

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：20101  
 研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2009～2011  
 課題番号：21591096  
 研究課題名（和文）ヒストン脱アセチル化酵素 SIRT の神経変性疾患の病態生理における機能解析  
 研究課題名（英文）Functional analysis of histone deacetylase SIRT in the pathophysiology of neurodegenerative disorders  
 研究代表者  
 久原 真 (HISAHARA SHIN)  
 札幌医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：80336403

研究成果の概要（和文）：PC12, SHSY5Y 細胞に過酸化水素水や 6-OHDA 添加によって酸化ストレスを加え細胞死を誘発する実験系においてヒストン脱アセチル化酵素 SIRT を活性化する Resveratrol は有意に細胞死を抑制した。SIRT1 を強制発現しても同様の効果を得ている。変異体の強制発現の結果から、SIRT1 の細胞死抑制にはヒストンアセチル化酵素活性に依存ないし非依存するメカニズムが存在する可能性が示唆される。

研究成果の概要（英文）：We now have investigating the function of histone deacetylase SIRT (sirtuin). To explore preventive effect against cell death, we have performed cell viability assay in PC12 and SHSY5Y cells with administration of hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and 6-hydroxydopamine (6-OHDA). Administration of resveratrol, an activator of SIRT, and overexpression of SIRT1 resulted in significant inhibition of oxidative stress-induced cell death. We also found that overexpression of SIRT1H355Y, a dominant-negative SIRT1, showed partial inhibition of cell death. These results indicate that SIRT1 promotes cellular viability via deacetylase activity-dependent and -independent mechanisms.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・神経内科学

キーワード：神経分子病態学

## 1. 研究開始当初の背景

(1) SIRTファミリーは出芽酵母で発見された NAD 依存的ヒストン脱アセチル化酵素 Sir2 (Silent information regulator) の相同分子で下等生物においては寿命の制御を正に制御する機能が明らかにされている。哺乳類で

ヒストン脱アセチル化以外に転写因子などに直接結合しうる。さらに必要に応じて核内に存在し転写を抑制的に制御する co-factor と結合して下流分子の制御に関わり広範囲の機能を有すると考えられている。申請時点で SIRT の中枢神経系における機能について

の報告は現時点ではきわめて少なくSIRTを活性化する化合物Resveratrolがアルツハイマー病モデルにおける $\text{A}\beta$ のクリアランスを増大させることや、シヌクレインが核内でヒストンのアセチル化を阻害して細胞毒性を發揮しているという報告やSIRT2の阻害剤がシヌクレインによる細胞毒性を抑制するという報告が散見されるのみであった。このように神経変性疾患では何らかの病的な刺激により核内でヒストンのアセチル化・脱アセチル化バランスの乱れが生じ、ヒストン脱アセチル化酵素による異常な分子修飾による下流分子の活性制御が病態生理に非常に重要であることが示唆される。従って本研究で神経疾患発病機序におけるSIRT関与を疾患モデル実験系で明らかにすることは意義があると思われた。

(2) 申請者は神経幹細胞においてSIRT1が神経分化に重要な役割を果たしていることを示した(Hisahara *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, *Leading Edge in Cell*, 2008)。SIRT1, SIRT3が発生期および成体脳の側脳室subventricular zone (SVZ)に強く発現しそれらの多くのSIRT発現細胞が神経幹細胞を含む未分化神経前駆細胞であることを確認している。また培養神経幹細胞にSIRT1の機能欠失型変異体、siRNAの発現による*in vitro*実験において幹細胞の増殖が抑制された。さらに幹細胞に分化刺激を与えた際に神経細胞、オリゴデンドロサイトへの分化が抑制されることを見出した。また*in utero* electroporationにより胎児脳でSIRT1をノックダウンさせることでSVZからの神経細胞の移動や細胞形態・分化に異常が認められた。これらよりSIRT1は神経幹細胞の増殖と神経細胞への分化を正に制御していることが示唆された。この結果を応用することで神経疾患においてSIRTの制御により神経細胞やオリゴデンドロサイトなどを効率的に保護し、機能維持を図れる可能性があると考えられた。

## 2. 研究の目的

以下の目的で 2 つの重要な神経疾患の *in vitro* ないし *in vivo* のモデルで SIRT の機能を明らかにする目的で実験系を計画した。

### (1) ドパミン作動性神経細胞死における SIRT の関与の検討

パーキンソン病ではドパミン作動性神経細胞の脱落が生じるが、この際に酸化ストレスが関与することが知られている。鉄の過剰投与やロテノンの添加を株細胞ないしは初代培養細胞の実験系で行い、内在性の SIRT の発現の変化を解析することとした。このような神経系細胞を用いて

6-hydroxydopamine (6-OHDA) などの神経毒や鉄などの投与による酸化ストレスで生じる細胞死を SIRT が抑制できるか検討する。またシヌクレイン変異体を強制発現させ細胞内に凝集体を形成させる実験系で SIRT を強制発現ないしはノックダウンさせることにより分子メカニズムのどこに SIRT が関与しているかを検討する。さらに機能解析として患者脳における神経細胞脱落と SIRT の発現について免疫組織学的に検討する計画を構築した。

### (2) 脱髄疾患モデルにおける SIRT の関与の検討

これまでの予備的実験では SIRT 阻害剤はニューロン分化と共にオリゴデンドロサイトの分化も阻害した。同細胞が障害され脱髄を生じる多発性硬化症のモデル疾患 EAE マウスを用いてオリゴデンドロサイト、ミクログリアなどにおける SIRT の発現を調べる。SIRT の活性化および阻害が EAE マウスの症候のグレードを変化させるかなどについて検討する予定とした。さらにオリゴデンドロサイトがサイトカインに暴露された後に生じる脱髄の分子メカニズムに SIRT が関与していないか検討することも計画した。

## 3. 研究の方法

### (1) Resveratrol による神経系細胞における酸化ストレス耐性の検討

Resveratrol は SIRT ファミリーの活性を正に制御するポリフェノールで、SIRT 分子機能の検討に一般に頻用されている。動物実験でも運動能の改善、インスリン感受性の増加、乳癌細胞の増殖抑制作用が報告されている。

(2) 以下の検討の前に PC12, SHSY5Y 細胞といった神経系細胞を含んだ株細胞を用いて  $\text{H}_2\text{O}_2$  や 6-hydroxydopamine (6-OHDA) を用いた酸化

ストレス刺激を付加した際に生じる細胞死を定量する系で Resveratrol や SIRT1 がどのように作用するか検討した。

#### (2) シヌクレイン過剰発現系における SIRT の関与の検討

シヌクレインはパーキンソン病患者に見られる Lewy 小体の主成分である。家族性パーキンソン病の遺伝子解析でいくつかのシヌクレインの異常が明らかになっており、疾患の発病過程に重要な役割を果たしている。これまで培養細胞に異常シヌクレインを過剰発現することによって細胞内凝集体の形成が促進されることが示唆されている。そこで SHSY5Y 細胞などで A30P, A53T, E46K などの変異シヌクレインと SIRT1, SIRT3 を過剰発現させて細胞内の凝集体形成に及ぼす影響を検討する。また凝集体を形成する前段階である protofibril が最も高い細胞障害性を有するとする報告がある。そこで A30P, A53T などの変異体と SIRT1 ないしは SIRT3 を共発現させて protofibril 形成に及ぼす影響についても検討する。結果が予想外であったときには鉄の投与や Reactive oxygen species (ROS) などの酸化ストレスを負荷するような状態で検討する。またトランスフェクションの高率を上げるような導入方法を検討するなどの実験方法の改変を図る。

#### (3) カテコルミン作動性細胞死における SIRT の関与の検討

パーキンソン病患者に見られるシヌクレインを主体とする Lewy 小体の蓄積はそれ自体が神経毒性を発揮するものか、あるいは、神経保護作用の結果生じた物であるか結論は出ていない。それを踏まえて SIRT がカテコルミン作動性神経系細胞の細胞死に関与している可能性について検討する。パーキンソン病ではドパミン作動性ニューロンが酸化的ストレスの結果細胞死をきたすことが考えられ、細胞培養系では neurotoxin である 6-hydroxydopamine (6-OHDA) でこれを再現できる。SH-SY5Y 細胞などで 6-OHDA の細胞毒性を SIRT が抑制できるか検討すると共に、SIRT の局在の変化を検討する。核内に局在の変化が観察されれば cAMP responsive element (CRE) 配列に結合する結合蛋白質との結合に変化を来す可能性もあり、これらを

ChIP assay や luciferase assay などで検討する。また最近核に局在する synuclein が細胞毒性を呈し、この時ヒストン H3 は低アセチル化状態であるとの報告がなされている。培養細胞に変異 synuclein と SIRT を過剰発現させ局在の変化を観察し、細胞の viability を検討する。さらに SIRT の阻害剤や活性剤を加えたり、核局在化シグナルの変異体を用いることで局在変化が細胞に与える影響を観察する。

#### (4) オリゴデンドロサイト分化における SIRT の関与の検討

申請者はこれまで未分化神経系細胞や神経幹細胞を分化条件で培養した場合、SIRT1 が神経細胞だけでなくオリゴデンドロサイトの分化も促進的に制御する可能性を見出している。またヒストン脱アセチル化酵素には、骨格タンパク質に結合してその機能制御に強く関与しているものも知られている。そこでオリゴデンドロサイトの髄鞘突起が神経軸索に対して伸長していく機構の中で、オリゴデンドロサイトの細胞自律的な分子メカニズムに SIRT がどの程度関与しているかを検討する。マウス胎児脳から取り出したオリゴデンドロサイト前駆細胞である O2A 細胞を用いて、骨格タンパク質であるアクチンやマイクロチューブと SIRT ファミリーとの共発現の有無を免疫組織学的染色法を用いて検討する。さらに前駆細胞に分化刺激を与えた際の、骨格タンパク質の発現や局在の変化を検討する。また野生型 SIRT-GFP fusion タンパク質を electroporation 法などで強制発現した場合の細胞骨格分子の動向と突起伸長の変化を time-lapse 法などで検討する。また、siRNA 法を用いて SIRT を down-regulate し同様の検討を加える。

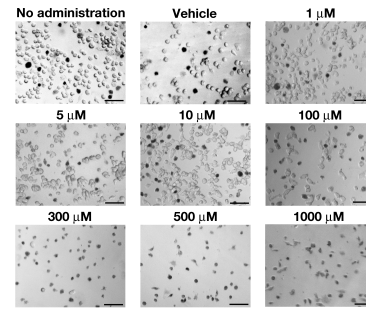
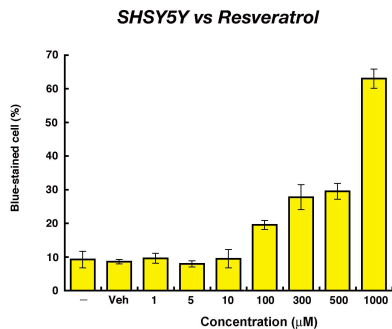
#### (5) 脱髄疾患モデルにおける SIRT の動態の検討

申請者は SIRT1 がオリゴデンドロサイトの分化を正に制御している可能性を見出している。神経細胞と同様にオリゴデンドロサイトの前駆細胞も Notch-ICD が核内に移行することでミエリン特異的蛋白質の転写が開始し分化していく。Myelin associated glycoprotein (MAG) などのミエリン特異的蛋白質の転写亢進が SIRT で認められるか、

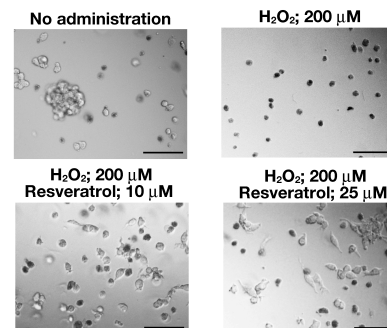
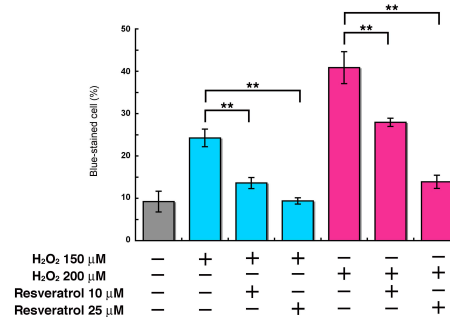
luciferase assay ないしはChIP法などを駆使して検討する。また申請者はオリゴデンドロサイトの初代培養系におけるTNF- $\alpha$ 等のサイトカインに対する細胞死の感受性をこれまで検討している。この実験系は *in vitro* の脱髄モデルとして、多発性硬化症における炎症性サイトカインによるオリゴデンドロサイトの障害を再現できると考えられる。この実験系を用いて、SIRTの過剰発現ないしはsiRNAなどによるノックダウン法で変化するかは初代培養系でオリゴデンドロサイトの細胞死の変化などを検討する。また、多発性硬化症のモデルである実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)におけるSIRTの関与を免疫組織学的検索を中心に展開する。この場合、オリゴデンドロサイトと浸潤している免疫担当細胞に分けて論じる予定である。特に抗原刺激により活性化され分裂、増殖を繰り返すリンパ球やミクログリア・マクロファージにおいてSIRTの発現に特徴が見られるか二重染色などで明らかにする。また *in vitro* 実験でサイトカイン産生に影響があると考えられた場合には、それらに対する抗体を用いた免疫染色も試みる。さらに直接的にSIRTやsiRNA-SIRTなどを *in vivo* electroporationなどで導入してEAE発病様式などの変化を検討する研究を行う予定とした。

#### 4. 研究成果

(1) PC12, SHSY5Y細胞にResveratrolの濃度を変えて投与し、48時間後に浮遊細胞としてTrypan blue染色を行った。光学顕微鏡で観察し細胞死の程度を半定量した。その結果、両細胞共に100  $\mu$ M以上の濃度になるとそれ自体で細胞死の割合が増加することが示唆された。下図はSHSY5Yの結果を示す。この量は既出の報告と概ね合致するものであった。

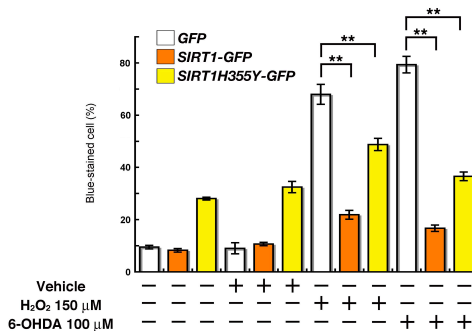
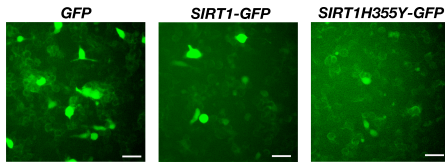
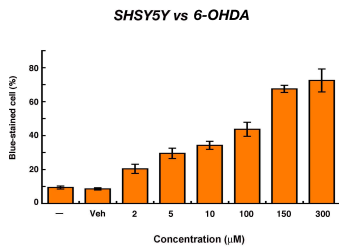


(2) 次に酸化ストレスとしてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を加えて、細胞死を惹起させる系でResveratrolの機能を観察した。その結果PC12細胞、SHSY5Y細胞のいずれにおいてもResveratrol 10ないし25  $\mu$ Mは有意に細胞死を抑制した。右上図がSHSY5Y細胞の結果を示す。



(3) 一方他の酸化ストレス6-OHDAをSHSY5Y細胞に添加したところ、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と同様に濃度依存性に細胞死を認めた。Electroporation法によってSIRT1-GFPないしヒストン脱アセチル化活性を失ったSIRT1H355Y-GFPを強制発現させ、酸化ストレスに対する耐性を検討したところ、SIRT1発現細胞では有意に細胞死を抑制したが、SIRT1H355Y変異体を強制発現させるとその効果は野生型と比較すると低下したが、細胞死抑制効果は認められた。





以上から Resveratrol と SIRT1 は酸化ストレスに対して細胞死を抑制する効果を有していることが示唆された。過剰発現の系では SIRT1H355Y 変異体は野生型ほどでないが、細胞死の抑制効果があった。このことから SIRT1 の細胞死抑制作用はヒストン脱アセチル化酵素活性に dependent, independent なメカニズムの両方があることを示唆している。両者共に下流の分子メカニズムには不明な点が多く今後何らかの形で解明していきたいと考える。

(4) 現在妊娠後期マウスから胎児脳を取り出してオリゴデンドロサイトの前駆細胞である O-2A 細胞を効率よく取り出す培養系を構築しており、順調に進捗している。近日中に前駆細胞は分化培地に置き換えることでオリゴデンドロサイトに分化する。O-2A 培養中ないしオリゴデンドロサイト分化培地に Resveratrol を添加して増殖効率ないし分化効率の変化を検討する予定である。SIRT1 を特異的に強制発現、ないしノックダウンする方法も検討中である。

(5) やはり近日中に EAE マウスの作製に着手

できる見通しである。脱髄マウスの作製が順調になれば Resveratrol を腹腔内投与するなどしたマウスとの脱髄の程度をスコア化し比較すると共に免疫組織学的検討も加える方針である。

## 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 6 件)

①Shin Hisahara and Shun Shimohama, Dopamine Receptors and Parkinson's Disease, International Journal of Medicinal Chemistry, 査読有, 2011, 10.1155/2011/403039 (Article ID 403039)

②Shin Hisahara and Shun Shimohama, Toxin-Induced and Genetic Animal Models of Parkinson's Disease, Parkinson's Disease, 査読有, 2011, 10.4061/2011/951709 (Article ID 951709)

③Meng Han, Hirofumi Ohnishi, Michio Nonaka, Rika Yamauchi, Takayoshi Hozuki, Takashi Hayashi, Masaki Saitoh, Shin Hisahara, Tomihiro Imai, Shun Shimohama, Mitsuru Mori, Relationship between dysphagia and depressive states in patients with Parkinson's disease, Parkinson's Disease & Related Disorders, 査読有, 17(6), 2011, 437-439

④Hozuki T, Imai T, Tsuda E, Matsumura A, Yamamoto D, Toyoshima T, Suzuki S, Yamauchi R, Hayashi T, Hisahara S, Shimohama S. Response of serum carboxylated and undercarboxylated osteocalcin to risedronate monotherapy and combined therapy with vitamin K(2) in corticosteroid-treated patients: a pilot study. Intern Med., 査読有, 49(5), 2010, 371-6.

⑤Tsuda E, Imai T, Hozuki T, Yamauchi R, Saitoh M, Hisahara S, Yoshikawa H, Motomura M, Shimohama S. Correlation of bite force with excitation-contraction coupling time of the masseter in myasthenia gravis. Clin Neurophysiol., 査読有, 121(7), 2010, 1051-8

⑥Tanno M, Kuno A, Yano T, Miura T, Hisahara S, Ishikawa S, Shimamoto K and Horio Y. Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. J. Biol. Chem., 査読有, 285, 2010, 8375-8382

〔学会発表〕(計3件)

- ① 久原 真、堀尾嘉幸、下濱 俊、Resveratrolによる神経系細胞における酸化ストレス耐性の検討、第51回日本神経学会総会、2010.5.22、東京
- ② S.Hisahara, M.Tanno, S.Shimohama, M.Sato, Y.Horio, Histone deacetylase SIRT1 modulates neuronal differentiation, Annual Meeting of Society for Neuroscience, 2009.10.20, アメリカ合衆国・シカゴ
- ③ 久原 真、堀尾嘉幸、下濱 俊、培養神経幹細胞における分化特性とヒストン脱アセチル化酵素SIRT1の関与、第50回日本神経学会総会、2009.5.20、仙台

〔図書〕(計1件)

- ① Shin Hisahara and Shun Shimohama, In Tech, Mechanisms in Parkinson's Disease - Models and Treatments, 2011, 28

〔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

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

久原 真 (HISAHARA SHIN)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：80336403

(2) 研究分担者

下濱 俊 (SHIMOHAMA SHUN)

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：60235687

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：