

平成 21 年 11 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19590865

研究課題名（和文）動脈硬化におけるDNA二重鎖切断とその修復機構の役割の解明

研究課題名（英文）Role of DNA double strand breaks and repair in atherosclerosis formation and progression.

研究代表者

石田 万里（ISHIDA MARI）

広島大学・大学院 医歯薬学総合研究科・講師

研究者番号：30359898

研究成果の概要：本研究により、ヒト動脈硬化巣にはDNA損傷、とくに二重鎖切断が存在し、これを修復するためにゲノム損傷修復酵素の活性化が認められること、さらに、動脈硬化マウスのゲノム修復機構を阻害すると動脈硬化が増悪することが示された。本研究結果から、動脈硬化の成因あるいはその進展にDNA損傷とそれに対する修復機構の異常が大きく関与していることが明らかとなった。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：血管病態学、動脈硬化

1. 研究開始当初の背景

高血圧、高脂血症、動脈硬化、癌などは誰もが罹るわけではないが、加齢と共に罹病率が増加する“老年病”と考えられる。なかでも動脈硬化にはほとんどの場合老化という現象が必要条件である。近年老化の分子メカニズムが少しずつではあるが明らかになりつつある。代表的な早老症であるウェルナー

症候群やハッチンソン・ギルフォード・プロジェリア症候群は若年における動脈硬化を主症状のひとつとするが、その病因はゲノム損傷修復異常である。ウェルナー症候群においてはゲノム上に生じる変異の蓄積によると考えられる種々の染色体転座や欠失が認められる。これらの最近の知見からゲノム損傷および修復異常と動脈硬化の関連が強く

示唆された。

私たちはこれまで、培養血管細胞において酸化ストレスにより惹起されるゲノムの損傷とそれに対する修復機転を研究してきた。これまでの培養系細胞を用いた研究から、酸化ストレスによりゲノムに酸化的損傷だけでなく、最も致命的な二重鎖切断をも生じさせることを見いだした。ゲノムの損傷と老化、動脈硬化症を直接結びつけるためにさらなる研究が必要と思われた。

2. 研究の目的

研究開始時の研究データは培養細胞の研究結果からゲノムの損傷と動脈硬化症の関係を示唆しているにとどまっており、これらの因果関係を直接証明するためには未解決の問題が多く残っていた。よって本研究では、(1)ヒト動脈硬化巣におけるゲノム損傷、修復機構活性化と染色体異常の有無、(2)ゲノム損傷修復異常を呈する変異マウスを用いて、ゲノム損傷修復異常と動脈硬化発症の関連の直接的証明を目的として、研究を遂行した。

3. 研究の方法

(1)ヒト動脈硬化巣におけるゲノム損傷、修復機構と染色体異常の有無

動脈硬化巣においてDNA損傷と修復機構の活性化が生じているか否かを検証するため、病理解剖により得られた動脈硬化巣のサンプルを用い、免疫組織化学あるいは蛍光免疫染色の二重染色により、以下の点を検討した。

- **動脈硬化巣におけるDNA二重鎖切断の有無とそれを生じている細胞の種類・局在**：リン酸化ヒストンH2AX (γ -H2AX:二重鎖切断の部位に集積する)抗体を用いて動脈硬化巣内にDNA二重鎖切断が生じているか否かを検

討した。さらに組織切片(動脈硬化部及び正常部)をvWF(内皮細胞)、HHF35(血管平滑筋細胞)、CD68(マクロファージ)の各抗体を用いて γ -H2AXとともにそれぞれ二重染色し、二重鎖切断の生じている細胞の種類、動脈硬化巣内の局在を明らかにした。

- **活性化されている修復機構シグナルの検討**：免疫組織染色により、まず損傷のセンサーであるATM(Ataxia Telangiectasia-Mutated)キナーゼやNHEJに関わる分子であるDNA依存性プロテインキナーゼ(DNA-PKcs)の活性化を明らかにした。
- **動脈硬化巣を構成する細胞の運命の検討**：TUNEL法により、アポトーシス細胞の有無を明らかにした。

(2)ゲノム損傷修復と動脈硬化発症の関連の直接的証明

- 動脈硬化を呈するapoEノックアウトマウス(apoE-KO)にATMの阻害剤であるカフェインを飲用させ、動脈硬化の増悪が認められるか否かをOil-red-O染色により検討した。
- apoE-KOと修復異常を示すKu80ノックアウトマウス(Ku80-KO)を交配した二重変異マウスを作成し、動脈硬化巣の形成の促進が認められるか否かを検討した。

4. 研究成果

(1)ヒト動脈硬化巣におけるゲノム損傷、修復機構と染色体異常の有無

ヒト動脈硬化病変部の免疫染色により、動脈硬化巣にDNA二重鎖切断の存在を証明した(図1)。二重鎖切断はマクロファージリッチな領域に多く認められた。

また、生体内の細胞のDNA損傷修復において主役を演じているといわれている非相同

末端結合(NHEJ)の中心となる分子、DNA 依存性プロテインキナーゼ(DNA-PK)の動脈硬化巣への集積を証明した(図1)。

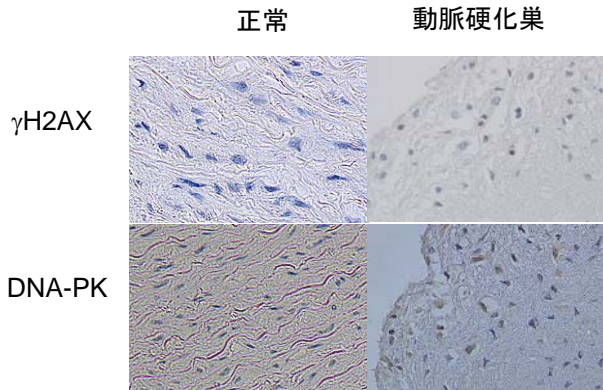


図 1: 正常組織及び動脈硬化巣における γ H2AX (二重鎖切断) の存在及び DNA-PK の発現を免疫染色にて検討。いずれも正常組織においては陰性だが動脈硬化巣において核に染色陽性 (茶色の染色) の細胞を認めた。

TUNEL 法により、二重鎖切断の認められる領域にはアポトーシス細胞が多く存在することを明らかにした。

(2) ゲノム損傷修復と動脈硬化発症の関連の直接的証明

- ApoE 欠損マウス (動脈硬化マウス) にゲノム修復因子である Ataxia Telangiectasia-mutated(ATM) の阻害剤・カフェインを投与する実験系を用いて、ゲノム修復機構を阻害すると動脈硬化が増悪することを証明した。



対照 apoE 欠損マウス大動脈

カフェイン投与した apoE 欠損マウス大動脈

- ApoE ノックアウト (動脈硬化) マウスとゲノム損傷に対する修復異常を示す Ku80 (DNA-PK と共同して修復を行う) ノックアウトマウスを交配した二重変異マウスを作成した。現在のところ、Ku80 ヘテロの二重変異マウスのみの結果であるが、対照 ApoE ノ

ックアウトマウスに比べ、動脈硬化巣の縮小が認められている。

今後ホモ接合体を用いて、さらなる検討が必要である。

5. 主な発表論文等

(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 1 件)

Shimote-Abe K, Hidekatsu Nakashima, Mariko Sawano, Mari Ishida, New New Soe, Masao Yoshizumi, Takafumi Ishida Angiotensin II-induced Osteopontin Expression in Vascular Smooth Muscle Cells Involves G_q/11, Ras, ERK, Src and Ets-1. *Hypertens. Res.*, 31:987-998, 2008 (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

1. Soe NN, Ishida T, Ishida M, Abe K, Nishioka K, Okada T, Shokawa T, Nakano Y, Teragawa H, Tadehara F, Yamamoto H, Kihara Y, Yoshizumi M.

Role of Src and Cas in dorsal ruffling, lamellipodia and migration in vascular smooth muscle cells. 第73回日本循環器学会総会・学術集会 2009年3月20日、大阪

2. 動脈硬化の成因としてのゲノム損傷・修復

石田万里、石田隆史、スー・ヌエヌエ、澤野真理子、山本秀也、蓼原太、荘川知己、岡田武規、寺川宏樹、中野由紀子、西岡健司、木原康樹、吉栖正雄、2008年11月29日 広島・呉 第93回日本循環器学会中国地方会

3. Mari Ishida, Noriko Kuwaba, Mariko Sawano, Mika Nakashima, Keiko Abe, Nwe Nwe Soe,

Masao Yoshizumi, Yasuki Kihara and Takafumi Ishida

The Role of DNA Double Strand Breaks in Atherosclerosis and Vascular Smooth Muscle Cell Apoptosis. 2008 年 9 月 5-6 日 北海道 第 12 回 Molecular Cardiovascular Conference

4. Soe NN、石田隆史、石田万里、三保成正、澤野真理子、阿部恵子、茶山一彰、吉栖正生
c-Src and Its Substrates Play a Pivotal Role in Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. 日本動脈硬化学会学術集会 2008 年 7 月 10-11 日、筑波

5. Soe NN, Ishida M, Miho N, Sawano M, Abe K, Chayama K, Yoshizumi M, Ishida T.
c-Src and Its Substrates Play a Pivotal Role in Migration of Vascular Smooth Muscle Cells. AHA Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology Annual Conference 2008, Atlanta, USA April 16-18 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 万里 (ISHIDA MARI)
広島大学・大学院 医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号：30359898

(2) 研究分担者

石田 隆史 (ISHIDA TAKAFUMI)
広島大学・大学院 医歯薬学総合研究科・講師
研究者番号：40346482

(3) 連携研究者

なし