

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17526

研究課題名(和文) ゲノム修復タンパクXRCC3遺伝子多型の心肥大発症・進展機序における役割

研究課題名(英文) Role of XRCC3 polymorphism in the initiation and progression of cardiac hypertrophy

研究代表者

坂井 千恵美 (SAKAI, CHIEMI)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：90827982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム修復タンパクXRCC3の遺伝子多型では、endoreduplicationという現象によりDNA複製時に細胞分裂が起らず倍数性が増加(多倍体化)することが知られている。この現象が心肥大の発症・進展に關与するかを検討した。血液透析患者を対象とした遺伝子多型解析においてXRCC3T241Mは心肥大発症のリスク因子であることが明らかとなった。また培養細胞にXRCC3T241Mを導入すると、細胞の多倍体化、DNA損傷の蓄積および細胞老化が増加した。以上の結果からXRCC3遺伝子多型は細胞の多倍体化、ゲノムの不安定化、細胞老化を誘導し心肥大に關与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

XRCC3遺伝子多型が心肥大のリスク因子であることが示された。心肥大のリスク因子には加齢があるが、加齢によりゲノムの不安定性が増加することが知られている。XRCC3はゲノムの恒常性維持を担うタンパクであることから、XRCC3遺伝子多型に誘発される心肥大の発症・進展のメカニズムは加齢に伴う心肥大に普遍的なプロセスと類似している可能性がある。心筋細胞は元々多倍体化の細胞が多いことが知られているが、本研究の成果により、XRCC3タンパクの発現異常に誘導されるような病的な多倍体化が心肥大の発症・進展に關与することが示された。

研究成果の概要(英文)：Polymorphism of the gene coding XRCC3, a DNA repair protein, induces a phenomenon called endoreduplication in which cells skip cytokinesis during DNA replication, resulting in polyploidy. We investigated whether XRCC3 polymorphism-induced endoreduplication is associated with cardiac hypertrophy. Single-nucleotide polymorphism analysis showed that XRCC3T241M is a risk factor of cardiac hypertrophy among dialysis patients. A normal fibroblast cell line introduced with XRCC3T241M showed polyploidy, accumulation of DNA damage, cell senescence, and an increased MCP-1 level. These results suggested that XRCC3 polymorphism is associated with cardiac hypertrophy by inducing polyploidy, genomic instability, cell senescence, and a pro-inflammatory response.

研究分野：分子生物学

キーワード：XRCC3遺伝子多型 心肥大 多倍体化 DNA損傷 細胞老化

1. 研究開始当初の背景

成体の心筋細胞は細胞分裂能を喪失しており、細胞の多倍体化によってその質量を増加させている。一方で、高血圧に誘発される心肥大において多倍体化により肥大した心筋細胞が増加することが知られている(Vliegen et al. Eur Heart J, 1991)。これらのことから心筋細胞の多倍体化には、心臓の成長・維持に必要なものと、心疾患を招く病的なものがあると考えられる。しかし、成体の心筋細胞における多倍体化のメカニズムや病的意義は明らかにされていない。

XRCC3 (X-ray repair cross-complementing protein 3) は DNA 二本鎖切断の修復に関与するタンパクである。XRCC3 遺伝子の第 7 エクソンの一塩基多型により 241 番目のコドンがスレオニンからメチオニンに置換する XRCC3^{T241M} は様々ながんの発症リスクに関連があることが報告されている。また先行研究では XRCC3 の遺伝子に欠損あるいは Thr241Met 変異があると、DNA 複製後の細胞分裂が起こらない endoreduplication という現象がおこり、染色体が多倍体化することが明らかにされた(Yoshihara et al. The EMBO journal, 2004)。我々は、血液透析患者を対象とした遺伝子多型解析において XRCC3^{T241M} が心肥大発症のリスクに関与することを明らかにした。さらに XRCC3^{T241M} を正常 2 倍体細胞に導入すると、細胞肥大が誘発されることを報告した(Ariyandy, Sakai et al. Hypertens Res, 2018)。

これらの知見から、XRCC3 遺伝子多型により誘発される endoreduplication は病的な多倍体化を心筋細胞に誘導し心肥大の病態に関与するのではないかと考えた。また XRCC3 遺伝子多型に限らず DNA 修復不全によりゲノムの恒常性維持に異常をきたしている細胞でも病的な多倍体化は誘発される可能性がある。

2. 研究の目的

本研究は、endoreduplication とそれに附随する多倍体化が心肥大の発症・進展に関与するかを検討し、そのメカニズムを明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 正常ヒト XRCC3 あるいはヒト XRCC3^{T241M} 変異体を組み込んだベクターを培養マウス線維芽細胞(NIH3T3)に導入し、以下の検討を行った。

DNA 損傷・細胞老化への影響

抗 53BP1 抗体を用いた蛍光免疫染色により DNA 二本鎖切断を検出し、細胞あたりの DNA 二本鎖切断量を算出した。老化細胞の検出のため senescence associated -galactosidase (SA -gal) 染色を行い、SA -gal 陽性細胞率を算出した。

炎症応答への影響

炎症性サイトカイン (MCP-1、IL-6、IL-8) mRNA の発現をリアルタイム RT-PCR により定量した。

細胞周期への影響

フローサイトメーターを用いて多倍体化の検出と細胞周期解析を行った。

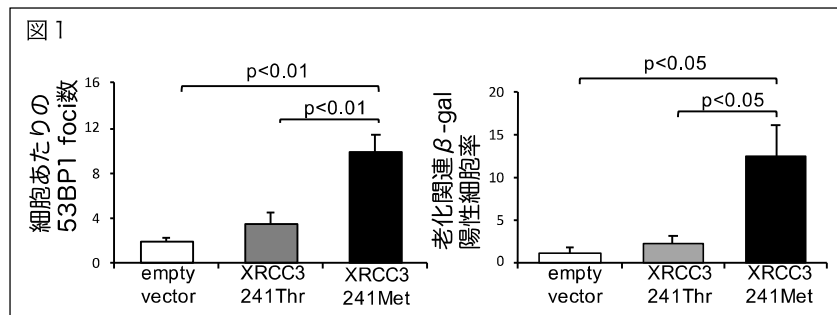
- (2) マウス心房由来心筋細胞株 (HL-1) を過酸化水素 (H₂O₂) あるいは高濃度イソプロテレノールに暴露し DNA 損傷への影響を検討した。アドレナリン受容体作動薬であるイソプロテレノールを高濃度で心筋に投与すると心肥大を誘導することが知られている。損傷を受けた DNA 断片は細胞質中に放出されることがある。この細胞質中に存在する DNA を抽出しリアルタイム RT-PCR により解析し定量化した。核由来 DNA のプライマーには B2m を、ミトコンドリア由来 DNA には NADH1 を用いた。

- (3) DNA 修復不全マウス由来心筋細胞を単離し DNA 損傷の程度を定量化した。Ku80 は二本鎖切断を受けた DNA 末端に結合し、DNA 修復に関与する分子である。この遺伝子を欠損させた Ku80^{-/-} マウスと野生型マウスの心室から心筋細胞を単離し、蛍光免疫染色により DNA 二本鎖切断を検出した。DNA 二本鎖切断は抗 H2AX 抗体、心筋細胞は抗 アクチニン抗体を用いて検出した。

4. 研究成果

- (1) XRCC3^{T241M} 変異体導入による DNA 損傷・細胞老化への影響

ヒト *XRCC3*^{T241M} 変異体 (241Met) を導入した細胞は正常ヒト *XRCC3* (241Thr) に比し、DNA 二本鎖切断の蓄積が有意に増加した。同様に、SA- β -gal 陽性細胞率も 241Met 導入細胞で有意に増加したことから細胞老化が認められた。(図 1)。

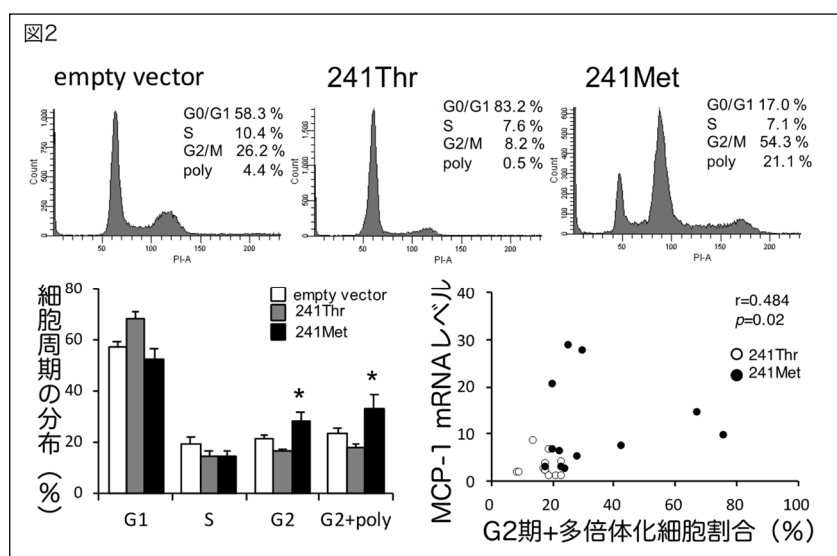


(2) *XRCC3*^{T241M} 変異体導入による炎症性サイトカイン発現への影響

241Met を導入した細胞では 241Thr を導入した細胞に比し、MCP-1 mRNA の発現が有意に増加したが、IL-6 および IL-8 mRNA 発現に有意な差は見られなかった。TNF- α による刺激下においても同様の結果を認めた。

(3) *XRCC3*^{T241M} 変異体導入による多倍体化・細胞周期への影響

241Met を導入した細胞では 241Thr を導入した細胞に比し、多倍体化の有意な増加が認められた。細胞周期解析から、241Met 導入細胞では 241Thr 導入細胞と比較し、G2/M 期に占める細胞の割合が増加し G0/G1 期に占める割合が減少していた。さらに、MCP-1 mRNA 発現レベルと G2 期および多倍体化の細胞率には正の相関関係があることが示された(図 2)。



(4) ストレス下におけるマウス心筋細胞の細胞質 DNA

HL-1 細胞を H₂O₂ (0, 30, 100, 300 μ M) で暴露し酸化ストレスを与えると、核由来およびミトコンドリア由来の細胞質 DNA が濃度依存的に増加した。HL-1 細胞をイソプロテレノール (0, 50, 100, 500 μ M) で刺激すると、H₂O₂ 暴露で示された濃度依存的な細胞質 DNA の増加は認められなかったが、500 μ M では核由来・ミトコンドリア由来の細胞質 DNA が増加傾向にあった。

(5) Ku80 欠損マウス由来心筋細胞における DNA 損傷

Ku80^{-/-} マウス心筋細胞では野生型に比較して DNA 二本鎖切断の蓄積が顕著であった。

以上の結果から、*XRCC3* 遺伝子多型は endoreduplication を誘発し、細胞の多倍体化を増加させ細胞肥大を誘導すること、DNA 損傷の蓄積、細胞老化を介して心肥大の発症・進展に関与することが示唆された。*XRCC3*^{T241M} を導入した細胞では G2/M 期の細胞割合が増加し G0/G1 期の細胞割合が減少していたことから、mitosis skip が起きていると考えられる。Mitosis skip は細胞老化の必要十分条件であるとの報告がなされており (Nakanishi et al. Molecular Cell, 2014)、*XRCC3*^{T241M} 導入による老化細胞の増加は mitosis skip を介して起きたものと考えられる。老化細胞は senescence associated secretory phenotype (SASP) という形質を獲得し炎症応答を惹起することが知られている。*XRCC3*^{T241M} 導入による MCP-1 の発現増加は細胞老化により誘導された可能性が示された。今後は、遺伝子改変動物を用いた検討により本研究で得られた結果の裏付けを行い、多倍体化が心肥大を誘導する詳細なメカニズムを明らかにする必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Imano N, Nishibuchi I, Kawabata E, Kinugasa Y, Shi L, Sakai C, Ishida M, Sakane H, Akita T, Ishida T, Kimura T, Murakami Y, Tanaka K, Horikoshi Y, Sun JY, Nagata Y, Tashiro S	4. 巻 195
2. 論文標題 Evaluating Individual Radiosensitivity for the Prediction of Acute Toxicities of Chemoradiotherapy in Esophageal Cancer Patients	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 RADIATION RESEARCH	6. 最初と最後の頁 244-252
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1667/RADE-20-00234.1	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 -

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 オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sakane H, Ishida M, Shi L, Fukumoto W, Sakai C, Miyata Y, Ishida T, Akita T, Okada M, Awai K, Tashiro S	4. 巻 295
2. 論文標題 Biological Effects of Low-Dose Chest CT on Chromosomal DNA	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 RADIOLOGY	6. 最初と最後の頁 439-445
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1148/radiol.2020190389	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7件（うち招待講演 0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 Impaired DNA damage response promotes atherosclerosis by enhancing senescence and proinflammatory activation
3. 学会等名 ESC congress（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Sakai C, Ishida M, Ueda K, Tashiro S, Yoshizumi M, Ishida T
2. 発表標題 Impaired DNA damage response promotes atherosclerosis by enhancing cellular senescence and proinflammatory activation
3. 学会等名 The 2021Research Center for Radiation Disaster Medical Science 5th International Symposium (国際学会)
4. 発表年 2021年

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 第84回日本循環器学会学術集会
4. 発表年 2020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

1. 発表者名 坂井千恵美、石田万里、上田桂太郎、田代聡、吉栖正生、石田隆史
2. 発表標題 タバコ煙抽出物のDNA損傷および細胞老化への関与
3. 学会等名 第51回日本動脈硬化学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Sakai C, Ishida M, Ueda K, Kobayashi Y, Tashiro S, Yoshizumi M, Ishida T
2. 発表標題 Accumulation of DNA damage promotes atherosclerosis by provoking inflammatory responses via cGAS-STING activation
3. 学会等名 The 19th International Symposium on Atherosclerosis (国際学会)
4. 発表年 2021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 ゲノム修復関連蛋白XRCC3の遺伝子多型は高血圧性心肥大の発症に關与する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
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