

## 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 25 年 5 月 15 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2012

課題番号：22590814

研究課題名（和文） カロリー制限によるミトコンドリア機能制御機構の解明

研究課題名（英文） Evaluation of mechanisms by which caloric restriction regulates mitochondrial function

研究代表者

新村 健 (SHINMURA KEN)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70206332

研究成果の概要（和文）：カロリー制限(以下 CR)は、強力な虚血心筋保護効果を発揮する。我々は、CR は特定のミトコンドリア蛋白の脱アセチル化修飾を介して虚血ストレス時の活性酸素種産出を軽減し、心保護効果を発揮する可能性を見出した。このミトコンドリア蛋白修飾は、sirtuin family によりもたらされていると推測された。次に我々は、心筋細胞特異的 SIRT1 欠損マウスを作製し、CR 効果の発現には心筋細胞の SIRT1 が必須であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Caloric restriction (CR) confers cardioprotection against ischemia/reperfusion injury. We speculated that CR primes mitochondria for stress-resistance by post-transcriptional modification of specific mitochondrial proteins. We found that deacetylation of specific mitochondrial proteins during CR preserved mitochondrial function and attenuated production of reactive oxygen species during ischemia/reperfusion. We also found that sirtuin activity was enhanced in the CR heart. Then, we evaluated the specific role of SIRT1 on CR-induced cardioprotection using cardiomyocyte-specific SIRT1 knockout mice and demonstrated that cardiac SIRT1 is essential for CR-induced cardioprotection.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
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・循環器内科学

キーワード：カロリー制限、心筋虚血、心保護、電子伝達系、脱アセチル化、ミトコンドリア、sirtuin、SIRT1

## 1. 研究開始当初の背景

抗老化療法である CR は、心血管系においても多面的な好ましい効果を発揮することが明らかにされた。我々はこれまで CR による虚血心保護効果に着目してきた。CR による心保護効果は、少なくともその一部は虚血再灌流時のミトコンドリア機能制御によると推測されているが、その詳細なメカニズムは未だ解明されていなかった。長寿遺伝子として注目されている SIR2 の ortholog である sirtuin は、様々な標的蛋白を脱アセチル化することにより CR の効果を仲介している。そこで我々は、CR 心では特定のミトコンドリア蛋白が脱アセチル化されることによりミトコンドリア機能が制御されていると予想した。ミトコンドリア蛋白の翻訳後修飾によるミトコンドリア機能制御機構の解明は、新たな CR mimetics (CR の好ましい効果を模倣しうる化合物) の開発に直結し、有望な心保護療法となるものと考えた。

## 2. 研究の目的

本実験の目的は、大きく分けて「CR 効果発現の標的細胞内小器官として、ミトコンドリア機能制御の分子メカニズムを解明すること」と「心保護効果の視点から新たな CR mimetics を開発していくこと」であった。

具体的な解明すべき項目としては、

- (1) 6 ヶ月間の CR により、脱アセチル化される CR 心のミトコンドリア蛋白を同定し、
- (2) 6 ヶ月間の CR により、CR 心のミトコンドリア機能がどのように修飾されているのかを虚血心保護の視点から解明し、
- (3) ミトコンドリア蛋白のアセチル化、脱アセチル化によって CR による心保護効果が再現できるかを確認することであった。

さらに

- (4) 最も重要な脱アセチル化はどの sirtuin によりなされているのかを同定し、
- (5) さまざまな CR mimetics、特に sirtuin-activating compounds (以下 STACs) のスクリーニングを行い、その化合物投与により特定のミトコンドリア蛋白の選択的脱アセチル化が模倣可能かを検討し、
- (6) 最終的にその化合物の長期投与により CR と同等の心保護効果が達成可能かを確認することを考えた。

## 3. 研究の方法

「CR によるミトコンドリア機能制御の分子メカニズムを解明すること」を目的にした研究は、主に 6 カ月間の CR を行ったラット心を用いて行った。

### (1) ラット CR 実験

24 週齢の雄性 Fischer 344 ラットを無作為に 2 群にわけ、一群はコントロール飼料の自

由摂取条件で以後飼育した (AL 群)。他の一群は最初の 2 週間 (ならし期間) は先に求めた 1 日量カロリー摂取の 90% 相当量を、以後は 1 日量の 65% 相当量を連日与え、6 カ月間の CR を行った (CR 群)。

### (2) Ettan DIGE 法による質的 proteomics 解析

CR により脱アセチル化される心筋ミトコンドリア蛋白を Ettan DIGE 法でスクリーニングし、個々の蛋白発現レベルとアセチル化の程度は免疫沈降法 + Western blotting で定量評価した。

### (3) ミトコンドリア機能の解析

ミトコンドリアを単離し、それぞれの電子伝達系酵素活性、呼吸機能、permeability transition pore (MPTP) 開口能、 $H_2O_2$  産出能を比較した。

### (4) Sirtuin 発現と活性の測定

Western blotting と  $NAD^+$  依存性 deacetylase 活性測定を核分画、ミトコンドリア分画を用いて行った。

### (5) 胎児ラット心筋細胞培養実験

培養胎児ラット心筋細胞に Resveratrol、Piceatannol などの STACs を添加し、免疫沈降法 + Western blotting により、ミトコンドリア蛋白の脱アセチル化を検討した。Anaero Pack と Anoerobic jar を用いた低酸素・再酸素化実験を行い、細胞障害の程度を比較した。

「心保護効果の視点から新たな CR mimetics を開発していくこと」を目標に sirtuin member を特異的に欠損させた遺伝子操作マウスを用いた CR 実験を行った。

### (6) 遺伝子操作マウス CR 実験

Floxed SIRT1 マウスと  $\alpha$ -myosin heavy chain-Cre マウスとの交配により心筋細胞特異的 SIRT1 ノックアウトマウス (以下 CM-SIRT1 KO) を作成した。コントロールマウス (以下 CONT) と CM SIRT1 KO を 2 群に分け、3 ヶ月齢よりコントロール飼料の自由摂取飼育 (AL) または -40% の CR を 3 か月間実施した。

### (7) 心機能評価

定期的に心エコー検査を実施し、心臓形態、心機能を比較した。

### (8) *ex vivo* 虚血再灌流傷害実験

摘出心 Langendorff 手技で灌流し、25 分間の完全虚血、60 分間の再灌流を順次作成した。虚血再灌流後の左室機能の回復と灌流液中に放出された LDH 活性を比較した。

### (9) 遺伝子発現解析

DNA microarray を用いて、CR 中 SIRT1 依存的に変化する遺伝子を検出した。候補遺伝子は RT-PCR と Western blotting でその発現変化を確認した。

### (10) *in vivo* 虚血再灌流傷害実験

麻酔下に挿管し、人工呼吸器を装着した。左冠動脈前下行枝の起始部から2mm心尖側を30分間結紮し虚血を作成した後、血流を再開し2時間後に心臓を摘出した。TTC染色で心筋梗塞サイズを測定し、C3に対する免疫染色を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) ラット CR 実験

6ヶ月間のCRによるラットの死亡は見られなかった。これまでに我々は同様のCRプロトコールにより心筋虚血再灌流傷害軽減効果が得られることを報告している (*Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2008;295:H2348-55.)。

##### (2) Ettan DIGE 法による質的プロテオミクス解析

CRにより6種類のミトコンドリア蛋白発現が変化し、10種類の蛋白でアセチル化の程度が変化した。特に電子伝達系複合体I構成蛋白NDUFS1と複合体III構成蛋白cytochrome *bcl* complex Rieske subunitがCR心で顕著に脱アセチル化されていた。

##### (3) ミトコンドリア機能の解析

基礎状態では両群間でミトコンドリア機能に差は見られなかった。虚血再灌流後の心臓から抽出したミトコンドリアにおいてCR群でミトコンドリア呼吸が良好に保たれ、 $H_2O_2$ 産出も軽減した。またCR群で $Ca^{2+}$ 過負荷によるMPTP開口能が改善した。

##### (4) Sirtuin 発現と活性の測定

ミトコンドリア分画におけるSIRT3、SIRT4、SIRT5の蛋白発現レベルは両群間で差を認めなかった。一方、 $NAD^+$ 依存性deacetylase活性は、核分画、ミトコンドリア分画ともにCR群で亢進していた。

##### (5) 胎児ラット心筋細胞培養実験

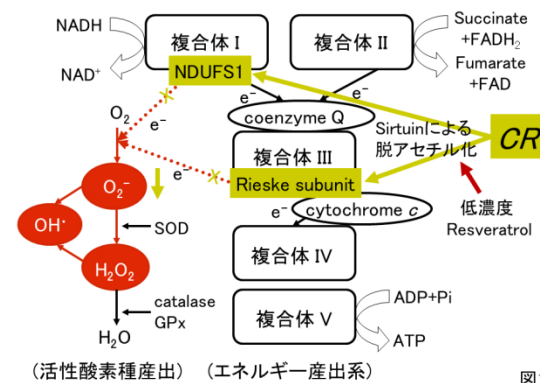
培養心筋細胞において低濃度(5  $\mu$ mol/L)のResveratrolはNDUFS1とRieske subunitを $NAD^+$ 依存的に脱アセチル化し、低酸素再酸素化による活性酸素種産出と細胞死を抑制した。

以上結果よりCRは特定の電子伝達系蛋白脱アセチル化修飾を介して虚血再灌流時の活性酸素種産出を軽減することにより、虚血心保護効果を呈するものと考察された。さらに低濃度のResveratrolは、sirtuinの活性化によりCRによる心筋細胞保護効果を模倣したものと推測した。

この結果は、CRによる心保護効果発現の新しい分子メカニズムの発見として国内外で高く評価された。さらにsirtuinの新規ミトコンドリア標的蛋白を同定したことになり、今後心血管保護効果を有する新規化合物を検索・開発していく際には、そのscreening上の有用な指標となるものと期待された。

一方、今回の我々の検討では、7つあるsirtuin memberの中、どのsirtuinがこの効果を仲介しているかを明らかにすることができなかった。また、特定のミトコンドリア電子伝達系蛋白の脱アセチル化がどのようなメカニズムで活性酸素種産出を軽減させるのかも解明できず、今後の課題として残った。そこで次のステップとして、心臓特異的に特定のsirtuinを欠損させたマウスを用いたCR研究を行うことで、心保護効果を担うsirtuinを同定し、Resveratrol以上に特異的かつ有効性の高いSTACsの発見につなげることを目指した。

図1に以上の結果から我々が想定するCRによる酸化ストレス制御機構に関する作業仮説を示す。



##### (6) 遺伝子操作マウス CR 実験

心臓でのSIRT1発現は、mRNAレベルではCM SIRT1 KOでCONTの約25%に、蛋白発現レベルでは約40%に低下した。CRによりCONT心ではSIRT1 mRNAが増加し、核分画でSIRT1蛋白発現も増加したが、CM SIRT1 KO心ではCRによるSIRT1発現に変化は見られなかった。

##### (7) 心機能評価

心エコーでの解析では、3か月齢、6か月齢ともに、CONTとCM SIRT1 KOとの間、それぞれAL群、CR群との間で左室サイズ、左室収縮機能に差を認めなかった。

##### (8) ex vivo 虚血再灌流傷害実験

CONTでは、CRによる心筋虚血再灌流傷害軽減効果が観察された。一方、CM SIRT1 KOはCONTに比べ、虚血再灌流傷害の程度が高度で、CRによる心保護効果は誘導されなかった。

##### (9) 遺伝子発現解析

CONTにおいてCRで発現が変化し、CM SIRT1 KOではCRを行っても変化しない遺伝子群をSIRT1依存的なCR効果を仲介する候補遺伝子として選び出した。GO解析から、候補遺伝子群として補体系に注目した。心臓における補体C3の蛋白発現レベルは、CRによりCONTでは低下したが、CM SIRT1 KOではCRによる低下はみられなかった。

### (10) *in vivo*虚血再灌流傷害実験

虚血再灌流心におけるC3dの蓄積の程度は、心筋梗塞の大きさと相関した。CONTでは虚血再灌流後のC3dの心筋への蓄積がCRで軽減したが、CM SIRT1 KOではCRによるC3d蓄積軽減は見られなかった。

以上の結果より、心筋細胞のSIRT1は、虚血再灌流傷害に対して保護的役割を担うこと、CRによる虚血心保護効果発現において必須であること、が明らかになった。CRによるSIRT1依存的な心保護効果発現の機序の一つとして、本研究結果からSIRT1による心臓補体系制御が示唆された。

心臓SIRT1は、虚血再灌流、飢餓、圧負荷などのさまざまなストレスに対する応答機転を担うことが報告されている。しかし、CRによる心保護効果を心臓SIRT1が担うことを明らかにしたのは我々が初めてである。さらに、既知の抗酸化酵素や抗アポトーシス分子の誘導、アポトーシス促進因子の抑制とは異なる新規のSIRT1の心保護的標的分子を発見したという点で高く評価された。今後、SIRT1によるC3発現調節機構の解明、C3欠損マウスでのCR効果について研究を展開していく。

図2に以上の結果から我々が想定するCRにおける心臓SIRT1の役割に関する作業仮説を示す。

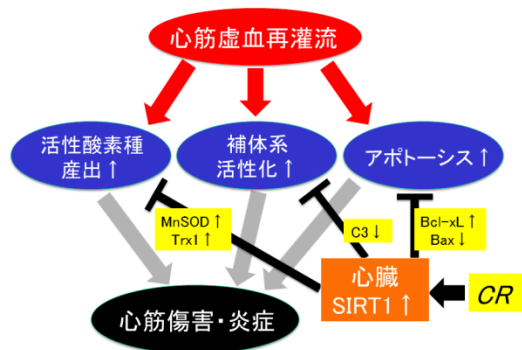


図2

### 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)

1. Shinmura K. Effects of caloric restriction on cardiac oxidative stress and mitochondrial bioenergetics: potential role of cardiac sirtuin. (査読有) *Oxid Med Cell Longev* 2013;2013:528935. Doi: 10.1155/2013/528935.

2. Shinmura K. Posttranslational modification of mitochondrial proteins by caloric restriction: Possible involvement

of caloric restriction-induced cardioprotection. (査読有) *Trends Cardiovasc Med* 2013;23(1):18-25. doi: 10.1016/j.tcm.2012.08.006.

3. Shinmura K, Tamaki K, Sano M, Nakashima-Kamimura N, Alexander MW, Amo T, Ota S, Katsumata Y, Fukuda K, Ishiwata K, Suematsu M, Adachi T. Caloric restriction primes mitochondria for ischemic stress by deacetylating specific mitochondrial proteins of the electron transport chain. (査読有) *Circ Res* 2011;109(4):396-406. Doi: 10.1161/CIRCRESAHA.111.243097.

[学会発表] (計6件)

1. 新村 健. Meet the Expert: カロリー制限による加齢関連循環器疾患治療戦略. 第77回日本循環器学会学術集会 2013年3月16日、横浜

2. Shinmura K, Yamamoto T, Tamaki K, Sano M, Fukuda K, Inaba T, Tsubota K. Cardiac Sirt1 is essential for caloric restriction-induced cardioprotection against ischemia/reperfusion. Keystone Symposia: Aging and Diseases of Aging. October 27, 2012, Tokyo, JAPAN

3. Shinmura K. Symposium: Mitochondrial injury of heart and vessel disease. Caloric restriction primes mitochondria for ischemic stress by deacetylating specific mitochondrial proteins of electron transport chain. Annual Meeting of the Korean Society of Cardiology 2012. April 20, 2012, Busan, South Korea.

4. 新村 健. トピックス: 心血管系の anti-aging. Mitochondria at the crossroad of metabolic stress and cardiovascular aging. 第76回日本循環器学会学術集会 2012年3月16日、福岡

5. Shinmura K, Tamaki K, Sano M, Yamamoto T, Fukuda K, Tsubota K. Posttranslational modification of mitochondrial proteins by sirtuin during caloric restriction. Keystone Symposia: Sirtuins in metabolism, aging and disease. February 14, 2012, Tahoe City, USA

6. 新村 健. シンポジウム: カロリーリストラクションの応用による心血管疾患治療戦略. 第11回日本加齢医学会総会 2011年5月27日、京都

〔図書〕(計1件)

1. Shinmura K. Adipokines as novel biomarkers in aging and heart failure. (eds. Bodh I. Jugdutt) Aging and heart failure: Mechanisms and management. Springer, New York, 2013 (in printing).

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

新村 健 (SHINMURA KEN)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70206332

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし

### (4) 研究協力者

末松 誠 (SUEMATSU MAKOTO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：00206385

福田 恵一 (FUKUDA KEIICHI)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：20199227

太田 成男 (OTA SHIGEO)

日本医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：00125832

坪田 一男 (TSUBOTA KAZUO)

慶應義塾大学・医学部・教授

研究者番号：40163878

足立 健 (ADACHI TAKESHI)

防衛医科大学校・医学教育部・医学科専門

課程・教授

研究者番号：50231931

佐野 元昭 (SANO MOTOAKI)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号：30265798

上村 尚美 (KAMIMURA NAOMI)

日本医科大学・医学研究科・講師

研究者番号：60283800