

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790768

研究課題名(和文)サーチュイン7の心血管病態における創傷治癒制御機構の解明

研究課題名(英文)Role of Sirt7 in cardiovascular wound healing process

研究代表者

泉家 康宏 (Izumiya, Yasuhiro)

熊本大学・生命科学研究部・助教

研究者番号：10515414

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では心血管創傷治癒機転におけるSirt7の役割を検討した。Sirt7ノックアウトマウスは心筋梗塞モデル、皮膚創傷治癒モデル、下肢虚血モデルいずれにおいても術後の創傷治癒が野生型マウスと比較して著明に遅延した。組織特異的ノックアウトマウスを用いた検討では野生型マウスと差は認めなかった。培養線維芽細胞においてSirt7をノックダウンするとTGF- β 刺激による線維化促進遺伝子の発現は有意に抑制された。その機序として、細胞膜上のTGF- β 受容体タンパクの減少が関与していることが明らかとなった。Sirt7は心血管組織の創傷治癒機転において、重要な役割を担う分子である可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We investigated the role of Sirt7 in cardiovascular tissue repair process. In wild type (WT) mice, Sirt7 expression increased in response to acute cardiovascular injury. Sirt7 deficient (Sirt7^{-/-}) mice showed susceptibility to cardiac rupture after MI, delayed blood flow recovery following hindlimb ischemia, and impaired wound healing after acute skin injury, compared to WT mice. In vitro, knockdown of endogenous Sirt7 by siRNA attenuated tube formation, proliferation and migration of endothelial cells. Fibroblasts isolated from Sirt7^{-/-} mice showed reduced smad2 phosphorylation upon TGF- β stimulation compared with WT mice, and these changes were accompanied by reduction in TGF- β receptor 1 (Tb-R1) protein. Tb-R1 protein level in the lipid raft fraction was higher in Sirt7^{-/-} dermal fibroblasts than WT. These data indicate that Sirt7 contributes to tissue repair processes by maintaining TGF- β receptor protein level.

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：サーチュイン 創傷治癒 線維化 TGF 受容体

1. 研究開始当初の背景

サーチュインは寿命に関与する分子として同定され、哺乳類ではこれまで Sirt1 から Sirt7 までのホモログが報告されている。Sirt7 は核小体に局在するユニークなサーチュインであるが、心血管病態における役割は不明である。われわれは心臓における Sirt7 の発現が心筋梗塞後の剖検心やマウス病態モデルにおいて亢進していることを見出し、Sirt7 はストレス刺激に対する心血管防御に関与しているのではないかと仮説を立てた。

2. 研究の目的

本研究の目的は Sirt7 ノックアウトマウスおよび組織特異的ノックアウトマウスを使用し、心血管病態における Sirt7 の機能解析を行うことである。

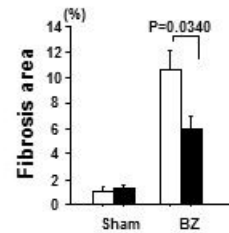
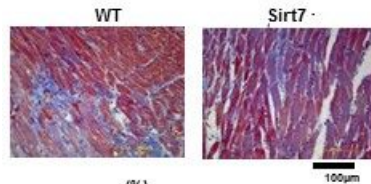
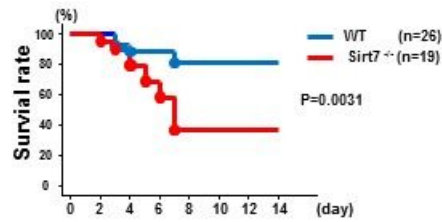
3. 研究の方法

- (1) Sirt7 ノックアウトマウスを用いた病態モデルでの検討
- (2) 組織特異的ノックアウトマウスを用いた Sirt7 の組織特異的役割の検討
- (3) 培養細胞を用いた Sirt7 の作用機序の検討

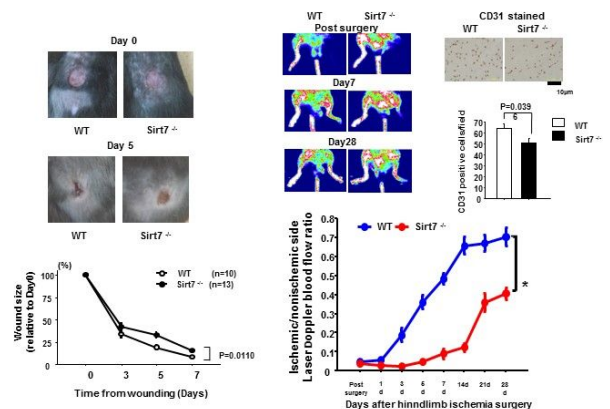
4. 研究成果

(1) Sirt7 ノックアウトマウスを用いた検討

心筋梗塞モデルにおいては、梗塞後 3 日目の時点では観血的血行動態測定や、心エコーパラメーターには有意差はなかったが、梗塞後 1 週間以内の心破裂による死亡の発生が Sirt7 ノックアウトマウスにおいて有意に多かった。マウスの死因は心破裂によるものであり、組織学的検討ではノックアウトマウスの梗塞部境界領域における線維化の減少が認められた。



皮膚創傷治癒モデルにおいても同様に、Sirt7 ノックアウトマウスは傷口の縮小率が不良であった。Sirt7 ノックアウトマウスでは下肢虚血術後の血流回復が野生型マウスと比較して著明に悪化した。CD31 免疫染色にて組織学的に微小血管レベルでの血管新生について評価を行ったところ、CD31 陽性細胞は Sirt7 ノックアウトマウスで有意に減少していた。



以上の結果から、Sirt7 は創傷部の線維化や血管新生に必須の分子であることが示唆された。

(2) 組織特異的ノックアウトマウスを用いた検討

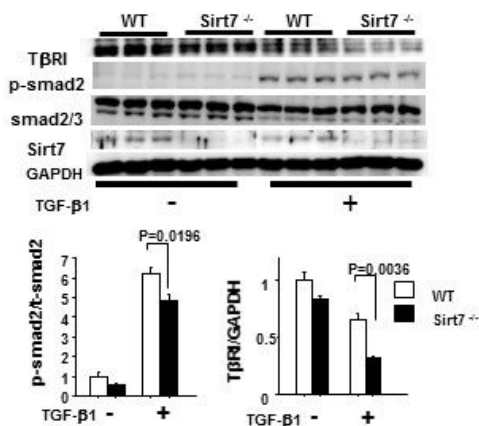
心筋細胞および線維芽細胞特異的 Sirt7 ノッ

クアウトマウスに対して心筋梗塞モデルを作成したが、Sirt7 の全身ノックアウトマウスの場合と異なり、心破裂の頻度は野生型マウスと差はなかった。また、内皮細胞特異的 Sirt7 ノックアウトマウスに対して下肢虚血モデルを作成したが、下肢虚血術後の血流回復は野生型マウスと同程度であった。以上の結果から、創傷治癒機転には多様な細胞の Sirt7 欠如が関与していることが示唆された。

(3) 培養細胞を用いた Sirt7 の作用機序の検討

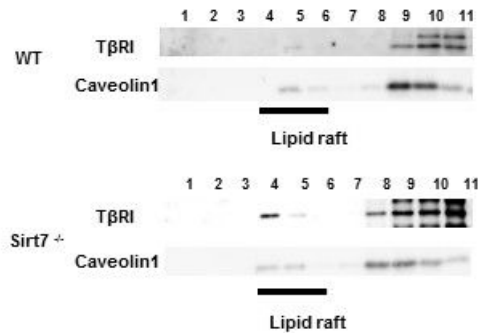
培養線維芽細胞での検討: Sirt7 のタンパク発現は TGF- β 1 刺激により有意に上昇した。siRNA により内因性の Sirt7 を抑制すると TGF- β 1 刺激による PAI-1、CD44 の遺伝子発現は有意に抑制された。その機序として Sirt7 をノックダウンすると TGF- β シグナルの古典的経路である Smad シグナルではなく、非古典経路である MAP キナーゼ経路が抑制されることが明らかとなった。

次に野生型マウスおよび Sirt7 ノックアウトマウス由来の線維芽細胞を用いて遺伝子発現、細胞内シグナルを解析した。Sirt7 ノックアウトマウス由来の線維芽細胞では TGF-受容体タンパクが有意に減少しそれに伴い smad2/3 の活性化も有意に減少した。



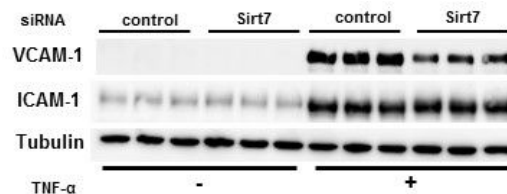
心筋梗塞境界領域の TGF- 受容体タンパクは Sirt7 ノックアウトマウスで有意に減少した。TGF- 受容体タンパクの分解には細胞膜

上の局在が重要であることが報告されている。そこで超遠心法を用いて TGF- 受容体の細胞膜上の局在を検討したところ、Lipid raft 分画に位置する TGF- 受容体の量が、Sirt7 ノックアウトマウス由来の線維芽細胞で有意に増加していることが確認された。



これらの局在変化が TGF- 受容体タンパク量の変化に寄与した可能性が示唆された。

内皮細胞での検討: 培養内皮細胞に siRNA を用いて Sirt7 のノックダウン実験を行ったところ、内皮細胞の管腔形成能、増殖能、遊走能が有意に抑制されることを確認した。また、アデノウイルスを用いた Sirt7 過剰発現実験では、管腔形成能、遊走能が有意に促進することが明らかとなった。また、炎症細胞浸潤に重要な接着因子の発現を PCR にて評価したところ、Sirt7 のノックダウンにより VCAM-1 の発現が有意に低下することを明らかにした。



TGF- シグナルは内皮細胞においても細胞増殖や細胞遊走を促進することが知られているため、線維芽細胞で認められた TGF- 受容体タンパクの分解が内皮細胞の機能維持に寄与している可能性が示唆された。

(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)

1. Hanatani S, Izumiya Y*, Araki S, Rokutanda T, Kimura Y, Walsh K, Ogawa H. Akt1-Mediated Fast/glycolytic Skeletal Muscle Growth Attenuates Renal Damage in Experimental Kidney Disease. J Am Soc Nephrol. 2014; in press. (*Corresponding author). 査読あり.
2. Izumiya Y*, Hanatani S, Kimura Y, Takashio S, Yamamoto E, Kusaka H, Tokitsu T, Rokutanda T, Araki S, Tsujita K, Tanaka T, Yamamuro M, Kojima S, Tayama S, Kaikita K, Hokimoto S, Ogawa H. Growth differentiation factor-15 is a useful prognostic marker in patients with heart failure with preserved ejection fraction. Can J Cardiol. 2014;30:338-44. Accompanied by editorial. (*Corresponding author). 査読あり.
3. Hanatani S, Izumiya Y*, Takashio S, Kimura Y, Araki S, Rokutanda T, Tsujita K, Yamamoto E, Tanaka T, Yamamuro M, Kojima S, Tayama S, Kaikita K, Hokimoto S, Ogawa H. Circulating thrombospondin-2 reflects disease severity and predicts prognosis of patients with heart failure with reduced ejection fraction. Circ J. 2014;78:903-10. Accompanied by editorial. (*Corresponding author). 査読あり.
4. Hanatani S, Izumiya Y*, Takashio S, Kojima S, Yamamuro M, Araki S, Rokutanda T, Tsujita K, Yamamoto E, Tanaka T, Tayama S, Kaikita K, Hokimoto S, Sugiyama S, Ogawa H. Growth differentiation factor 15 can distinguish between hypertrophic cardiomyopathy and hypertensive hearts. Heart Vessels. 2014;29:231-7.

(*Corresponding author). 査読あり.

5. Takashio S, Izumiya Y*, Jinnin M, Yamamuro M, Kojima S, Ihn H, Ogawa H. Diagnostic and Prognostic Value of Subcutaneous Tissue Biopsy in Patients with Cardiac Amyloidosis. Am J Cardiol. 2012;110:1507-11. (*Corresponding author). 査読あり.
6. Izumiya Y*, Araki S, Usuku H, Rokutanda T, Hanatani S, Ogawa H. Chronic C-Type Natriuretic Peptide Infusion Attenuates Angiotensin II-Induced Myocardial Superoxide Production and Cardiac Remodeling. Int J Vasc Med. 2012;2012:246058. (*Corresponding author). 査読あり.

[学会発表](計 6 件)

1. 荒木智、泉家康宏、六反田拓、花谷信介、木村優一、小川久雄
Sirt7 regulates wound healing processes by modulating TGF signaling.
第 78 回日本循環器学会学術集会
3.21.2014
東京国際フォーラム、東京
2. 泉家康宏、荒木智、六反田拓、小川久雄
Sirt7 contributes to proper wound healing after cardiovascular injuries by modulating fibroblast differentiation and angiogenic responses.
第 17 回日本心不全学会・学術集会
11.28.2013
大宮ソニックセンター、埼玉
3. 荒木智、泉家康宏、六反田拓、花谷信介、木村優一、小川久雄
Sirt7 regulates wound healing by modulating TGF signaling.
American Heart Association
Scientific Session 2013
11.17.2013

- グラスコンベンションセンター、米国
4. 荒木智、泉家康宏、六反田拓、花谷信介、小川久雄
Sirt7 is essential for proper wound healing after mouse model of myocardial infarction by modulating TGF receptor I degradation.
第 77 回日本循環器学会学術集会
3.15.2013
パシフィコ横浜、神奈川
 5. 荒木智、泉家康宏、六反田拓、花谷信介、小川久雄
Sirt7 is essential for proper wound healing processes after mouse model of myocardial infarction by inhibiting smad7-mediated TGF receptor I degradation.
American Heart Association
Scientific Session 2012
11.4.2012
ロサンゼルスコンベンションセンター、米国
 6. 泉家康宏、荒木智、六反田拓、小川久雄
Sirt7 contributes to proper wound healing after cardiovascular injuries by modulating fibroblast differentiation and angiogenic responses.
日本高血圧学会・シンポジウム
9.20.2012
ウェスティンナゴヤキャッスル、愛知

6 . 研究組織

(1)研究代表者

泉家 康宏(IZUMIYA YASUHIRO)
熊本大学・大学院生命科学研究部・助教
研究者番号：10515414