

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08059

研究課題名(和文) Sirt7 による非ヒストン核タンパク HMGB1 制御機構の解明

研究課題名(英文) Relationship between deacetylation of nuclear High-Mobility Group Box 1 and Sirt7 activation in failing heart

研究代表者

久保田 功 (Kubota, Isao)

山形大学・学内共同利用施設等・理事

研究者番号：30161673

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：核内 HMGB1は心筋細胞の恒常性制御機構に重要な役割を果たす。心不全の進展により核内 HMGB1はアセチル化を受け、核外移行し、核内 HMGB1 の心筋保護作用が喪失する。心不全モデルでは脱アセチル化酵素Sirt7 の発現の低下を認めた。心不全患者でもSirt7発現の低下やHMGB1の核外移行を確認した。心不全モデルを用い、Sirt7がHMGB1のアセチル化と心機能に与える影響を検討した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核内 HMGB1は心筋細胞の恒常性制御機構に重要な役割を果たす。我々は核内 HMGB1のアセチル化が心筋細胞に与える効果を検討し、心不全進展機構の解明を行ってきた。感染、糖尿病、虚血、圧負荷、加齢などのストレスによって、持続的にHMGB1のアセチル化が生じている。HMGB1の脱アセチル化機構の解明により、治療抵抗性の心不全やリパースリモデリングを得るための治療法の開発に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：HMGB1 is a DNA-binding protein associated with nuclear homeostasis and DNA repair. Decreased nuclear HMGB1 and Sirt7 expression were observed in the pressure-overload heart failure mouse model. Decreased nuclear HMGB1 and Sirt7 expression were also confirmed in patients with heart failure. Nuclear HMGB1 was acetylated and translocated to extracellular from intracellular as heart failure progresses, which attenuated the protective effect of nuclear HMGB1. We investigated the role of Sirt7 in deacetylation of HMGB1 and cardiac function in the heart failure model.

研究分野：循環器内科

キーワード：核内 HMGB1 心不全 Sirt7 脱アセチル化

## 1. 研究開始当初の背景

近年、高齢化に伴い緩徐進行性で無症候性の心不全や収縮機能の低下を伴わない (HFpEF) 患者が増加している。感染などの軽微な負荷によって症候性かつ治療抵抗性の心不全へと進展することから、心臓老化の進展機序の解明と新規治療法の開発が急務である。ミトコンドリア機能障害は細胞変性や Apoptosis を伴い、Huntington 病やパーキンソン病の進行 (J. Clin. Invest 2009, J Cell Sci. 2010)、加齢に伴う心不全の進展に関連する (Circ Res 2012, Nat Med 2007)。ミトコンドリア障害に伴い酸化ストレスが亢進し、DNA 損傷や癌遺伝子の発現などによる過剰な増殖刺激によって p53 依存性の老化シグナルが活性化する。

High Mobility Group Box Protein 1 (HMGB1) は、ヒストンや DNA に結合しクロマチン構造を調節する非ヒストン核蛋白である (EMBO J. 2003)。また、核内 HMGB1 は傷害 DNA の塩基除去修復作用や転写因子活性の調節作用を持っている。

我々は、ヒト心筋生検サンプルを用いて検討を行い、慢性心不全患者では HMGB1 の局在が核内から核外へ移行していることを明らかにした。

また、心筋梗塞時に HMGB1 が心臓保護作用を有すること (Cardiovasc Res. 2008)、大動脈縮窄術 (TAC) による圧負荷モデルにおいて心筋の DNA 傷害が HMGB1-TG マウスが抑制されていること、HMGB1 がアセチル化によって核内から核外へ移行し胎児型遺伝子を発現し心筋機能障害をきたすことを報告した (Cardiovasc Res. 2013)。さらに、核内の HMGB1 は心筋保護タンパクである HSPB1 の発現を促すことで心筋 Apoptosis を抑制することを明らかにした (J Mol Cell Cardiol. 2015)。従って、心筋細胞核内の HMGB1 が心筋細胞の恒常性の維持に作用していると考えられる。

Sirt2 はカロリー制限による寿命延長効果に関与する NAD<sup>+</sup> 依存性ヒストン脱アセチル化酵素として機能し哺乳類ホモログとして Sirt1 から Sirt7 までが同定されている。

Sirt1, 6, 7 が核内に存在し、肝細胞では加齢によって Sirt1, Sirt7 の発現が低下すること (Mol Biol Cell. 2013)。Sirt6, Sirt7 ノックアウトマウスは HMGB1 ノックアウトマウスと類似したフェノタイプをきたすことから我々は Sirt7 に着目した。心臓線維芽細胞の Sirt7 は Autophagy により TGF 受容体発現を制御し心筋梗塞後の心破裂に関与する (Circulation. 2015) が、心筋細胞に与える役割は不明である。

HMGB1 がアセチル化を受け核外へ移行すると、HMGB1 による DNA 修復機構が障害を受け、また心筋細胞からの胎児型遺伝子が発現し続ける状態に陥っている。レニンアンジオテンシンアルドステロン系 (RAAS) 阻害薬、プロロッカーを用いても HMGB1 のアセチル化は持続しており、治療抵抗性の心不全や HFpEF の発症の誘因となっている可能性がある。そこで、Sirt7 が HMGB1 脱アセチル化の機構と心筋細胞保護作用にどのように関与するかを明らかにすることができれば、心不全患者に対する新規治療法の開発につながると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、HMGB1 と Sirt7 の相互作用に着目し、Sirt7 による HMGB1 のアセチル化に与える効果を明らかにすることである。心不全において心筋細胞の Sirt7 の発現が減少すること、アセチル化を受けると核内 HMGB1 が心筋保護作用を喪失すること、Sirt7 の発現を維持することにより、HMGB1 のアセチル化が抑制され心機能が維持されることを明らかにする。

我々は核内 HMGB1 のアセチル化や心筋細胞に与える効果に関して以前から着目し心不全進展機構の解明を行ってきた。感染、糖尿病、虚血、圧負荷、加齢などのストレスによって、持続的に HMGB1 がアセチル化しているため、HMGB1 の脱アセチル化機構の解明によって、治療抵抗性の心不全やリバーシブルモデリングを得るための治療法の開発が期待できるため、in vitro, in vivo とともに世界に先んじた研究といえる。

本研究によって、我々がこれまで明らかにしてきた心筋細胞の恒常性制御機構に対する核内 HMGB1 の意義に対する理解を深め、加齢に伴う心不全、治療抵抗性の心不全や HFpEF の進展機序を明らかにしていくことが可能となる。HMGB1 のアセチル化に対する治療法の開発は、これらの慢性心不全に対する新規治療標的分子の発見につながり、基礎研究を臨床研究へ応用することが可能となることが期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) HMGB1 と Sirt7 の相互作用の検討

培養心筋細胞を用いて Sirt7 と HMGB1 との結合や脱アセチル化に与える効果を Western blotting と免疫沈降法で検証する。Angiotensin II 刺激による心筋細胞肥大を顕微鏡的検討や BNP-luc, ANP-luc を用いた luciferase assay で行う。EGFR, ERK1/2, AKT 活性を Western

blotting 法、アセチル化で低下する HSPB1 promoter 領域への HMGB1 の結合を Chip assay で検討する。Doxorubicin 刺激による心筋細胞アポトーシスに関する検討を、real-time PCR, western blotting 法で HSPB1, BCL-2, BCL-x1 の発現の評価, Caspase 活性を Western blotting 法で、apoptosis 細胞の検出を TUNEL assay、DNA 傷害に与える効果を Comet assay と 8-OHdG の免疫染色法で行う。

#### (2) Sirt7 による HMGB1 の脱アセチル化による Autophagy 制御について

先行研究では K2, K11 のアセチル化によって核外に移行することが報告された。しかし Autophagy 制御タンパクである Beclin 1 と HMGB1 との結合に与える影響はあきらかでない。そこで、アセチル化 HMGB1 に伴う Beclin 1 の結合や Sirt7 による脱アセチル化の意義に関して免疫沈降法、Western blotting を用いて検討を行い、Sirt7 と HMGB1 を介した Autophagy 制御システムを明らかにする。また、K2, K11 の mutation を行い、Sirt7 による HMGB1 の制御領域を明らかにする。

#### (3) ヒト心筋細胞での HMGB1, Sirt7 の発現の評価

ヒト生検サンプルを用いた検討では、核内 HMGB1 の減少が心不全重症度や拡張能指標である E/E' の上昇と相関していた。そこで、Sirt7 の発現を免疫染色法で検討し、心不全の重症度や心機能との比較検討を行う。培養心筋を用いた実験、マウスを用いた検討では、Sirt7 の発現が ROS, Angiotensin II, 加齢によって低下していたことから心不全患者の生検サンプルでも同様の傾向を認めることが予想される。

#### (4) Sirt7 過剰発現マウスを用いた検討

心臓特異的過剰発現マウスに、TAC 手術, Doxorubicin 投与を行い、心臓エコーとカテーテルを用いて心機能評価を行う。HMGB1 のアセチル化、肥大シグナルを Western blotting 法で検討する。心臓のストレス下における autophagy の評価を Western blotting 法、電子顕微鏡を用いて検討する。心筋細胞 apoptosis を TUNEL 法、caspase-3 の Western blotting で検討する。

## 4. 研究成果

心不全患者で、最適な薬物療法を行っても、治療抵抗性でリバースリモデリングが得られない患者がいる。治療にもかかわらず、様々な病態で HMGB1 のアセチル化が認められ、治療抵抗製の一因になっていると仮説を立てた。そこで、HMGB1 の脱アセチル化を促す分子ターゲットとして脱アセチル化酵素の重要性に着目し、さまざまな脱アセチル化酵素の発現を圧負荷心不全モデルを用いスクリーニングを行ったところ、Sirt7 の発現の低下を認めた。HMGB1 Tg マウス、Sirt7 ノックアウトマウスはどちらも低血糖をきたすことが知られており、機能的にも類似するメカニズムが関与している可能性がある。Sirt7 が HMGB1 の脱アセチル化を促し、HMGB1 の DNA 傷害修復機構やミトコンドリア機能を改善し、心筋細胞保護作用のみならずリバースリモデリング作用を有するか検討を行った。その結果、HMGB1 と Sirt7 の作用、Sirt7 による心筋保護効果を検討し、HMGB1 に Sirt7 が結合し HMGB1 脱アセチル化に寄与していること、Sirt7 が心筋細胞肥大を抑制すること、重症心不全患者では Sirt7 発現の低下や HMGB1 の核外移行を確認した。心臓特異的 Sirt7 過剰発現マウスを作成している。TAC, Angiotensin II 持続投与による心肥大モデル、心筋梗塞モデル、ドキシソルピシン投与などによる心不全モデルの作成と心機能解析を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takahashi T, Shishido T, Kinoshita D, Watanabe K, Toshima T, Sugai T, Narumi T, Otaki Y, Tamura H, Nishiyama S, Arimoto T, Takahashi H, Miyamoto T, Watanabe T, Woo CH, Abe JI, Takeishi Y, Kubota I, Watanabe M.	4. 巻 4
2. 論文標題 Cardiac Nuclear High-Mobility Group Box 1 Ameliorates Pathological Cardiac Hypertrophy by Inhibiting DNA Damage Response.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JACC Basic Transl Sci.	6. 最初と最後の頁 234
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jacbts.2018.11.011	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 Takahashi T, Shishido T, Watanabe K, Sugai T, Toshima T, Kinoshita D, Yokoyama M, Tamura H, Nishiyama S, Takahashi H, Arimoto T, Miyamoto T, Watanabe T, Shibata Y, Konta T, Ueno Y, Kato T, Kayama T, Kubota I, Watanabe M.	4. 巻 20
2. 論文標題 Ventricular wall stress and silent myocardial damage are associated with pulse pressure in the general population.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Clin Hypertens (Greenwich).	6. 最初と最後の頁 1319-1326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jch.13349. Epub 2018 Jul 23.	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 Tetsuya Takahashi, Tetsuro Shishido, Daisuke Kinoshita, Ken Watanabe, Taku Toshima, Takayuki Sugai, Taro Narumi, Yoichiro Otaki, Harutoshi Tamura, Satoshi Nishiyama, Takanori Arimoto, Hiroki Takahashi, Takuya Miyamoto, Tetsu Watanabe, Chang-Hoon Woo, Jun-ichi Abe, Yasuchika Takeishi, Isao Kubota and Masafumi Watanabe	4. 巻 4
2. 論文標題 Cardiac Nuclear High-Mobility Group Box 1 Ameliorates Pathological Cardiac Hypertrophy by Inhibiting DNA Damage Response	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jacbts.2018.11.011	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 T. Takahashi
2. 発表標題 Cardiac nuclear higt-mobility grop box 1 attenuates angiotenin induced pathological cardiac hypertrophy by inhibitting DAN damage response pathway.
3. 学会等名 ESC, Munich ; 2018.8 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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	穴戸 哲郎  (Shishido Tetsuro)  (60400545)	山形大学・医学部・客員研究員    (11501)	

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
---------	---------