

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08038

研究課題名(和文) 心筋梗塞後リモデリングにおけるDNA損傷応答-炎症関連の探索

研究課題名(英文) Significance of DNA damage response in inflammation during remodeling after myocardial infarction

研究代表者

石田 万里 (ISHIDA, Mari)

広島大学・医系科学研究科(医)・准教授

研究者番号：30359898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：心筋梗塞後におこるリモデリングは心不全の発症に重大な影響を及ぼす。その過程で重要な役割を果たしている炎症反応にDNA損傷応答が重要な役割を担っていることを検討した。DNA損傷応答に異常を示すKu80ノックアウトマウスに心筋梗塞を作成すると、野生型マウスに比し、心機能の低下、予後の悪化、心筋のDNA損傷の増加、炎症性サイトカイン発現の遅延、梗塞巣のM2(組織修復性)マクロファージの集積低下、骨髄細胞のM2aへの分化の低下がみられた。以上から、DNA損傷応答は、心筋梗塞時のマクロファージの分化・動態および炎症反応に重要であり、心リモデリングに影響することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

炎症が損傷した心筋の修復・リモデリング機転に深く関わることは知られているが、本研究によりその炎症・抗炎症のバランスにDNA損傷応答が重要であることが示された。本研究の成果により、心筋梗塞時のDNA損傷応答を制御することにより炎症とその結果としての心リモデリング、心機能の低下を抑制する新しい治療法の開発が可能であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The remodeling that occurs after myocardial infarction has a major impact on the development of heart failure. We examined whether the DNA damage response is important for the inflammatory response in remodeling after myocardial infarction. When myocardial infarction occurred in Ku80 knockout mice, which exhibit an abnormal DNA damage response, compared to wild-type mice, we observed reduced cardiac function, worse prognosis, increased myocardial DNA damage, delayed expression of proinflammatory cytokines, reduced accumulation of M2 macrophages at the infarct area, reduced differentiation to M2a. These results suggest that the DNA damage response is important for macrophage differentiation and dynamics and inflammatory response during myocardial infarction, and influences cardiac remodeling.

研究分野：循環器内科学

キーワード：DNA損傷 炎症 マクロファージ 心筋梗塞 線維化 心不全

1. 研究開始当初の背景

心筋梗塞後、心筋そのものの喪失により急性心不全をきたし得る。加えて、その後境界領域や非梗塞領域に負荷がかかることにより、これらの部分は徐々に拡大や肥大を生じる。この梗塞後の左室の形態変化をリモデリングというが、壁ストレスの増加により心不全増悪の悪循環をきたす。従って心筋梗塞後の治癒反応、瘢痕形成、リモデリングは急性期のみならず慢性期の予後に重大な影響を及ぼす。これらの過程に炎症反応が深く関与していることが明らかになっているが、その分子メカニズムには未だ不明な点が多い。心筋梗塞時の血流の途絶は細胞に障害を与え DNA 損傷を誘発する (Clin Appl Thromb Hemost. 2017、doi:10.1177/1076029617725602.)。DNA 損傷はこの他、細胞内外の様々な因子(酸化ストレス・電離放射線・紫外線など)によってもおこるが、DNA 損傷の蓄積は細胞死や老化、腫瘍化などをひきおこし、結果的に生体の恒常性維持や疾患形成に深く関わる。また、DNA 損傷により誘導された細胞老化は SASP (senescence-associated secretory phenotype) とよばれる現象を引き起こし炎症性サイトカインの発現を増加させることが注目されている。

我々は従来から DNA 損傷・修復異常と心血管疾患との関連に着目して研究を行っており、これまでにヒトの動脈硬化部に DNA 損傷が蓄積していることを示し (Ishida et al. PLoS One, 2014)、DNA 損傷が動脈硬化の発症メカニズムのひとつであるという仮定の下研究を行っている。

我々は、DNA 損傷応答に異常を示すモデルとして DNA 二本鎖切断の修復に関わる蛋白である Ku80 のノックアウトマウス (Ku80-KO) を使用し、本マウスと ApoE ノックアウトマウスとの二重改変マウスにおいて動脈硬化薬の増加が認められることを示した。Ku80-KO 大動脈平滑筋初代培養細胞では DNA 二本鎖切断が蓄積し、炎症性サイトカイン発現の増加が認められることから、これが動脈硬化増悪の機序であると考えられた。

これまでに DNA 損傷応答の異常が心筋梗塞後の生命予後、心機能、心筋における DNA 損傷の程度、梗塞部の炎症性サイトカインの発現や炎症性細胞の動態などを与える影響をみた研究は存在しない。よって本研究では、Ku80-KO マウスを用いて上記を検討し、心筋梗塞後の炎症反応に DNA 損傷応答が強く関与している可能性、そして心筋梗塞後の心機能、瘢痕形成、リモデリングにおいて DNA 損傷応答が関与している可能性を検証する。

2. 研究の目的

本研究は、DNA 損傷応答が炎症を惹起あるいは制御することにより心筋梗塞後の修復・リモデリングに關与する、という仮説を炎症細胞動態に焦点を当てて検証することを目的とする。

3. 研究の方法

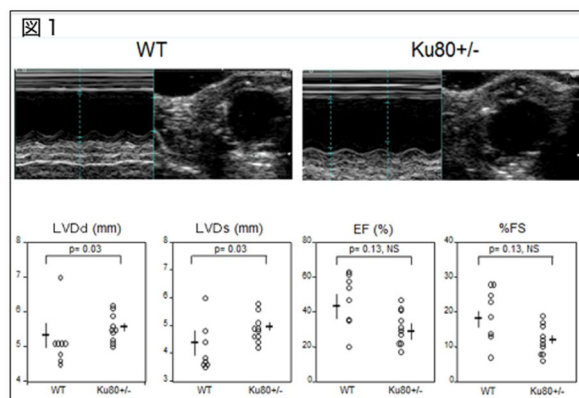
約 60 日齢、オスの Ku80-KO および野生型マウスを麻酔・人工呼吸下に開胸後、左冠動脈前下行枝を結紮して心筋梗塞を作成し、両者を比較した。

- (1) Ku80 欠損が梗塞範囲および心筋梗塞後の心機能に与える影響
梗塞範囲は TTC (Triphenyltetrazolium Chloride) 染色により評価、心機能は心筋梗塞 7 日後、14 日後、28 日後に心エコーを用いて心機能の評価を行った。
- (2) Ku80 欠損が心筋梗塞後の生存率に与える影響
心筋梗塞作成後マウスの飼育を行い生存期間を検討した。死亡時には解剖を行い、死因を探索した。
- (3) 心筋梗塞後心筋における DNA 損傷の蓄積・損傷応答の程度
心筋梗塞後の心臓を切除し、パラフィン包埋後切片を作成した。DNA 二本鎖切断の検出にはリン酸化ヒストン H2AX 抗体を、DNA 損傷応答の活性化の検出にはリン酸化 ATM 抗体を使用し、免疫組織染色を行った。染色したスライドを顕微鏡下で観察・撮影後、陽性細胞数をカウントし全細胞に対する陽性細胞率を算出した。
- (4) 心筋梗塞後心筋における好中球、マクロファージの動態
心筋梗塞後の心臓切片を免疫染色し、好中球 (Ly6C 抗体)、マクロファージ (Mac3 抗体) の集積を蛍光免疫染色にて比較検討した。また、M1 マクロファージ (iNOS 抗体)、M2 マクロファージ (CD206 抗体) についても検討した。
- (5) 心筋梗塞後心筋における炎症性サイトカイン発現の時間的、量的検討
心筋梗塞後の心臓を切除し、心臓を左心室梗塞部・左心室非梗塞部・右心室に切り分け、それぞれから mRNA を抽出し、リアルタイム PCR を行い炎症性サイトカインの発現を定量し、発現を Ku80-KO と野生型で比較した。
- (6) 骨髄細胞からマクロファージサブセットへの分化
Ku80-KO および対照マウス大腿骨から骨髄細胞を得、マクロファージを分離し、IFN- γ および lipopolysaccharide (LPS)、IL-4、IL-10 でそれぞれ M1、M2a、M2c に分化させた。IFN- γ /LPS による M1 マクロファージへの分化は IL-6 をマーカーとし、M2a、M2c マクロファージへの分化は Arg-1 および CD206 をマーカーとして測定した。

4. 研究成果

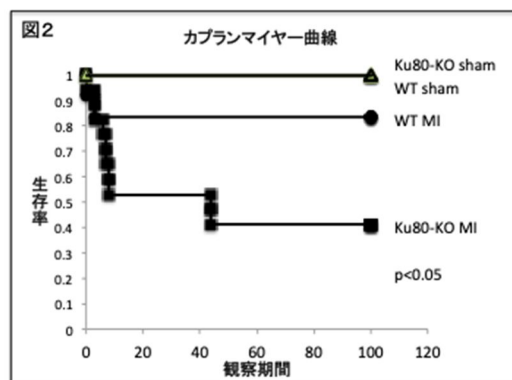
(1) Ku80 欠損が梗塞範囲および心筋梗塞後の心機能に与える影響

心筋梗塞作成後 4 週間時の心エコーでは、対照群に比べ Ku80-KO の左室拡張末期径の増大が認められ心機能の低下が示唆された (図 1)。



(2) Ku80 欠損が心筋梗塞後の生存率に与える影響

また生命予後を比較したところ、Ku80-KO は梗塞後早期から生存率が低下しており野生型マウスに比べ予後が悪いことが明らかとなった (図 2)。



(3) 心筋梗塞後心筋における DNA 損傷の蓄積・損傷応答の程度

心筋梗塞 1 週間後の心筋の DNA 二本鎖切断は梗塞部、境界部、非梗塞部とも Ku80-KO で多かった。

(4) 心筋梗塞後心筋におけるマクロファージの動態

梗塞部に集積したマクロファージを Mac-3 抗体を用いて免疫染色したところ、Ku80-KO で低下していた。iNOS 抗体を用いて M1 マクロファージを、CD206 抗体を用いて M2 マクロファージの集積を検討したところ、梗塞後 1 週間目の M1 マクロファージの集積は Ku80-KO と対照群で差がなかったが、梗塞 2 週間後の M2 マクロファージの集積は Ku80-KO で低下していた。

(5) 炎症サイトカイン発現の時間的、量的検討

梗塞部の炎症性サイトカイン (IL-1 β 、IL6、MCP-1) の発現は梗塞後 48 時間までの間 Ku80-KO で発現が遅延し、かつ発現低下していた。

以上の結果から、心筋梗塞後の炎症反応、リモデリング、心機能に DNA 損傷応答が強く関与している可能性、そして炎症反応への影響にはマクロファージの動態が関与している可能性が示唆された。

(6) マクロファージの極性化についての検討

Ku80-KO および対照マウス大腿骨から骨髓細胞を得てマクロファージを分離し、IFN- γ および lipopolysaccharide (LPS)、IL-4、IL-10 でそれぞれ M1、M2a、M2c に分化させた。それぞれの刺激によるマクロファージマーカーは 6 時間をピークに増加した。

IL-6 をマーカーとして測定した IFN- γ /LPS による M1 マクロファージへの分化は、Ku80-KO 骨髓から得たマクロファージにおいて野生型マウスに比べ亢進していた。Arg-1 および CD206 をマーカーとして測定した M2a マクロファージへの分化は Ku80-KO において低下していた。M2c への分化は両群間で差がなかった。

以上より、DNA 損傷応答の異常は、心筋梗塞時のマクロファージの分化・動態に変化をもたらし、炎症反応の変化を介して心リモデリングに影響を与え、心機能、予後を悪化させることが示唆された。

これまで心筋梗塞時に引き起こされる強いストレスによる DNA 損傷やそれに対する損傷応答による炎症・抗炎症のバランスの変化についての報告、特に DNA 損傷応答の異常がマクロファージの動態にどのように関わっているかを検討した研究はない。本研究の成果に加え、マクロファージサブセットへの分化の機構と DNA 損傷応答の関連性をより詳細に明らかにできれば、心筋梗塞時の DNA 損傷応答を制御することにより炎症の程度を調節でき、その結果として心リモデリング、心機能の低下を抑制できる可能性がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Bumdelger B, Otani M, Karasaki K, Sakai C, Ishida M, Kokubo H, Yoshizumi M	4. 巻 15
2. 論文標題 Disruption of Osteoprotegerin has complex effects on medial destruction and adventitial fibrosis during mouse abdominal aortic aneurysm formation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0235553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0235553.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Hu W, Dong A, Karasaki K, Sogabe S, Okamoto D, Saigo M, Ishida M, Yoshizumi M, Kokubo H.	4. 巻 11
2. 論文標題 Smad4 regulates the nuclear translocation of Nkx2-5 in cardiac differentiation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 3588
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-82954-2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Sakai C, Ishida M, Tashiro S, Yoshizumi M, Ishida T.
2. 発表標題 Role of Impaired DNA Damage Response in the Initiation and Progression of Atherosclerosis.
3. 学会等名 The 84th Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society.
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakai C, Ishida M, Tashiro S, Yoshizumi M, Ishida T
2. 発表標題 Impaired DNA damage response promotes atherosclerosis by enhancing senescence and proinflammatory activation.
3. 学会等名 ESC congress 2020（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ueda K, Ishida M, Sakai C, Yoshizumi M, Ishida T
2. 発表標題 Cigarette smoke-induced nuclear and mitochondrial DNA damage evokes an innate immune response.
3. 学会等名 The 5th International Symposium of the Network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ishida M, Ueda K, Sakai C, Yoshizumi M, Ishida T
2. 発表標題 Cigarette smoke extract induces DNA damage and accelerates cellular senescence in human endothelial cells.
3. 学会等名 Joint Meeting ESH-ISH 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石田万里、坂井千恵美、吉栖正生、石田隆史
2. 発表標題 ゲノム損傷と炎症・動脈硬化
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 坂井千恵美、石田万里、田代聡、吉栖正生、石田隆史
2. 発表標題 DNA損傷修復不全による動脈硬化進展メカニズムの探索
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	石田 隆史 (ISHIDA Takafumi) (40346482)	福島県立医科大学・医学部・教授 (21601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------