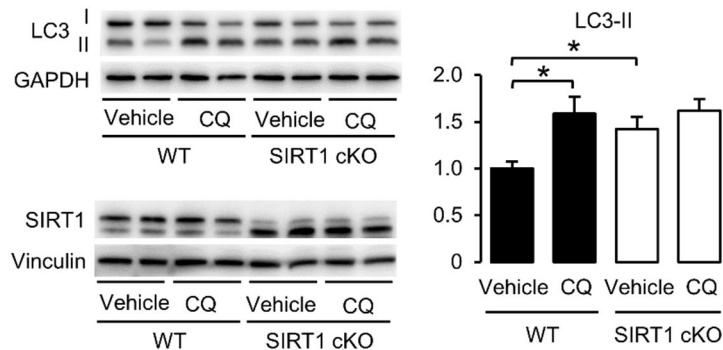
4. 研究成果

(1)- : mdx マウスにおける心筋組織では、a) mTORC1 が活性化しており、b) オートファゴソームや p62 蛋白が蓄積し、c) 障害ミトコンドリアの指標である欠失ミトコンドリア DNA (mtDNA) の量が増加していた。以上から、mdx マウスでは mTORC1 活性化によりオートファゴソームの分解が阻害されオートファジーの活性が低下したため障害ミトコンドリアも蓄積したと考えられた。一方、SIRT1 活性化薬であるレスベラトロールの投与により、d) オートファゴソームや p62 蛋白の蓄積は改善し、欠失 mtDNA の量も減少した。e) 一方、mTORC1 活性はレスベラトロールにより影響を受けなかった。従って、SIRT1 の活性化がオートファゴソームの分解を回復してマイトファジーによる障害ミトコンドリアの分解を促進したと考えられた。

(1)- : 心筋細胞特異的 SIRT1 ノックアウトマウスの心筋組織では、オートファゴソーム指標である LC3-II 量が蓄積し、クロロキンによるオートファゴソーム分解阻害の影響を受けなかった

(図2)。従って、SIRT1 ノックアウトによりオートファゴソームの分解が阻害されオートファゴソームが蓄積すると考えられた。

図2: SIRT1ノックアウトマウス心臓ではオートファゴソーム分解が抑制されている。

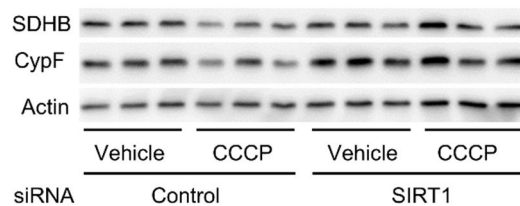


(2)- 心筋細胞株である H9c2 細胞を用いた。mTORC1 阻害薬である MHY1485 処置はオートファゴソームの指標である LC3-II レベルを増加させ、この効果は mTORC1 阻害薬であるラパマイシンで遮断され、そしてリソソーム阻害薬であるクロロキン存在下で変化なかった。従って、心筋細胞において mTORC1 の過剰な活性化はオートファゴソームの分解を阻害してオートファジーを障害すると考えられた。

SIRT1 活性化薬であるレスベラトロールは MHY1485 処置によるオートファゴソーム蓄積を軽減し、この効果は SIRT1 ノックダウンにより遮断された。従って、mTORC1 活性化によるオートファゴソーム蓄積は SIRT1 活性化により抑制されることが示された。

(2)- : H9c2 細胞において、CCCP 処置によりミトコンドリア蛋白が低下する条件、つまりマイトファジー誘導の条件を確立した。このモデルにおいて、SIRT1 をノックダウンすると CCCP によるミトコンドリア蛋白低下が遮断されたことから (図3)、SIRT1 はマイトファジーの過程に関与することが示された。

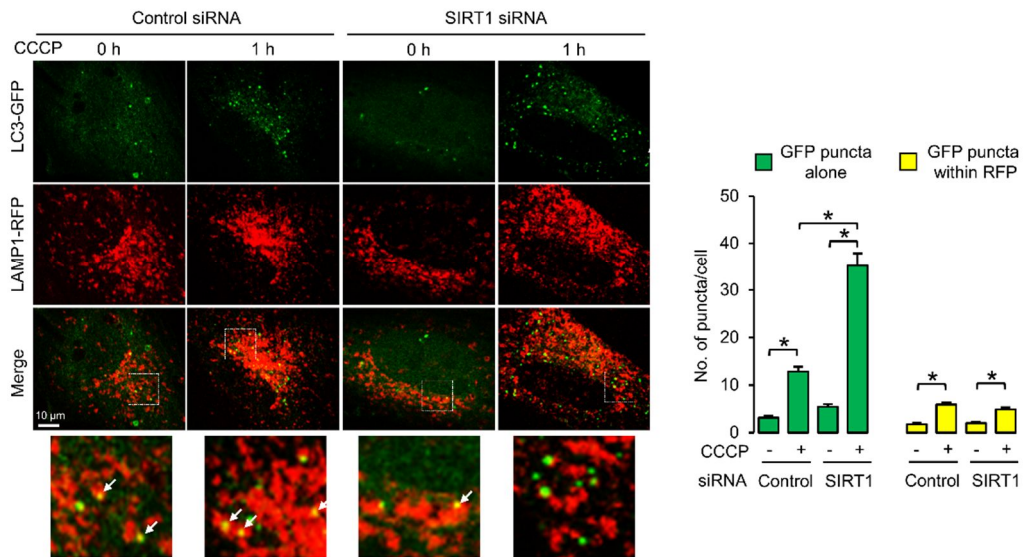
図3: 心筋細胞においてSIRT1ノックダウンによりマイトファジーが抑制される。



SIRT1 によるマイトファジー進行における作用点を明らかにするため、オートファゴソームの量を評価した。CCCP 処置によりオートファゴソームの指標である LC3-II の量が増加し、オートファゴソームの形成が促進されたと考えられた。SIRT1 siRNA による SIRT1 のノックダウンにより、CCCP 処置による LC3-II の増加はより大きくなった。この結果から、SIRT1 阻害下ではオートファゴソーム形成は維持され、一方オートファゴソームの分解が障害されることが示された。

(2)- : オートファゴソームとリソソームの融合を可視化するために、オートファゴソームの指標である GFP 標識 LC3 とリソソームの指標として RFP 標識 LAMP1 を共発現する H9c2 細胞を準備した。CCCP 処置でマイトファジーを誘導すると、GFP-LC3 dot と RFP-LAMP1 の共局在が増加したことから、マイトファジー誘導によりオートファゴソームとリソソームの融合が促進されたと考えられた。一方、この CCCP による反応は SIRT1 をノックダウンした細胞では減弱していた (図4)。従って SIRT1 はオートファゴソームとリソソームが融合する過程に重要な役割を果たすと考えられた。

図4: 心筋細胞においてSIRT1ノックダウンによりオートファゴソームとリソソームの融合が抑制される。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 9件 / うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Sebori R, Kuno A, Hosoda R, Hayashi T, Horio Y.	4. 巻 2018
2. 論文標題 Resveratrol Decreases Oxidative Stress by Restoring Mitophagy and Improves the Pathophysiology of Dystrophin-Deficient mdx Mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oxid Med Cell Longev.	6. 最初と最後の頁 9179270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1155/2018/9179270.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kuno A, Hosoda R, Sebori R, Hayashi T, Sakuragi H, Tanabe M, Horio Y.	4. 巻 8
2. 論文標題 Resveratrol Ameliorates Mitophagy Disturbance and Improves Cardiac Pathophysiology of Dystrophin-deficient mdx Mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 15555
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-33930-w.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Fujiwara Daisuke, Iwahara Naotoshi, Sebori Rio, Hosoda Ryusuke, Shimohama Shun, Kuno Atsushi, Horio Yoshiyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 SIRT1 deficiency interferes with membrane resealing after cell membrane injury	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0218329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0218329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kuno Atsushi, Kimura Yukishige, Mizuno Masashi, Oshima Hiroto, Sato Tatsuya, Moniwa Norihito, Tanaka Marenao, Yano Toshiyuki, Tanno Masaya, Miki Takayuki, Miura Tetsuji	4. 巻 10
2. 論文標題 Empagliflozin attenuates acute kidney injury after myocardial infarction in diabetic rats	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7238
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-64380-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Abe Koki, Yano Toshiyuki, Tanno Masaya, Miki Takayuki, Kuno Atsushi, Sato Tatsuya, Kouzu Hidemichi, Nakata Kei, Ohwada Wataru, Kimura Yukishige, Sugawara Hirohito, Shibata Satoru, Igaki Yusuke, Ino Shoya, Miura Tetsuji	4. 巻 1865
2. 論文標題 mTORC1 inhibition attenuates necroptosis through RIP1 inhibition-mediated TFEB activation	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease	6. 最初と最後の頁 16552 ~ 16552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbadis.2019.16552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kimura Yukishige, Kuno Atsushi, Tanno Masaya, Sato Tatsuya, Ohno Kouhei, Shibata Satoru, Nakata Kei, Sugawara Hirohito, Abe Koki, Igaki Yusuke, Yano Toshiyuki, Miki Takayuki, Miura Tetsuji	4. 巻 10
2. 論文標題 Canagliflozin, a sodium-glucose cotransporter?2 inhibitor, normalizes renal susceptibility to type?1 cardiorenal syndrome through reduction of renal oxidative stress in diabetic rats	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Diabetes Investigation	6. 最初と最後の頁 933 ~ 946
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jdi.13009	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Oshima Hiroto, Miki Takayuki, Kuno Atsushi, Mizuno Masashi, Sato Tatsuya, Tanno Masaya, Yano Toshiyuki, Nakata Kei, Kimura Yukishige, Abe Koki, Ohwada Wataru, Miura Tetsuji	4. 巻 368
2. 論文標題 Empagliflozin, an SGLT2 Inhibitor, Reduced the Mortality Rate after Acute Myocardial Infarction with Modification of Cardiac Metabolomes and Antioxidants in Diabetic Rats	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics	6. 最初と最後の頁 524 ~ 534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1124/jpet.118.253666	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Mizuno Masashi, Kuno Atsushi, Yano Toshiyuki, Miki Takayuki, Oshima Hiroto, Sato Tatsuya, Nakata Kei, Kimura Yukishige, Tanno Masaya, Miura Tetsuji	4. 巻 6
2. 論文標題 Empagliflozin normalizes the size and number of mitochondria and prevents reduction in mitochondrial size after myocardial infarction in diabetic hearts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Physiological Reports	6. 最初と最後の頁 e13741 ~ e13741
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14814/phy2.13741	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tatekoshi Yuki, Tanno Masaya, Kouzu Hidemichi, Abe Koki, Miki Takayuki, Kuno Atsushi, Yano Toshiyuki, Ishikawa Satoko, Ohwada Wataru, Sato Tatsuya, Niinuma Takeshi, Suzuki Hiromu, Miura Tetsuji	4. 巻 119
2. 論文標題 Translational regulation by miR-301b upregulates AMP deaminase in diabetic hearts	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 138 ~ 146
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2018.05.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Yano Toshiyuki, Abe Koki, Tanno Masaya, Miki Takayuki, Kuno Atsushi, Miura Tetsuji, Steenbergen Charles	4. 巻 23
2. 論文標題 Does p53 Inhibition Suppress Myocardial Ischemia?Reperfusion Injury?	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics	6. 最初と最後の頁 350 ~ 357
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1074248418763612	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohno Kouhei, Kuno Atsushi, Murase Hiromichi, Muratsubaki Shingo, Miki Takayuki, Tanno Masaya, Yano Toshiyuki, Ishikawa Satoko, Yamashita Tomohisa, Miura Tetsuji	4. 巻 313
2. 論文標題 Diabetes increases the susceptibility to acute kidney injury after myocardial infarction through augmented activation of renal Toll-like receptors in rats	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology	6. 最初と最後の頁 H1130 ~ H1142
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1152/ajpheart.00205.2017	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Muratsubaki Shingo, Kuno Atsushi, Tanno Masaya, Miki Takayuki, Yano Toshiyuki, Sugawara Hirohito, Shibata Satoru, Abe Koki, Ishikawa Satoko, Ohno Kouhei, Kimura Yukishige, Tatekoshi Yuki, Nakata Kei, Ohwada Wataru, Mizuno Masashi, Miura Tetsuji	4. 巻 7
2. 論文標題 Suppressed autophagic response underlies augmentation of renal ischemia/reperfusion injury by type 2 diabetes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 5311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-017-05667-5	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ogasawara Makoto, Yano Toshiyuki, Tanno Masaya, Abe Koki, Ishikawa Satoko, Miki Takayuki, Kuno Atsushi, Tobisawa Toshiyuki, Muratsubaki Shingo, Ohno Kouhei, Tatekoshi Yuki, Nakata Kei, Ohwada Wataru, Miura Tetsuji	4. 巻 108
2. 論文標題 Suppression of autophagic flux contributes to cardiomyocyte death by activation of necroptotic pathways	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Molecular and Cellular Cardiology	6. 最初と最後の頁 203 ~ 213
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yjmcc.2017.06.008	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tobisawa Toshiyuki, Yano Toshiyuki, Tanno Masaya, Miki Takayuki, Kuno Atsushi, Kimura Yukishige, Ishikawa Satoko, Kouzu Hidemichi, Nishizawa Keitaro, Yoshida Hideaki, Miura Tetsuji	4. 巻 112
2. 論文標題 Insufficient activation of Akt upon reperfusion because of its novel modification by reduced PP2A-B55 contributes to enlargement of infarct size by chronic kidney disease	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Basic Research in Cardiology	6. 最初と最後の頁 31
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00395-017-0621-6	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件)

1. 発表者名 久野篤史
2. 発表標題 SIRT1の活性化はミトファジーにより障害ミトコンドリアを除去して筋ジストロフィー心筋障害を軽減する
3. 学会等名 第41回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsushi Kuno
2. 発表標題 Sirt1 Activation Restores Mitophagy-Mediated Clearance of Damaged Mitochondria and Ameliorates Dystrophic Cardiomyopathy in Mice
3. 学会等名 American Heart Association Scientific Sessions 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久野篤史
2. 発表標題 レスベラトロールによる筋ジストロフィー治療
3. 学会等名 第69回 日本薬理学会北部
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsushi Kuno
2. 発表標題 The SIRT1 activator resveratrol ameliorates dystrophic cardiomyopathy by promoting mitophagy. 久野 篤史
3. 学会等名 European Society of Cardiology Congress 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久野篤史、細田隆介、堀尾嘉幸
2. 発表標題 Role of impaired autophagosome clearance in cardiomyopathy of dystrophin-deficient mice.
3. 学会等名 第82回 日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 久野篤史、細田隆介、瀬堀理生、堀尾嘉幸
2. 発表標題 筋ジストロフィー心筋におけるオートファジー不全の意義
3. 学会等名 第68回 日本薬理学会北部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Atsushi Kuno, Ryusuke Hosoda, Yoshiyuki Horio
2. 発表標題 SIRT1, a protein deacetylase, contributes to mitophagy by promoting autophagosome-lysosome fusion in the cardiomyocyte.
3. 学会等名 第93回 日本薬理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 久野篤史、細田隆介、堀尾嘉幸
2. 発表標題 ミトファジーにおける蛋白脱アセチル化酵素 SIRT1 の役割
3. 学会等名 第70回 日本薬理学会北部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 久野篤史、細田隆介、堀尾嘉幸
2. 発表標題 蛋白脱アセチル化酵素SIRT1はオートファゴソームの分解を介してミトファジーを制御する
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Kuno
2. 発表標題 Role of impaired autophagy caused by aberrant activation of mTORC1 in dystrophic cardiomyopathy
3. 学会等名 Keystone symposia Conference (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Atsushi Kuno
2. 発表標題 Restoration of impaired autophagosome clearance underlies amelioration of cardiomyopathy afforded by SIRT1 activation in dystrophin-deficient mice.
3. 学会等名 第 34 回国際心臓研究学会日本部会 (ISHR2017)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Atsushi Kuno
2. 発表標題 Role of autophagy-mediated clearance of mitochondria in cardioprotection afforded by the protein deacetylase SIRT1 in dystrophin-deficient mdx mice.
3. 学会等名 Keystone Symposia Conference: Mitochondrial Biology
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsushi Kuno
2. 発表標題 Resveratrol, a SIRT1 activator, restores autophagy-mediated clearance of damaged mitochondria and ameliorates dystrophic cardiomyopathy in mice.
3. 学会等名 第22回 日本心不全学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Atsushi Kuno
2. 発表標題 Protective Role of SIRT1, a Protein Deacetylase, in Doxorubicin-induced Cardiotoxicity.
3. 学会等名 第83回 日本循環器学会年次学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	堀尾 嘉幸 (Horio Yoshiyuki) (30181530)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究 分担者	矢野 俊之 (Yano Toshiyuki) (40444913)	札幌医科大学・医学部・講師 (20101)	