

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25640031

研究課題名(和文)脳梗塞治療法の開発を見据えた長寿遺伝子産物Sirt1による脳虚血抵抗性機序の解明

研究課題名(英文)A study to elucidate the mechanism by which the longevity gene product SIRT1 confers neuroprotection

研究代表者

猪原 匡史 (Ihara, Masafumi)

独立行政法人国立循環器病研究センター・病院・医長

研究者番号：00372590

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：長寿遺伝子サーチュイン(SIRT1)の働きを脳で2-3倍程度に高めると、脳卒中が原因となる認知症を予防できるという仮説のもと、脳のサーチュイン量が通常の2-3倍になるよう遺伝子操作したマウスを作成し、頸動脈を狭窄させる(細くする)手術を行って、認知機能の変化を観察した。

普通のマウスでは両側の頸動脈を狭窄させると認知機能の障害(認知症)が起こったが、サーチュインが脳で働くよう操作したマウスでは頸動脈を狭窄させても、認知機能が正常に保たれ、脳血流がほとんど減少しなかった。サーチュインが働くとき血管を拡張させる物質(一酸化窒素)を合成する酵素がオンの状態に保たれ、脳血管が拡張したことが原因だった。

研究成果の概要(英文)：SIRT1 belongs to the sirtuin family of protein deacetylases which mediate extensions of lifespan and suppress cerebrovascular diseases in model organisms. We hypothesized that neurovascular protection incorporates the broad-range effects of SIRT1. To test this, we generated Sirt1-overexpressing (Sirt1-Tg) mice driven by a prion promoter to determine whether Sirt1-Tg mice protect consequences of cerebral hypoperfusion in vivo. Cerebral hypoperfusion induced by bilateral common carotid artery stenosis caused memory impairment and histological changes in wild-type mice. However, these phenotypes were rescued in Sirt1-Tg mice, where cerebral blood flow was maintained even poststenosis. Brain endothelial nitric oxide synthase was acetylated after cerebral hypoperfusion in wild-type littermates but remained unacetylated in Sirt1-Tg mice. Our results indicate that neurovascular endothelial SIRT1 potentiation upregulates the nitric oxide system and counters cerebral hypoperfusion injury.

研究分野：脳卒中学

 キーワード：長寿遺伝子 サーチュイン SIRT1 血管性認知症 脳梗塞 脳卒中 内皮型一酸化窒素合成酵素 血液
脳関門

1. 研究開始当初の背景

げっ歯類などの哺乳類を含めた後生動物で、確実に寿命を延ばす方法はカロリー制限のみであり、その分子メカニズムとして長寿関連遺伝子産物 Sirt1 を介した代謝抑制応答が知られている (Wood JG, et al. Nature 2004; Baur JA, et al. Nature 2006). マウスの脳虚血耐性機構の際にも、遺伝子の大部分が負の制御を受ける代謝抑制応答が生じ (Stenzel-Poore MP, et al. Lancet 2004), このような脳虚血耐性現象が Sirt1 活性化剤であるレスベラトロールにより誘導されるところからも、脳虚血耐性への Sirt1 の直接的な関わりが予想されている (Raval AP, et al. J Cereb Blood Flow Metab 2006). Sirt1 の神経保護効果は、アルツハイマー病、パーキンソン病、筋萎縮性側索硬化症などの神経変性疾患にまで及ぶとされ、疾患ごとに異なる作用点が想定されてきた (Zhang F, et al. Prog Neurobiol 2011). たとえば、アルツハイマー病では ROCK1 を阻害しセクレターゼを活性化 (Qin W, et al. J Biol Chem 2006), パーキンソン病では PGC-1 を活性化してミトコンドリア密度を上昇させる (Warecki P, et al. J Biol Chem 2009), 筋萎縮性側索硬化症では p53 を脱アセチル化する、といった具合である。よって、Sirt1 は代謝抑制応答のみならず、多面的な作用点を有し、様々な神経疾患に作動する分子として脚光を浴びている。しかし、Sirt1 が神経細胞保護効果を示すのに最適な Sirt1 の発現部位や発現量に関しては未定であり、疾患ごとに異なる作用機序を想定すべきなのか疑問を持った。加齢性疾患である神経変性疾患にも多かれ少なかれ血管病の要素が内在しており (de la Torre JC. Stroke 2002), 「ヒトは血管とともに老いる」という老化研究のセントラルドグマに立ち返り、申請者は、Sirt1 による保護効果が、「血管機能の改善」という統一スキームで語れるのではないかと着想し、Sirt1 を脳内に発現するマウスを作成した。予想通り、このマウスは脳虚血に対する抵抗性を示すことが判明した。

2. 研究の目的

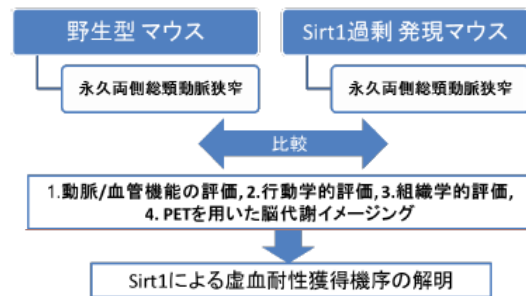
脳梗塞を主体とする脳血管疾患は我が国の死因の第 3 位、寝たきりの第 1 位の原因である。全医療費の 1 割が脳卒中診療に費やされ、患者の ADL/QOL 低下は、その介護者にまで多大な負担を強いる。しかし、超高齢社会を迎えた現在でも、脳梗塞や血管性認知症の予防法・治療法に決め手はない。フランスなど欧州の一部の国々では、動物性脂肪の大量摂取にもかかわらず、脳血管疾患の発症率・死亡率が低いという疫学データが知られ、その機序の一つは、赤ワインの成分レスベラトロールが長寿関連遺伝子 Sirt1 を活性化することにある。そこで、本研究では、脳血管障害治療の新機軸として Sirt1 に着目する。Sirt1 が脳に虚血抵抗性を賦与するメカ

ニズムを検討し、虚血巣選択的な Sirt1 の送達法を開発し、将来の脳卒中治療法開発への基盤とする。

3. 研究の方法

(1) 脳内で広範に目的タンパク質を発現させるプリオンプロモーターを用いたトランスジェニックマウス (Tg マウス) 作成システムを用い、マウス脳に哺乳類 Sirt1 を過剰発現させた (Neuron 2007 で報告した方法に準ずる)。本 Sirt1-Tg マウスを用い、Sirt1 が虚血耐性に果たす役割を哺乳類生体内で検証した。すでに、体重、食餌摂取量、体温、活動量の基礎データを得た。

(2) Sirt1-Tg/野生型マウスに永久両側総頰動脈狭窄 (BCAS) 負荷を加えて、以下の解析を行う (下図)。



(3) これらのコホートでレーザースペックル血流計 (Omegazone) を用いて脳血流を評価したところ、BCAS 群においては、野生型マウスで狭窄 2 時間後の脳血流が前値の平均 75% (n=6) まで低下していたのに対して、Sirt1-Tg マウスは全く低下しなかった (平均 95%, n=5)。このことから、Sirt1-Tg マウスは脳循環予備能が高いことが明らかとなったことから、そのメカニズムの探索のため以下の実験を計画する。

(4) 動脈/血管機能の評価: ラテックス灌流法 (パパベリン投与により血管平滑筋を最大限弛緩させ、脳血管をラテックス+墨汁にて黒色に描出) や 5% 二酸化炭素吸入下での FITC-dextran を用いた脳表血管のリアルタイムイメージング、さらには HE 染色や PECAM 抗体を用いた免疫染色法にて血管の構造・機能を評価する。また、BrdU (0.5 mg/Kg 体重) 腹腔内注射 1 日後の血管壁への BrdU 取り込みを血管内皮細胞増殖能の指標として評価する。

(5) 行動学的評価: Rotarod による運動機能評価、バーンズ迷路/放射状迷路による認知機能評価を行う。

(6) 組織学的評価: HE 染色, GFAP 染色, MHC-II 染色による大脳皮質・海馬の微小梗塞の検索を行う。

4. 研究成果

SIRT1 過剰発現マウスにおいては、野生型マウスの手術後に観察される作業記憶障害が有意に軽減した。また、白質における星状膠細胞・小膠細胞の活性化は有意に抑制され、乏突起膠細胞の減少も有意に阻止された。さらに、白質粗鬆化は有意に抑制され SIRT1 による白質保護効果が示された。術後 2 時間の野生型マウスでは、電子顕微鏡にて大部分の毛細血管内皮の密着結合が開いており、神経細胞が萎縮していた。一方、SIRT1 過剰発現マウスにおいては上記の所見は認めず、正常であった。脳血流量測定において、野生型マウスでは、術後急性期に術前の 70~75%にまで血流低下を示し、以後は術前の 80~85%の低灌流状態であった。一方、SIRT1 過剰発現マウスにおいては、術後は一貫して脳血流量は維持された。この脳血流量維持効果は、SIRT1 阻害剤投与にて完全に消滅した。アセチルコリン脳表灌流において、野生型と比較して SIRT1 過剰発現マウスでは、有意に脳血流量増加を認め、脳表動脈径の増大を認めた。術後 2 時間におけるマウスの脳では、eNOS 全タンパク質量に両群とも相異は認めなかったが、SIRT1 過剰発現マウスのみ、アセチル化 eNOS が有意に低下し、非アセチル化 eNOS が有意に増量していた。さらに、SIRT1 過剰発現マウスに eNOS 阻害剤を投与した後に手術を行うと、野生型と同程度の術後 2 時間の脳血流低下を示した。

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 6 件 全て査読有)

Hattori Y, Enmi JI, Kitamura A, Yamamoto Y, Saito S, Takahashi S, Iguchi S, Tsuji M, Yamahara K, Nagatsuka K, Iida H, Ihara M. A novel mouse model of subcortical infarcts with dementia. *J Neurosci* 2015; 35(9):3915-3928. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.3970-14.2015

Hattori Y, Okamoto Y, Nagatsuka K, Takahashi R, Kalaria RN, Kinoshita M, Ihara M. SIRT1 attenuates severe ischemic damage by preserving cerebral blood flow. *NeuroReport* 2015;26(3):113-117. DOI: 10.1097/WNR.0000000000000308

Hattori Y, Kitamura A, Nagatsuka K, Ihara M. A novel mouse model of ischemic carotid artery disease. *PLOS ONE* 2014;9:e100257. DOI: 10.1371/journal.pone.0100257

Hattori Y, Kitamura A, Tsuji M, Nagatsuka K, Ihara M. Motor and cognitive impairment in a mouse model of ischemic carotid artery disease. *Neurosci Lett* 2014;581c:1-6. DOI: 10.1016/j.neulet.2014.08.009

Hattori Y, Okamoto Y, Maki T, Yamamoto Y, Oishi N, Yamahara K, Takahashi R, Kalaria RN, Fukuyama H, Kinoshita M, Ihara M. SIRT1 counters cerebral hypoperfusion injury by deacetylating eNOS. *Stroke* 2014;45:3403-3411. DOI: 10.1161/STROKEAHA.114.006265

Maki T, Okamoto Y, Carare RO, Hase Y, Hattori Y, Hawks CA, Saito S, Yamamoto Y, Terasaki Y, Ishibashi-Ueda H, Taguchi A, Takahashi R, Miyakawa T, Kalaria RN, Lo EH, Arai K, Ihara M. Phosphodiesterase III inhibitor promotes drainage of cerebrovascular -amyloid. *Ann Clin Transl Neurol* 2014;1:519-33. DOI: 10.1002/acn3.79

[学会発表](計 6 件)

— 猪原 匡史. Silent information regulator 2 homolog 1 counters cerebral hypoperfusion injury by deacetylating eNOS. 第 40 回日本脳卒中学会総会(広島). Late breaking science session. 2015 年 3 月 27 日(金)

— Masafumi Ihara. Animal Models of Vascular Dementia. Invited lecture: Asia Pacific Stroke Conference (Taipei, Taiwan) Sep 14, 2014

— Masafumi Ihara. Animal models of SVD: what do they teach us about vascular cognitive disorders? Invited lecture at PIA meeting, Alzheimer's Association International Conference 2014 (Denmark), July 12

— Masafumi Ihara. Bench to bedside: using mouse models to identify new treatment approaches for Alzheimer's disease. Invited lecture: 19th Southampton Neuroscience Group (SoNG) Meeting (Southampton, UK), Sep 19, 2013

— Masafumi Ihara. Generating rodent models of chronic cerebral hypoperfusion and investigating the pathogenesis of vascular

cognitive impairment. Plenary session (Special session on animal models of VCI). Vas-Cog2013 (Toronto, Canada) Jun 26, 2013

- Masafumi Ihara. Lessons from rodent models characterizing features of vascular cognitive impairment. Minisymposium (Animal models of VCI). Vas-Cog2013 (Toronto, Canada) Jun 26, 2013

〔図書〕(計1件)

- 猪原匡史. アルツハイマー型認知症と血管性認知症の接点と治療戦略. 神経疾患最新の治療 2015 - 2017. p21-p24 (株)南江堂.

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計0件)
- 取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.ncvc.go.jp/hospital/pro/info/neurovascular/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

猪原 匡史 (IHARA, Masafumi)

国立循環器病研究センター・病院・医長

研究者番号：00372590

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし