

67. Sirt7 による血管病変制御機構の解明

泉家 康宏

熊本大学 大学院生命科学研究部 循環器内科学

Key words : サーチュイン, 動脈硬化, 細胞周期, マイクロ RNA, 血管平滑筋細胞

緒 言

高齢化が進行する我が国において、高齢者の健康増進や予防医学の重要性は大きくなっている。心血管疾患は老化と密接な関係にあり、寿命の短縮や QOL の低下を引き起こす主要な原因疾患となっている。“ヒトは血管とともに老いる”といわれるように、血管機能障害や動脈硬化は老化の表現型のひとつと捉えることができる。従って、心血管病を老化の面からアプローチし、その機序を分子レベルで明らかにすることは、新しい治療標的の同定・開発につながると考えられる。

サーチュインは NAD 依存性脱アセチル化酵素群であり、酵母・線虫・ショウジョウバエにおいて寿命に関するタンパク質として同定され、いわゆる「長寿遺伝子」として知られている。哺乳類では Sirt1 から Sirt7 までのホモログが報告されており、サーチュインファミリーと呼ばれている。サーチュインはカロリー制限、酸化ストレス、低酸素などの様々なストレス刺激にともない活性化され細胞保護的に働くことがこれまで報告されている¹⁾。Sirtuin 7 (Sirt7) は核小体に局在するユニークなサーチュインとして同定され、RNA ポリメラーゼ 1 の転写に関与すること²⁾や、ストレス状態において、cell growth を停止し細胞保護的に働くこと³⁾などが報告されている。さらにここ数年で Sirt7 の機能解析は飛躍的に進み、腫瘍細胞の形質転換を制御することや⁴⁾、肝臓での脂質代謝を制御すること⁵⁾などが明らかとなっていった。しかしながらこれまで Sirt7 の心血管病態における役割はほとんどわかっていない。

ドイツ Max-Planck-Institute の Bober らは *Sirt7* ノックアウトマウスを作製し、寿命の短縮、心臓でのアポトーシス細胞と線維化の増加などの表現型を報告しているが、その原因や分子機序については明らかにできなかった⁶⁾。その論文において、Sirt7 の発現が加齢とともに減少することが報告されていたことから、我々は Sirt7 が加齢に伴う心疾患において重要な役割を演じていると考え、2009 年より Bober らと共同研究を開始した。野生型マウスにおいて心筋梗塞モデルを作製すると、創傷治癒が盛んに進行している梗塞境界領域において Sirt7 の発現が著明に亢進することが明らかとなった。*Sirt7* ノックアウトマウスでは急性心筋梗塞後の心破裂が有意に多く、梗塞境界領域で有効な創傷治癒が進行していないことが明らかとなった。我々は Sirt7 が欠如した培養線維芽細胞では、創傷治癒の中心的役割を演じる TGF- β シグナルが減弱することを見出した。その分子機序として Sirt7 が TGF- β 受容体の分解を促進する PICK-1 というアダプタータンパクと直接結合し、TGF- β 受容体の分解を抑制していることを明らかにした⁷⁾。

急性心疾患の創傷治癒機序における Sirt7 の重要性が我々の先行研究から示唆されるが、一方でこれまで Sirt7 の血管機能障害や動脈硬化に与える影響については全く検討されていない。本研究では Sirt7 の血管疾患における役割を *in vivo* で明らかにするため、動脈硬化マウスと *Sirt7* ノックアウトマウスのダブルノックアウトマウスを作製し、動脈硬化病変形成に与える影響を比較検討した。また、血管内膜障害モデルと腹部大動脈瘤モデルを作製し、新生内膜形成の程度や細胞応答を比較検討した。さらにその分子機序を培養平滑筋細胞を用いて検討した。

方 法

1. *Sirt7* KO マウスを用いた血管病態モデルにおける Sirt7 の機能評価

1) 動脈硬化モデルでの検討

ApoE KO マウスと *Sirt7* KO マウスを交配し、DKO マウスを作製した。DKO マウスと *ApoE* シングル KO マウスに対し、高脂肪食を負荷し、動脈硬化病変の広がり、動脈硬化プラークの不安定化、炎症細胞の浸潤、接着因子・細胞

増殖マーカーの発現について比較検討した。さらに大動脈弓部から mRNA を抽出し、細胞増殖・炎症・細胞周期関連遺伝子の発現を検討した。

2) 腹部大動脈瘤モデルでの検討

DKO マウスと *ApoE* シングル KO マウスに対し、高脂肪食負荷 4 週後よりアンジオテンシン II を持続注入することで腹部大動脈瘤モデルを作製した。大動脈瘤のサイズはエコーで経時的に評価し、持続注入 8 週後に解剖し、病理組織学的解析と遺伝子発現の比較検討を行った。

3) 血管障害モデルでの検討

野生型 (WT) マウスと *Sirt7* KO マウスに対して、ワイヤー障害による血管内膜肥厚モデルを作製し新生内膜形成の程度を比較検討した。

2. 初代培養血管平滑筋細胞を用いたメカニズム解析

Sirt7 の血管病変形成に及ぼす影響の分子機序を解明するために、WT マウスと *Sirt7* KO マウスから初代培養血管平滑筋細胞を採取し、増殖刺激後の細胞応答を比較検討し、その分子機序解明を行った。

結 果

1. *Sirt7* KO マウスを用いた血管病態モデルにおける *Sirt7* の機能評価

1) 動脈硬化モデルでの検討 (図 1)

ApoE KO マウスの動脈硬化巣では *Sirt7* の発現亢進が認められた。高脂肪食負荷後の動脈硬化巣は *ApoE* シングル KO マウスと比較して DKO マウスで有意に減少していた。動脈硬化巣における血管平滑筋とマクロファージの集積は DKO マウスで有意に減少していた。

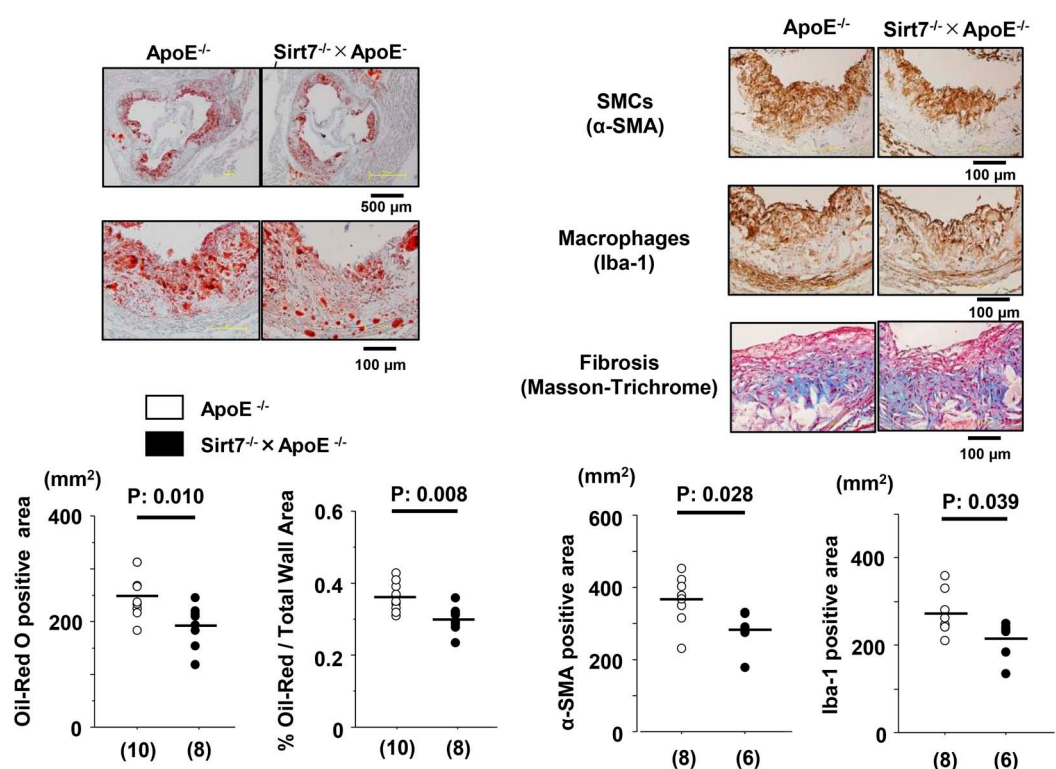


図 1. 動脈硬化モデルでの検討

高脂肪食負荷後の動脈硬化巣及び血管平滑筋とマクロファージの集積はダブルノックアウトマウスで有意に減少していた。2 群間の差は unpaired Welch t test にて検討した。

さらにインターロイキン-6、TNF- α などの炎症性サイトカイン、MCP1 などのケモカインの発現も DKO マウスで有意に減少していた。

2) 腹部大動脈瘤モデルでの検討 (図 2)

腹部大動脈瘤モデルにおいても同様に、動脈瘤の直径は DKO マウスで有意に小さく、病変部の炎症性サイトカインの発現も DKO マウスで有意に減少した。

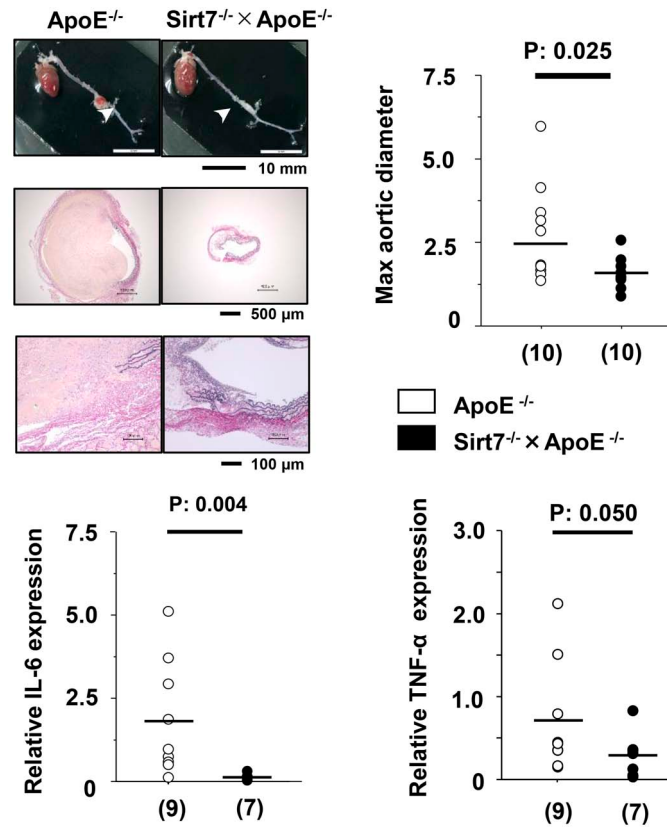


図 2. 腹部大動脈瘤モデルでの検討

動脈瘤の直径はダブルノックアウトマウスで有意に減少した。2 群間の差は unpaired Welch t test にて検討した。

3) 血管障害モデルでの検討 (図 3)

ワイヤー障害後の病変部において Sirt7 のタンパク発現は 3 日目をピークに上昇を認めた。内膜/中膜比は Sirt7 KO マウスで有意に小さく新生内膜の形成の抑制が認められた。

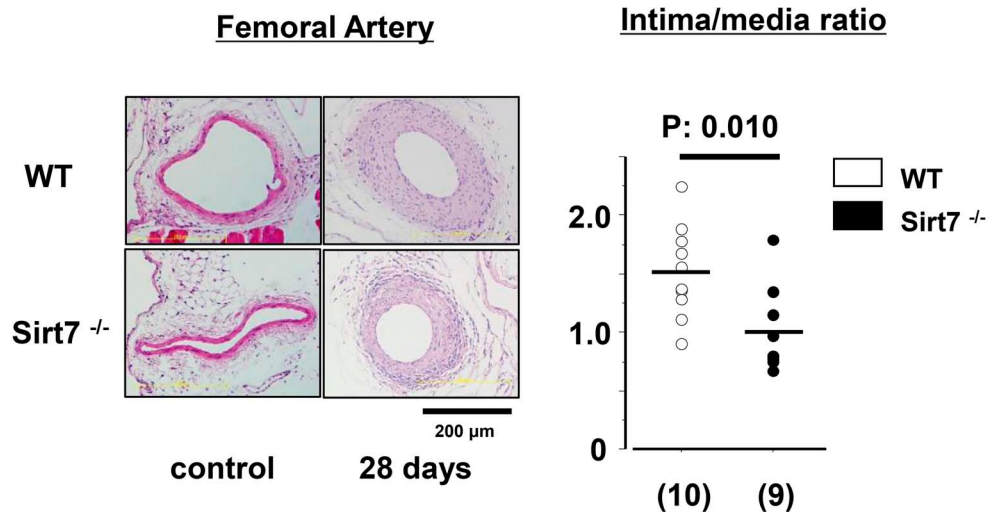


図 3. 血管障害モデルでの検討

Sirt7 ノックアウトマウスではワイヤー障害後の新生内膜形成の抑制が認められた。2 群間の差は unpaired Welch t test にて検討した。

2. 培養細胞を用いたメカニズム検証 (図 4)

WT マウスと *Sirt7* KO マウスから初代培養平滑筋細胞を採取し、増殖刺激後の細胞応答を比較検討した。血清刺激による細胞増殖、遊走は *Sirt7* KO マウス由来の平滑筋細胞で有意に減弱した。siRNA を用いて内因性の Sirt7 をノックダウンした場合も同様に増殖刺激後の細胞増殖が抑制された。ウェスタンブロットにて細胞周期蛋白の発現を調べたところ、*Sirt7* KO マウス由来の血管平滑筋細胞において CDK2 や CyclinA/E などの細胞周期制御タンパクの発現が著明に減弱していることが明らかとなった。Sirt7 の結合蛋白として知られる Cul4b は、CDK2 の蛋白発現量を負に制御する miR371-373 という miRNA のクラスターを負に制御することが知られている⁸⁾。我々は miR371-373 のマウスホモログである miRNA290-295 の発現を検討した。miRNA290-295 は *Sirt7* KO マウス由来の血管平滑筋細胞で有意に発現が上昇していることが明らかとなった。

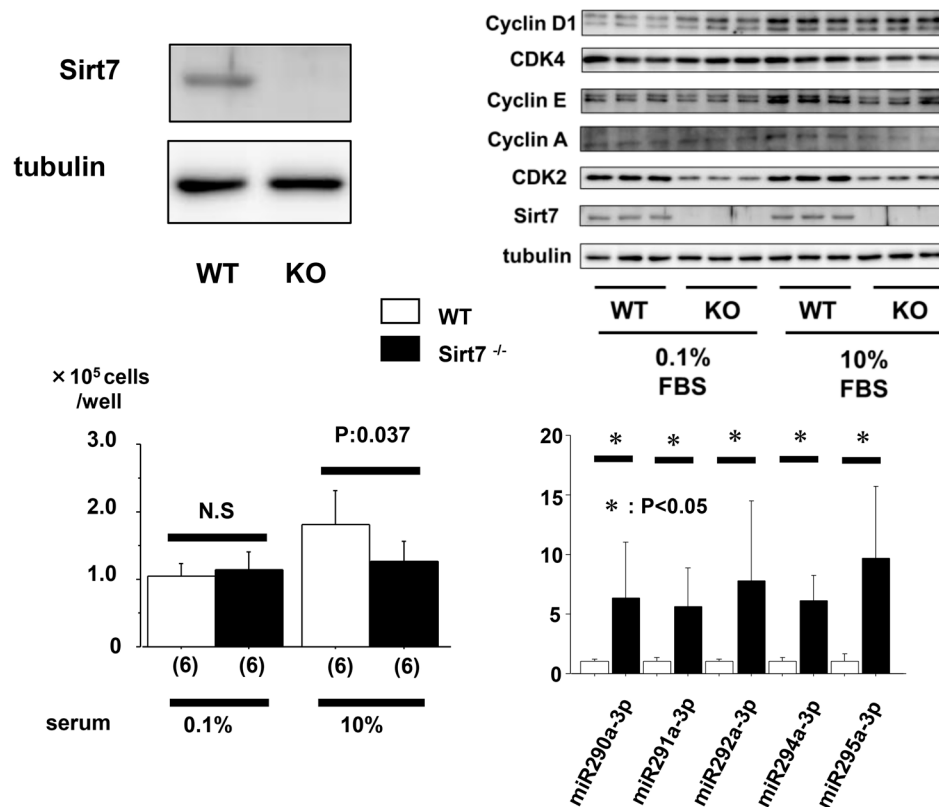


図 4. 初代血管平滑筋細胞を用いた検証

血清刺激による細胞増殖、遊走は *Sirt7* ノックアウトマウス由来の平滑筋細胞で有意に減弱した。*Sirt7* ノックアウトマウス由来の血管平滑筋細胞では細胞周期制御タンパクの発現が著明に減弱した。2 群間の差は unpaired Welch t test にて検討した。

考 察

本研究により得られた結果は以下の 4 点である。1) 血管障害後の病変形成は *Sirt7* KO マウスで有意に減弱した。2) *Sirt7* KO マウス由来の血管平滑筋細胞では血清刺激後の細胞増殖や遊走が有意に抑制された。3) *Sirt7* KO マウス由来の血管平滑筋細胞では細胞周期制御蛋白の発現が有意に減弱した。4) 細胞周期蛋白のうち、CDK2 の発現を負に制御する miRNA290-295 の発現は、*Sirt7* KO マウス由来の血管平滑筋細胞で有意に増加した。以上の結果から、*Sirt7* の抑制は血管病変の進行抑制の新たな戦略となりうる可能性が示唆された。

サーチュインファミリーのうち、*Sirt1* は心血管疾患における役割について比較的研究が進んでいる。*Sirt1* の過剰発現マウスは血管障害モデルでの新生内膜形成を抑制し⁹⁾、*ApoE* ノックアウトマウスの動脈硬化形成を抑制すること¹⁰⁾などが報告されており、*Sirt1* は血管保護的に働く可能性が示唆されている。一方今回の我々の結果は *Sirt7* の発現抑制が血管病変の進行を抑制した。脱アセチル化酵素群であるサーチュインファミリーの一員であるものの、*Sirt7* は脱アセチル化以外の多彩な機能を有することが知られている。我々も以前、*Sirt7* はオートファジー制御蛋白と結合し、TGF- β 受容体の分解を抑制していることを報告している⁷⁾。本研究で得られた平滑筋細胞の機能制御にも同様の受容体分解機構が関与しているかは今後検討する必要がある。

血管病変の形成には本研究で着目した血管平滑筋細胞以外にも血管内皮細胞や炎症細胞も関与する。我々は以前血管内皮細胞を用いた研究にて、*Sirt7* の欠如は増殖刺激による細胞増殖、遊走、管腔形成を抑制することを報告している⁷⁾。これらは今回の培養平滑筋細胞と同様の細胞応答であるが、今後はマクロファージなどの炎症細胞における *Sirt7* の機能解析も必要である。さらに生体での機能解析のため組織特異的 *Sirt7* KO マウスの作製と、血管障害モデルにおける表現型解析を行う必要がある。

結論： *Sirt7* の発現制御が加齢に伴う血管疾患の新規治療手段となりうる可能性が示唆された。

共同研究者

本研究の共同研究者は、熊本大学大学院 生命科学研究部 循環器内科の木村優一および荒木智である。本研究にご支援を賜りました上原記念生命科学財団に深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Guarente L. Sir2 links chromatin silencing, metabolism, and aging. *Genes Dev.* 2000;14:1021-1026. PubMed PMID: 10809662.
- 2) Ford E, Voit R, Liszt G, Magin C, Grummt I, Guarente L. Mammalian sir2 homolog sirt7 is an activator of rna polymerase i transcription. *Genes Dev.* 2006;20:1075-1080. doi: 10.1101/gad.1399706. PubMed PMID: 16618798.
- 3) Vakhrusheva O, Braeuer D, Liu Z, Braun T, Bober E. Sirt7-dependent inhibition of cell growth and proliferation might be instrumental to mediate tissue integrity during aging. *Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society.* 2008;59 Suppl 9:201-212. PubMed PMID: 19261981.
- 4) Barber MF, Michishita-Kioi E, Xi Y, Tasselli L, Kioi M, Moqtaderi Z, Tennen RI, Paredes S, Young NL, Chen K, Struhl K, Garcia BA, Gozani O, Li W, Chua KF. Sirt7 links h3k18 deacetylation to maintenance of oncogenic transformation. *Nature.* 2012;487:114-118. doi: 10.1038/nature11043. PubMed PMID: 22722849.
- 5) Yoshizawa T, Karim MF, Sato Y, Senokuchi T, Miyata K, Fukuda T, Go C, Tasaki M, Uchimura K, Kadomatsu T, Tian Z, Smolka C, Sawa T, Takeya M, Tomizawa K, Ando Y, Araki E, Akaike T, Braun T, Oike Y, Bober E, Yamagata K. Sirt7 controls hepatic lipid metabolism by regulating the ubiquitin-proteasome pathway. *Cell metabolism.* 2014;19:712-721. doi: 10.1016/j.cmet.2014.03.006. PubMed PMID: 24703702.
- 6) Vakhrusheva O, Smolka C, Gajawada P, Kostin S, Boettger T, Kubin T, Braun T, Bober E. Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res.* 2008;102:703-710. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.107.164558. PubMed PMID: 18239138.
- 7) Araki S, Izumiya Y, Rokutanda T, Ianni A, Hanatani S, Kimura Y, Onoue Y, Senokuchi T, Yoshizawa T, Yasuda O, Koitabashi N, Kurabayashi M, Braun T, Bober E, Yamagata K, Ogawa H. Sirt7 contributes to myocardial tissue repair by maintaining transforming growth factor-beta signaling pathway. *Circulation.* 2015;132:1081-1093. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.114.014821. PubMed PMID: 26202810.
- 8) Tian RQ, Wang XH, Hou LJ, Jia WH, Yang Q, Li YX, Liu M, Li X, Tang H. MicroRNA-372 is down-regulated and targets cyclin-dependent kinase 2 (cdk2) and cyclin a1 in human cervical cancer, which may contribute to tumorigenesis. *J Biol Chem.* 2011;286:25556-25563. doi: 10.1074/jbc.M111.221564. PubMed PMID: 21646351.
- 9) Li L, Zhang HN, Chen HZ, Gao P, Zhu LH, Li HL, Lv X, Zhang QJ, Zhang R, Wang Z, She ZG, Wei YS, Du GH, Liu DP, Liang CC. Sirt1 acts as a modulator of neointima formation following vascular injury in mice. *Circ Res.* 2011;108:1180-1189. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.237875. PubMed PMID: 21474819.
- 10) Zhang QJ, Wang Z, Chen HZ, Zhou S, Zheng W, Liu G, Wei YS, Cai H, Liu DP, Liang CC. Endothelium-specific overexpression of class iii deacetylase sirt1 decreases atherosclerosis in apolipoprotein e-deficient mice. *Cardiovasc Res.* 2008;80:191-199. doi: 10.1093/cvr/cvn224. PubMed PMID: 18689793.