

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461852

研究課題名(和文)放射線誘発性動脈硬化性疾患の発症メカニズムにおけるDNA損傷応答の役割

研究課題名(英文)The molecular mechanism of radiation-induced acceleration of atherosclerosis

研究代表者

石田 隆史 (Takafumi, Ishida)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：40346482

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)：乳ガンや頭頸部ガンに対する放射線治療後に虚血性心疾患や脳卒中などの発症率が増加することが近年問題になっている。本研究は、放射線による動脈硬化病変が増悪するメカニズムをDNA損傷の視点から明らかにすることを目的として行った。オスのApoEノックアウトマウスの胸部大動脈に放射線10Gyを照射した。放射線照射後、標準食で2か月間飼育した後に、大動脈を採取した。放射線照射群の大動脈弁輪部の動脈硬化巣面積は非照射群に比して有意に大であった。免疫組織化学染色による検討などから、放射線による動脈硬化病変が増悪には、DNA損傷の蓄積、DNA損傷応答の活性化、炎症などが関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：It has been well recognized that radiotherapy increases the risk of atherosclerotic cardiovascular disease. The object of this study was to clarify the mechanism of radiation-induced acceleration of atherosclerosis. Thoracic aorta of apoE-deficient (apoE-KO) mice were irradiated with the dose of 10Gy and kept on a normal chow diet for 8 weeks. The plaque area was significantly increased in aortic roots of irradiated apoE-KO mice compared with control mice. Infiltration of inflammatory cells and hemorrhage was observed in the plaque. Additionally, immunohistochemical study revealed that gamma-H2AX and phospho-ATM staining were increased in the plaque of irradiated apoE-KO mice. These results suggest that accumulation of DNA damage and activation of DNA damage response is involved in the mechanism of radiation-induced acceleration of atherosclerosis.

研究分野：動脈硬化

キーワード：DNA損傷 動脈硬化 放射線被ばく

1. 研究開始当初の背景

最近の研究により、早老症候群の原因遺伝子のほとんどが DNA 損傷 / 損傷応答に関与する分子をコードすることが明らかとなった。近年、動脈硬化病変において DNA の二重鎖切断など種々の DNA 損傷が蓄積していることが報告されている。我々も、ヒト動脈硬化病変において DNA の二重鎖切断と酸化的損傷が同じ部位に蓄積していることを見いだした。さらに我々は、虚血性心疾患の強力な危険因子である喫煙が、末梢血単核球 DNA の二重鎖切断をもたらすことを見いだした。これらの知見から、動脈硬化の進展機序として DNA 損傷の関与が強く示唆される。

乳ガンなどの胸部悪性腫瘍に対する放射線治療により、虚血性心疾患が増加することは古くから指摘されている。同様に頭頸部ガンに対する放射線治療により、脳卒中のリスクが増加することも知られている。また原爆の被爆者においても、被曝線量に比例して虚血性心疾患や脳卒中の発症率が増えることが報告されている。このように放射線被曝が動脈硬化病変を促進し、心血管疾患のリスクを増やすことは明らかであるが、その機序に関する検討はこれまでは病理学的検討が主であり、分子メカニズムはほとんど不明である。

2. 研究の目的

放射線による動脈硬化病変の加速には DNA 損傷 / DNA 損傷応答が関与している、という仮説を検証する。そのためにマウスの放射線誘発動脈硬化モデルを作成し、放射線誘発動脈硬化における DNA 損傷の存在、および DNA 損傷応答の活性化を観察する

3. 研究の方法

60-70 日齢のオスの動脈硬化自然発症マウス (ApoE ノックアウトマウス) の胸部大動脈に MBR-1520R-3 を用いて 10Gray の単回照射した。胸部大動脈以外の部分は鉛により防護した。放射線照射後、標準食で 2 か月間飼育した後に、大動脈を採取し、HE 染色、Oil red-O 染色、MOMA-2 抗体を用いた免疫組織化学などを行い、プラークのサイズ、破綻の有無、炎症細胞浸潤の観察を行う。被曝モデルマウスの大動脈において、最も重篤な DNA 損傷である 2 本鎖切断を γ H2AX (ヒストン蛋白である H2AX のリン酸化体) に対する抗体による免疫組織化学により検出する。また DNA 損傷に対する初期応答を制御する中心的な分子 Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) の活性を、抗リン酸化 ATM 抗体を用いた免疫組織化学により大動脈の動脈硬化巣において検討する。

4. 研究成果

1) 血清コレステロール値、LDL-コレステロール、HDL-コレステロール、中性脂肪、CRP は放射線照射群、非照射群の間で差は無かつ

た。放射線照射群の大動脈弁輪部の動脈硬化巣面積は非照射群に比して有意に大であった (7.04 ± 0.76 vs. 4.57 ± 0.58 , 任意単位)。放射線を照射した大動脈弁輪部においては、マクロファージや顆粒球の浸潤や出血が認められた。免疫組織化学染色による検討では、放射線照射群の大動脈弁輪部において γ H2AX と phospho-ATM の陽性細胞の増加が認められ、DNA 損傷の蓄積および DNA 損傷応答の亢進が示唆された (図 1、2)。

図 1

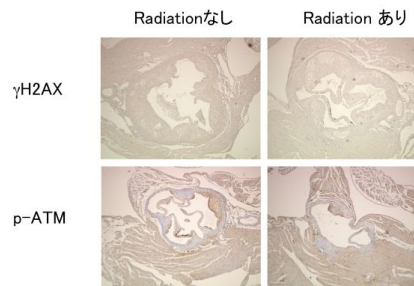
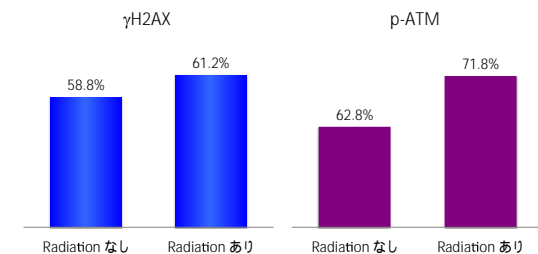


図 2



これに対し、より遠位の胸部大動脈における動脈硬化は放射線照射群において非照射群と比べても差が無かった。以上より、放射線による動脈硬化の増悪に DNA 損傷応答が関与することが示唆された。また動脈のなかでも部位によって放射線による影響が異なる可能性があり、今後部位別に放射線による影響を注意深く検討する必要がある。

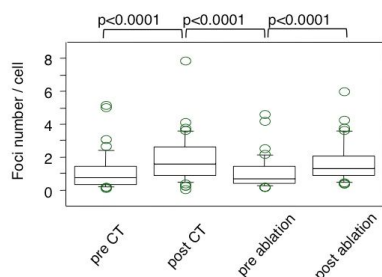
放射線照射は心臓にも影響を及ぼした。すなわち主として心外膜において著明な炎症細胞の浸潤、および線維化が認められた。

2) 放射線治療による被ばくに比べれば格段に低いのが、近年画像診断による放射線被ばくの健康への影響が問題になりつつある。そこで我々は心臓 CT による末梢血単核球の DNA 損傷の程度を検討した。まず血液をファントムに入れ CT 撮影装置上で ex vivo にて被ばくさせた。CTDI 50, 100, 150mGy の被ばくにて、 γ H2AX のフォーカス数はそれぞれ 36、103、130%増加した。

心臓 CT 検査を受けた 45 人の患者から採取した in vivo で被ばくした末梢血単核球にお

いては、 γ H2AX のフォーカス数は 59% 増加していた (図 3)。 γ H2AX は CT による被ばく量 (CTDI, DLP, SSDE) と正相関していた。以上のことから、CT 等の放射線画像診断によっても、DNA 損傷が生じ得ることが明らかになった。

図3. 心臓CTによるDNA二本鎖切断



今後は、放射線治療を受ける患者から採取した単核球において DNA 損傷を測定し、動脈硬化の程度との関連を検討するなど、実臨床においての検討を行いたい。

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 5 件)

1. Nishibuchi I, Suzuki H, Kinomura A, Sun J, Liu NA, Horikoshi Y, Shima H, Kusakabe M, Harata M, Fukagawa T, Ikura T, Ishida T, Nagata Y, Tashiro S. Reorganization of damaged chromatin by the exchange of histone variant H2A.Z-2. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2014;89:736-44. (査読有り)
2. Ishida M, Ishida T, Tashiro S, Uchida H, Sakai C, Hironobe N, Miura K, Hashimoto Y, Arihiro K, Chayama K, Kihara Y, Yoshizumi M. Smoking cessation reverses DNA double-strand breaks in human mononuclear cells. *PLoS One*. 2014;9:e103993. (査読有り)
3. 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*. 2016;11:e0147088. (査読有り)

4. 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*. 2017;27:1660-1666. (査読有り)

5. 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*. 2016;11:e0165132. (査読有り)

[学会発表](計 7 件)

1. 坂井千恵美、石田万里、木原康樹、吉栖吉栖正生、石田隆史。エイコサペンタエン酸は血管内皮細胞の DNA 損傷を軽減する。第 46 回日本動脈硬化学会、2014 年 7 月 10-11 日、東京
2. 檜垣忠直、栗栖智、日高貴之、福田幸弘、石田隆史、木原康樹。正常耐糖能、耐糖能異常、糖尿病患者における糖負荷に対する Augmentation Index の急性変化。第 37 回日本高血圧学会総会、2014 年 10 月 17 日-19 日、横浜
3. 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. *European Society of Cardiology Congress 2015*, 2015 年 8 月 29 日-9 月 2 日, London, UK
4. 坂井千恵美、石田万里、Andi Ariyandy、日下美穂、平沼浩司、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、2015 年 10 月 9 日-11 日、松山
5. 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、2016 年 9 月 30 日-10 月 2 日、仙台
6. 石田万里、坂井千恵美、福本航、栗井和

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
13-15 日、奈良

7. 坂井千恵美、Andi Ariyandy、石田万里、
吉栖正生、石田隆史。
XRCC3 polymorphism is associated with
hypertension-induced left ventricular
hypertrophy.
第 81 回日本循環器学会学術集会、2017 年
3 月 17-19 日、金沢

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

石田 隆史 (ISHIDA, Takafumi)
福島県立医科大学・医学部・教授
研究者番号：40346482

(2)研究分担者

石田 万里 (ISHIDA, Mari)
広島大学・医歯薬保健学研究院・講師
研究者番号：30359898

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし