

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19H03662

研究課題名(和文) 心筋細胞特有のゲノムDNA損傷応答機構の解明

研究課題名(英文) Investigation of the cardiomyocyte-specific DNA damage response

研究代表者

内藤 篤彦 (NAITO, Atsuhiko)

東邦大学・医学部・教授

研究者番号：10588891

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：心筋細胞の分裂増殖が停止する機構として心筋細胞特異的なDNA損傷応答機構が存在するのではないかと考え、遺伝子工学を駆使して心筋細胞と非心筋細胞にDNA損傷を再現性・制御性高く加えるシステムの開発を目指したが、十分に再現性の高いシステムを開発することはできなかった。一方、研究計画の過程で観察された現象から、SWI/SNF複合体がATPaseサブユニット特異的に心筋細胞の分裂増殖を逆方向に制御することを見出した。クロマチンリモデリング因子ATPaseサブユニット特異的な制御機構を明らかにしていくことで、心筋細胞が生後細胞周期を停止する仕組みも明らかになると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋細胞が生後に分裂増殖を停止する仕組みを明らかにすることで、心筋細胞を細胞周期に復帰させて分裂増殖を誘導する新たな再生医療の開発につながる可能性がある。また、がん細胞に対して心筋細胞が細胞周期を離脱する仕組みを導入する技術を開発できればがんに対する新たな治療法となる可能性がある。さらに、心筋細胞がROSによる持続的なDNA損傷に対して細胞死や細胞老化を引き起こすことなく機能を保ち続ける仕組みを明らかにすることで老化に関連する疾患の治療法開発につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We hypothesized that cardiomyocyte-specific DNA damage response play a role in cell cycle exit of cardiomyocyte after birth. To test this hypothesis, we tried to develop a system that could reproducibly and controllably induce DNA damage in myocardial cells and non-myocardial cells using genetic engineering techniques. However, we were unable to develop a system with sufficient reproducibility. On the other hand, through the observations made during the course of the initial research plan, we discovered that the SWI/SNF complex controls the division and proliferation of myocardial cells to the opposite direction in an ATPase subunit-specific manner. We are convinced that this chromatin remodeling complex ATPase subunit-specific regulation of DNA damage response and gene regulation is involved in the mechanism by which cardiomyocytes exit the cell cycle after birth.

研究分野：細胞生理学

キーワード：心筋細胞 DNA損傷応答 SWI/SNF複合体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

心筋細胞は生後すぐに細胞周期を離脱して分裂増殖を停止する。この性質のため、心筋梗塞などの心筋細胞が失われる病態において心臓を元の状態に回復させることはできない。心筋細胞が細胞周期を離脱する仕組みとして、酸素の乏しい胎内から酸素が豊富な胎外へと環境が変化することで心筋細胞内における活性酸素 (ROS) が増加し、DNA 損傷を引き起こす仕組みが報告されている。一方、通常の細胞の場合、DNA 損傷が修復されれば細胞は再び細胞周期へと復帰し、修復されなければ細胞死または細胞老化が誘導されるにもかかわらず、心筋細胞はいずれの経過も経ず細胞周期から離脱したままその機能を果たし続ける。また、胎内から胎外への環境の変化は心臓以外の他の臓器も経ており、心筋細胞だけが何故、酸素が豊富な外環境に曝露されることで細胞周期から完全に離脱するかは一切明らかになっていない。

生後すぐに分裂増殖を停止する心筋細胞のもう一つの特徴として異常に長命であることが挙げられる。我々の心臓では、出生時に存在する心筋細胞が入れ替わることなく死ぬまで収縮し、全身に血液を送り続けている。心筋細胞内には多くのミトコンドリアが存在しており、個体の生涯にわたり収縮に必要なエネルギーと同時に大量の ROS を産生し続ける。大量に産生される ROS は心筋細胞のゲノムに DNA 損傷を加えるが、心筋細胞は細胞死を引き起こすことなく、また老化して機能を低下させることなく、淡々とその機能を果たし続ける。

心筋細胞が生後に分裂増殖を停止する仕組みを明らかにすることで、心筋細胞を細胞周期に復帰させて分裂増殖を誘導する新たな再生医療の開発につながる可能性がある。また、がん細胞に対して心筋細胞が細胞周期を離脱する仕組みを導入する技術を開発できればがんに対する新たな治療法となる可能性がある。さらに、心筋細胞が ROS による持続的な DNA 損傷に対して細胞死や細胞老化を引き起こすことなく機能を保ち続ける仕組みを明らかにすることで老化に関連する疾患の治療法開発につながる可能性がある。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は DNA 損傷を時間的・空間的・定量的に制御する実験系を構築することで、様々な程度の DNA 損傷に対する心筋細胞と非心筋細胞の DNA 損傷応答機構の違いを明らかにし、最終的に心筋細胞特有の DNA 損傷応答機構を規定するメカニズムを解明することである。

### 3. 研究の方法

#### (1) 細胞培養

ヒト胎児肺由来線維芽細胞 IMR-90 (ATCC #CCL-1860 およびヒト新生児表皮由来線維芽細胞 BJ (ATCC #CRL-2522) は 10% Fetal Bovine Serum および 1% penicillin/streptomycin を添加した Eagle's Minimal Essential Medium を用いて、ヒト乳がん細胞 MCF-7 細胞 (ATCC #HTB-22) およびヒト iPS 細胞由来心筋細胞 Asclestem® (ナカライテスク) は 10% Fetal Bovine Serum および 1% penicillin/streptomycin を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium を用いて、ヒト冠動脈血管内皮細胞 (HCAEC: Lonza CC-2585) およびヒト心室線維芽細胞 (NHCFV: Lonza CC-2904) はメーカー推奨の培養液を用いてそれぞれ 37 °C、5% CO<sub>2</sub> の条件で培養した。

#### (2) プラスミド DNA

時間特異的に DNA 損傷を制御する実験系を構築するため、Addgene 社から mCherry-miniSOG-H2B-C-10 (Plasmid #55090) を購入した。空間特異的に DNA 損傷を制御する実験系を構築するため、Addgene 社から pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) V2.0 (Plasmid #62987) を購入した。

#### (3) 遺伝子導入・細胞株樹立

IMR-90 および BJ 細への遺伝子導入はエレクトロポレーション法にて実施した。エレクトロポレーション法を行った後の細胞株樹立は G418 (500 µg/mL) および puromycin (1 µg/mL) で行った。

#### (4) Western blotting

培養細胞からのタンパク質抽出は RIPA buffer に protease inhibitor, phosphatase inhibitor cocktail を加えた溶液を用いて行なった。同量のタンパク質サンプルを SDS-PAGE で展開した後に PVDF membrane に転写し、以下の抗体を利用して標識した：抗 ATM 抗体 (Cell signaling technologies (CST) 92356S)、抗リン酸化 ATM 抗体 (CST 13050S)、抗 ATR 抗体 (Novus NB110-308)、抗リン酸化 ATR 抗体 (58014S)、抗 CHK1 抗体 (CST 2360S)、抗リン酸化 CHK1 抗体 (CST 2348S)、抗 CHK2 抗体 (CST 3440S)、抗リン酸化 CHK2 抗体 (CST 2661S)。

### 4. 研究成果

#### (1) 核内で誘導的に ROS を発生させるシステムの開発

タンパク質 miniSOG (mini Singlet Oxygen Generator) は青色光を照射することで 1 重項酸素を発生する性質を有しており、細胞に恒常的に発現させることで時間特異的に、定量的に DNA 損傷を制御するシステムとなる。正常線維芽細胞 IMR-90 および BJ に miniSOG タンパク質をヒストン H2B の融合タンパク質 (miniSOG-H2B) を発現するプラスミドをエレクトロポレーション

法で導入し、G418 (500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で安定的に発現する細胞を選択した。約7日間で選択は完了し、シングルセル由来と考えられるコロニーを複数得たため、クローン毎に拡大培養を試みたが、細胞の増殖は極めて低調であり、一つもクローン化することができなかった。クローン化する方法として、限界希釈法、シリンドーカップ法、濾紙法を行ったが、いずれも拡大培養初期に細胞の増殖が停止してしまった。並行して同様に pEGFP-1 プラスミドをエレクトロポレーション法で導入した細胞では問題なく複数のクローンを取得できていたことから、miniSOG-H2B タンパク質がクローン化に影響を与えているのではないかと考えられた。

青色光だけでなく微弱な室内光で1重項酸素が発生してしまう可能性も考えられたため、アルミホイルで培養皿を包む、クリーンベンチの照明を消すなどの対応を行なったが、やはりコロニー出現後の拡大培養において細胞が死滅した。2013年の報告では (Ryumiya AP et al. *Biochimica et Biophysica Acta* 2013)、HeLa細胞にminiSOG-H2B遺伝子を導入し、青色光を照射しない条件では細胞死が誘導されないことを示しているが、一過性の発現でクローン化や選択もしていない。本研究の目的を達成するためには正常線維芽細胞を利用する必要があり、癌細胞であるHeLa細胞とは一重項酸素によるストレスに対する耐性が異なったために十分な結果が得られなかった可能性がある。Lentivirusを利用して一過性に発現することも考えたが、そのような実験系ではminiSOG-H2Bの発現量も異なり、当初の目標であった心筋細胞と非心筋細胞の直接的な比較が不可能であることから断念した。

## (2) ゲノム上の特定の領域にDNA損傷を誘導するシステムの開発

レトロトランスポゾンLINE-1はゲノム上の様々な部位に存在している。誘導性にLINE1の配列を標的としたCRISPR/Cas9を発現するシステムを開発することで、ゲノム上の同じ部位に再現性高くDNA損傷を加えることができると考えた。pSpCas9n(BB)-2A-Puro (PX462) V2.0のクローニング領域に、Zhang labのinstruction通りにLINE1 ORF2を標的とするようにデザインしたgRNAを導入した後、IMR-90細胞およびBJ細胞にエレクトロポレーション法で導入し、puromycin (1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) で安定的に発現する細胞を選択しようと試みた。繰り返し実験を試みたもののクローニングの過程で細胞は全て死滅してしまっただけでなく、研究計画実施中、2020年に本計画と同様にヒトゲノム中に散在する配列を標的としてCRISPR/Cas9によるDNA切断を誘導するシステムが報告され、我々と同様の細胞死を認めるものの、変異を加えたCas9を利用することで細胞死を回避することが報告された (Smith CJ et al. *Nucleic Acids Res* 2020)。研究計画の後半に入っており、追試験を実施して一定の成果を得ることは困難と考えたため、システムの開発を断念することとした。

## (3) 心筋細胞と非心筋細胞におけるDNA損傷応答シグナルの違い

当初の計画では、遺伝的ツールを利用して心筋細胞と非心筋細胞に同じ程度のDNA損傷を制御しながら引き起こすシステムを開発する予定であったが、上記のように不首尾に終わったため、より直接的にDNA損傷を引き起こした際のDNA損傷応答の違いを複数の細胞で検討した。

ヒトiPS細胞由来心筋細胞 (AscleStem)、乳がん細胞 (MCF-7)、ヒト冠動脈血管内皮細胞、ヒト心室線維芽細胞に対してdoxorubicin (1  $\mu\text{M}$ ) を加えたところ、いずれの細胞でもATM、ATR、Chk1、Chk2のリン酸化が誘導された。一方、そのタイミングと程度は細胞の種類によって大きく異なっていた。心筋細胞と非心筋細胞の比較という観点からは、心筋細胞は基底状態におけるATMのリン酸化の程度が高く、ATMおよびATRともにdoxorubicinを加えた後の変化が乏しかった。ATMおよびATRの基質であるCHK1とCHK2のリン酸化の変化は心筋細胞と非心筋細胞で大きな違いを認めなかった。この結果から、心筋細胞では直接的なDNA損傷がない状態でも持続的かつ部分的なDNA損傷応答の活性化が起こっており、非心筋細胞とはその制御機構が異なる可能性が想定された。

2008年にはクロマチンへのDNA損傷修復タンパクの持続的な結合により、直接的なDNA損傷がない状態であってもATMを起点としたDNA損傷応答シグナルを活性化することが報告されている (Soutoglou E et al. *Science* 2008) ことから、心筋細胞と非心筋細胞におけるクロマチン構造を変化させる因子 (クロマチンリモデリング因子) の違いに着目した解析を計画した。

## (4) クロマチンリモデリング因子ATPaseの違いによる心筋細胞分裂制御

クロマチンリモデリング因子はクロマチンの構造を変化させることでタンパク質とゲノムDNAのaccessibility (近接性) を制御する。代表的にはゲノム上のエンハンサー領域の近接性を変化させ、転写因子や転写共役因子が結合できる状態にすることで遺伝子発現制御に重要な役割を果たしているが、ゲノムDNAの損傷部位の近接性を変化させ、DNA損傷修復タンパク質が結合できる状態にすることでDNA損傷応答制御にも重要な役割を果たす。

クロマチンリモデリング因子の一種であるSWI/SNF複合体を構成するATPaseであるBrg1タンパク質がPARPやHDACといったタンパク質と結合し、ミオシン重鎖のサブタイプを調節するとともに、心筋細胞の細胞周期を制御しており、Brg1をロックアウトすることで心筋細胞の分裂が抑制されることが報告されており (Hang CT et al. *Nature* 2010)、同様の現象がヒトiPS細胞由来心筋細胞でも観察されるか評価したが、想定とは正反対にBrg1のロックダウンは心筋細胞の増殖をむしろ亢進させた。そこで、Brg1と同じくSWI/SNF複合体のATPaseサブユニットであるBRMに着目し、ロックダウンしたところ心筋細胞の増殖は抑制された。

これらの結果は、心筋細胞の細胞周期がクロマチンリモデリング因子 ATPase サブユニット特異的に制御されている可能性を示しており、DNA 損傷応答に関しても同様にクロマチンリモデリング因子 ATPase サブユニット特異的な仕組みが重要なのではないかと考えられた。

#### 総括

心筋細胞の分裂増殖が停止する機構として心筋細胞特異的な DNA 損傷応答機構が存在するのではないかと考え、当初は遺伝子工学を駆使して心筋細胞と非心筋細胞に DNA 損傷を再現性・制御性高く加えるシステムの開発を目指したが、十分に再現性の高いシステムを開発することはできなかった。

一方、研究計画の過程で観察された現象から、予期せずクロマチンリモデリング因子の ATPase サブユニット特異的に反対方向に心筋細胞の分裂増殖が制御されることを発見した。クロマチンリモデリング因子の遺伝子発現制御や DNA 損傷応答における役割を解析する研究は数多く存在するものの、ATPase サブユニットの特異的な機能を解析した研究はほとんど存在しない。Brg1 と BRM を始めとしたクロマチンリモデリング因子 ATPase サブユニットが細胞増殖や DNA 損傷応答、遺伝子発現制御などの現象においてサブユニット特異的に果たす役割を明らかにしていくことで、心筋細胞のユニークな特徴を明らかにしていくことが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 1件）

1. 著者名 Yamaguchi Toshihiro, Sumida Tomokazu S., Nomura Seitaro, Satoh Masahiro, Higo Tomoaki, Ito Masamichi, Ko Toshiyuki, Fujita Kanna, Sweet Mary E., Sanbe Atsushi, Yoshimi Kenji, Manabe Ichiro, Sasaoka Toshikuni, Taylor Matthew R. G., Toko Haruhiro, Takimoto Eiki, Naito Atsuhiko T., Komuro Issei	4. 巻 11
2. 論文標題 Cardiac dopamine D1 receptor triggers ventricular arrhythmia in chronic heart failure	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-18128-x	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 Shibamoto Masato, Higo Tomoaki, Naito Atsuhiko T., Nakagawa Akito, Sumida Tomokazu, Okada Katsuki, Sakai Taku, Kuramoto Yuki, Yamaguchi Toshihiro, Ito Masamichi, Masumura Yuki, Higo Shuichirou, Lee Jong-Kook, Hikoso Shungo, Komuro Issei, Sakata Yasushi	4. 巻 60
2. 論文標題 Activation of DNA Damage Response and Cellular Senescence in Cardiac Fibroblasts Limit Cardiac Fibrosis After Myocardial Infarction	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Heart Journal	6. 最初と最後の頁 944 ~ 957
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1536/ihj.18-701	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 内藤篤彦
2. 発表標題 iPS細胞由来心筋細胞を利用した創薬研究
3. 学会等名 第41回日本臨床薬理学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内藤篤彦
2. 発表標題 iPS細胞を利用した創薬研究
3. 学会等名 日本小児心筋疾患学会第29回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------