

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 20 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010 ～ 2012

課題番号：22590528

研究課題名（和文） 動脈硬化の DNA 損傷・修復機構連関に基づく新規診断法の開発

研究課題名（英文） A new biomarker for atherosclerosis

研究代表者

石田 万里（ISHIDA MARI）

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・講師

研究者番号：30359898

研究成果の概要（和文）：

動脈硬化の病態のうちゲノム損傷修復異常の側面から新規診断法を開発することが本研究の目的である。ゲノム損傷修復異常をもつ動脈硬化マウスを用いた実験から、ゲノム修復機構の異常は細胞DNAに二本鎖切断を蓄積させ、動脈硬化を増悪させることを証明した。動脈硬化の発症メカニズムとしてゲノム損傷の蓄積という点に着目し、動脈硬化の新規診断法として、体細胞に蓄積しているゲノム損傷を定量化する方法を確立し、有用性を検討した。確立した検査法は動脈硬化の危険因子のひとつ、喫煙を検出できることを証明した。本検査法がその他の危険因子を含む総合的なリスク評価において有用かどうかをさらに検討していきたい。現在の動脈硬化の有無だけでなく、総合的なリスク評価として用いることができれば、予防医学上、非常に有用である。

研究成果の概要（英文）：

The aim of this study is to find a biomarker for atherosclerosis or its comprehensive risk factors from the point of view of DNA damage/repair. The experiments using atherosclerotic mice lacking DNA damage response revealed that abnormality in DNA damage-repair accumulates DNA damage and accelerates atherosclerosis. According to the results, we established the method to quantify DNA damage, especially double strand breaks in human mononuclear cells. We showed that this method precisely detect one of the atherosclerotic risk factors, smoking. It is important for preventive medicine to further verify whether this method can estimate other risk factors comprehensively.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：循環器内科学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：DNA 損傷、DNA 修復、DNA 損傷応答、動脈硬化、DNA 二本鎖切断

## 1. 研究開始当初の背景

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・早老症候群は若年における動脈硬化を主症状の一つとするが、最近その病因がゲノム損傷修復異常であることが明らかにされつつある。また被爆者の追跡調査から被爆線量と動脈硬化性心疾患の罹患率に相関のあることも報告されている。これらの知見から、我々はゲノム損傷および修復異常と動脈硬化との関連に興味をいだいた。

我々は培養血管細胞を用いた実験から、酸化ストレスはゲノムの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、修復系のシグナルを活性化すると同時に、p21などの細胞分裂抑制因子の誘導、つまり老化の形質をも誘導することを見いだした。また、ヒト動脈硬化巣内にDNA二重鎖切断とアポトーシスに陥った細胞が多数存在することも証明した。

## 2. 研究の目的

上記の結果から、動脈硬化の成因にゲノムの損傷が重要であることが示唆された。本研究では遺伝子改変マウスを用いて、ゲノム損傷の動脈硬化への関与を明確にし、これを基盤として動脈硬化の新規診断法を開発する。

## 3. 研究の方法

本研究では、動脈硬化進展度診断の新規開発の基盤となるエビデンス、すなわちゲノム損傷修復異常と動脈硬化発症の関連を明らかにする過程において、診断法に用いるべき臨床検査項目を探索・確立し、実際の動脈硬化症患者においてその診断精度を検証する。

### (1) 機序解析:

動脈硬化マウス(ApoE ノックアウトマウス;

ApoE-KO マウス)とゲノム損傷修復異常マウス(Ku80 ノックアウトマウス;Ku80-KO マウス)の交配による二重変異マウスを作製し、動脈硬化巣の比較検討により、ゲノム損傷と動脈硬化の関連を直接的に証明する。

(1)-1. 二重変異マウスの動脈硬化巣形成促進の有無を、大動脈標本の Oil Red O 染色により比較検討により明らかにする。

(1)-2. 二重変異マウス動脈硬化巣の病理学的・分子生物学的変化を解析する: DNA 修復システムの欠如によるその下流の修復系シグナルの変化を検討する。動脈硬化形成における以下の現象の重要性についても検討する。

①動脈硬化巣におけるDNA二本鎖切断の増減を検討する。

②活性化されている修復機構シグナルを解析する。

③動脈硬化巣を構成する細胞の運命、特にアポトーシスの重要性を解析する。

### (2)臨床検査項目の探索・検査法の確立:

(1)の機序解析時に、動脈硬化巣アポトーシス細胞数と血中遊離DNA量の関係を明らかにし、測定項目・方法を確立する。すなわち、血中遊離DNA量と病理組織所見との関連を検討する:ゲノムの損傷によりアポトーシスに陥った細胞は分解され細胞核内のDNAは血中に遊離する。従ってアポトーシスの増加した病態においては血中の遊離DNAが増加すると考えられる。これを証明することを目的に、二重変異マウスの血中遊離DNA量を測定し、組織TUNELによるアポトーシス細胞数との相関関係を検討する。

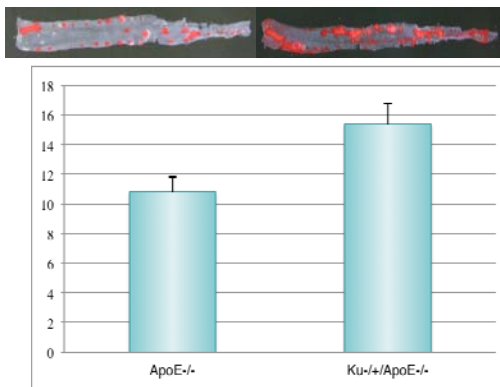
### (3)動脈硬化症患者における診断精度検証:

確立した方法を用いて動脈硬化症患者のリスク評価あるいは動脈硬化重症度の予測が可能かどうかを検討する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 機序解析:

動脈硬化マウス(ApoE-KO マウス)とゲノム損傷修復異常マウス(Ku80-KO マウス)の交配による二重変異マウスを作製し、4 週間の高脂肪食負荷による動脈硬化巣の形成について Oil-red-O 染色を用いて比較検討した。DNA 損傷に対する修復異常のある動脈硬化マウス(Ku80-+/ApoE-/-マウス)において有意に動脈硬化が促進していた(動脈硬化巣の大動脈全体に対する占有率:Ku80-+/ApoE-/-マウス;15.4 ± 1.4%, 対照 ApoE-/-マウス;10.8 ± 1.0%,  $p < 0.05$ , Mann-Whitney's U test)



8 週間の高脂肪食負荷後、動脈硬化巣に存在する DNA 二重鎖切断量(全細胞に対する陽性細胞の割合)とアポトーシス細胞割合は現在のところ、Ku80-+/ApoE-/- と対照 ApoE-/-マウス間で差がない。ただし、正常部に比べ動脈硬化巣に DNA 二重鎖切断が多く存在することは共通の所見であった。現在、2 週間の高脂肪食負荷後の DNA 二重鎖切断量およびアポトーシス細胞割合に差がないか、検討中である。(2 週間の高脂肪食負荷後の動脈硬化巣形成(Oil-red-O 染色)には差が認められない)

##### (2) 臨床検査項目の探索・検査法の確立:

血中遊離 DNA 量測定は FitAmp Circulating DNA Assay Kit (EPIGENTEK) を用いて行った。検体内誤差が大きく、また、(1)の結果より、血中遊離 DNA 量測定は断念した。

また、(1)の結果から動脈硬化を生じるメカニズムのひとつとしてゲノム損傷の蓄積という点に着目し、動脈硬化の新規診断法として、体細胞に蓄積しているゲノム損傷(DNA 二本鎖切断)の定量化を行う方法を確立した。心血管疾患のリスクとなる疾患(糖尿病や高血圧)において増加しているといわれている酸化ストレスは強力なゲノム損傷因子のひとつであることから、この DNA 二本鎖切断量を測定することによって動脈硬化の総合リスク評価を行えると同時に動脈硬化の程度を推測することができると考えた。

検体としては採取しやすい血球を選定し、被験者の採血検体から単核球を分離しこれを用いた。γH2AX 抗体(DNA 二本鎖切断を示す)による免疫染色を行い、蛍光顕微鏡を用いて γH2AX foci 数をカウントする。1 細胞あたりの foci 数および細胞全体における foci 陽性細胞を算出した。

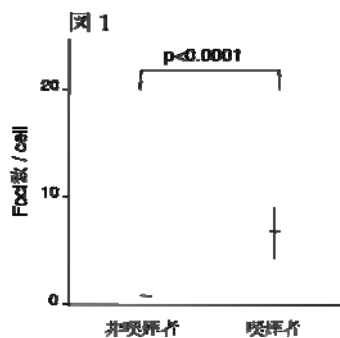
##### (3) 動脈硬化症患者における診断精度検証:

本方法を用い、DNA 二本鎖切断量測定により動脈硬化の独立したリスクファクターである喫煙を検出できるか否かを検討した。

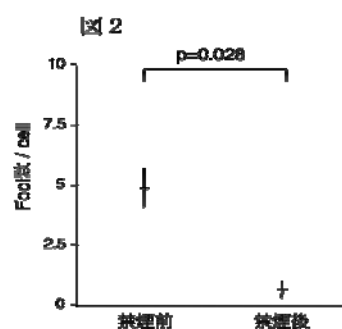
若年健康人を対象とし、単核球内 DNA 二本鎖切断量を喫煙の有無により比較検討した。

両群において、喫煙以外の年齢、body mass index、収縮期血圧、拡張期血圧、空腹時血糖、尿酸値、中性脂肪、コレステロール値に差は認められなかった。単核球内二本鎖切断量(1 細胞あたりの foci 数)は、非喫煙者  $0.5 \pm 0.1$  /cell、喫煙者  $6.5 \pm 2.4$  /cell と有意に喫煙者が多かった ( $p < 0.0001$ 、図 1)。

次に喫煙者が禁煙をした場合、本検査法がこのリスクの軽減を検出できるか否かの検討を行った(n=13)。



禁煙により細胞あたりの foci の数は  $4.8 \pm 0.8/\text{cell}$  から  $0.6 \pm 0.3/\text{cell}$  ( $p < 0.0277$ , 図 2) に減少した。禁煙前後での body mass index、収縮期血圧、拡張期血圧、空腹時血糖、尿酸値、中性脂肪、コレステロール値に差は認められなかった。



以上より我々の用いている単核球内二本鎖切断の評価法は喫煙のリスクを検出することにおいて鋭敏な方法であると考えられた。現在、喫煙以外の、動脈硬化のリスクファクターである加齢、脂質異常症、高血圧、糖尿病、肥満、高尿酸血症と単核球内二本鎖切断量の関係を検討している。症例数を蓄積し多変量解析を行いたい。

##### 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)

石田万里、石田隆史、DNA 損傷応答と動脈硬化、細胞、査読無、43 (6) 215-219、2011

[学会発表] (計 6 件)

1. Takafumi Ishida、Cigarette Smoking Induces DNA Damage in Human Cells、

3rd International symposium of RIRBM、2013 年 02 月 12 日、広島

2. Mari Ishida、Cigarette Smoking Induces DNA Damage in Human Mononuclear Cells、第 76 回日本循環器学会、2012 年 3 月 18 日、福岡

3. Mari Ishida、DNA Double-Strand Breaks: A Possible Mechanisms for Atherosclerosis Formation and Progression、広島大学原爆放射線医科学研究所 第 1 回国際シンポジウム (招待講演)、2011 年 3 月 4 日、広島

4. Mari Ishida、Oxidative Stress Induces DNA Double Strand Breaks and Activation of DNA Damage Responses in Vascular Cells、広島大学原爆放射線医科学研究所 第 1 回国際シンポジウム (招待講演)、2011 年 3 月 3 日、広島大学

5. Takafumi Ishida、The role of DNA damage response in atherosclerosis and vascular smooth muscle cell apoptosis、INTERNATIONAL ACADEMY OF CARDIOLOGY, 15th WORLD CONGRESS ON HEART DISEASE, ANNUAL SCIENTIFIC SESSIONS 2010 (招待講演)、2010 年 7 月 26 日、the Hyatt Regency Vancouver, Vancouver, BC, Canada

6. Mari Ishida、Oxidative stress induces DNA double strand breaks and DNA damage response、INTERNATIONAL ACADEMY OF CARDIOLOGY, 15th WORLD CONGRESS ON HEART DISEASE, ANNUAL SCIENTIFIC SESSIONS 2010、2010 年 7 月 25 日、the Hyatt Regency Vancouver, Vancouver, BC, Canada

[その他]

ホームページ等

<http://home.hiroshima-u.ac.jp/seiri1/>

##### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

石田 万里 (ISHIDA MARI)

広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・講師

研究者番号：30359898

(2) 研究分担者

石田 隆史 (ISHIDA TAKAFUMI)  
広島大学・大学院医歯薬保健学研究院・  
講師  
研究者番号：40346482

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号：