

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 21 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26640034

研究課題名(和文) SIRT1活性化薬を用いた脳梗塞の新規予防/治療法の開発

研究課題名(英文) Establishment of novel prophylaxis/treatment for cerebral infarction using SIRT1 activator

研究代表者

服部 頼都 (Hattori, Yorito)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・病院・客員研究員

研究者番号：60713849

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：SIRT1は「脳虚血抵抗性に賦与する」という仮説を検証した。SIRT1過剰発現マウス(Sirt1-Tg)と野生型同腹仔マウスに両側総頸動脈狭窄術(BCAS)を行って、慢性脳低灌流を誘導した。通常、BCAS後は作業記憶障害、大脳白質の虚血性傷害が発現するが、Sirt1-Tgでは認めなかった。この要因として、野生型マウスの術後脳血流は術前の約70～80%に低下したが、Sirt1-Tgでは一貫して脳血流は保たれたことであった。この機序は、SIRT1が内皮型一酸化窒素合成酵素を脱アセチル化して活性型とし、脳血管を拡張させたことによるものであった。今後はSIRT1活性化薬を使用した臨床応用を目指す。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that SIRT1 counteracts cerebral ischemia/hypoperfusion. We did the bilateral common carotid artery stenosis (BCAS) surgery to Sirt1 transgenic (Sirt1-Tg) mice and wild-type (WT) littermates, which induces chronic cerebral hypoperfusion. WT mice showed working memory impairment and cerebral white matter ischemic injury, but Sirt1-Tg mice preserved memory function and cerebral histologic integrity at 1 month after BCAS. For Sirt1-Tg mice showed continuously preserved cerebral blood flow after BCAS even though CBF of WT mice decreased to 70-80% of baseline after the surgery. The mechanism is that SIRT1 deacetylate endothelial nitric oxide synthase (eNOS) and activated that so that cerebral arteries dilate. We are going to try the clinical research using SIRT1 activator.

研究分野：神経内科学

キーワード：SIRT1 頸動脈狭窄症 血管性認知症 脳血流量

1. 研究開始当初の背景

近年、生活様式の欧米化に伴って頸動脈狭窄症患者は増加の一途をたどっている。頸動脈狭窄症は、脳梗塞、血管性認知障害の強いリスクファクターであり、一次・二次予防法の開発は喫緊の課題である。しかし、現状において、予防、治療ともに、低侵襲かつ万能な治療法は見当たらない。我々は長寿遺伝子 *SIRT1* に注目して、「*SIRT1* は脳虚血抵抗性に賦与する」という仮説を検証するために研究を行うこととした。

2. 研究の目的

脱アセチル化酵素の *SIRT1* は長寿遺伝子と言われ、近年、*SIRT1* を高発現させることによってアルツハイマー病やハンチントン舞踏病などの神経変性疾患や心筋梗塞などの心血管障害において抗アポトーシス効果、抗酸化作用などを発揮して保護作用を有することが報告されている。その中でもわれわれが注目している興味深い報告は以下の通りである。

#1. 虚血プレコンディショニングは *SIRT1* を活性化し、虚血による細胞死を抑制する (Ami P. Ravel, *et al.*, J Cereb Blood Flow Metab 2006)。

#2. 心筋虚血 / 再灌流後において *Sirt1-Tg* マウスでは梗塞巣の減少を認める (Hsu *et al.*, Circulation 2010)。

#3. *SIRT1* は eNOS と直接結合し脱アセチル化することで eNOS を活性化し NO 産生が増加する (Mattagajasingh I., *et al.*, Proc Natl Acad Sci 2007)。

つまり、虚血状況下において *SIRT1* の活性化は血管拡張などを介して組織障害を軽減する可能性が示唆される。

以上のことから、*SIRT1* による組織保護効果が脳血管にも応用できると仮説を立て、中枢神経と血管内皮に *SIRT1* が過剰発現したマウスを用いて *in vivo* で仮説の検証を行うこととした。

また、*in vivo* での仮説の検証が終了した後は、*SIRT1* 活性化薬を使用した臨床応用を検討している。

3. 研究の方法

プリオンプロモーター制御下に神経細胞と血管内皮に *SIRT1* が過剰に発現するマウス (*Sirt1-Tg*) と同腹仔の野生型マウスの両側総頸動脈に内径 0.18 mm の微小コイルを装着する手術 (BCAS: bilateral common carotid artery stenosis) を行うことで脳低灌流を誘導し、その表現型を比較検討した。術後 28 日の時点で、8 方向放射状迷路試験で認知機能を評価した。また同時点における白質変化を免疫組織化学とクリューバー・パレラ染色により評価した。次に、野生型マウスでは手術後 2 時間で脳血流量が術前の 70~80%まで低下することがすでに報告されているため、術後 2 時間における毛細血管、神経細胞の微小構造を電子顕微鏡で観察した。また、術後の脳血流量の継時的変化をレーザースペッ

クル脳血流画像化法により解析した。さらに、内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) 作動薬であるアセチルコリンを脳表へ灌流し血管反応性を解析し、eNOS の脳内発現量をウェスタンブロット法により定量した。

次に、同様に、*Sirt1-Tg* マウスとその同腹仔の野生型マウスの両側総頸動脈に 10 分間の閉塞手術を行い、閉塞前から閉塞後 10 分間の脳血流量の推移をレーザースペックル脳血流計を使用して測定し、術後 7 日において、海馬の虚血性神経細胞死の程度を抗 NeuN 抗体による免疫組織化学で評価した。

上記で *in vivo* での *SIRT1* の効果を検証した後に、臨床応用として *SIRT1* 活性化剤を認知機能低下を有する頸動脈狭窄症の患者に投与する前に、頸動脈狭窄症の新規モデルマウスを作成してこのモデルマウスにおいても *SIRT1* の効果を確認することを目標とした。C57BL/6J の野生型マウスの両側総頸動脈に内径 0.75mm のアメロイドコンストリクター (AC) を装着した。手術 1 か月後、AC 装着部の頸動脈の組織、虚血性傷害 (菲薄化、グリオーシス) の程度を確認するために大脳白質の組織と認知機能を観察した。

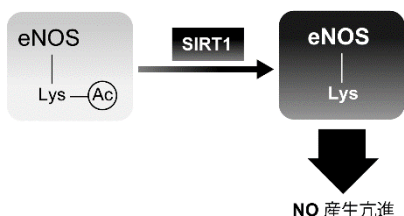
4. 研究成果

SIRT1 過剰発現マウスにおいて、野生型マウスの BCAS 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・小膠細胞の活性化や乏突起膠細胞の減少も有意に抑制された。白質粗鬆化も有意に抑制され *SIRT1* による白質保護効果が示された。電子顕微鏡による観察では、術後 2 時間の野生型マウスでは、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が、*SIRT1* 過剰発現マウスにおいては上記の所見を認めず、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%の低灌流状態が持続した。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* 阻害剤投与によって完全に消滅した。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 タンパク質総量に両群間で差異は認めなかったが、*SIRT1* 過剰発現マウスでは、アセチル化 eNOS が有意に減少し、非アセチル化 eNOS が有意に増加していた。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。

以上より、*SIRT1* は eNOS を活性化することで血管性認知症・脳梗塞の予防 / 治療法になりうると提唱した。従来の脳虚血の治療法は、Virchow の血栓形成の 3 要因 (血液、血管、血流) 中の「血液」成分、つまり血小板や凝固因子からなる血栓形成機構のみに注目

されたものであった。しかし、この研究において、SIRT1は、eNOSを活性化し脳血流を維持するという「血流」と「血管」にも同時に

SIRT1の効果(脱アセチル化効果)



フォーカスを当て、より生理的な血栓防止機構を提案できた。

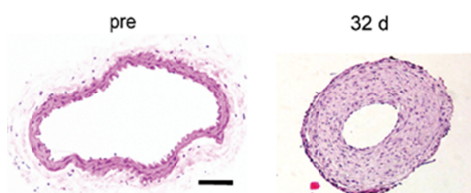
次に、頸動脈狭窄症のモデルマウスを作成した。マウス両側総頸動脈に AC を装着すると、1か月後の AC 装着部の頸動脈は、著明な内膜肥厚を示した。内膜内には、平滑筋が遊走し、マクロファージが浸潤しており、早期動脈硬化性病変を有した頸動脈狭窄症を再現できていた。よって、この手術を GCAS: Gradual common Carotid Artery Stenosis と名付けた。GCAS 術後、脳血流量は緩徐進行性に低下した。GCAS 術後 1 か月においては、作業記憶障害を有意に認め、また、大脳白質における星状膠細胞・小膠細胞の活性化や乏突起膠細胞の減少も有意に認めた。今後はこのモデルを使用して、頸動脈狭窄に対する SIRT1 の効果を確認し、臨床応用へつなげていく予定としている。

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 3 件、すべて査読あり)

- (1) Hattori Y, Enmi J, Iguchi S, Saito S, Yamamoto Y, Tsuji M, Nagatsuka K,



Kalaria RN, Iida H, Ihara M. Gradual Carotid Artery Stenosis in Mice Closely Replicates Hypoperfusive Vascular Dementia in Humans. *J Am Heart Assoc.* 2016; 5: e002757.

- (2) 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.* 26; 3: 113-117; 2015.

- (3) Hattori Y, Okamoto Y, Maki T, Yamamoto Y, Oishi N, Yamahara K, Takahashi R, Kalaria RN, Fukuyama H, Kinoshita M, Ihara M. Silent information regulator 2 homolog 1 counters cerebral

hypoperfusion injury by deacetylating endothelial nitric oxide synthase. *Stroke.* 45; 11:3403-3411; 2014.

[学会発表](計 3 件、すべて査読あり)

- (1) Hattori Y, Enmi J, Okamoto Y, Nagatsuka K, Kalaria RN, Iida H, Ihara M. Gradual Carotid Artery Stenosis in Mice Closely Replicates Hypoperfusive Vascular Dementia in Humans. International Stroke Conference 2016. Los Angeles. USA. March 2016
- (2) 服部頼都, 圓見純一郎, 長束一行, 飯田秀博, 猪原匡史. 緩徐進行性の脳血流低下による血管性認知障害モデルマウスの作製 第 27 回日本脳循環代謝学会総会 富山国際会議場 2015 年 10 月
- (3) Hattori Y, Okamoto Y, Yamamoto Y, Oishi N, Nagatsuka K, Takahashi R, Fukuyama H, Kinoshita M, Ihara M. A POTENT PROTECTIVE ROLE OF SIRT1 AGAINST CHRONIC CEREBRAL HYPOPERFUSION. The 55th Annual Meeting of the Japanese Society of Neurology. 福岡国際会議場 2014 年 5 月

[図書](計 1 件)

服部頼都, 猪原匡史 脳卒中 新時代の治療を求めて「SIRT1」. 日本臨牀 74 (4): 589-594; 2016.

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]

ホームページ等:
各種新聞掲載あり, Yahoo JAPAN ホームページ掲載あり(Hattori et al, Stroke 2014)

6. 研究組織

- (1)研究代表者:服部 頼都(HATTORI, Yorito)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター
病院・客員研究員
研究者番号：26440034

(2)研究分担者
()

研究者番号：

(3)連携研究者
()

研究者番号：