

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09122

研究課題名(和文) DNA損傷の定量を基盤とした心血管病リスクマーカーの確立

研究課題名(英文) Biomarker for cardiovascular disease risk based on quantification of DNA damage

研究代表者

石田 万里 (Ishida, Mari)

広島大学・医歯薬保健学研究科(医)・准教授

研究者番号：30359898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：様々な疾患の病態とDNA損傷修復系との関連が明らかにされている。糖尿病、高血圧、喫煙、脂質異常症、加齢などの心血管病危険因子が疾患発症に寄与する度合いは各個人の細胞の応答の違いによって異なることから、個々人の細胞応答の結果を包括的に表す指標として、単核球内DNA二本鎖切断量を候補とし検証した。単核球内DNA二本鎖切断量は、動脈硬化の有無ではなく、ある特定の危険因子との間に相関を示すことが判明した。このことはリスクの層別化に寄与するという点で重要であり、引き続き症例数を増やすと同時にその機序についても検討を進める。

研究成果の概要(英文)：The relationship between the pathology of various diseases and the DNA damage repair system has been clarified. The contribution of cardiovascular risk factors such as diabetes, hypertension, smoking, dyslipidemia, and aging to disease onset depends on the difference in response of individual's cells. We investigated whether the amount of DNA double strand breaks (DSBs) in the mononuclear cells may be an inclusive biomarker for the risks. We found that the amount of DSBs in the mononuclear cell correlates with a specific risk factor rather than the presence of arteriosclerosis. This is important in contributing to the stratification of risk, and we will continue to study the mechanism while increasing the number of cases.

研究分野：循環器内科学

キーワード：DNA損傷 動脈硬化 老化 危険因子

## 1. 研究開始当初の背景

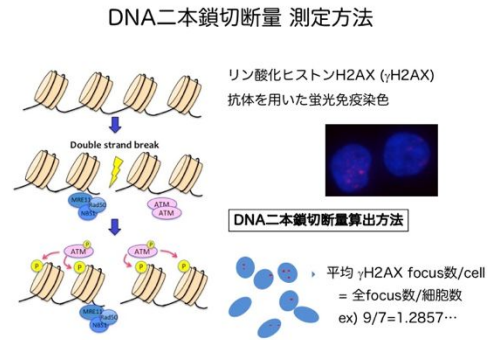
近年、様々な疾患の病態と DNA 損傷修復系との関与が明らかにされつつある。特に癌、老化などにおいて DNA 損傷修復系は重要な役割を果たすことが知られているが、最近の研究により DNA 損傷に対する細胞応答の不備が DNA 損傷の蓄積および慢性的な損傷応答の活性化を惹起し、動脈硬化の形成・進展に関わっていることが示唆されている (Nat Clin Pract Cardiovasc Med. 2008;5:637-48, Circ Res.2008;103:717-725, Circulation 2013;127:386-96)。DNA 損傷のなかでも最も重篤で修復困難な損傷が DNA 二本鎖切断であり、それゆえ二本鎖切断は細胞のアポトーシスや老化、癌化など、細胞の運命に関わっている。

原爆被爆者は動脈硬化性疾患罹患率が高いこと、ゲノム修復異常を病態基盤とする先天性疾患 (ウェルナー症候群などの早老症や血管拡張性失調症 (Ataxia Telangiectasia)) において若年における動脈硬化が認められることから、ゲノム損傷・修復異常と動脈硬化との関連を探る研究を行ってきた。これまでに、ヒトの動脈硬化巣に DNA 二本鎖切断が蓄積していることを示し (PLoS One. 9(8):e103993, 2014) また DNA 修復異常を示す動脈硬化マウス (Ku80 と ApoE の二重改変マウス (ApoE<sup>+/+</sup>/Ku<sup>-/-</sup>)) においては、DNA 二本鎖切断の増加と動脈硬化の増悪が認められること、動脈硬化が顕著化する以前にすでに大動脈に DNA 二本鎖切断の蓄積が認められることを見いだした。以上より、DNA 二本鎖切断の存在は動脈硬化進展の予測因子となる可能性が示唆された。

動脈硬化の危険因子である糖尿病、肥満、喫煙などは体内の酸化ストレスを上昇させるが、その酸化ストレスは強力なゲノム損傷因子のひとつである。上記の実験結果も合わせ、細胞の DNA 二本鎖切断量は動脈硬化のリスクを総和的に評価しうると考え、トランスレーショナルなアプローチとして、生体試料を用いたゲノム損傷の程度を評価する手法を確立した。具体的には、採取の安易な末梢血液中の単核球を単離し、DNA 二本鎖切断を検出する H2AX 抗体を用いて、単核球内 DNA 二本鎖切断の定量的測定法を確立した (図 1)。

本手法を用いて、心血管病および癌の危険因子である喫煙が体細胞にゲノム損傷を惹起していることを示した (PLoS One.9(8):e103993, 2014)。

図 1.



## 2. 研究の目的

糖尿病、高血圧、喫煙、脂質異常症、加齢などの心血管病危険因子が、疾患発症に寄与する度合いは各個人によって異なる。この寄与度の違いは各個人の細胞の応答の違いによると考えている。すなわち、同等のリスクが存在しても細胞がどのように反応するかによって生じる結果 (心血管病発症の有無) は異なってくる。そこで、本研究では、単核球内 DNA 二本鎖切断量をリスクに対する細胞の応答の結果ととらえ、DNA 二本鎖切断量が心血管病リスクマーカーとして有用か否かを検証することを目的とした。

## 3. 研究の方法

臨床症状、あるいは危険因子から心血管疾患が疑われ、頸動脈エコー、心臓CT、あるいは冠動脈造影を行う患者を対象とし、単核球内 DNA 二本鎖切断量測定をリン酸化ヒストン H2AX ( γH2AX ) 抗体を用いて検出した。

- (1) 患者の有する個々の心血管病危険因子と単核球内 DNA 二本鎖切断量の関係を検出し、単核球内 DNA 二本鎖切断量が危険因子の総和を反映しているか否かを検討した。
- (2) 単核球内 DNA 二本鎖切断量が現存する動脈硬化の有無、程度 (頸動脈エコー、心臓CT、冠動脈造影から評価) と相関するか否かを検討した。

## 4. 研究成果

H2AX 抗体を用いた単核球 DNA 二本鎖切断量の信頼性を増すために、MetaSystems (MetaSystems Hard & Software GmbH, Althluthsheim, Germany) を用いた自動撮影システムおよび Metafer classifier (MetaSystems) による foci 数の自動

カウントシステムを構築し以下の検討を行った。

64 人の患者を解析した。現在男性 49 人、女性 15 人、年齢（平均±標準偏差）61.8±8.9 歳、患者背景を表 1 に示す。

表 1.

	平均±標準偏差
年齢 (歳)	62.1 ± 13.0
Body Mass Index (kg/m <sup>2</sup> )	23.4 ± 6.5
収縮期血圧 (mmHg)	120.4 ± 14.4
拡張期血圧 (mmHg)	70.5 ± 10.0
喫煙量 (Pack·year)	17.1 ± 25.8
LDLコレステロール (mg/dL)	124.5 ± 49.7
HDLコレステロール (mg/dL)	58.4 ± 15.7
トリグリセリド (mg/dL)	188.3 ± 283.1
空腹時血糖 (mg/dL)	121.2 ± 43.6
HbA1c (%)	6.5 ± 0.8
尿酸 (mg/dL)	5.6 ± 1.2
クレアチニン (mg/dL)	0.85 ± 0.22
NT-proBNP (pg/mL)	495.9 ± 736.4

(1) 患者の有する個々の心血管病危険因子と単核球内 DNA 二本鎖切断量の関係：目標数に達していないので今後症例数を増やし single regression および multiple regression 解析を行う。現時点で単核球内 DNA 二本鎖切断量と相関する危険因子を二項目認めている。

(2) 単核球内 DNA 二本鎖切断量と現存する動脈硬化の有無、程度との関係：現在の症例のうち、動脈硬化を冠動脈 CT にて確認した症例が 47 例、頸動脈エコーにより確認した症例が 6 例である。動脈硬化を冠動脈 CT にて確認した症例のみで解析すると、冠動脈硬化のない症例が 24 例、冠動脈硬化のある症例が 23 例で、単核球内 DNA 二本鎖切断量はそれぞれ、 $1.14 \pm 1.17/\text{cell}$ 、 $1.36 \pm 1.41/\text{cell}$  で両者に有意差は認められなかった。今後目標数に達するまで研究を続ける。

## 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 10 件)すべて査読有り

1. Ariyandy A\*, Sakai C\*, Ishida M\*, Mizuta R, Miyagawa K, Tashiro S, Kinomura A, Hiraaki K, Ueda K, Yoshizumi M, Ishida T. XRCC3

polymorphism is associated with hypertension-induced left ventricular hypertrophy. *Hypertens Res.* 41:426-434, 2018 (\*equally contributed)

2. Miyamoto T, Akutsu SN, Tauchi H, Kudo Y, Tashiro S, Yamamoto T, Matsuura S. Exploration of genetic basis underlying individual differences in radiosensitivity within human populations using genome editing technology. *J Radiat Res.* 59:ii75-ii82, 2018
3. Shi L, Tashiro S. Estimation of the effects of medical diagnostic radiation exposure based on DNA damage. *J Radiat Res.* 59:ii121-ii129, 2018
4. Sakai C, Ishida M, Ohba H, Yamashita H, Uchida H, Yoshizumi M, Ishida T. Fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acids attenuate oxidative stress-induced DNA damage in vascular endothelial cells. *PLoS One.* 12:e0187934, 2017
5. Fukumoto W, Ishida M, Sakai C, Tashiro S, Ishida T, Nakano Y, Tatsugami F, Awai K. DNA damage in lymphocytes induced by cardiac CT and comparison with physical exposure parameters. *Eur Radiol.* 27:1660-1666, 2017
6. Kamata R, Bumdelger B, Kokubo H, Fujii M, Yoshimura K, Ishida T, Ishida M, Yoshizumi M. EPA Prevents the Development of Abdominal Aortic Aneurysms through Gpr-120/Ffar-4. *PLoS One.* 11:e0165132, 2016
7. Livingston GK, Khvostunov IK, Gregoire E, Barquinero JF, Shi L, Tashiro S. Cytogenetic effects of radioiodine therapy: a 20-year follow-up study. *Radiat Environ Biophys.* 2016 May;55:203-13, 2016
8. Bumdelger B, Kokubo H, Kamata R, Fujii M, Yoshimura K, Aoki H, Orita Y, Ishida T, Ohtaki M, Nagao M, Ishida M, Yoshizumi M. Osteoprotegerin Prevents Development of Abdominal Aortic Aneurysms. *PLoS One.* 11:e0147088, 2016
9. Misumi K, Sun J, Kinomura A, Miyata Y, Okada M, Tashiro S. Enhanced gefitinib-induced repression of the

- epidermal growth factor receptor pathway by ataxia telangiectasia-mutated kinase inhibition in non-small-cell lung cancer cells. *Cancer Sci.*107:444-51, 2016
- Okimoto S, Sun J, Fukuto A, Horikoshi Y, Matsuda S, Matsuda T, Ikura M, Ikura T, Machida S, Kurumizaka H, Miyamoto Y, Oka M, Yoneda Y, Kiuchi Y, Tashiro S. hCAS/CSE1L regulates RAD51 distribution and focus formation for homologous recombinational repair. *Genes Cells*. 2015 Sep;20:681-94, 2015

[学会発表](計 10件)

- 石田万里, 坂井千恵美, 吉栖正生, 石田隆史. ゲノム損傷と動脈硬化. 第49回日本動脈硬化学会総会. 2017年7月6日(木) 広島(グランドプリンスホテル広島)シンポジウム
- Bumdelger Batmunkh, Hiroki Kokubo, Ryo Kamata, Masayuki Fujii, Takafumi Ishida, Mari Ishida, Koichi Yoshimura, Masao Yoshizumi. Role of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-osteoprotegerin (OPG) axis in the development of abdominal aortic aneurysm. 第49回日本動脈硬化学会総会. 2017年7月6日(木) 広島(グランドプリンスホテル広島)
- 石田万里, 坂井千恵美, 平川稔明, 田代聡, 吉栖正生, 石田隆史. みそによるDNA損傷抑制効果 第4回みそサイエンス研究会総会 東京(コートヤード・マリオット銀座東武ホテル) 2017年6月6日(火)
- Chiemi Sakai, Mari Ishida, Andi Ariyandy, Takamasa Mizuta, Keitaro Ueda, Masao Yoshizumi, Takafumi Ishida. XRCC3 polymorphism is associated with hypertension-induced left ventricular hypertrophy. 第81回日本循環器学会 The 81<sup>th</sup> Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. March 17-19, 2017 発表日時: 2017年3月17日(金)
- Andi Ariyandy, Chiemi Sakai, Mari Ishida, Masao Yoshizumi, Satoshi Tashiro, Kiyoshi Miyagawa, Takafumi Ishida. XRCC3 Polymorphism and hypertension-induced left ventricle hypertrophy. The 1st International Symposium of the network-type Joint Usage/Research Center for Radiation Disaster Medical Science. (第1回放射線災害医科学研究拠点国際シンポジウム) 2017年2月22日 広島

- 石田万里, 坂井千恵美, 福本航, 粟井和夫, 吉栖正生, 石田隆史. 放射線診断検査によるDNA損傷の検討 第57回日本脈管学会総会 2016年10月14日(金) 奈良(ホテル日航奈良)
- 坂井千恵美, 石田万里, 上田瞳, 吉栖正生, 石田隆史. n-3系多価不飽和脂肪酸は血管内皮細胞のDNA損傷を軽減する 第39回日本高血圧学会総会 仙台国際センター 2016.9.30~2016.10.2 2016.9.30 発表
- 坂井千恵美, 石田万里, アリヤンディ・アンディ, 日下美穂, 平昭浩司, 吉栖正生, 石田隆史. ゲノム修復関連蛋白 XRCC3 の遺伝子多型と心肥大の関連 第38回日本高血圧学会総会 愛媛県県民文化会館 2015.10.9-10
- Wataru Fukumoto, Mari Ishida, Satoshi Tashiro, Kenji Kajiwara, Makoto Iida, Kazuo Awai, Chikako Fujioka, Masao Kiguchi. DNA Double-strand Breaks in Blood Lymphocytes of Patients Undergoing Coronary CT: Comparison with the Physical CT Radiation Exposure Index. *RSNA* 2015., Nov.29-Dec 4, 2015 (Dec.2 発表) Oral, MacCORMICK PLACE, Chicago, USA
- Chiemi Sakai, Mari Ishida, Yasuki Kihara, Masao Yoshizumi, Takafumi Ishida. Fish oils, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid, attenuate oxidative stress-induced DNA damage in vascular endothelial cells. (poster 303) *ESC Congress* 2015. August 29-September 2 (H27) (8月30日発表). EXCEL LONDON, UK

[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://home.hiroshima-u.ac.jp/seiri1/topics/index.html>

## 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科

准教授

研究者番号 : 30359898

### (2) 研究分担者

石田 隆史 ( ISHIDA, TAKAFUMI )

福島県立医科大学. 循環器内科学・教授

研究者番号 : 40346482

### (3) 連携研究者

田代 聡 ( TASHIRO, SATOSHI )

広島大学. 原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号 : 20243610