

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08533

研究課題名（和文）石灰化大動脈弁狭窄症の発症抑制における長寿遺伝子Sirt-1の役割解明

研究課題名（英文）The role of Sirt-1 in development of calcific aortic valve stenosis

研究代表者

渡邊 哲（Watanabe, Tetsu）

山形大学・医学部・准教授

研究者番号：40359568

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：人口の高齢化により大動脈弁狭窄症が増加しているが有効な薬物療法はない。長寿遺伝子Sirt-1は加齢が関与する疾患の発症抑制に関与する。しかし大動脈弁狭窄症とSirt-1の関係は十分に検討されていない。本研究では、ブタ大動脈弁間質細胞を用い、大動脈弁石灰化にSirt-1の果たす役割を検討する。さらに我々が開発したマウス大動脈弁ワイヤー傷害石灰化大動脈弁狭窄症モデルを用いて、傷害大動脈弁におけるSirt-1の発現と大動脈弁石灰化について検討する。さらにSirt-1活性化薬の投与により組織修復を促進させ、大動脈弁尖のリモデリング抑制、大動脈弁圧較差の減少および石灰沈着の抑制が生じるか検討を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高齢人口の増加に伴い心不全患者が急増しており、その重要な原因の1つに大動脈弁狭窄症（AVS）の増加が挙げられる。AVSの危険因子は動脈硬化と共通するが、脂質低下療法を含めAVS進行抑制に有効な薬物療法がない。長寿遺伝子Sirt-1は加齢が関与する疾患の発症抑制に関与することが報告されているが、AVSの進行とSirt-1の関係は未だ不明である。本研究では、Sirt-1がAVSの進展抑制に果たす役割を明らかにする。Sirt-1活性化薬がAVS進展を抑制するか検討し、新しい治療法確立を目指す。

研究成果の概要（英文）：The prevalence of aortic valve stenosis (AVS) is increasing with increasing the elderly population. However, effective drug therapy has not been established. Sirt-1 is reportedly involved in suppressing the development of age-related diseases. The relationship between Sirt-1 and the progression of calcific AVS has not been fully investigated. In this study, we investigate the role of Sirt-1 in the development of calcific AVS using porcine aortic valve interstitial cells. Furthermore, we examine Sirt-1 expression and aortic valve calcification using wire injury calcific AVS mouse model. We also examine whether administration of Sirt-1 activators can promote tissue repair, inhibit aortic valve leaflet remodeling, reduce aortic valve pressure gradient, and inhibit calcification.

研究分野：循環器内科学

キーワード：大動脈弁狭窄症 石灰化 Sirt-1 Shear stress 長寿遺伝子 早期細胞老化 石灰化大動脈弁狭窄症

1. 研究開始当初の背景

心不全患者は世界的に増加しており、心不全パンデミックと呼ばれている。2017年度の心不全入院患者は全国で26万人にのぼり(2017年度循環器疾患診療実態調査報告書)その約4分の1が心臓弁膜症を原因とする。大動脈弁狭窄症(AVS)は最も頻度の高い弁膜症であり、人口の高齢化とともに、その有病率が増加している。欧米では75歳以上の一般住民におけるAVSの有病率は12.4%で、うち3.4%が重症AVSと報告されている(JACC 2013;62:1002-12)。AVSの治療の基本は外科手術であり、手術適応の重症AVSの5年生存率は15-50%と予後不良である。2017年度の外科的大動脈弁置換術(SAVR)は11,210件に達している。近年、外科手術が困難な合併症を有する高齢AVS患者に対し、経カテーテル大動脈弁置換術(TAVR)が施行可能となった。2017年度のTAVRは3,346件と、前年の1,614件より倍増している。今後団塊の世代が75歳を迎えるに当たりSAVRおよびTAVRを必要とする患者は爆発的に増加することが予想される。

AVSの初期段階では、大動脈弁石灰化とカスプ肥厚を生じるが、流出路狭窄は起こさない。65歳以上の20-30%、85歳以上の48%で大動脈弁石灰化が認められ、5年で約9%の人がAVSに進展すると報告されている。また先天性二尖弁は人口の1-2%に見られ、AVSの主要な発症要因とされ、大動脈弁が三尖の場合より10-20年早く、AVSを発症する(JACC 2008;51:1327-1336)。心臓超音波検査などにより、大動脈弁石灰化は容易にスクリーニングが可能であることより、無症候な大動脈弁石灰化症例に対して、重症AVSへの進展抑制を図ることが重要である。

AVSは高血圧、糖尿病、脂質異常症など危険因子が動脈硬化疾患と共通するが、アンジオテンシン変換酵素阻害薬や強力なスタチン療法はAVSの進展および予後を改善しないことが報告されており(Circulation 2004;110:1291-1295, NEJM 2008;359:1343-56)未だ有効な薬物療法は確立していない。また半数のAVS患者では動脈硬化疾患を合併していないことが報告されている(J Heart Valve Dis 2010;19:466-470)。

Sirtuin (Sirt)は高度に保存されたNAD⁺依存性ヒストン脱アセチル化酵素であり、カロリー制限などで活性化されることから、以前より長寿との関係が推測されてきた。哺乳類ではSirt-1からSirt-7まで存在し、Sirt-1の働きが最も解明されている。Sirt-1は脳、心臓、肝臓、膵臓、骨格筋、脾臓、脂肪組織など全身の臓器に発現し、細胞内では核および細胞質内に局在している。様々な蛋白量を調整し、酸化ストレス、代謝、細胞増殖、ゲノム安定性などの生物学的プロセスに重要な役割を果たす。これまでSirt-1は加齢が関与するがんやアルツハイマー病、心血管疾患、糖尿病の発症を抑制する可能性が報告されている(N Engl J Med 2011;364:2235-2244)。細胞老化には、(1)テロメア短縮を伴う細胞老化と、(2)テロメア短縮を伴わないストレス誘発性の早期細胞老化がある。酸化ストレスやDNA傷害が関与する疾患発症には後者の関与が大きく(Can J Cardiol 2016;32:634-641) Sirt-1による新しい心血管疾患の発症抑制メカニズムとして注目されている(Future Cardiol 2012; 8: 89-100, Antioxid Redox Signal 2018;28(8):711-732)。レスベラトロールやSRT1720などSirt活性化薬による疾患発症抑制効果が検討されており、臨床応用が期待されている(Nat Rev Drug Discov 2015;11:443-461, Biochem Biophys Res Comm 2015;1852: 1311-1322)。しかし、これまでSirt-1とAVS発症の関係を検討した報告は極めて少なく(PLoS ONE 7(4): e35110) AVS発症におけるSirt-1の役割は、ほとんど知られていない。

2. 研究の目的

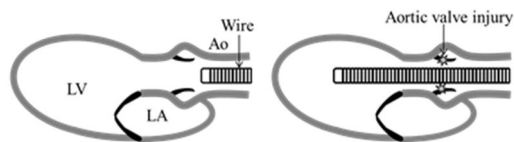
本研究の目的は、石灰化大動脈弁狭窄症の発症抑制における長寿遺伝子Sirt-1の役割解明である。AVSの重要な原因の一つとして、弁の開閉に伴う機械的損傷や動脈硬化因子による弁組織の内膜障害が知られている。動脈硬化と同様に response to tissue injury 仮説が注目されている(Cardiovasc Pathol 2011;20:183-190, Cardiovasc Pathol 2002;11:69-77)。大動脈弁間質細胞は最も多い弁の構成細胞であり、傷害を受け活性化すると筋線維芽細胞様に分化する。過剰なりモデリング、癒痕化、石灰沈着が生じ、弁尖やカスプが破壊される。大動脈弁尖の病的石灰化は左室側に比べ大動脈側に顕著に生じる(Circulation 2001;103:1522-1528)。大動脈弁を通過する血流は左室側では層流で、大動脈側では乱流になる。左室側ではずり応力による内皮依存性NO産生酵素(eNOS)の活性化が内皮障害を抑制する。Sirt-1はeNOSを活性化し内皮保護作用を有する(Antioxid Redox Signal 2018;28:711-732)。また乱流により内皮細胞でmicroRNA-34aが増加し、Sirt-1を抑制し、内皮障害が生じることが報告されている(J Cell Sci 2015;128:70-80)。Sirt-1活性化薬やSirt-1過剰発現は、血管傷害後の内膜新生や血管リモデリングを抑制することが報告されていることより(J Mol Med 2014;92:347-357, Circ Res 2011;108:1180-1189)大動脈弁の機械的損傷や動脈硬化因子による弁組織の内膜障害の組織修復に、Sirt-1が重要な役割を果たすのではないかと仮説を立てた。これまでin vitroやex vivoでの機械的傷害に対する組織修復についての研究がなされてきたが、これらのモデルは生理的な血流や血液が欠如しているという問題があった。そこで我々は、ワイヤー傷害による石灰化AVSマウスモデルを開発し報告した(Arterioscler Thromb Vasc Biol 2014;34:270-8)。このモデルでは、ほぼ全例で大動脈弁逆流なしに著明な大動脈弁圧較差上昇と、遠隔期に弁尖の石灰沈着が観察される。この新しいAVSモデルを用い、大動

脈弁尖の組織修復における Sirt-1 の役割を検討する。

3. 研究の方法

(1) マウス大動脈弁ワイヤー傷害 AVS モデルを用いた検討

8-10 週齢の C57/BL6 雄マウスに対し、大動脈弁ワイヤー傷害術を施行する。トリプロモエタノール腹腔投与(250 mg/kg)による麻酔下に、ヒト冠動脈形成術用ガイドワイヤー(径 0.36mm)を、右総頸動脈を通して心臓超音波ガイド下に左室内に挿入し、ワイヤーをスライドおよびスピンさせることで大動脈弁を選択的に傷害する。



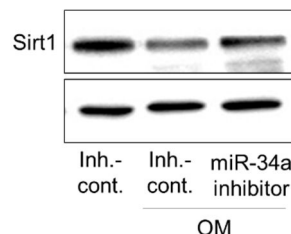
傷害大動脈弁における Sirt-1 の発現と大動脈弁石灰化について検討する。レスベラトロールや SRT1720 などの Sirt 活性化薬を腹腔内投与し、ワイヤー傷害後の大動脈弁尖の修復過程を観察する。このモデルでは、ワイヤー傷害により浮腫、出血、炎症が生じ、早期から大動脈弁圧較差が生じる。傷害弁を通過する血流により大動脈弁尖のリモデリングが生じ、大動脈弁に石灰沈着が生じる。Sirt-1 活性化により組織修復が促進されれば、大動脈弁尖のリモデリングが抑制され、大動脈弁圧較差の減少および石灰沈着の抑制が生じることが予想される。Sirt-1 ノックアウトマウスを用い、Sirt-1 による組織保護効果が失われるか、検討を行う。

(2) ブタ大動脈弁間質細胞を用いた検討

Yanagawa らの報告に従い (J Thorac Cardiovasc Surg 2012;144:256-62) ブタ大動脈弁間質細胞 (AVIC) を採取する。AVIC に石灰化誘導培地 (OM) を与え、Sirt-1 の発現が変化するか検討する。またフローチェンバーを用いて、ずり応力による Sirt-1 発現の変化と石灰沈着に与える影響を検討する。次に OM 刺激下に AVIC に Sirt-1 活性化薬を投与し、石灰沈着に与える影響を検討する。さらに AVIC に Sirt-1 過剰発現および Sirt-1 ノックダウンを行い、OM 刺激による石灰沈着に与える影響を検討する。

4. 研究成果

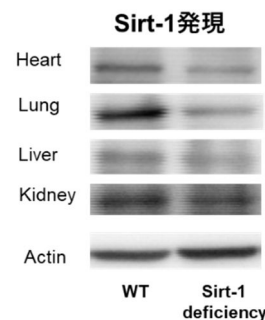
先行研究で、大動脈弁狭窄症の発症に microRNA-34a が重要な働きをしていることを報告した (Cardiovasc Res 2020; 116: 983-994)。ブタ AVIC を用いた in vitro 実験で、microRNA-34a を抑制すると Notch1 の発現が上昇し、Runx2 を抑制することにより石灰沈着が抑制された。石灰化誘導培地 (OM) によりブタ AVIC では、Sirt-1 の発現が低下し、microRNA-34a を阻害すると Sirt-1 の発現が上昇した。これらより AVS の進行抑制に長寿遺伝子 Sirt-1 が重要な役割を果たすのではないかと仮説を立てた。



(1) Sirt-1 ノックアウトマウスの作成

山形大学医学部メディカルサイエンス推進研究所遺伝子実験センターにおいて、Sirt-1 の exon4 を Crispr/Cas9 法によりゲノム編集し、Sirt-1 欠損マウスを作成した。Sirt-1 ホモ欠損マウスは、胎生致死であることより、ヘテロ欠損マウスを使用した。

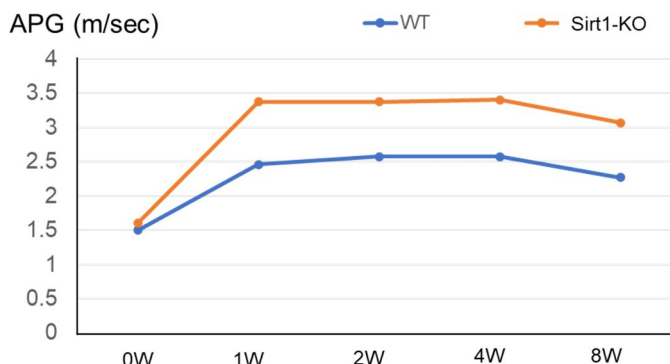
ウエスタンブロットティングにより、各臓器で Sirt-1 の発現が低下していることを確認した。

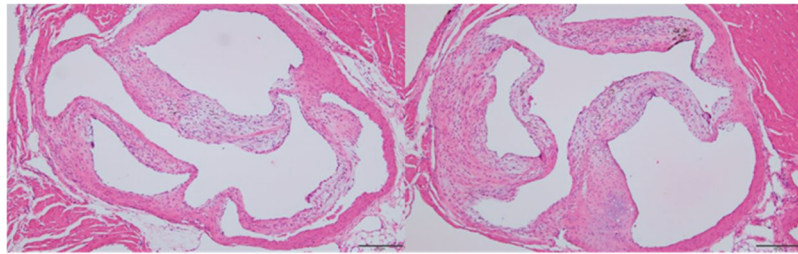


(2) マウス大動脈弁ワイヤー傷害 AVS モデル

野生型マウスと Sirt-1 ヘテロ欠損マウスに、大動脈弁ワイヤー傷害 AVS モデルを作成した。大動脈弁血流速度を心エコーにより経時的に確認したところ、野生型マウスに比べ、Sirt-1 欠損マウスで、有意に上昇していた。このモデルでは、ワイヤー傷害により大動脈弁に炎症が生じ、初期から大動脈弁流速は上昇する。この後、大動脈弁にリモデリングが生じ、弁尖が修復していくものと、組織破壊が進み、石灰化が生じるものに分かれる。Sirt-1 欠損により、炎症が遷延し、大動脈弁狭窄が進行しやすくなることが示唆された。

大動脈弁のヘマトキシリン・エオジン染色による組織標本では、野生型に比べ、Sirt-1 欠損マウスで、組織リモデリングの程度が増強している傾向がみられた。





WT

Sirt1-KO

(3) ブタ大動脈弁間質細胞を用いた検討

ブタ AVIC に Sirt-1 siRNA をトランスフェクションし石灰化誘導培地 (OM) を投与し、Runx2 および Catenin の発現を検討した。コントロールと比較し、si-Sirt-1 は Runx2 および Catenin の発現に変化を与えなかった。Si-Sirt-1 の抑制効率が低い影響が考えられた。

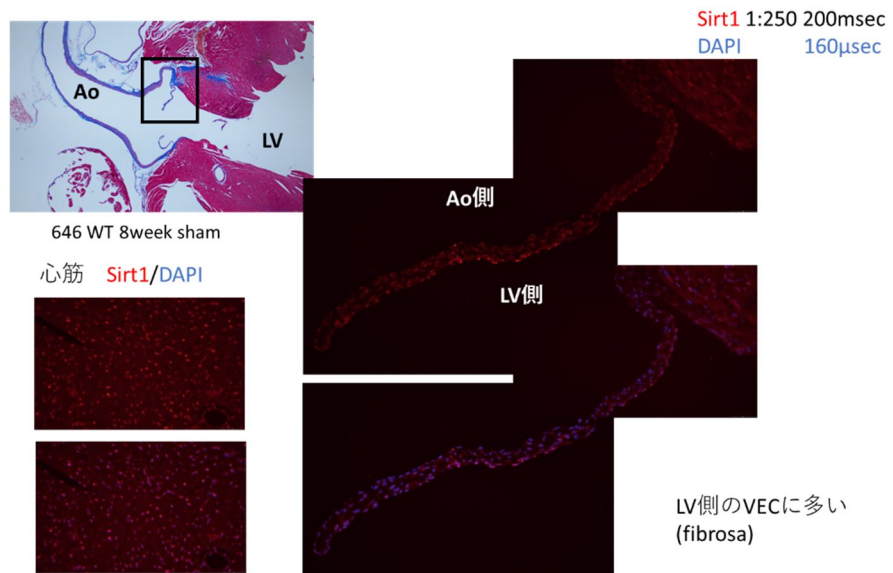
逆にブタ AVIC に Sirt-1 過剰発現を行うと、Runx2 の発現が抑制される傾向を認めた。Sirt-1 活性化薬 Sirtinol 投与においても、Runx2 の発現が抑制される傾向を認めた。

ブタ AVIC に Sirt-1 siRNA をトランスフェクションし TNF 刺激を行うと、NF B の活性化が増強する傾向を認めた。

野生型マウスの大動脈弁組織における Sirt-1 の発現を検討すると、大動脈弁の大動脈側と比べ、左室側で Sirt-1 の発現が多いことが分かった。

大動脈弁置換術を受けた大動脈弁狭窄症患者の大動脈弁では、大動脈側で病変が顕著であることが知られている。

加齢や血流により、Sirt-1 の発現が低下し、大動脈弁狭窄症が進展しやすくなる可能性が示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------