

機関番号 : 12601

研究種目 : 若手研究 (B)

研究期間 : 2009~2010

課題番号 : 21790621

研究課題名 (和文) Sirtuin 遺伝子の抗老化作用による血管障害抑制機構の解明

研究課題名 (英文) The mechanism of prevention of vascular senescence by Sirtuin

研究代表者 大田 秀隆 (OTA HIDETAKA)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号 : 20431869

## 研究成果の概要 (和文) :

今回、我々は実際臨床応用されているシロスタゾールやスタチンといった薬剤の投与により血管内皮細胞の老化を抑制出来ることを確認した。また Sirt1 あるいは eNOS の発現上昇が血管内皮老化抑制に大きな役割を演じており、それに伴うミトコンドリアの産生増加および MnSOD の発現上昇が重要であることを確認した。

## 研究成果の概要 (英文) :

Our results indicated that cilostazol or statins exerted protective effects against endothelial senescence and dysfunction, and enhancement of NO production is a key mediator in up-regulation of SIRT1.

## 交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野 : 内科学一般 (含心身医学)

科研費の分科・細目 : 循環器内科学

キーワード : SIRT1, eNOS, 抗老化, 血管老化

## 1. 研究開始当初の背景

我が国の高齢化は世界でも類をみない速度で進行しており、今世紀半ばには 3 人に 1 人が高齢者になると予測される。「ヒトは血

管とともに老いる」と言われるように、このような高齢社会では動脈硬化性疾患、特に虚血性心疾患や脳血管障害の発症が高率とな

る。厚生労働省の「人口動態統計」によると虚血性心疾患の死亡数は1960年には2万人弱であったものが、2000年には約3.5倍の7万人となっている。高齢人口の著しい増加に伴って動脈硬化性疾患を有する高齢患者が増加しているのが現状であり、高齢者特有の観点から疾患を予防、治療することが重要になってくると思われる。動脈硬化を予防する確実な方法はカロリー制限である。適度なカロリー制限は運動と同様、糖尿病、脂質代謝異常、高血圧等の動脈硬化の原因となる疾患の予防につながり重要である。近年、霊長類である猿において、カロリー制限(70%に制限)による老化関連疾患(糖尿病、心血管疾患、悪性腫瘍、認知症)および関連死の減少が証明され、ヒトに対する抗老化、疾患予防効果としてのカロリー制限が注目を集めている。カロリー制限による寿命延長効果に関与する分子は、酵母や線虫などの下等生物を使った実験系により同定されており、その中の一つにSir2 (silent information regulator-2)がある。Sir2は酵母の長寿遺伝子として発見され(Imai S et al. Nature. 2000 ;403:795-800)、その後線虫、ショウジョウバエにおいても老化・寿命を制御することが実験的に証明されている。Sir2はDNA修復や転写制御を介して寿命の延長に作用すると考えられているが、カロリー制限による寿命延長にも深く関与することが最近の研究でわかってきた。Sir2はNAD<sup>+</sup>依存性脱アセチル化酵素として働き、その発現および欠損により各動物種の寿命が大きく左右される。現在、哺乳類のホモログとして7種類同定されており、そのなかでもっとも構造が類似するSirt1(Sirtuin1)は様々な細胞内蛋白と相互作用することにより老化、脂質糖代謝、細胞死、呼吸、ストレス抵抗性の制御等に大きな役割を演じていることがわかっている。赤

ワインに含まれるポリフェノール的一种であるレスベラトロールがSir2の活性化物質であることも同定され、血管機能改善作用の観点からもおおいに興味深い。血管内皮障害による血管機能障害は、結果として動脈硬化性疾患(心筋梗塞、脳梗塞)を引き起こし現在の高齢化社会において主要な死因となる血管病変となっている。血管内皮障害による血管機能障害により血管内皮細胞老化が促進され、さらに病態を悪化させていることがわかっている。実際、ヒト動脈硬化層において血管内皮細胞老化が正常血管と比較して優位に増加していることや、機械的な障害を受けやすいヒト腸骨動脈がより障害の低いヒト内胸動脈の方よりテロメア長が短いことも報告されている。血管機能制御に大きな役割を演じているのがendothelial nitric oxide synthase(eNOS)である。eNOSはその活性化によりNOの産生増加がもたらされ血管内皮機能維持に作用している。また加齢とともにその活性が減少していくこともわかっている。一方では、NO産生増加は酸素ラジカルと反応することによりNO<sup>+</sup>を産生し細胞障害的に作用すると考えられているが、通常生体内で起きているeNOSの活性化は適度なNO産生により血管内皮機能を保護する作用があり、また近年ヒト血管内皮細胞老化を抑制することもすでに報告されている。ヒトで行われたカロリー制限においてもその被検者から採取した線維芽細胞でSirt1およびeNOSの発現が上昇していることが確認されており、老化抑制のkey mediatorとしてこれらの分子が大きな役割を演じていると考えられる。

## 2. 研究の目的

今回我々は、これらSirt1、eNOSをターゲット分子と考え、その血管老化抑制メカニズムについて検討を行った。血管内皮抑制機構がSirt1-eNOSにより生体内の恒常性を維持す

るためのシステムとして相互にバランスをとりつつ作用している普遍的なメカニズムについて検討を行った。ヒト血管内皮、あるいは平滑筋細胞を用いて、血管壁細胞老化という観点から、酸化ストレスにより誘導される動脈硬化性変化や障害を Sirt1 と eNOS の活性化および抑制により、促進あるいは回避することができるかどうか検討を行った。

### 3. 研究の方法

血管保護作用を有する薬剤（脂質低下薬、インスリン抵抗改善薬、レズベラトロール、エストロゲンなどの性ホルモン、およびその誘導体 (SERM)、骨粗鬆症治療薬）を細胞に加えた際の Sirt1-eNOS によるそのメカニズム関与について検討を行う。PDE3 阻害剤（シロスタゾール）、アンジオテンシン II 受容体拮抗薬（オルメサルタン）、レズベラトロール、脂質低下薬（アトルバスタチン、ピタバスタチン）の血管老化抑制作用を確認した。これらの薬剤が eNOS の活性を優位に上昇させることもすでに NOS activation assay にて確認している。ヒト血管内皮細胞および平滑筋細胞を用いて、薬剤の処理により Sirt1, eNOS の発現がどのように影響をうけ、またその発現上昇あるいは活性化により血管壁細胞老化、障害を抑制しうるかどうかが検討した。薬剤による細胞老化に対する影響は、増殖能、形態学的変化、senescence-associated- $\beta$  galactosidase の染色およびウェスタンブロット方法により検討した。Sirt1 の活性は、ELISA 法を用いて、一度に網羅的にその活性を比較した。また in vivo の系としては老化研究で汎用されているパラコート投与マウスや STZ 糖尿病モデルマウスを用いた。DNA ダメージストレスの確認には尿中 8-OHdG (クレアチニン補正) を用いた。パラコート 25mg/kg 腹腔内投与による大動脈血管内皮細胞老化をシロスタゾール 60mg/kg/day、レズベラトロール 22mg/kg/day、アトルバスタチン 20mg/kg/day 強制経口投与により行った。これら検体について Sirt1, eNOS 発現について組織免疫学的検討を行った。また、血管内皮細胞を剥離法を用い、その細胞特異性を確認した。薬物投与によりそれらの寿命が影響をうけるか観察した。

### 4. 研究成果

ヒト血管内皮細胞において、これらの薬剤が eNOS の活性を優位に上昇させること、またその活性化、発現上昇により Sirt1 の発現が上昇、血管壁細胞老化、障害を抑制しえることを確認した。薬剤による細胞老化に対する影響は、増殖能、形態学的変化、senescence-associated- $\beta$  galactosidase の染色およびウェスタンブロットを用いている。in vivo の系としては老化研究で汎用さ

れているパラコート投与マウスや STZ 糖尿病マウスを用いて示した。更には Sirt1 の発現上昇が、ミトコンドリアの産生増加を促し、抗酸化ストレス作用をしめすカタラーゼや SOD の発現上昇をもたらすことが示せた。Sirt1-eNOS を介した抗老化メカニズムの関与について、PDE3 阻害剤（シロスタゾール）、抗高脂血症薬（アトルバスタチン）やレズベラトロールについては確認できた。今後さらに他の薬剤についても検討中である。今回の我々の研究により、高齢者で重要な位置を占める循環器疾患、つまり血管老化、血管病変への予防、治療へとアプローチを進めていく過程の中で、血管障害、細胞老化という観点からの Sirt1-eNOS を標的とした検討により、疾患の予防、治療法や普遍的な老化メカニズムを解明するためにも非常に重要であったといえる。

### 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：すべて査読有）

1. Ota H, Eto M, Kano MR, Kahyo T, Setou M, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y: Induction of Endothelial Nitric Oxide Synthase, SIRT1, and Catalase by Statins Inhibits Endothelial Senescence Through the Akt Pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 30(11):2205-11, 2010.

2. Ota H, Eto M, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y: SIRT1/eNOS axis as a potential target against vascular senescence, dysfunction and atherosclerosis. *J Atheroscler Thromb.* 17(5):431-5. 2010.

3. Ota H, Eto M, Ako J, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y: Sirolimus and everolimus induce endothelial cellular senescence via sirtuin 1 down-regulation: therapeutic implication of cilostazol after drug-eluting stent implantation. *J Am Coll Cardiol.* 53(24):2298-305. 2009.

〔学会発表〕（計 2 件）

1. 大田秀隆：シンポジウム 14「血管のアンチエイジングー血管から老いないために」スタチンによる血管老化抑制機構。第 10 回日本抗加齢医学会総会、2010. 6. 12-13、京都

2. Ota H, Eto M, Kano MR, Kahyo T, Setou M, Ogawa S, Iijima K, Akishita M, Ouchi Y: SIRT1/eNOS axis inhibits vascular senescence, dysfunction and atherosclerosis.

ISHR 2010, kyoto, Japan, 2010. 5. 15.

〔図書〕（計 0 件）

〔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  
無

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大田 秀隆 (OTA HIDETAKA)

東京大学・医学部附属病院・特任臨床医

研究者番号：20431869

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし