

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K08561

研究課題名(和文) 心筋虚血再灌流障害の克服を目指したSirt7の新たな機能解析

研究課題名(英文) The role of sirt7 in the cardiac ischemia-reperfusion injury

研究代表者

荒木 智 (Araki, Satoshi)

熊本大学・地域医療・総合診療実践学寄付講座・特任准教授

研究者番号：20706717

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)：心筋虚血再灌流障害は有効な治療がなく新たな開発が喫緊の課題である。申請者は心筋虚血再灌流障害時にSirt7が減少することに注目し、Sirt7が心筋虚血再灌流障害に与える影響を検証した。Sirt7ノックスアウトマウスでは心筋虚血再灌流障害が抑制されており、sirt7の抑制が心筋虚血再灌流障害に保護的に働くことを見出した。in vitroの検討ではSirt7がMafGを脱アセチル化することにより、NRF2の活性を抑制することでHO-1やNQO-1などの抗酸化物質の産生を抑制することを見出した。本研究によりSirt7は虚血再灌流障害の新たな治療ターゲットとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

加齢関連疾患である心筋梗塞の急性期死亡率は、早期の再灌流療法や集中治療室での管理により年々低下傾向である。しかし冠動脈の血流再開時に引き起こされる虚血再灌流障害に対する有効な治療がないため、その後に心不全を発症する患者が増加しており新たな虚血再灌流療法の開発が喫緊の課題である。本申請では心筋虚血再灌流障害においてSirt7の欠如はMafGを介したNRF2の転写活性を更新することにより、酸化ストレス抑制因子を増加させることを見出した。この結果は、心筋虚血再灌流障害においてSirt7が新たな治療ターゲットとなりうる可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：Sirt7 is one of the sirtuin family. The expression of cardiac Sirt7 expression was decreased in response to ischemia-reperfusion injury (IR injury). We created ischemia-reperfusion model in Sirt7 KO mice and WT mice. There was no difference in the area at risk (AAR). However, the infarct area/AAR were significantly decreased in Sirt7 KO mice compared with WT mice. In vitro experiments, Sirt7 knockdown in rat neonatal cardiomyocyte attenuated hypoxia-reoxygenation induced cell apoptosis. Sirt7 knockdown increased antioxidative factors after hypoxia/reoxygenation. NRF2 knockdown abolished Sirt7 knockdown-induced HO-1. NRF2 transcriptional activity was increased by Sirt7 siRNA treatment. CHIP assay revealed that knockdown of Sirt7 increased NRF2 binding at enhancer element of HO-1 promoter lesion. Sirt7 was interacted with not NRF2 but MafG. We also found that Sirt7 deacetylated MafG. Lack of Sirt7 attenuates ischemia-reperfusion injury by modulating NRF2 activity.

研究分野：循環器内科

キーワード：sirt7 心筋虚血再灌流障害 心筋梗塞 酸化ストレス

1. 研究開始当初の背景

加齢関連疾患である心筋梗塞の急性期死亡率は、早期の再灌流療法や集中治療室での管理により年々低下傾向である。しかし冠動脈の血流再開時に引き起こされる虚血再灌流障害に対する有効な治療法がないため、その後心不全を発症する患者が増加しており新たな虚血再灌流療法の開発が喫緊の課題である。

長寿関連蛋白であるサーチュインは NAD 依存性にヒストンや転写因子の脱アセチル化や脱アシル化を介して、老化や代謝、癌の進展、炎症などの様々な生体反応を制御していることが明らかとなってきた。なかでも Sirt1 や Sirt3、Sirt5、Sirt6 は心筋虚血再灌流障害により発現が増加し、酸化ストレスの軽減やミトコンドリア機能の改善することが報告されており、サーチュインは新たな治療ターゲットとして注目されている (*Circulation*. 2010, *AJP Heart Circ Physiol*. 2014, *JMCC*. 2015, *Basic Res Cardiol*. 2016)。

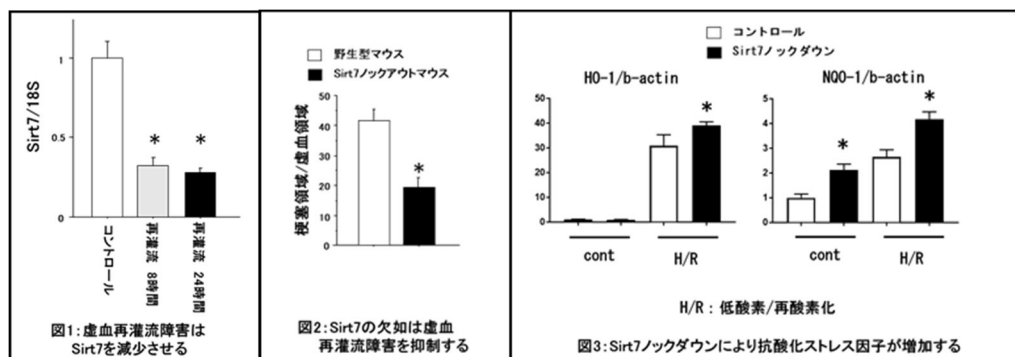
申請者はサーチュインと虚血再灌流障害の新たな関連を見出すために、野生型マウスを用いて心筋虚血再灌流モデルを作成したところ、Sirt7 が他のサーチュインと異なり著明に減少することを見出した (図 1)。Sirt7 は核や核小体に存在しているユニークなサーチュインである。申請者は近年、Sirt7 の欠如が TGF 受容体の減少を介して心筋梗塞後(左前下行枝永久結紮モデル)の線維化を抑制することを見出した (Araki et al. *Circulation*. 2015)。しかし冠動脈血流が再開するとき起こる心筋虚血再灌流障害における Sirt7 の役割についてはいまだ不明である。

2. 研究の目的

申請者は予備検討において、Sirt7 ノックアウトマウスおよび野生型マウスを用いて、冠動脈の左前下行枝の結紮・再灌流を行い、心筋虚血再灌流モデルを作成した。再灌流 24 時間後の虚血領域には両群間で差はなかったものの、Sirt7 ノックアウトマウスでは壊死部位である梗塞領域が他のサーチュインとは逆に著明に減少することを見出した(図 2) Sirt7 がどのような経路で虚血再灌流障害を軽減するかを確認するために、新生児ラット由来初代心筋細胞に siRNA による Sirt7 のノックダウンを行い、低酸素・再酸素化刺激を加えたところ、Heme Oxygenase-1 (HO-1)に代表される酸化ストレス抑制因子が増加することを見出した(図 3)。以上の結果より、虚血再灌流障害において Sirt7 が重要な役割を担っていることが予想された。

近年、NAD の合成中間産物である nicotinamide mononucleotide (NMN) が細胞内 NAD 濃度の上昇を介して Sirt1 を活性化し、糖尿病の改善などの抗老化作用をもたらすことが報告された(*Cell* 2018)。一方サーチュインの抑制が病態の改善につながるという報告はほとんどなされていない。申請者の予備検討からは他のサーチュインと異なり Sirt7 は心筋虚血再灌流障害の増悪因子であることが予想される。

本申請の目的はこのようなユニークな作用を有している Sirt7 の虚血再灌流障害制御機構を検証することにより、新たな治療ターゲットとしての Sirt7 の可能性を検証することである。



3. 研究の方法

本申請では Sirt7 が虚血再灌流障害をどのような機序で制御するか in vivo、in vitro の両面から検証を行なった。

1) in vivo の検討

心筋虚血再灌流モデルの作成

野生型マウスおよび Sirt7 ノックアウトマウスに対し、虚血再灌流モデルを作成し、再灌流 24 時間後に心臓を摘出し以下の解析を行う。

- ・ Evans Blue および TTC 染色によって虚血リスク領域、梗塞領域を同定し、Sirt7 の欠如が虚血再灌流障害に与える影響を検証した。

心筋細胞特異的 Sirt7 ノックアウトマウスでの解析

a-MHC Cre マウスと Sirt7 flox/flox マウスを交配することにより、心筋特異的 Sirt7 ノックアウトマウスを作成した。このマウスを用いて、心筋細胞の Sirt7 が再灌流障害制御に寄与するかを評価した。

2) in vitro の検討

心筋細胞における Sirt7 の機能解析

ラット新生児初代心筋細胞に対して siRNA によるノックダウンもしくはプラスミドを用いた Sirt7 の過剰発現を行い、低酸素-再酸素化刺激による心筋障害を上清中の LDH 測定にて評価した。また Caspase3 に代表されるアポトーシスの経路をウエスタンブロット法でも検討し多角的に心筋障害の評価を行った。

Sirt7 のターゲット因子の探索

予備検討の結果より酸化ストレスへの Sirt7 の関与が疑われるため、NQO1 のプロモーター領域を組み込んだプラスミドを用いてルシフェラーゼレポーターアッセイを行い、候補蛋白が Sirt7 による抗酸化ストレス因子の転写制御に関与しているか検証を行った。

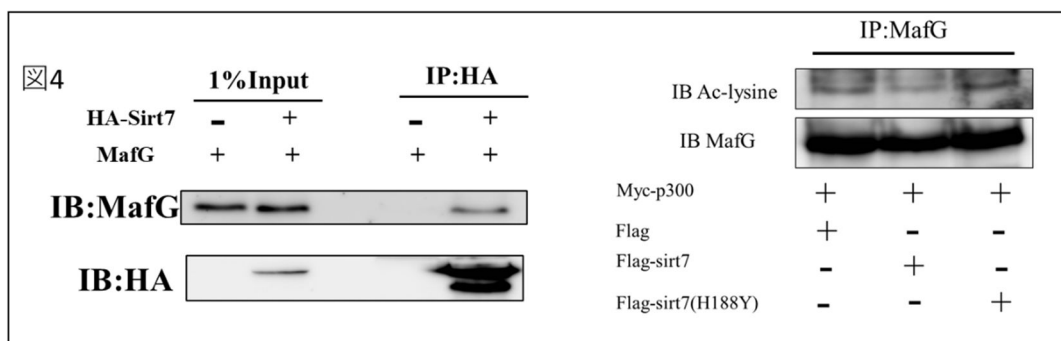
4. 研究成果

心筋虚血再灌流における Sirt7 の役割を解明するため、Sirt7 ノックアウトマウスを用いて虚血再灌流障害モデルを作成した。吸入麻酔下を開胸し、左前下行枝の血流を 50 分間途絶し、その後血流を再開し閉胸した。再灌流 24 時間後に解剖をおこない、Evans Blue および TTC 染色によって心臓の虚血リスク領域、梗塞領域を同定した。Sirt7 ノックアウトマウスでは野生型マウスと比較し、虚血リスク領域は変化しないものの、梗塞領域が有意に減少しており、Sirt7 の欠如は虚血再灌流障害において保護的に働くことが示唆された。

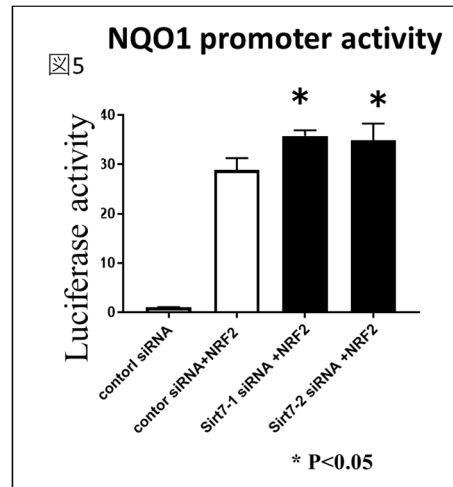
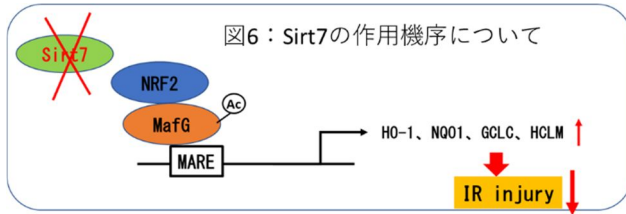
上記の機序を解明するため、in vitro ではラット新生児心筋細胞を培養し、Sirt7 もしくは control siRNA を導入し、その後低酸素・再酸素化を行った。ウエスタンブロット法による Cleaved-Caspase3 の発現を評価したところ、Sirt7 ノックダウンにより Cleaved-Caspase3 の増加が有意に抑制された。また培養上清に放出される LDH を評価したところ、Sirt7 ノックダウンにより低酸素/再酸素化による LDH 上昇は有意に減少しており、Sirt7 の減少が再灌流障害に対して保護的に働くことが示唆された。また RT-PCR による評価では低酸素/再酸素化後の HO-1 や NQO-1 といった抗酸化物質の発現が Sirt7 ノックダウンによる増加しており、また HO-1 の発現は蛋白レベルでも増加することを確認できた。

引き続き Sirt7 がどのような経路を介して、酸化ストレス応答に関与しているかの検討を行った。HO-1 および NQO-1 は転写因子である NRF2 により制御を受けるため、Sirt7 が NRF2 の発現に影響するか、培養心筋細胞を用いて検討を行った。ルシフェラーゼ活性測定による NQO-1 promoter 活性は Sirt7 ノックアウトにより上昇することを見出したが、Sirt7 は NRF2 の発現には qRT-PCR およびウエスタンブロット法の蛋白定量法ともに影響を与えておらず、また共免疫沈降法による評価でも Sirt7 と NRF2 との結合は見られず、Sirt7 が NRF2 以外の因子に影響を与えている可能性が考えられた。

NRF2 は小 Maf と 2 量体を作り、抗酸化剤応答配列 (ARE) に結合することで標的遺伝子の発現を亢進することが報告されている。我々は共免疫沈降法で Sirt7 は MafG と結合すること、さらに Sirt7 は MafG を脱アセチル化することを見出した(図 4)。



また NRF2 による NQO1 プロモーター活性化は Sirt7 ノックダウンにより有意に増強されており、Sirt7 が MafG を介して NRF2 の転写活性を制御していることが示唆された(図 5、6)。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒木 智
2. 発表標題 Sirt7 contributes to vascular lesion development by modulating ER stress
3. 学会等名 第3回日本循環器学会基礎研究フォーラム
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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