

ヒストン脱アセチル化酵素SIRTをターゲットとした心不全の治療戦略

丹野 雅也 [札幌医科大学薬理学講座 / 助教]

背景・目的

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。ほ乳類のhomologueであるSIRT1は転写活性を制御し細胞ストレス耐性を高める。我々はこれまでSIRT1が未分化心筋細胞では核に存在し、分化に伴い細胞質に移行すること、この局在変化に核移行シグナル(NLS)および核外移行シグナル(NES)が関与することを見いだした。SIRT1は心臓で多く発現しているがその意義に関する検討は少ない。本研究ではSIRT1の不全心での発現、細胞内局在、その調節機構および生理的意義を解析する。

内容・方法

- (1) 拡張型心筋症モデルのTO-2ハムスター心および、剖検で得た心不全患者の心筋を用いてSIRT1の細胞内局在を解析した。
- (2) 一次培養単離心筋細胞を用いて酸化ストレスによる細胞死とSIRT1の細胞内局在の関係を検討した。
- (3) 核に局在する野生型のSIRT1または細胞質に局在する変異SIRT1をC2C12細胞に導入しSIRT1の核局在が酸化ストレスによる細胞死を抑制するか検討した。
- (4) SIRT1が内因性の酸化ストレス消去酵素の発現レベルを亢進させるか解析した。
- (5) SIRT1の細胞内局在調節の機序にリン酸化が関与するかを各種キナーゼ阻害薬投与により検討した。またSIRT1の欠失変異体と点変異体を作成しリン酸化部位の同定を試みた。
- (6) 心筋梗塞後のリモデリングによる不全心モデルを、対照ラットおよびspontaneously hypertensive ratを用いて作製し、SIRT1の細胞内局在を比較検討した。

結果・成果

- (1) TO-2ハムスターでは心重量/体重比の増加を認め明らかな心不全を呈した。免疫組織染色でSIRT1を核に発現する心筋細胞は不全心で4.4%、対照心では0.1%であった。同様に重症心不全の拡張型心筋症患者、および対照の患者では、それぞれ3.1%、0.2%の心筋細胞でSIRT1が核に観察された。これらの所見から心不全ではSIRT1が細胞質から核へと移行すると考えられた。
- (2) 新生ラット培養心筋細胞にミトコンドリアの呼吸鎖を阻害し酸化ストレスを誘導するantimycin Aを投与するとアポトーシスが誘導された。内因性のSIRT1はベースラインでは核と細胞質の両方に分布していた。antimycin Aの

投与後にはSIRT1を核に発現する細胞、細胞質にのみ発現する細胞が観察され、アポトーシスの頻度は各々6%、47%であり、SIRT1の核局在が酸化ストレス耐性を増加させることが示唆された。

- (3) 核に局在する野生型SIRT1または細胞質に局在する変異SIRT1を導入したC2C12細胞ではantimycin Aにより誘導されるアポトーシスの頻度は各々4%、44%であり、酸化ストレスによる細胞死抑制にSIRT1の核局在が必須であることが確認された。
- (4) 核に局在する野生型SIRT1のみがMn-SODの発現を約4倍亢進させた。細胞質局在変異SIRT1ではこの効果は認めなかった。
- (5) PI3K/Akt阻害薬のLY294002投与によりC2C12細胞でSIRT1が核から細胞質に移行し、PI3K/Aktによるリン酸化がSIRT1の核移行をもたらす可能性が示唆された。一連の欠失変異体および点変異体のLY294002に対する反応からThr336、Ser517、Thr522の全て、あるいはいずれかがPI3K/Aktのリン酸化部位である可能性が考えられた。
- (6) in vivoの不全心におけるSIRT1の核移行へのPI3K/Aktの関与を検討した。内因性のPI3K/Aktシグナルが減弱していることが知られるspontaneously hypertensive rat(SHR)および対照のラットの冠動脈を結紮、あるいは開胸のみのsham手術をおこない、4週後に心臓を摘出しSIRT1の核局在の頻度を比較解析した。sham手術後はSHR、対照ラットともSIRT1を核に発現する心筋細胞は0.2%であったが、梗塞後リモデリングによる不全心ではSHRで6.8%、対照ラットで10.2%の心筋細胞がSIRT1を核に発現していた。SHRでは内因性のPI3K/Aktシグナルの減弱と平行してSIRT1の核移行が減弱しており、in vivoの不全心でもSIRT1の核移行にPI3K/Aktが寄与することが示唆された。

今後の展望

今後は、以下の実験を追加し、SIRT1の核局在の心筋保護効果をさらに確認し、臨床応用の基礎となる知見を得ることを目指す。

- (1) 心筋梗塞後の心不全モデルラットにresveratrolを服用させ、死亡率、心不全の重症度に対する効果を評価する。
- (2) また、Cre/loxP recombination systemを応用しSIRT1の心臓特異性過剰発現マウスを作製し、心筋梗塞後の死亡率、心不全の重症度に対する効果を評価する。