

平成 27 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670612

研究課題名(和文) 脳微小血管内皮細胞の老化、細胞特性におけるSIRT1の病態的役割についての解明

研究課題名(英文) The role of SIRT1 in cellular senescence and characteristics in brain microvascular endothelial cells

研究代表者

寶金 清博 (Houkin, Kiyohiro)

北海道大学・大学病院・教授

研究者番号：90229146

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、ウシBMECの過継代による老化モデル実験を行った。過継代P15～20 BMECにおいて巨細胞が出現し、 $\beta$ -galactosidase活性、活性酸素産生が増大していた。次いで、P5 BMECとP15 BMECで細胞の生死、アポトーシス、SIRT1発現を比較した。未刺激では差がなかったが、OGD/再酸素化の負荷刺激をすると、P15 BMECで細胞死、アポトーシスが増加した。一方、SIRT1発現は、P5 BMECでのみ負荷刺激後に増加した。この結果はSIRT1が細胞保護的に働いている可能性を示し、老化細胞でSIRT1の誘導がかかりにくいことが細胞の脆弱性に関連していることを想起させた。

研究成果の概要(英文)：The present study was performed with cultured senescent bovine brain endothelial cells (BMEC) with high passage numbers. P15-20 senescent BMEC contained giant cells with increase of  $\beta$ -galactosidase activity and reactive oxygen species. In comparison between P5 BMEC and P15 BMEC subjected to oxygen-glucose deprivation and reoxygenation, P15 BMEC showed significantly more cell death and apoptosis. P5 BMEC showed significantly more induction of SIRT1 expression. This result suggests that SIRT1 seems to have cellular protective effects and lose its capacity of induction in senescent cells.

研究分野：脳血管障害

キーワード：脳微小血管 細胞老化 SIRT1

## 1. 研究開始当初の背景

SIRT1 は NAD<sup>+</sup> 依存性脱アセチル化酵素であり、複数の生物種で確認されている“カロリー制限で老化が遅延する現象”に働くと考えられる Sirtuin ファミリーの一つである。SIRT1 はカロリー制限の他、レスベラトロール、アディポネクチンにより活性化され、転写因子等を脱アセチル化し、糖・脂質代謝、アポトーシス、炎症などに働き、最終的には抗老化作用を示すと考えられている。

SIRT1 は大血管レベルで抗動脈硬化作用を示すことが報告されているが、脳微小血管で老化と SIRT1 について取り組まれた研究はほとんどない。我々は脳微小血管内皮細胞 (BMEC) を使った研究で BMEC は大動脈内皮細胞に比べて脆弱であり、細胞刺激に対する組織因子、VEGF の発現がより亢進しやすいことを報告してきた。このような BMEC の細胞特性が何に起因するのか未だ不明であるが、SIRT1 の機能低下による老化性障害が関わっている可能性もあると考え、今回の研究を着想した。

## 2. 研究の目的

ウシ BMEC (Cell applications 社) を使用し、継代を繰り返すことで細胞分裂の回数を多くして、細胞老化の状態を作り、細胞の増殖能、老化、その他の特性と SIRT1 の発現および活性の関連を調べる。ウシ BMEC は分裂回数増加で増殖スピードが遅くなり、巨細胞出現、等の変化を見るが、これらの現象と SIRT1 の発現、活性化がどのように関連しているか調べる。

次いで、より老化の生理的条件に近い細胞実験モデルとして、幼若マウスと老齢マウス脳から BMEC を直接採取して初代培養を行い、前述のウシ BMEC での実験と同じ手法を用いて、増殖、老化、その他の細胞特性と SIRT1 発現および活性がどのように関連しているか検討する。

さらに上述の培養血管内皮細胞に SIRT1 活性化物質の投与、もしくは SIRT-1 インヒビターの投与を行い、SIRT1 の作用を調節することにより、

BMEC の老化や細胞特性に変化を来すことができるか検討する。

## 3. 研究の方法

ウシ BMEC (Cell applications 社) を使用し、継代を繰り返すことで細胞分裂の回数を多くして過継代の 15~20 継代 (P15~20) 細胞を用意して、細胞老化の状態を作り、細胞の増殖能、老化、その他の特性と SIRT1 の発現および活性の関連を調べる。特に 5 継代 (P5) の正常 BMEC と P15 過継代 BMEC を用いて、酸素グルコース欠乏 (OGD) 4 時間刺激における細胞応答の違いを経時的に比較し、細胞老化の影響と SIRT-1 の発現の関連を検討する。

次いで、マウス脳から BMEC を単離採取培養する方法を確立し、幼若マウス (8 週齢) と老齢ラット (50 週齢) よりそれぞれ単離した BMEC 初代培養細胞を用いて、前述のウシ BMEC での実験と同じ手法を用いて、増殖、老化、その他の細胞特性と SIRT1 発現および活性がどのように関連しているか検討する。

### (1) 形態の評価

顕微鏡下に巨細胞の出現など、形態の変化について観察する。

### (2) $\beta$ -galactosidase 活性による細胞老化の評価

老化した細胞では  $\beta$ -galactosidase 活性が増加しているため、X-Gal を基質として加えて青色に染色し、老化細胞を同定検出する。

### (3) 細胞内活性酸素産生の評価

スーパーオキシドアニオンラジカル ( $O_2^{\cdot-}$ ) を比較的特異的に検出できる蛍光プローブ Dihydroethidium (DHE) で蛍光発色して活性酸素を検出する。

### (4) Live/Dead staining Kit による細胞の生死の評価

生細胞をカルセイン-AM (緑色蛍光物質)、死細胞をエチジウムホモダイマー III (赤色蛍光) でそれぞれ発色し、細胞の生死を評価する。

(5) FLICA in vitro Apoptosis Detection Kit によるアポトーシスの評価

活性型カスパーゼと選択的に共有結合し、緑色の蛍光を発する試薬を投与してアポトーシスの評価を行う。

(6) SIRT1 の発現の定量

ウェスタンブロッティングによる蛋白定量、リアルタイム PCR による遺伝子発現定量を行う。

(7) マウス BMEC の単離採取培養

① Percoll 密度勾配遠心法を用いた BMEC 細胞単離

マウス脳を取り出して髄膜、小脳組織を取り除き、コラゲナーゼ、ディスパーゼで酵素処理する。Percoll 密度勾配遠心にて BMEC の細胞成分を含んだ細胞塊を採取する。これをコラーゲンコートディッシュに撒き、BMEC 株を作り出し、培養する。

② MACS 磁気細胞分離を用いた BMEC 細胞単離

髄膜、小脳組織を取り除いたマウス脳を用い、Neural tissue dissociation kit のプロトコールに従って細胞単離を行う。酵素処理の後にミエリン除去処理を行い、最終的には CD31 抗体磁気ビーズを用いて、細胞をカラム内で吸着して回収する。この抗体反応で単離された BMEC をコラーゲンコートディッシュに撒く。

#### 4. 研究成果

ウシ BMEC (Cell applications 社) を使用し、継代回数を P15~20 までに増やし、細胞老化について以下の検討を行った。

(1) 形態の評価

P10 を超えると老化細胞の特徴的な所見と言われている巨細胞が出現し始め、P15~20 では 5~10% の頻度で認めた。巨細胞は扁平化しており、核は不整形、巨大化、複数化していた。

(2)  $\beta$ -galactosidase 活性による細胞老化の評価  
P20 BMEC では、巨細胞のほとんどにおいて

X-Gal の青色の染色を示した。巨細胞ではない正常サイズ細胞では、細胞が密に存在する部分で陽性になる傾向にあった。巨細胞と正常サイズ細胞との染色のパターンには違いがあり、正常サイズ細胞では細胞質が染色されたが、巨細胞では核内部も染色されていた(図1)。

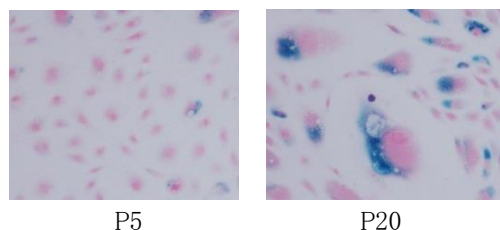


図1 細胞老化での  $\beta$ -galactosidase 活性

(3) DHE による活性酸素産生の評価

P20 BMEC では活性酸素の産生量が多くなっていた。特に前述の巨細胞において蛍光発光が強かった。前述の  $\beta$ -galactosidase 活性の評価で巨細胞と正常サイズ細胞との染色のパターンには違いがあったが、DHE の発光パターンも両者で違いがあり、巨細胞では核での発光が著しく強い傾向にあった。

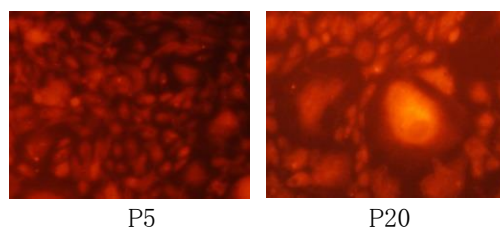


図2 細胞老化での活性酸素産生

次の(4)、(5)、(6)の3項目については、P5 BMEC と P15 BMEC の未刺激の状態では差が認められなかった。このため、細胞負荷刺激として OGD4 時間とその後の再酸素化を行い、P5 BMEC と P15 BMEC における細胞応答の違いを経時的に比較した(図3)。



図3 OGD と再酸素化のタイムコース

#### (4) Live/Dead staining Kit による細胞の生死の評価

P5 BMEC に比べて P15 BMEC の方が負荷刺激により細胞死が増加しており、P15 BMEC の方が脆弱であることが分かった (図 4)。

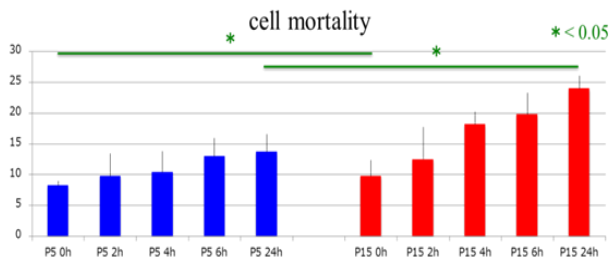


図 4 OGD 再酸素化後の細胞死の変化

#### (5) FLICA in vitro Apoptosis Detection Kit によるアポトーシスの評価

P5 BMEC に比べて P15 BMEC の方が負荷刺激によりアポトーシスが增加しており、P15 BMEC の方が脆弱であることが分かった (図 5)

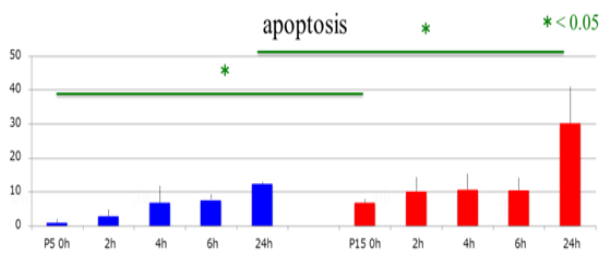


図 5 OGD 再酸素化後のアポトーシスの変化

#### (6) SIRT1 の発現の定量

P5 BMEC は負荷刺激により SIRT1 の発現が増加していたが、P15 BMEC では同様の変化は認めなかった (図 6)

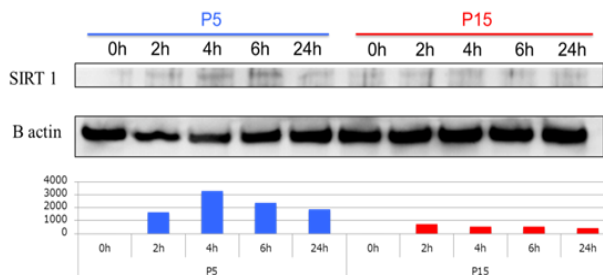


図 6 OGD 再酸素化後の SIRT1 発現の変化

#### (7) マウス BMEC の単離採取培養

① Percoll 密度勾配遠心法を用いた BMEC 細胞

#### 単離

Percoll 密度勾配遠心法により、細胞塊を採取し、コラーゲンコートディッシュに撒き、細胞株を得ることはできた。しかし、単一の細胞群ではなく、内皮細胞以外の細胞がコンタミした状態であった。継代すると内皮細胞以外の細胞が増殖してしまい、実験に使用することができなかつた。

#### ② MACS 磁気細胞分離を用いた BMEC 細胞単離

MACS 磁気細胞分離キットを用いて、製品プロトコールに従って細胞単離を試みた。しかし、条件をいろいろと変えてみても、残念ながら今までのところ BMEC が回収できない状態が続いている。

#### 研究成果のまとめ

今回の検討では、マウス BMEC の細胞単離がうまく出来なかつたため、ウシ BMEC の過継代による老化実験モデルの結果を以下にまとめて記述する。

P15~20 過継代 BMEC において、細胞の形態の変化として巨細胞が出現し、細胞増殖のスピードが鈍化した。β-galactosidase 活性、活性酸素産生は未刺激の状態でも過継代 BMEC の巨細胞では増大していた。

一方、細胞の生死、アポトーシス、SIRT1 の発現量、の 3 項目については、P5 BMEC と P15 BMEC の未刺激の状態では差が認められなかつた。このため、細胞負荷刺激をした場合にどうなるかを見るため、OGD4 時間とその後の再酸素化を行い、P5 BMEC と P15 BMEC における細胞応答の違いを検討した。その結果、P15 BMEC の方が、細胞死、アポトーシスが增加することが明らかになった。一方、SIRT1 は P5 BMEC の方で刺激後に発現が増加していた。この結果は SIRT1 が細胞保護的に働いている可能性を示しており、老化細胞で SIRT1 の誘導がかけにくいことが細胞の脆弱性に関連していることを想起させた。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

①下田祐介、鑑谷武雄、宝金清博、他、培養脳微小血管内皮細胞での低酸素刺激に対するNOX4・ICAM-1・VCAM-1発現亢進の高感受性  
日本脳卒中学会、2014年3月13-15日、大阪国際会議場(大阪府)

②Shimoda Y, Abumiya T, Houkin K. et al.  
Association of increased expression of NOX4 with susceptibility to hypoxia-induced ROS overproduction and ICAM-1 and VCAM-1 upregulation in brain microvascular endothelial cells. International Stroke Conference 2014, 2014.2.12-14, San Diego Convention Center, (San Diego, USA)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

寶金 清博 (HOUKIN KIYOHIRO)  
北海道大学・大学病院・教授  
研究者番号:90229146

### (2) 研究分担者

中山 若樹 (NAKAYAMA NAOKI)  
北海道大学・大学院医学研究科・講師  
研究者番号:40421961

数又 研 (KAZUMATA KEN)  
北海道大学・大学病院・講師  
研究者番号:60634144

鑑谷 武雄 (ABUMIYA TAKEO)  
北海道大学・大学院医学研究科・特任助教  
研究者番号:80270726

七戸 秀夫 (SHICHINOHE HIDEO)  
北海道大学・大学病院・助教  
研究者番号:80374479