

様式 C-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成 22 年 5 月 11 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20790535

研究課題名 (和文) 動脈硬化における酸化 DNA 障害とその防御機構

研究課題名 (英文) Oxidative DNA damage and its defense mechanism in atherosclerosis

研究代表者 鳥巢 久美子

九州大学 生体防御医学研究所 (非常勤研究員)

研究者番号：20448434

研究成果の概要 (和文)：酸化 DNA 障害の蓄積が動脈硬化を増悪させるのかは分かっていない。我々は酸化 DNA 障害のうち 8-オキシグアニン(8-oxoG)に注目し、動脈硬化モデルである *Apoe*^{-/-}マウスに 8-oxoGTP 分解活性をもつヒト MTH1 を過剰発現させ動脈硬化を調べた。ヒト MTH1-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスと *Apoe*^{-/-}マウスの全大動脈の Oil red O 陽性面積は差がなかった。

研究成果の概要 (英文)：It is unknown that accumulation of oxidative DNA damage can accelerate atherosclerosis. We used *Apoe*^{-/-} mice overexpressing human MTH1 which catalyses 8-oxoGTP. The severity of atherosclerosis of hMTH1-Tg/*Apoe*^{-/-} mice was not different from *Apoe*^{-/-} mice.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：分子血管病態学

1. 研究開始当初の背景

動脈硬化における活性酸素の過剰生成は既に報告されている。活性酸素は脂質、タンパク質、DNA を酸化する。しかし動脈硬化病変において酸化 DNA 障害が血管を構成するどの細胞に蓄積するのか、またその結果動脈硬化が増悪するのか、抑制されるのかはまだ明らかではない。

2. 研究の目的

酸化 DNA 障害のうち 8-oxoG に注目し、8-oxoG の細胞内の蓄積が減少した場合、動脈硬化は軽快するかを明らかにする。

3. 研究の方法

MTH1-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスを樹立し動脈硬化を解析する。

- 1) ヒト MTH1-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスの樹立
ヒト MTH1 トランスジェニックマウスは**

*より分与を受けた。*Apoe*^{-/-}マウス (*Apoe*^{tm1Unc/J})は Jackson laboratory から購入した。*MTH1-Tg(+/-)/Apoe*^{-/-}マウスどうしの交配によって得られたマウスを実験に使用した。マウスの遺伝子型はテール DNA を鋳型に PCR で判定した。マウスは 1 2 時間の昼夜サイクルで自由に飲水、摂食ができる状態で飼育した。実験は九州大学大学院医学系学府動物実験倫理委員会で承認されたプロトコルに従って行った。

2) マウスへの高脂肪食投与
オスマウスを 3 週令で離乳し、通常食(CLEA, CA-2)を 5 週間投与した後、8 週令から高脂肪食 (オリエンタル酵母、脂肪総カロリー比 40%、コレステロール 0.15%) を 22 週間投与した。

3) マウスの体重、血圧測定
高脂肪食投与中の 8 週令から 30 週令までは毎週摂食量を測定した。また 2 週間ごとに体重とテールカフ法 (室町機械、MK-2000ST) によって収縮期血圧を測定した。収縮期血圧は 6 回測定した平均を記録した。

4) マウスの解剖
30 週令のマウスをペントバルビタール腹腔内投与により麻酔した。大静脈から血液を採取後、左室から 30 ml 生理食塩水で還流し、続けて 4%パラホルムアルデヒド 30 ml で還流した。心臓は 4%パラホルムアルデヒドに一晩浸漬した後、OCT compound に包埋し凍結切片とした。大動脈はマウスから取り出した後、縦方向に切り開き 4%パラホルムアルデヒドに一晩浸漬し、以後の実験に用いた。

5) マウス血清中の総コレステロール測定
採血した血液を遠心後、血清を回収しマイナス 80°C で保存した。血清総コレステロールは L タイプワコー CHO・H を用いて測定した。

6) 動脈硬化解析
大動脈洞の連続切片 (6μm) を調製し解析を行った。大動脈起始部において大動脈弁 3 尖が現れた部位から 120μm おきに 6 カ所の部位で切片を作成した。各切片は hematoxylin-eosin (HE)、elastica-van Gieson (EVG)、SudanIV 染色を行った。明視野観察はデジタルカメラを装着した (AxioCamHRc, Carl Zeiss) 顕微鏡 (Axio Imager A1, Carl Zeiss) で観察、撮影を行った。撮影した画像は Photoshop 7.0 (Adobe) と ImageJ 1.40g (National Institute of Health) を用いて解析した。全大動脈は Oil red O で染色後、デジタルカメラを装着した実体顕微鏡で観察と撮影を行い Photoshop 7.0 (Adobe) を用いて陽性面積を算出した。

4. 研究成果
ヒト *MTH1-Tg/Apoe*^{-/-}マウスオス (n=9) とコントロール群である *Apoe*^{-/-}マウスオス (n=9) に対して、8 週齢から 2 2 週間高脂肪食 (0.15% コレステロール、総カロリー比 40%) を投与した。

(1) 体重、血圧
高脂肪食投与中の体重増加の程度はヒト *MTH1-Tg/Apoe*^{-/-}マウスと *Apoe*^{-/-}マウスでは有意差がなかった (図 1)。22 週齢から 28 週

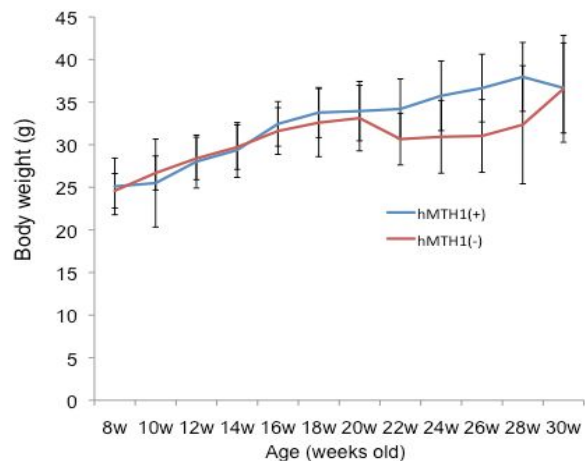


図1 hMTH1-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスと*Apoe*^{-/-}マウスの体重変化

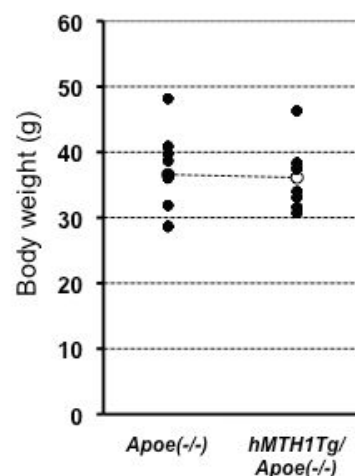


図1b hMTH1-Tg/*Apoe*^{-/-}マウスと *Apoe*^{-/-}マウスの解剖時体重

齢の期間に体重差があるが、30 週齢の解剖時には差がなくなる (図 1b) ため、マウスの匹数を増やしてさらに確認する必要がある。また収縮期血圧はヒト *MTH1-Tg/Apoe*^{-/-}マウスが *Apoe*^{-/-}マウスに対して 10mmHg 程度高い傾向があった。しかし両者に有意差はなかった (図 2)。

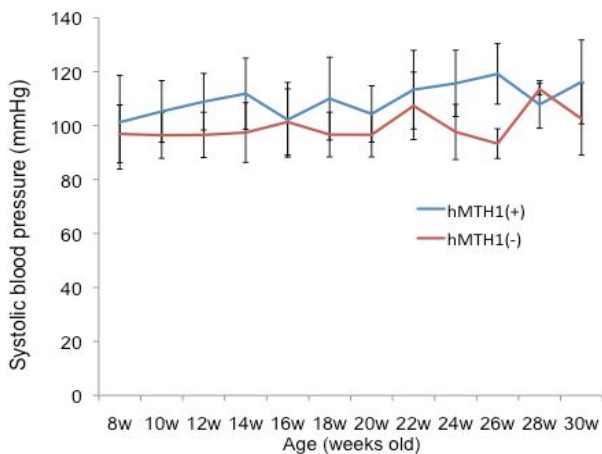


図2 hMTH1-Tg/ApoE^{-/-}マウスとApoE^{-/-}マウスの血圧変化

(2) 動脈硬化

大動脈起始部から総腸骨動脈分岐までを含む全大動脈の Oil red O 染色を行った(図3)。Oil red O 陽性面積の割合は hMTH1-Tg/ApoE^{-/-}マウスの陽性面積が増加する傾向にあった(図4)。しかし ApoE^{-/-}マウスが3匹のため、さらに n を増やす必要がある。



図3 全大動脈の Oil red O 染色

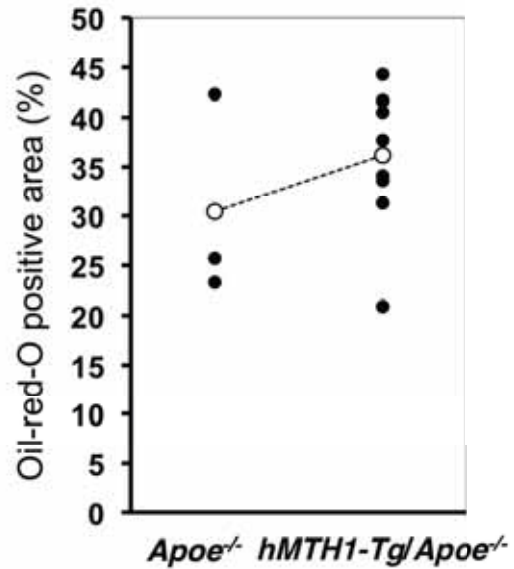


図4 全大動脈の Oil red O 陽性面積

(3) 血清総コレステロール

hMTH1-Tg/ApoE^{-/-}マウスと ApoE^{-/-}マウスでは差がなかった(図5)。

(4) 動脈硬化組織中の 8-oxoG

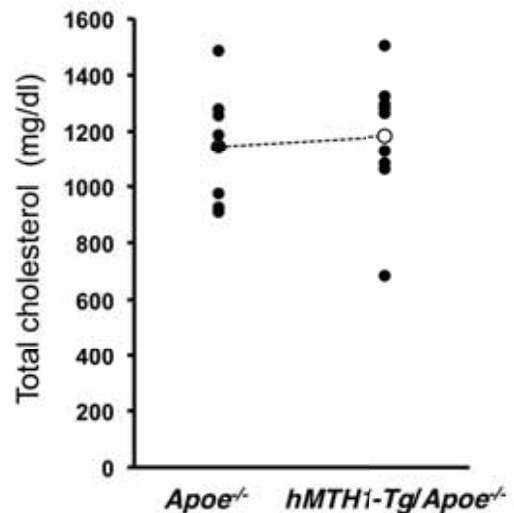


図5 血清総コレステロール

ApoE^{-/-}マウスの核内の 8-oxoG を免疫染色によって検出した。血管内皮細胞、泡沫マクロファージ、平滑筋細胞のいずれにおいても 8-oxoG の高い蓄積を認めた(図6)。

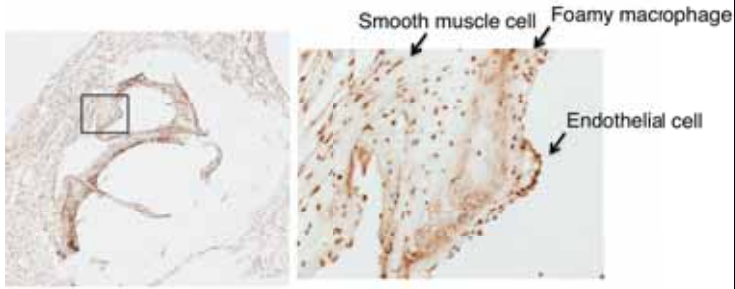


図6 動脈硬化での核の8-oxoG染色

(考察)

ヒト MTH1-Tg/ApoE^{-/-}マウスは 8-oxoG の蓄積を抑制する。動脈硬化病巣は活性酸素ストレスが高い環境であり、血管を構成する細胞、血管内皮細胞、泡沫マクロファージ、平滑筋細胞中の 8-oxoG は多いと予想される。ヒト MTH1 の過剰発現により 8-oxoG の DNA 中への取り込みが抑制されれば、動脈硬化は抑制されることを期待して実験を行った。

しかしヒト MTH1-Tg/ApoE^{-/-}マウスでは動脈硬化面積の縮小は観察されなかった。それどころか収縮期血圧はわずかに上昇、動脈硬化面積もやや増加していた。マウスの体重や血清コレステロールは同じであったため、脂質代謝は変化ないことが示唆された。

MTH1 は細胞質において 8-oxoG の分解を行うため、DNA への 8-oxoG の取り込みを抑制するだけでなく、細胞内シグナル伝達物質としての 8-oxoG を減少させる。近年シグナル伝達物質としての 8-oxoG が生体の維持に重要であるとの報告がある。今回の実験においては動脈硬化に対する防御に 8-oxoG が有用である可能性が示された。この可能性を示すためにはさらに実験が必要と考えられた。

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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

(1) 鳥巢久美子、張学礼、中別府雄作、脳梗塞感受性遺伝子である *PRKCH* は動脈硬化の進展に関与するか? 九州 CVD カンファレンス第一回研究会、2008/12/13、福岡

(2) 鳥巢久美子、張学礼、野中麻里、中別府雄作、**Disruption of *Prkch* gene for protein kinase C η efficiently attenuates atherosclerosis in mice.** 2008/12/9、第 32 回分子生物学会年会

(3) 鳥巢久美子、張学礼、野中麻里、中別府雄作、脳梗塞感受性遺伝子 *Prkch* の欠損は *ApoE* 遺伝子欠損マウスにおける高脂血症と動脈硬化を改善する、第 2 回 Kyushu CVD

Conference、2010/1/23、福岡
[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/nfg/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥巢久美子 (Torisu Kumiko)

九州大学・生体防御医学研究所・非常勤研究員

研究者番号：20448434

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし