

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07068

研究課題名（和文）心不全におけるオートファジー障害の機序解明と治療への応用

研究課題名（英文）Mechanisms of dysregulation of autophagy in heart failure

研究代表者

久野 篤史（Kuno, Atsushi）

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：30468079

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）：本研究は、心不全では心筋細胞の蛋白脱アセチル化酵素SIRT1の活性低下によりオートファジーが減弱し、その病態に關与するかを検討した。マウスを用いて抗がん剤ドキシソルビンによる心不全モデルを作成した。SIRT1ノックアウトマウスでは、ドキシソルビンによる心機能低下はより高度で、オートファジー活性の減弱も示唆された。またSIRT1はオートファジーの進行に重要な役割を果たすことも見出した。以上からSIRT1・オートファジー経路の活性低下が心不全の病態に重要であることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、SIRT1活性やオートファジー活性の回復といった介入による新しい心不全治療の開発に向けた基盤となるものであると考えられる。心不全以外の様々な疾患でも臓器のオートファジーが障害されていることが報告されている。従って、本研究のSIRT1によるオートファジー制御機構を明らかにできたことは、これら疾患におけるオートファジー障害の機序解明にも展開され、新しい治療法にもつながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We examined roles of reduced activity of SIRT1, an NAD⁺-dependent protein deacetylase, and impaired autophagy in pathogenesis of heart failure. We induced heart failure by administration of doxorubicin in mice. We found cardiac dysfunction and impairment in autophagy after doxorubicin were enhanced in cardiomyocyte-specific SIRT1 knockout mice. We also examined how SIRT1 regulate the process of autophagy. SIRT1 was involved in autophagosome-lysosome fusion. Taken together, impaired autophagy due to suppression of SIRT1 activity may contribute to pathogenesis of heart failure.

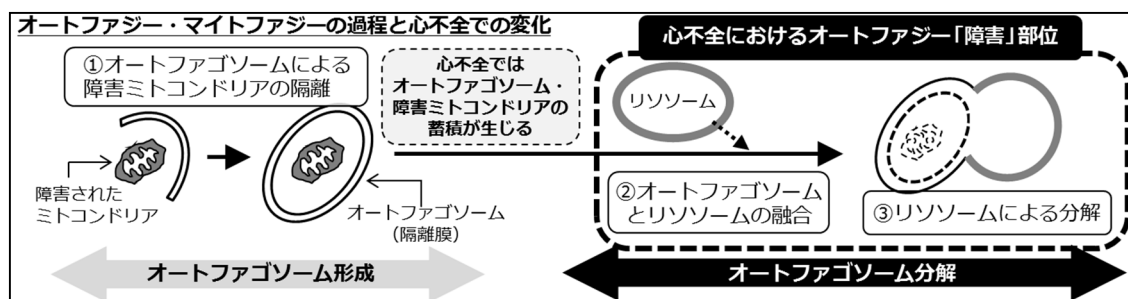
研究分野：分子心臓病学

キーワード：心不全 オートファジー SIRT1

1. 研究開始当初の背景

心不全の患者数や死亡数は社会の高齢化に伴い急増し、現在の治療法でも心不全患者の5年生存率は約50%と予後は不良である。新しい治療薬の開発にはさらなる心不全の病態解明が急務である。加齢に伴う心不全の増加から、老化制御因子が心不全の病態に関わると考えられる。長寿因子 SIRT1 は NAD⁺依存性に標的蛋白を脱アセチル化して細胞を保護する。これまで申請者は SIRT1 の活性化が心不全動物の心機能や生存率を改善すること (Tanno, Kuno ら JBC 2010、Kuno ら JBC 2013)、心筋細胞特異的 SIRT1 ノックアウトマウスでは加齢による心機能低下や抗癌剤ドキシソルピシンの副作用である心不全が、より重症であることを見出し、SIRT1 が心不全治療の標的となりうることを提唱してきた。しかし SIRT1 の心保護機構の解明は十分ではなく、ヒト心不全心筋での SIRT1 活性の変化は不明である。また心不全研究の大きな問題点として、ヒト心不全心筋の解析が困難な点が挙げられる。

ミトコンドリア機能障害は ATP 低下や活性酸素種の増加を介して心機能低下に寄与する。障害ミトコンドリアはオートファジーの仕組みにより除去され (マイトファジー)、その過程は隔離膜であるオートファゴソームの「形成」とリソソームでの「分解」からなる。オートファジーを欠損した心臓では障害ミトコンドリアが蓄積し心機能が低下するため、オートファジーによる障害ミトコンドリアの除去は心機能の維持に重要である。ヒト心不全心筋ではオートファゴソームや異常ミトコンドリアの蓄積が報告されている。また申請者はマウス心不全モデルでも心機能が低下する前の時点で、オートファゴソーム・障害ミトコンドリアが蓄積していることを見出した (Kuno ら Sci Rep 2018)。従ってオートファゴソーム形成後の分解が滞り、障害ミトコンドリアが除去されず蓄積した結果、心不全が進展すると考えられる。しかし心不全でのオートファゴソーム分解障害の分子機序は不明である。



SIRT1 によるオートファジー促進は報告されていたが、マイトファジーにおける役割は不明だった。しかし申請者は、心不全モデルにおいて、SIRT1 の活性化が心筋のオートファゴソーム分解を促進して障害ミトコンドリアを減少させること (Kuno ら Sci Rep 2018)、培養心筋細胞では SIRT1 のノックダウンによる抑制により、オートファゴソーム分解が阻害され、マイトファジーも抑制されることを見出した。従って SIRT1 はオートファゴソーム分解に関与して障害ミトコンドリアの除去を促進すると考えられる。興味深いことに、この SIRT1 のオートファジーへの作用点は心不全のオートファジー障害部位と一致する。つまり、心不全におけるオートファジー障害は SIRT1 活性低下により生じる可能性がある。

2. 研究の目的

上記の未だ不明な点を明らかにするために、以下を本研究の目的とした。

- (1) 心不全におけるオートファジー障害の機序を、オートファゴソーム分解障害と SIRT1 活性低下の観点から明らかにする。また不全心において SIRT1 活性が低下するメカニズムを調べる。
- (2) SIRT1 によるオートファゴソーム分解促進による障害ミトコンドリア除去の分子機序を解明する。

3. 研究の方法

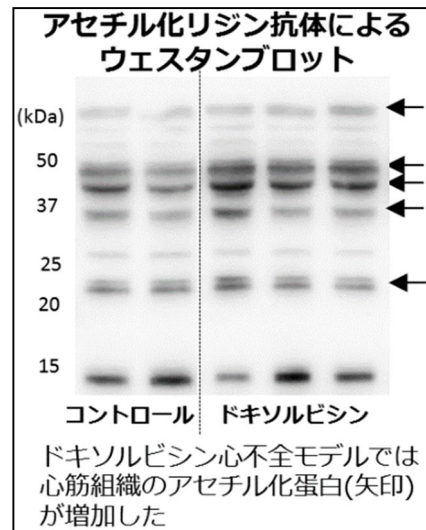
- (1) ドキシソルピシンによる心不全モデルを野生型および SIRT1 ノックアウトマウスで作成した。心筋組織を採取して、Western blot 法を用いて、心筋におけるオートファジー活性、アセチル化蛋白、SIRT1 の発現量などを評価した。また定量 PCR 法により、SIRT1 の mRNA レベ

ルを定量した。(研究開始前は dystrophin 欠損マウスでの心機能障害モデルを使用する予定であったが、心機能障害の程度が軽かったため、別のモデルとしてドキシソルピシン誘導性の心不全モデルを新たに確立した)

- (2) 心筋細胞モデルやその他培養細胞モデルを用いて、SIRT1 とオートファジー・ミトファジーの関連を評価した。SIRT1 を siRNA を用いてノックダウンすることで、SIRT1 がオートファジー・ミトファジーに与える影響を検討した。また SIRT1 がオートファジーのどのプロセスに関わるのかを検討した。

4. 研究成果

- (1) 野生型マウスにおいて、対照群と比較してドキシソルピシン心筋障害モデルではアセチル化リジン量はドキシソルピシン投与群で増加していた(右図)。したがって、SIRT1 の脱アセチル化能はドキシソルピシン投与により低下した可能性が示された。SIRT1 の発現量に差があるかを確認したが、SIRT1 蛋白量・mRNA 量はドキシソルピシン投与群で変化はなかった。従って機能的な変化が生じていることが示唆された。同モデルにおいて、心筋組織におけるオートファゴソームの指標である LC3-II 量はドキシソルピシンにより 17%低下した。一方 SIRT1 ノックアウトマウスではこのようなドキシソルピシンによる LC3 の低下は認めなかったことから、SIRT1 ノックアウトによるオートファジー活性のさらなる低下が示唆された。また SIRT1 ノックアウトマウスの方が、ドキシソルピシン投与後に出現する心筋障害がより高度だった。以上より、SIRT1 はオートファジーを維持し、心不全に対して抑制的に作用すると考えられた。



- (2) H9c2 心筋細胞では SIRT1 をノックダウンすることにより、オートファゴソームとリソソームの融合の過程が抑制されたが、リソソームの pH に影響を与えなかった。オートファゴソームとリソソームの融合に関わる因子の遺伝子発現を評価したが、SIRT1 ノックダウンにより発現変化するものは見られなかった。従って、遺伝子発現の調節というよりは標的蛋白を直接的に脱アセチル化する制御がはたらくことが想定された。そこで免疫沈降法を用いて、SIRT1 とオートファゴソーム・リソソーム融合に関与する既知の蛋白が結合するかを評価した。いくつか SIRT1 と結合する蛋白を同定できた。以上より、SIRT1 によるオートファジー調節の一端を明らかにできた。

以上の研究成果から、不全心においては SIRT1 の活性化低下していること、SIRT1 は心筋保護的に作用すること、そして SIRT1 はオートファジーの過程の中でもオートファゴソームとリソソームの融合に関与する可能性が示された。従って、SIRT1 の活性低下を是正してオートファジー活性を維持するといった、新しい心不全治療のための標的となりうると考えられた。

今後の課題として、今回はドキシソルピシンによる心不全モデルを用いたが、他の原因による心不全モデルでも同様に SIRT1 活性の低下やオートファジー障害といった所見が得られるか、を評価する必要がある。また、SIRT1 がどのような分子メカニズムでオートファゴソーム・リソソーム融合に関与するかを明らかにすることも重要と考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Hosoda Ryusuke, Nakashima Ryuta, Yano Masaki, Iwahara Naotoshi, Asakura Seidai, Nojima Iyori, Saga Yukika, Kunimoto Risa, Horio Yoshiyuki, Kuno Atsushi	4. 巻 152
2. 論文標題 Resveratrol, a SIRT1 activator, attenuates aging-associated alterations in skeletal muscle and heart in mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 112 ~ 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2023.04.001	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 -
1. 著者名 Iwahara Naotoshi, Azekami Kuya, Hosoda Ryusuke, Nojima Iyori, Hisahara Shin, Kuno Atsushi	4. 巻 12
2. 論文標題 Activation of SIRT1 promotes membrane resealing via cortactin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15328-15328.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-022-19136-1	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 -
1. 著者名 Kuno Atsushi, Hosoda Ryusuke, Tsukamoto Miki, Sato Tatsuya, Sakuragi Hiromi, Ajima Nami, Saga Yukika, Tada Kouhei, Taniguchi Yoshiki, Iwahara Naotoshi, Horio Yoshiyuki	4. 巻 118
2. 論文標題 SIRT1 in the cardiomyocyte counteracts doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating histone H2AX	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cardiovascular Research	6. 最初と最後の頁 3360 ~ 3373
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/cvr/cvac026	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 -
1. 著者名 Nojima Iyori, Hosoda Ryusuke, Toda Yuki, Saito Yoshiki, Ueda Naohiro, Horimoto Kouhei, Iwahara Naotoshi, Horio Yoshiyuki, Kuno Atsushi	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Downregulation of IGFBP5 contributes to replicative senescence via ERK2 activation in mouse embryonic fibroblasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Aging	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/aging.203999	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 -

1. 著者名 久野 篤史、堀尾 嘉幸	4. 巻 93
2. 論文標題 レスベラトロールの生体作用とその標的SIRT1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 100 ~ 108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2021.930100	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 Sugawara Hirohito, Moniwa Norihito, Kuno Atsushi, Ohwada Wataru, Osanami Arata, Shibata Satoru, Kimura Yukishige, Abe Koki, Gocho Yufu, Tanno Masaya, Miura Tetsuji	4. 巻 145
2. 論文標題 Activation of the angiotensin II receptor promotes autophagy in renal proximal tubular cells and affords protection from ischemia/reperfusion injury	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pharmacological Sciences	6. 最初と最後の頁 187 ~ 197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jphs.2020.12.001	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 -

1. 著者名 Shibata Satoru, Moniwa Norihito, Kuno Atsushi, Kimura Ayumu, Ohwada Wataru, Sugawara Hirohito, Gocho Yufu, Tanaka Marenao, Yano Toshiyuki, Furuhashi Masato, Tanno Masaya, Miki Takayuki, Miura Tetsuji	4. 巻 Online ahead of print
2. 論文標題 Involvement of necroptosis in contrast-induced nephropathy in a rat CKD model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clinical and Experimental Nephrology	6. 最初と最後の頁 N/A
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02048-1	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Atsushi Kuno
2. 発表標題 SIRT1, a protein deacetylase, promotes autophagy/mitophagy by regulating autophagosome-lysosome fusion in the cardiomyocyte.
3. 学会等名 第87回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 久野 篤史
2. 発表標題 ニコチンアミド・モノヌクレオチドはドキソルピシンによる心毒性や筋萎縮を抑制する
3. 学会等名 第96回日本薬理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久野 篤史
2. 発表標題 ドキソルピシンによる臓器毒性はニコチンアミド・モノヌクレオチドにより軽減する
3. 学会等名 第73回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久野 篤史
2. 発表標題 SIRT1はヒストンH2AXを脱アセチル化してDNA損傷反応を介することによりドキソルピシンから心筋細胞を保護する
3. 学会等名 第95回日本薬理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 久野 篤史
2. 発表標題 SIRT1はヒストンH2AXを脱アセチル化することによりドキソルピシンによる心筋細胞障害に対して保護的に作用する
3. 学会等名 第72回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細田隆介
2. 発表標題 レスベラトロールはオートファジーを促進して加齢による筋萎縮と運動機能障害を抑制する
3. 学会等名 第95回日本薬理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 細田隆介
2. 発表標題 レスベラトロールはオートファジーを活性化して加齢による筋萎縮と運動機能低下を軽減する
3. 学会等名 第72回日本薬理学会北部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Kuno
2. 発表標題 SIRT1 protects the heart against doxorubicin induced cardiotoxicity by mediating the DNA damage response via deacetylation of histone H2AX.
3. 学会等名 ESC Congress 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Kuno
2. 発表標題 Deacetylation of Histone H2AX by Sirt1 Regulates DNA Damage Response and Protects Cardiomyocytes Against Doxorubicin-Induced Injury
3. 学会等名 AHA Scientific Sessions 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 久野篤史
2. 発表標題 SIRT1 mediates histone H2AX Ser139 phosphorylation and DNA repair via deacetylating H2AX at Lys5.
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 細田 隆介, 久野 篤史, 朝倉 聖大, 岩原 直敏, 野島 伊世里, 國本 梨沙, 堀尾 嘉幸
2. 発表標題 レスベラトロールは加齢による筋委縮と筋機能障害を軽減する
3. 学会等名 第94回日本薬理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Atsushi Kuno, Ryusuke Hosoda, Yoshiyuki Horio
2. 発表標題 The histone deacetylase SIRT1 mediates the proper DNA repair response by targeting histone H2AX to protect against doxorubicin-induced cardiotoxicity.
3. 学会等名 ESC Congress 2020
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

札幌医科大学 薬理学講座 ホームページ https://web.sapmed.ac.jp/pharmacology/
--

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	藤谷 直樹 (Fijitani Naoki) (10374191)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	野島 伊世里 (Nojima Iyori) (10827398)	札幌医科大学・医学部・研究員 (20101)	
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)	

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