

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591085

研究課題名(和文) 蛋白脱アセチル化酵素 SIRT1 の核移行誘導による心不全治療の開発

研究課題名(英文) Novel therapeutic approach for heart failure by promoting nuclear translocation of SIRT1, a protein deacetylase

研究代表者

丹野 雅也 (Tanno, Masaya)

札幌医科大学・医学部・講師

研究者番号：00398322

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：SIRT1の細胞質から核への移行は不全心における心筋細胞死の進行および置換性の線維化を抑制する。その核移行の機序にはAkt/PI3KによるSer517残基のリン酸化が寄与していることを証明した。さらに、酸化ストレスによりSIRT1と結合が増加する蛋白、減少する蛋白を免疫沈降法、2次元電気泳動法およびmass spectrometryにより同定した。この蛋白-蛋白相互作用の生理的意義は今後検討予定である。次にSIRT1の心不全での効果をin vivoで観察するモデルとして肥満インスリン抵抗性2型糖尿病モデルでの心機能低下の機序を解析し、SIRT1活性化による効果の検討に着手した。

研究成果の概要(英文)：Nuclear translocation of SIRT1 suppresses cardiomyocyte death in failing hearts. We demonstrated that phosphorylation of Ser517 of SIRT1 by Akt/PI3K contributed to the nuclear translocation. Furthermore, we identified proteins whose binding to SIRT1 change during oxidative stress, using immunoprecipitation, 2D gel electrophoresis and mass spectrometry. The physiological significance of the protein-protein interaction is currently under investigation. To translate the cardioprotective function of activation or nuclear translocation of SIRT1, we first analyzed a characteristics of OLETF rats, obese insulin-resistant type 2 diabetes rats, as an in vivo animal model for heart failure. In this model, diastolic dysfunction was induced under pressure overload, but not physiological conditions, and the mechanisms that trigger the functional impairment was explored in detail. We are currently investigating whether and how SIRT1 modifies the development of diastolic dysfunction.

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：心不全 SIRT1 酸化ストレス 糖尿病 細胞死

1. 研究開始当初の背景

近年本邦では、糖尿病や高血圧およびその合併症としての虚血性心疾患患者の増加が顕著である。これらの疾患は最終的に心不全発症をもたらす。臨床試験により β 遮断薬、アンジオテンシン変換酵素阻害薬、アンジオテンシン受容体遮断薬、アルドステロン拮抗薬が心不全の予後を改善することが示されてきた。しかし、これらの薬剤を用いて神経体液性因子の修飾をおこなっても、中等症 (NYHA Class III) および重症 (NYHA Class IV) の心不全は1年生存率が各々80%、40%と極めて予後が悪く (*Braunwald's Heart Disease, 2007, 8th edition*)、新しい治療法の開発が待望される。我々が着目した NAD⁺依存性ヒストン脱アセチル化酵素 Sir2 は酵母や線虫の寿命を延長する長寿蛋白である。ほ乳類のホモログである SIRT1 はヒストンだけではなく多くの転写因子を脱アセチル化しその活性を制御する。p53 の阻害と FOXO や Ku70 の活性化によるアポトーシスの抑制、酸化ストレス耐性の増強、障害 DNA 修復促進はこの一例である (*Guarente et al. Cell. 2005;120:473-82*)。こうした報告に基づき、我々は SIRT1 が不全心の心筋細胞保護をもたらすと仮説をたて研究に着手した。これまでに、(1)心臓は高レベルの SIRT1 を発現していること (*Sakamoto et al. FEBS Lett. 2004;556:281-86*)、(2)SIRT1 はそのアミノ酸配列中に核移行シグナルおよび核外移行シグナルを有し核-細胞質間をシャトルすること、(3)心不全で核に局在する SIRT1 が増加すること、(4)核局在 SIRT1 は Mn-SOD の発現を増加させ酸化ストレスによる細胞死を抑制すること、(5)SIRT1 活性化薬のレスベラトロールが拡張型心筋症ハムスターの死亡率を低下させることを報告した (*Tanno et al. J Biol Chem. 2007;282:6823-32, Tanno et al. J Biol Chem. 2010;285:8375-82*)。

2. 研究の目的

上記のように、既報、あるいは我々がこれまでに得た成績から、心不全では SIRT1 の一部が核へ移行し内因性心筋保護機構として心筋細胞死を抑制していると考えられる。したがって本研究では心筋細胞の SIRT1 を活性化させること、またはその核局在を増加させることで心不全のさらなる予後改善が得られると仮説をたて、これを検証することを目的とした。前述のようにジストロフィン欠

損拡張型心筋症モデル動物である TO-2 ハムスターでは SIRT1 活性化薬であるレスベラトロールによる心不全の進展抑制、予後改善効果が認められたが、心不全はその原因により進展、増悪の機序が必ずしも同一では無い。したがって SIRT1 による心筋保護作用には心不全の原因疾患により差異がある可能性が考えられる。SIRT1 はミトコンドリア酸化的リン酸化の亢進、インスリン感受性亢進作用といった脂肪酸代謝や糖代謝を改善する効果も有するため、糖尿病や代謝異常に起因する心不全では特にその活性化の有効性が高い可能性がある。臨床応用を念頭に置くといかなる原因の心不全に対して SIRT1 が有効か、すなわち、心不全の原因疾患によって SIRT1 の有効性に差異があるかを確認することは重要である。したがって本研究では臨床的に頻度の高い複数の心不全モデル、特に糖尿病や代謝障害による心不全モデルの確立を目指し、心機能障害の背景にある分子機序を解析した。さらに、各々の心不全に対する SIRT1 活性化の効果を実験的にまた遺伝子工学的手法を用いて解析することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) まず、SIRT1 の効果が有効であるためには核局在が必要であるため、核局在の分子機序にリン酸化が寄与するかを検討した。リン酸化部位予測アルゴリズム (*Yaffe et al. Nature Biotechnol 2001;19:348-53*) による解析では Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) のリン酸化ターゲット配列が SIRT1 に含まれる。実際に PI3K/Akt の活性化薬である insulin like growth factor-1 (IGF-1) が SIRT1 の核内移行をもたらすことを見いだした。そこで、PI3K またはその下流の Akt のリン酸化サイトを同定するために、一連の SIRT1-GFP 結合欠失変異体、点変異体を作成した。心筋細胞またはラット心筋芽細胞株の H9c2 細胞にこれらの変異体を導入し PI3K および Akt の活性化薬および阻害薬に暴露した。GFP の細胞内局在変化を比較検討することにより核移行に寄与するリン酸化部位を同定することを試みた。また、同定されたリン酸化部位の修飾により酸化ストレスによる細胞死や細胞ストレス耐性がどう変化するかを検討した。細胞死や細胞ストレス耐性は溶媒中の LDH 活性、CK 活性、propidium iodide 染色、TUNEL 染色、活性型 caspase3 の免疫染色、超解像顕微鏡によるミトコンドリアの形態

観察、ミトコンドリアのCa²⁺取り込み能の定量(単離心筋細胞からミトコンドリアを抽出し、外因性のCa²⁺を段階的に溶媒に加える。ミトコンドリアによるCa²⁺取り込みにより溶媒中のCa²⁺濃度はその都度低下するが、一定のCa²⁺負荷量に達した時点でミトコンドリア透過性遷移孔の開孔が惹起され溶媒中のCa²⁺濃度が急速に上昇する。この時点までに負荷したCa²⁺の総量をCalcium Retention Capacity (CRC)としてmPTP開孔閾値の指標として定量評価する)など複数の指標を用いて多角的に評価した。

(2)次に、蛋白-蛋白相互作用によるSIRT1の細胞内局在や機能修飾について検討した。心不全では酸化ストレスや炎症性サイトカインにより緩徐に惹起される細胞死が病勢の進行に寄与する。SIRT1と他の蛋白の相互作用がこの細胞死に及ぼす影響を検討するために単離心筋細胞をアンチマイシンA、過酸化水素またはTNF α で刺激した。細胞のホモジネートを用いて抗SIRT1抗体により免疫沈降を行い、沈降物を2次元電気泳動により分離しmass spectrometryによりストレス下でSIRT1との結合が変化する蛋白の同定を試み、またその相互作用の機能的意義を検証した。

(3)次にSIRT1活性化(SIRT1活性化薬の投与、核移行に寄与するSer517リン酸化、核移行に寄与する蛋白-蛋白相互作用の増加)をもたらす各種インターベンションによる心不全の改善を臨床応用に結びつけるために、*in vivo*の心不全モデルにおいてSIRT1活性化による心不全改善効果を観察することを目指した。SIRT1活性化薬レスベラトロールの継続的投与がジストロフィン欠損遺伝的拡張型心筋症モデルのTO-2ハムスターにおいて酸化ストレス除去酵素であるMn-SODの発現を亢進させ、左室収縮能の低下や線維化の進展を抑制し生存率の改善をもたらすことを既に報告した。本研究では臨床的に頻度がより高く、治療に難渋することの多い糖尿病性心筋症モデルの確立に取り組んだ。

まず、臨床的にも頻度が極めて高い肥満インスリン抵抗性2型糖尿病のモデルであるラットOLETFに焦点を当てて解析することとした。まずSIRT1活性化による心不全治療効果の有無、程度を評価するための指標を確立することとした。そのためにOLETFが心不全を発症する週齢や重症度、心不全発症の機序の解析を行った。具体的にはコン

ダクタンスカテーテル挿入下のPressure-Volume loopの解析、DNAマイクロアレイによる遺伝子発現解析、ウェスタンブロットングによる収縮蛋白、マトリックス蛋白やカルシウム制御蛋白の発現量やリン酸化の定量、メタボローム解析による代謝異常の有無、特徴の解析をおこなった。

4. 研究成果

(1)リン酸化部位予測アルゴリズムにより予測された複数のSer残基およびThr残基に順次点変異を挿入し一連の点変異体を作成し、その細胞内局在を観察した。Ser517をAlaに置換した点変異体(S157A)ではIGF-1によりPI3K/Aktのリン酸化/活性化を誘導しても野生型で観察されるようなSIRT1の細胞質から核内への移行は認めなかった。この成績からSer517のリン酸化がSIRT1の核内移行に寄与することが示された。次にSer517リン酸化によるSIRT1の核内移行の生理的意義を検討した。野生型(WT)またはS517AをトランスフェクションしたH9c2細胞に酸化ストレス誘導薬であるアンチマイシンAまたは炎症性サイトカインであるTNF α により細胞死を誘導したところ、溶媒中のLDH活性やpropidium iodide染色で評価した細胞壊死はS517Aで有意に増加した。対照的にTUNEL染色や活性化型caspase3の免疫染色ではWTとS517A間で有意差は無く、SIRT1による細胞保護作用は主にネクロシスの抑制によるものであってアポトーシスには大きな影響を与えないことがわかった。さらにCalcium Retention Capacity (CRC)により定量評価したミトコンドリア透過性遷移孔の開孔閾値はS517AにおいてWTと比較して著明に低下した。すなわちS517Aはより軽度のストレスで容易にミトコンドリア透過性遷移孔の開口が誘導され細胞死を誘導することがわかった。よってSer517リン酸化によるSIRT1の核内移行は細胞ストレス耐性を増加し細胞死を抑制することが示唆された。

(2)アンチマイシンA、過酸化水素またはTNF α で刺激した単離心筋細胞において、抗SIRT1抗体により得られた免疫沈降物を2次元電気泳動により分離したところ、それぞれの刺激により複数のスポットの濃度が増加または減少した。本研究ではこれらのスポットのうち、上記ストレスにより増加したスポットを切り出しmass spectrometryにより蛋白の同定を試みた。

SIRT1との結合が増加する蛋白としてはそれぞれ

のストレスに独自のものを多数認め、さらにいずれのストレスでも共通して増加するものが少数同定された。今後その機能的意義を検証するためにそれぞれを siRNA 法により発現抑制させ、細胞のストレス耐性におよぼす影響を観察する予定である。さらには SIRT1 とそれぞれの蛋白との結合部位を同定し、その結合を修飾する介入（相補ペプチドなど）により心筋細胞死が抑制あるいは促進されるかを検証したい。

(3) 25 週齢の OLETF でコンダクタンスカテテル挿入下の Pressure-Volume loop で心機能を解析したところ、OLETF では左室収縮能の指標である maximal dP/dt, Emax、拡張能の指標である minimal dP/dt および tau のいずれもが非糖尿病対照ラットと比較して変化を認めなかった。しかし、フェニレフリンの持続静注により圧負荷をかけると、収縮能は OLETF および非糖尿病対照ラットの間で差を認めないものの、左室拡張障害は OLETF で有意に低下した。さらに DNA マイクロアレイによる遺伝子発現解析で L 型 Ca²⁺ チャンネルをコードする Cav1.2 の発現が OLETF では減少を認めた。ウェスタンブロッティングによる解析では Sarcoplasmic Reticulum Ca²⁺ ATPase 2a (SERCA2a) の蛋白発現量は変化無いもののそのリン酸化が抑制されていることを観察した。マトリックス蛋白の titin のリン酸化状態には変化無く、さらに titin のアイソフォームは Stiff タイプの N2B アイソフォームには変化なく、逆説的に compliant タイプの N2A アイソフォームが OLETF で増加しており、OLETF での拡張能の低下や titin のリン酸化では説明できなかった。さらにメタボローム解析では心筋 ATP 量は生理的条件下では OLETF と非糖尿病性対照ラットの心筋で差が無かったが、フェニレフリン持続静注による圧負荷下では OLETF 心筋において有意に減少した。同様に圧負荷条件下で OLETF においてアデノシンの低下、IMP の増加を認め、この変化は同時に観察された AMP deaminase の活性が約 2.5 倍上昇していることで説明されると考えられた。今後は SIRT1 の活性化薬あるいは心臓特異性 overexpression が OLETF の圧負荷下での拡張能障害を抑制するか、また、OLETF において上記のように見いだされた変化がどのように修飾されるかについて検討予定である。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 10 件)

Tanno M, Kuno A. Reversal of metabolic shift in post-infarct remodeled hearts: possible novel therapeutic approach.

Cardiovasc Res 2013;97:195-6. 査読有
DOI: 10.1093/cvr/cvs364

Kuno A, Hori YS, Hosoda R, Tanno M, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. Resveratrol Improves Cardiomyopathy in Dystrophin-deficient Mice through SIRT1-mediated modulation of p300.

J Biol Chem 2013;288:5963-72. 査読有
DOI: 10.1074/jbc.M112.392050

Miura T, Tanno M. The mPTP and its regulatory proteins: final common targets of signalling pathways for protection against necrosis. *Cardiovasc Res* 2012;94:181-9. 査読有

DOI: 10.1093/cvr/cvr302

Tanno M, Kuno A, Horio Y, Miura T. Emerging beneficial roles of sirtuins in heart failure. *Basic Res Cardiol* 2012;107:273. 査読有

DOI: 10.1007/s00395-012-0273-5

Ishikawa S, Kuno A, Tanno M, Miki T, Kouzu H, Itoh T, Sato T, Sunaga D, Murase H, Miura T. Role of connexin-43 in protective PI3K-Akt-GSK-3 β signaling in cardiomyocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2012;302:H2536-44. 査読有

DOI: 10.1152/ajpheart.00940.2011

Takada A, Miki T, Kuno A, Kouzu H, Sunaga D, Itoh T, Tanno M, Yano T, Sato T, Ishikawa S, Miura T. Role of ER Stress in Ventricular Contractile Dysfunction in Type 2 Diabetes. *PLoS One* 2012;7:e39893. 査読有

DOI: 10.1371/journal.pone.0039893

Itoh T, Kouzu H, Miki T, Tanno M, Kuno A, Sato T, Sunaga D, Murase H, Miura T. Cytoprotective regulation of the mitochondrial permeability transition pore is impaired in type 2 diabetic Goto-Kakizaki rat hearts.

J Mol Cell Cardiol 2012;53:870-9. 査読有

DOI: 10.1016/j.yjmcc.2012.10.001

Sato T, Miki T, Murakami N, Hirohashi Y, Kouzu H, Furuhashi M, Tanno M, Yuda T, Saitoh S, Hasegawa T, Miura T.

Histopathology of the pancreas in fulminant type 1 diabetes after 23-year follow-up: a case report.

Pathology International 2012;62:827-29. 査読有
doi: 10.1111/pin.12017

Yano T, Miki T, Tanno M, Kuno A, Itoh T, Takada A, Sato T, Kouzu H, Shimamoto K and Miura T. Hypertensive hypertrophied myocardium is vulnerable to infarction and refractory to erythropoietin-induced protection. *Hypertension* 2011;57:110-5. 査読有
DOI:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.158469

Hori Y, Kuno A, Hosoda R, Tanno M, Miura T, Shimamoto K, Horio Y. Resveratrol ameliorates muscular pathology in the dystrophic mdx mouse, a model for Duchenne muscular dystrophy. *J Pharmacol Exp Ther* 2011;338:784-94. 査読有
DOI: 10.1124/jpet.111.183210

[学会発表](計 15 件)

第17回日本心不全学会 平成25年11月30日

大宮

Insufficient ATP supply due to excessive degradation of adenine nucleotides underlies afterload-induced diastolic dysfunction in type 2 diabetic heart. □Kouzu H, Miki T, Tanno M, Kuno A, Yano T, Murase H, Tobisawa T, Ogasawara M, Miura T.

第17回日本心不全学会 平成25年11月28日

大宮

The Role of mTORC2 and Ribosomal Protein S6 in Cardioprotective Signaling.
Yano T, Felito M, Tobisawa T, Ogasawara M, Murase H, Kuno A, Tanno M, Miki T, Steenbergen C, Miura T.

American Heart Association 2013. Dallas, TX, U.S.A. November 17, 2013

Activation of the glucagon-like peptide-1 receptor restores myocardial autophagic flux and reduces mortality after myocardial infarction in diabetic rats. Murase H, Kuno A, Miki T, Tanno M, Yano T, Kouzu H, Tobisawa T, Ogasawara M, Ishikawa S, Miura T.

European Society of Cardiology Congress 2013. Amsterdam, Netherlands. September 3, 2013

Activation of the mitochondrial ATP-sensitive potassium channel achieves cell protection by promoting re-closure of the mPTP via suppression of GSK-3 β -complex III interaction. Tanno M, Sunaga D, Miki T, Kuno A, Kouzu H, Sato T, Ishikawa S, Ogasawara M, Tobisawa T, Miura T.

European Society of Cardiology Congress 2013. Amsterdam, Netherlands. September 2, 2013

Type 2 diabetes induces ventricular electrical remodeling with a transmural gradient
Tobisawa T, Sato T, Yuda S, Miki T, Tanno M, Kuno A, Kobayashi T, Akasaka H, Tohse N, Miura T.

Basic Cardiovascular Sciences 2013 (AHA). Las Vegas, NV, U.S.A. July 23, 2013

Mechanisms underlying mitochondrial translocation of GSK-3 β , a crucial inducer of mitochondrial permeability transition: GSK-3 β activity, interaction with VDAC2 and a mitochondrial targeting sequence. □Tanno M, Kuno A, Ishikawa S, Ogasawara M, Tobisawa T, Murase H, Sato T, Kouzu H, Miki T, Miura T.

The 50th International Society of Heart Research Japanese Section. San Diego, CA, U.S.A. June 29, 2013

Type 2 diabetes induces subendocardium-predominant reduction of transient outward K⁺ current via downregulation of Kv4.2 and KChIP2. Sato T, Kobayashi T, Kuno K, Murase H, Kouzu H, Tanno T, Miki T, Miura T, Tohse N.

The 50th International Society of Heart Research Japanese Section. San Diego, CA, U.S.A. June 29, 2013

Mechanisms of mPTP re-closure by activation of the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel: suppression of GSK-3 β -Rieske interaction and ROS production after oxidative stress. □Sunaga D, Tanno T, Ishikawa S, Kuno A, Sato T, Kouzu H, Miki T, Miura T.

第77回日本循環器学会学術総会

平成25年3月17日 横浜

Role of SIRT3, a Mitochondrial Protein Deacetylase, in Type 2 Diabetic Myocardium
Kuno A, Itoh T, Sato T, Kouzu H, Tanno M, Miki T, Horio Y, Miura T.

第77回日本循環器学会学術総会

平成25年3月17日 横浜

Promotion of Re-closure of the mPTP Underlies Cardiomyocyte Protection by Activation of the Mitochondrial KATP Channel against ROS-induced Necrosis. □Sunaga D, Kuno A, Ishikawa S, Miki T, Tanno M, Kouzu H, Itoh T, Sato T, Murase H, Miura T.

第77回日本循環器学会学術総会

平成25年3月16日 横浜

Interaction with VDAC2 Promotes Mitochondrial Translocation of GSK3B in a Kinase Activity-Dependent Manner and Induces Cell Death. □Tanno M, Ishikawa S, Miki T, Kuno A, Kouzu H, Itoh T, Sato T, Sunaga D, Murase H, Miura T.

第77回日本循環器学会学術総会

平成25年3月16日 横浜

Changes in Titin-based Ventricular Stiffness May Underlie Diastolic Dysfunction Unmasked by Acute Systolic Pressure Overloading in Type 2 Diabetic Hearts. □Kouzu H, Kuno A, Miki T, Tanno M, Itoh T, Sato T, Sunaga D, Murase H, Miura T.

第77回日本循環器学会学術総会

平成25年3月16日 横浜

Interaction of Cyclophilin D with Inorganic Phosphate Carrier during Ischemia Determines Threshold for mPTP Opening and Reperfusion-induced Cell Necrosis. Ito T, Miki T, Tanno M, Kuno A, Kouzu H, Sato T, Sunaga D, Murase H, Ishikawa S, Miura T.

第77回日本循環器学会学術総会

平成25年3月15日 横浜

Iroquois Homeodomain 5 (Irx5) is Upregulated via Increased ER Stress in Type 2 Diabetic Hearts. Sato T, Kuno A, Kobayashi T, Miki T, Tanno M, Ishikawa S, Miura T, Tohse N.

European Society of Cardiology Congress 2012. Munich, Germany. August 26

Resveratrol, a SIRT1 activator, prevents cardiomyopathy in dystrophin-deficient mice by down- regulation of p300. Kuno A, Tanno M, Miki T, Ishikawa S, Horio Y, Miura T.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

無し

6 . 研究組織

(1)研究代表者

丹野 雅也 (TANNO, Masaya)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号：00398322

(2)研究分担者

三浦 哲嗣 (MIURA, Tetsuji)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：90199951

堀尾 嘉幸 (HORIO, Yoshiyuki)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号：30181530

(3)連携研究者

無し