

機関番号：20101

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590869

研究課題名 (和文) 蛋白脱アセチル化酵素 SIRT1 の活性制御機構解明と心不全治療への応用

研究課題名 (英文) Clarification of mechanisms to regulate the activity of protein deacetylase SIRT1 and its therapeutic application in heart failure

研究代表者

丹野 雅也 (TANNO MASAYA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：00398322

研究成果の概要 (和文) : SIRT1 が核-細胞質間をシャトルすることを示した。核に局在する SIRT1 は Mn-SOD の発現を亢進させ酸化ストレスによる細胞死を抑制した。不全心では恐らく内因性の代償機構として SIRT1 が核に集積し、SIRT1 活性化薬レスベラトロールの投与により拡張型心筋症ハムスターの死亡率が低下した。以上から SIRT1 活性化薬が新しい心不全の治療として期待される。

研究成果の概要 (英文) : SIRT1 shuttled between the nuclei and cytoplasm. Nuclear SIRT1 suppressed oxidative stress-induced cell death by up-regulating Mn-SOD. SIRT1 accumulated in nuclei in cardiomyocytes of failing hearts probably as an endogenous adaptive mechanism and activation of SIRT1 by resveratrol reduced the mortality in cardiomyopathic hamsters. These findings suggest that SIRT1 activator may be a novel therapeutic approach for chronic heart failure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子心臓病態学、心不全、エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

近年本邦では、ライフスタイルの変化に伴い糖尿病や高血圧およびその合併症としての虚血性心疾患患者の増加が顕著である。これらの疾患はいずれも最終的に心不全発症をもたらす。心不全に対する薬物療法としては、β遮断薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシン受容体拮抗薬、抗アルドステロン薬などといった薬剤による神経体液性因子の修飾が予後を改善することが報告されてきたが、全ての薬剤を使用しても重症

心不全はいまだ極めて予後が悪く、新しい治療法の開発が待望される。

## 2. 研究の目的

新しい心不全治療としてエピジェネティックな遺伝子発現調節による心筋保護に着目した。NAD<sup>+</sup>依存性ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT1 は多くの転写因子の活性を制御しストレス耐性を増強する。そこで SIRT1 が不全心の心筋細胞保護をもたらす心不全患者の予後を改善できるかを検討した。

### 3. 研究の方法

(1) SIRT1 の一連の欠失変異体および点変異体を作成し培養細胞に遺伝子導入することにより核移行シグナルおよび核外移行シグナルの同定を試みた。また各種リン酸化酵素が SIRT1 の細胞内局在に及ぼす影響を検討することにより SIRT1 の核-細胞質シャトルに寄与するシグナルの同定を試みた。リン酸化部位推測のアルゴリズムに基づき、複数の点変異体を作成して核移行を惹起するリン酸化部位の同定を試みた。

(2) SIRT1 活性化による心筋細胞保護効果の分子機序を初代培養心筋細胞および H9c2 心筋芽細胞を用いて検討した。

①細胞に野生型 SIRT1、dominant negative SIRT1 (H355Y)、細胞質局在型 SIRT1(mtNLS)、対照ベクターを過剰発現させて酸化ストレスによる細胞死に対するそれぞれの効果および発現の変化する蛋白を比較した

②resveratrol または vehicle を含む培養液中で細胞を培養し、酸化ストレスによる細胞死および発現レベルの変化する遺伝子および蛋白を比較検討した。

(3) 実験的心不全モデルおよびヒト不全心での SIRT1 の発現レベル、細胞内局在をウェスタンブロットイングおよび免疫組織染色を用いて検討した。動物モデルとしてはラットの心筋梗塞後心不全モデルおよび遺伝的拡張型心筋症モデル TO-2 ハムスターを用いた。また剖検で得られた拡張型心筋症患者の心筋サンプルを用いて検討した。

(4) 遺伝的拡張型心筋症モデル TO-2 ハムスターを用いて SIRT1 活性化薬の慢性投与が予後を改善するかを解析するため TO-2 ハムスターにおいて resveratrol の慢性投与による効果を検討した。

### 4. 研究成果

(1) SIRT1 の核-細胞質間シャトルにはアミノ酸配列中の核移行シグナル(NLS)および核外移行シグナル(NES)が関与していた。一連の欠失変異体および点変異体を用いて複数の NLS および NES を同定した。NLS および NES の機能は phosphatidylinositol 3 kinase (PI3K) によるリン酸化で制御され Ser517 がそのリン酸化部位のひとつであり、このセリン残基のリン酸化により SIRT1 の核移行が誘導されることを示した。

(2) ミトコンドリアの呼吸鎖阻害により酸化ストレスを誘導するアンチマイシン A (Ant A) を培地に加えると、核に局在する野生型 SIRT1 によりミトコンドリアの Manganese

superoxide dismutase (Mn-SOD) の発現が亢進され (図 1)、酸化ストレスによるアポトーシスおよびネクローシスはいずれも抑制された(図 2)。この効果は dominant negative SIRT1 や細胞質型 SIRT1 では観察されなかった。野生型 SIRT1 による細胞保護効果は Mn-SOD を siRNA 法によりノックダウンすることにより消失した。Resveratrol は酸化ストレスによる細胞死を抑制し、この細胞保護効果には SIRT1 の核内局在が必要であった。Mn-SOD のノックダウンは resveratrol による細胞保護効果も抑制した。

この結果から核局在 SIRT1 がその脱アセチル化酵素活性を介して Mn-SOD の発現亢進を介して酸化ストレスによる細胞死を抑制していることが示された。

図 1

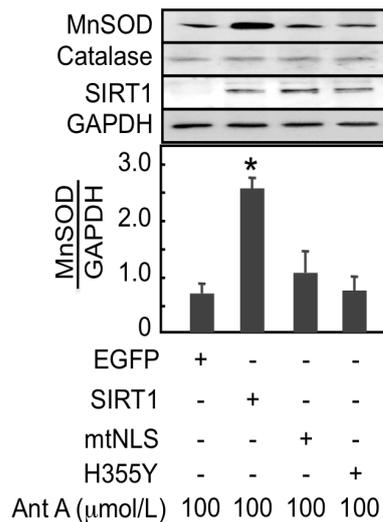
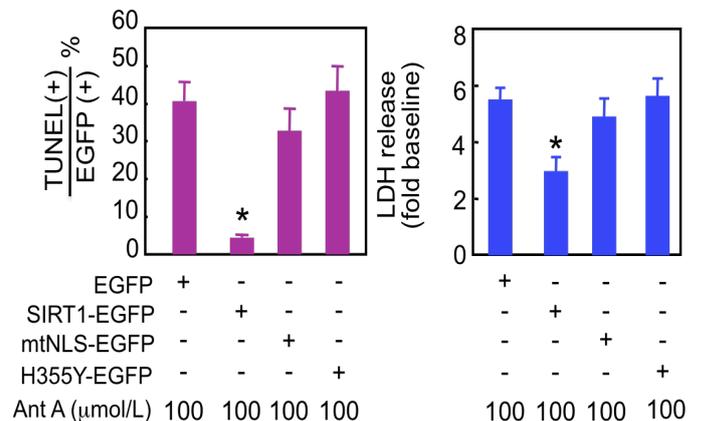
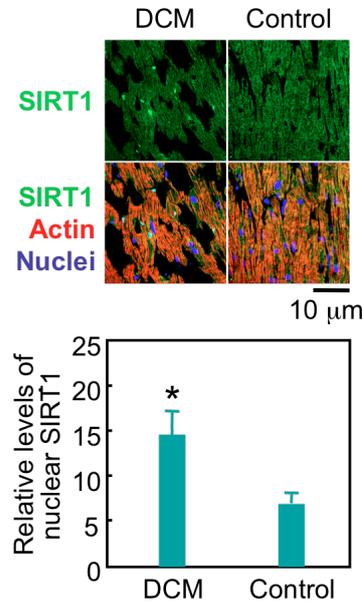


図 2



(3) T0-2 ハムスターおよび心筋梗塞後のラット心筋では心不全の無い対照群と比較すると核局在の SIRT1 は有意に増加していた。また剖検で得た拡張型心筋症 (DCM) による重症心不全患者の左室心筋では心不全のない対照患者と比較してやはり核局在の SIRT1 は有意に増加していた (図 3)。

図 3



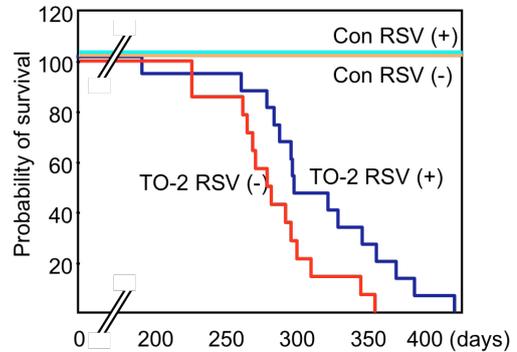
(4) T0-2 ハムスターに生後 6 週の時点から resveratrol を投与し通常の食餌のみを与えた対照群と比較し、心不全の重症度に関して生化学的、生理学的解析を行い死亡率を比較検討したところ、以下の所見を得た。

- ① 心エコーで評価した左室駆出率は resveratrol 群で有意に高かった。
- ② 心重量/体重比は resveratrol 群で有意に低かった。
- ③ RT-PCR で評価した BNP の mRNA 発現量は resveratrol 群で有意に低かった。
- ④ 免疫組織染色で評価した心筋線維化は resveratrol 群で有意に抑制された。
- ⑤ TUNEL 染色で評価した心筋細胞アポトーシスは resveratrol 群で有意に抑制された。
- ⑥ ウェスタンブロッティングで評価した心筋 MnSOD 蛋白発現量は resveratrol 群で有意に高かった。
- ⑦ ウェスタンブロッティングで評価したアセチル化ヒストン H3 は resveratrol で有意に低下した。
- ⑧ 生存曲線は resveratrol 群で有意に上方へシフトした。すなわち resveratrol 群で死亡率が有意に低下した (図 4)。

以上の研究結果から resveratrol を含む

SIRT1 活性化薬が心不全の予後を改善することが示され臨床応用への可能性が示唆された。現在心不全患者数は本邦のみならず世界的にも増加の一途を辿っており現時点でのベストの治療下でもその予後は不良であることを考えると SIRT1 活性化による新しい治療の導入は大きなインパクトを持つと考えられる。

図 4



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

① Yano T, Miki T, Tanno M, Kuno A, Itoh T, Takada A, Sato T, Kouzu H, Shimamoto K, Miura T. Hypertensive hypertrophied myocardium is vulnerable to infarction and refractory to erythropoietin-induced protection.

Hypertension, 査読有, 2011;57:110-115

② Tanno M, Kuno A, Yano T, Miura T, Hisahara S, Ishikawa S, Shimamoto K, Horio Y. Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure.

J Biol Chem, 査読有, 2010;285:8375-82

③ Sugino T, Maruyama M, Tanno M, Kuno A, Houkin K, Horio Y. Protein deacetylase SIRT1 in the cytoplasm promotes nerve growth factor-induced neurite outgrowth in PC12 cells.

FEBS Lett, 査読有, 2010;584:2821-6

④ Miura T, Tanno M, Sato T. Mitochondrial kinase signalling pathways in myocardial protection from ischaemia/reperfusion-induced necrosis.

Cardiovasc Res, 査読有, 2010;88:7-15

⑤ Miki T, Miura T, Hotta H, Tanno M, Yano T, Sato T, Ishikawa S, Shimamoto K.

Endoplasmic reticulum stress in diabetic

hearts abolishes erythropoietin-induced myocardial protection by impairment of phospho-glycogen synthase kinase 3beta-mediated suppression of mitochondrial permeability transition.

Diabetes, 査読有, 2009;58:2863-72

⑥ Hisahara S, Chiba S, Matsumoto H, Tanno M, Yagi H, Shimohama S, Horio Y.

Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation by its nuclear translocation. Proc Natl Acad Sci U S A, 査読有, 2008;105:15599-604

[学会発表] (計 14 件)

① Kuno A, Tanno M, Ishikawa S, Horio Y, Miura T. Activation of Sirt1 suppresses hypertrophic response of cardiomyocytes by inhibition of H3K9 acetylation via proteasome-mediated p300 degradation.

83<sup>rd</sup> Scientific Session of American Heart Association: 2010 Nov 13-17: Chicago, U. S. A.

② Kuno A, Tanno M, Yano T, Takada A, Miura T, Horio Y, Shimamoto K.

The SIRT1 activator resveratrol suppresses cardiomyocyte hypertrophy by promoting histone H3 Lys9 deacetylation and tri-methylation.

82<sup>nd</sup> Scientific Session of American Heart Association: 2009 Nov 14-18: Orlando, U. S. A.

③ Kuno A, Tanno M, Miura T, Horio Y, Shimamoto K. Activation of histone/protein deacetylase SIRT1 by resveratrol induces MnSOD up-regulation via FOXO3a and improves survival of heart failure animals.

31<sup>st</sup> Congress of the European Society of Cardiology: 2009 Aug 29- Sep 2, Barcelona, Spain.

① Tanno M, Kuno A, Miki T, Miura T, Horio Y, Shimamoto K. Activation of a protein deacetylase, SIRT1, by resveratrol suppresses progression of heart failure and improves survival by up-regulation of Mn-SOD. 81<sup>st</sup> Scientific Session of American Heart Association: 2008 Nov 8-12: New Orleans, U. S. A.

④ Kuno A, Tanno M, Miura T, Horio Y, Shimamoto K. Resveratrol, an activator of protein deacetylase SIRT1, suppresses oxidative stress-induced cell death by upregulating MnSOD expression through transactivation of FOXO3a.

81<sup>st</sup> Scientific Session of American Heart Association: 2008 Nov 8-12: New Orleans, U. S. A.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

丹野 雅也 (TANNO MASAYA)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号: 00398322

### (2) 研究分担者

三浦 哲嗣 (MIURA TETSUJI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 90199951

堀尾 嘉幸 (HORIO YOSHIYUKI)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号: 30181530