

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：84404

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09014

研究課題名(和文)心筋細胞のDNA損傷応答におけるDNAメチル化制御機構の役割

研究課題名(英文)The role of DNA methylation in anticancer drug-induced cardiomyocyte toxicity

研究代表者

細田 洋司 (HOSODA, HIROSHI)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・研究所・客員研究員

研究者番号：40359807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：抗がん剤起因性心不全は、がん患者のQOLや生命予後に直接影響を与えるため臨床的社会的な問題であるが、そのメカニズムは不明な点も多い。本研究において、抗がん剤投与によって、心筋細胞DNA損傷と心室BNP遺伝子の発現抑制が認められた。BNP遺伝子発現抑制に、プロモーター領域のDNAメチル化亢進が関与していた。心筋細胞特異的DNAメチル化酵素欠損マウスでは、抗がん剤によるBNP遺伝子抑制が認められなかった。抗がん剤の心筋障害時に、これまで知られていなかったDNAメチル化修飾によるBNP遺伝子発現制御系が機能していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

果によって、抗がん剤心毒性の病態理解や心筋細胞のDNA損傷応答の解明、心不全バイオマーカー応用研究等への展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Anticancer drug-induced heart failure impacts the quality of life and life expectancy of cancer patients, and remains a clinical and societal issue, but the mechanisms of cardiomyocyte injury remains unclear. In the present study, focusing on the transcriptional regulation of the BNP gene, the DNA damage response of cardiomyocytes induced by anticancer drugs and the role of epigenetic modifications in gene expression changes were investigated. The following were revealed: 1) Anticancer drug treatment resulted in cardiomyocyte DNA damage and suppression of ventricular BNP gene expression; 2) The suppression of BNP gene expression was accompanied by increased DNA methylation of the promoter region; 3) In mice deficient in cardiomyocyte-specific DNA methyltransferase, BNP gene suppression by anticancer drugs was not observed. During DNA damage in cardiomyocytes caused by anticancer drugs, the BNP gene expression is regulated by the DNA methylation modification system.

研究分野：ペプチド化学

キーワード：ナトリウム利尿ペプチド 腫瘍循環器学 DNAメチル化

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム DNA は、生命の遺伝情報を担うとともに転写制御にも関わり、細胞の構造と機能を統合している最も重要な生体高分子である。生物をとりまく環境中では細胞のゲノム DNA は多くの内外の物理的、化学的因子によって絶え間なく損傷を受けており、放射線や酸化ストレス等は細胞にとって重篤な DNA 鎖切断を引き起こす。細胞は DNA 損傷に対して DNA 修復やアポトーシスを誘導し、DNA の安定性を維持している。DNA 損傷応答機構の破綻は DNA 変異の蓄積を来し、細胞の老化やがん化の原因となる。一方、進化とともに細胞の DNA 損傷応答・修復機構も高度に発達、多様化している。これまでに心筋虚血性や圧過負荷誘導性の心不全発症に DNA 損傷や修復応答が深く影響していることが報告されている (Nat Commun 2011;2:593、Nat Commun 2017;8:15104) が、心筋細胞における DNA 損傷応答・修復機構の分子レベルでの理解はあまり進んでいない。抗がん剤の多くはがん細胞の DNA 損傷・合成阻害をきたすことでその効果を発揮する。アントラサイクリン系薬剤や白金製剤、代謝拮抗剤等は DNA2 本鎖切断を来す薬剤である。一方、抗がん剤はがん細胞以外の正常細胞にも作用する。抗がん剤が引き起こす心筋細胞障害は心不全の発症リスクとなり、がん患者の QOL や生命予後に影響を与えるため、臨床的かつ社会的に問題となっている。

抗がん剤性心筋細胞障害の病態解明と早期診断バイオマーカーの同定を目的に、抗がん剤治療症例において血中サイトカインやホルモンの変化を検討し、抗がん剤治療開始早期に心不全マーカーである BNP (brain natriuretic peptide) が低下することを報告している (Anticancer Res 2017;37:3505)。また、抗がん剤投与マウスの予備検討において、心筋細胞の DNA 損傷・修復応答の時期に一致した BNP 遺伝子の発現変化と、BNP 遺伝子のプロモーター領域の DNA メチル化変化を見出した。細胞の DNA 修復シグナルやクロマチン構造変化に対するヒストン修飾の重要性は報告されているが、DNA 損傷・修復応答と DNA メチル化との関連性は全く知られていない。抗がん剤による心筋細胞の DNA 損傷・修復応答に対する転写調節系を含めた多様なエピジェネティック制御機構が存在するものと考えられる。

## 2. 研究の目的

DNA 損傷応答・修復機構は、大腸菌や酵母を用いた遺伝学的解析により分子レベルでの研究が進んでおり、ヒトにおいても遺伝性の DNA 修復異常疾患の原因究明の過程で徐々に明らかとなってきた。しかし、非分裂細胞である心筋細胞の DNA 損傷・修復応答に焦点を当てた研究はほとんど行われていない。本研究では、心筋細胞に特異的に発現している BNP に着目して、抗がん剤に対する心筋細胞の DNA 損傷応答と、BNP 遺伝子転写制御及び DNA メチル化及び DNA メチル化酵素 (DNA methyltransferases : DNMT) によるエピジェネティック修飾の意義について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

C57BL/6 マウスに抗がん剤を投与し、0、1、3、5、7、14 日後に経時的に心室をサンプリングして以下の検討を行った。

抗がん剤による心筋細胞 DNA 損傷と BNP 遺伝子発現変化について

DNA 損傷・修復マーカーである免疫組織学的な  $\gamma$ H2AX 発現を指標に、抗がん剤 (ドキソルビシン、シスプラチン、シタラビン) とその投与量を最適化した。その条件において、RT-qPCR 法で心室 BNP の遺伝子発現を解析した。

BNP プロモーター領域の DNA メチル化パターン解析

Bisulfite sequencing 法を用いて、BNP 遺伝子発現変化と DNA メチル化パターンを比較検討した。

DNA メチル化が BNP 転写活性に及ぼす影響を評価

BNP プロモーターの転写開始点上流の CpG 配列を DNA メチル化酵素 (SssI) でメチル化もしくは非メチル化のプロモーターを含む reporter plasmid を HEK293 細胞に導入し、reporter gene assay にて両プロモーターの活性を比較検討した。

BNP プロモーター領域 DNA メチル化修飾に関わる DNMT について

DNMT のアイソフォームである DNMT1、DNMT3a、DNMT3b の各特異的抗体を用いた Chip-qPCR 解析を行い、BNP プロモーター領域の DNA メチル化制御に関わる制御機構を検討した。

in vivo レベルで DNA メチル化修飾と BNP 転写調節の関連性を確認

Cre-loxP system を用いて心筋細胞特異的な DNMT 遺伝子の欠損マウスを作製し、抗が

ん剤投与による BNP 転写調節における DNMT の役割を検討した。

#### 4 . 研究成果

抗がん剤による心筋細胞 DNA 損傷と BNP 遺伝子発現変化について

白金製剤シスプラチン投与後、心筋細胞に  $\gamma$ H2AX 発現を認めた。心室 BNP の遺伝子発現は、抗がん剤投与 3 日後に一過性の発現低下を認め、その後徐々に遺伝子発現は回復した。

BNP プロモーター領域の DNA メチル化パターン解析

抗がん剤投与 3 日後に、BNP プロモーターの CpG 部位の DNA メチル化亢進が一過性に認められた。

DNA メチル化が BNP 転写活性に及ぼす影響を評価

BNP 転写開始点付近の DNA メチル化亢進によって、BNP 遺伝子発現が抑制された。

BNP プロモーター領域 DNA メチル化修飾に関わる DNMT について

Chip-qPCR 解析において、BNP プロモーター領域 DNA と特異的に結合する DNMT は特定できなかった。

in vivo レベルで DNA メチル化修飾と BNP 転写調節の関連性を確認

1 つの心筋細胞特異的 Dnmt 欠損マウスにおいて、抗がん剤投与による BNP 遺伝子発現低下は認められなかった。

抗がん剤の心筋障害時には、これまで知られていなかった DNA メチル化修飾による BNP 遺伝子発現制御系が機能していることが明らかとなった。本結果によって、抗がん剤心毒性の病態理解や心筋細胞の DNA 損傷応答の解明、心不全バイオマーカー応用研究等への展開が期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Nonaka Miki, Hosoda Hiroshi, Uezono Yasuhito	4. 巻 190
2. 論文標題 Cancer treatment-related cardiovascular disease: Current status and future research priorities	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical Pharmacology	6. 最初と最後の頁 114599 ~ 114599
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bcp.2021.114599	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0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 DNA損傷抑制または修復に関する権利	発明者 細田洋司、寒川賢治	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2019/222050	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------