
酸化的 DNA 塩基損傷の修復機構活性を介する
虚血再灌流心筋障害軽減効果の検討

(課題番号：14570630)

平成 14 年度～平成 15 年度科学研究費補助金
(基盤研究 (C))

研究成果報告書

平成 16 年 4 月

研究代表者 長谷部直幸
(旭川医科大学医学部 助教授)

酸化了的 DNA 塩基損傷の修復機構活性を介する

虚血再灌流心筋障害軽減効果の検討

(課題番号：14570630)

平成 14 年度～平成 15 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C))

研究成果報告書 平成 16 年 4 月

研究組織

研究代表者：長谷部直幸 (旭川医科大学医学部助教授)

交付決定額 (配分額)	(金額単位：千円)		
	直接経費	間接経費	合計
平成 14 年度	2000	0	2000
平成 15 年度	1500	0	1500

目次

1. 研究目的・背景
2. 研究結果
3. 研究成果：投稿論文 (英文のみ抜粋)
4. 研究成果：学会発表

【目的と背景】

虚血再灌流時に発生する活性酸素種 (ROS) は、心筋障害の主要な原因物質であり、DNA の酸化的塩基損傷をもたらす。申請者らは、代表的な酸化的 DNA 塩基損傷産物である 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) が実験的な虚血再灌流心筋細胞の DNA 中のみならず、ヒト急性心筋梗塞の再灌流療法時の末梢血白血球中においても増加することを明らかにした (Circulation 102, 2000)(Circulation 103, 2001)。一方このような損傷塩基は、生体内では一般的に DNA グリコシラーゼ、AP (apurinic/aprimidinic) エンドヌクレアーゼ、DNA ポリメラーゼ・リガーゼによる塩基除去修復 (base excision repair :BER) 機構によって修復される。最近、ラットの虚血再灌流モデルでエンドヌクレアーゼ活性が上昇することが示され (J Mol Cell Cardiol 32, 2000)、虚血再灌流心筋においても酸化的塩基損傷に対して BER 機構が作動する可能性が示された。生体の防御機転として合目的的な現象と考えられるが、損傷塩基修復機構の活性化が虚血再灌流心筋障害自体ないしはその予後にどのような影響をおよぼすのかは全く知られていない。

そこで申請者は、虚血再灌流心筋における酸化的 DNA 塩基損傷の修復機構の活性変化を検討し、この機構が心筋障害に対して保護的に作用し得るのか否か、さらに遺伝子導入手法によって修復機転の活性を増幅させた際に、障害心筋の予後はリモデリングを含めていかなる修飾を受けるのかを明らかにするために本研究を計画した。

- ①虚血再灌流心筋障害にともなう BER 機構の活性変化を明らかにし、ROS 産生の修飾と BER 機構の活性変化が心機能および梗塞サイズにおよぼす効果を明らかにする。
- ②虚血心筋の代表的な保護機序のひとつである虚血プレコンデイショニング効果の有無による BER 機構の活性変化を明らかにし、両者は相加的あるいは相反的いずれに作用し合うものであるかを明らかにする。

損傷 DNA の修復機構は、主に悪性腫瘍の領域において研究が進められてきた。本研究は、損傷 DNA の修復機構の修飾が、虚血再灌流後の心筋障害の軽減および心機能の保持につながる可能性を仮説として計画したものであり、この視点からの研究は過去に報告がない。我々は既に、虚血再灌流に伴って発生する hydroxyl radical (OH·) が心筋細胞内の DNA 塩基の損傷をもたらす事を 8-OHdG 量の変動から捉えている (Circulation 98, 1998) (Circulation 102, 2000)。最近、You HJ (J Moll Cell Cardiol 32, 2000) らによって、虚血再灌流

に伴い心筋組織中のエンドヌクレアーゼ活性が上昇することが示された。申請者らは既に予備研究において、虚血プレコンディショニング操作によって心筋組織中のエンドヌクレアーゼ活性が上昇する可能性を確認しており、酸化的 DNA 塩基損傷の修復機構の活性亢進が心筋保護効果をもたらす可能性は十分考えられる。本研究は酸化的 DNA 塩基損傷の BER 機構の活性を修飾する手法が、虚血再灌流心における新たな治療戦略となり得るか否かを検討するものであり、独創性と現実性を合わせ持つ本研究の学術的意義は高い。

国内外を通じて、過去に虚血再灌流心筋の保護を、酸化的損傷塩基の修復機構との関わりで検討した報告はなく、上述のごとくエンドヌクレアーゼ活性の上昇を示した You HJ (J Moll Cell Cardiol 32, 2000)らの報告が唯一この保護機転の存在を示唆するのみである。今回の研究は、まず虚血再灌流心筋障害における酸化的 DNA 塩基損傷の BER 機構の存在とその詳細を明らかにするものであり、虚血再灌流心筋障害の軽減および慢性期心機能保持のための新たな治療ターゲットを提言することができるものと考えられる。最近エンドヌクレアーゼ G がミトコンドリアから放出されることがアポトーシスの重要な実行系となることも明らかにされており (Nature 412, 2001)、心筋保護の上でエンドヌクレアーゼ活性の亢進がいかなる効果を生むのかは極めて興味深いトピックスである。また、虚血プレコンディショニングは、ROS の産生を介して心筋保護効果を発現することが示されているが、これが DNA の酸化的損傷塩基の BER 機構を活性化するか否かは全く知られておらず、本研究はこれを明らかにする目的も合わせ持つものである。

【方法と結果】

心筋虚血再灌流による活性酸素種・ラジカルの産生と消去系活性の変化および酸化的 DNA 損傷塩基の除去修復 (BER: Base Excision Repair) 機構の活性変化と虚血プレコンディショニングの修飾効果

家兔の摘出灌流心(Langendorff 法)標本を用いて 30 分虚血 180 分再灌流を行った。Hydroxyl radical (OH[·]) の追加曝露群では、再灌流と同時に H₂O₂ を負荷した。力学的・血行動態的指標、梗塞心筋量(TTC 法)およびアポトーシス誘導(TUNEL 法、DNA ladder 形成)から心筋障害度を比較検討した。経時的に採取したサンプルから ROS の産生量を検討した。これら実験系において虚血終了時と再灌流終了時の二時点の心摘出各群から採取した心筋組織標本を用いて、心

筋組織抽出 DNA 中の 8-OHdG 量(HPLC-ECD,UV 法)を免疫組織染色により検討した。

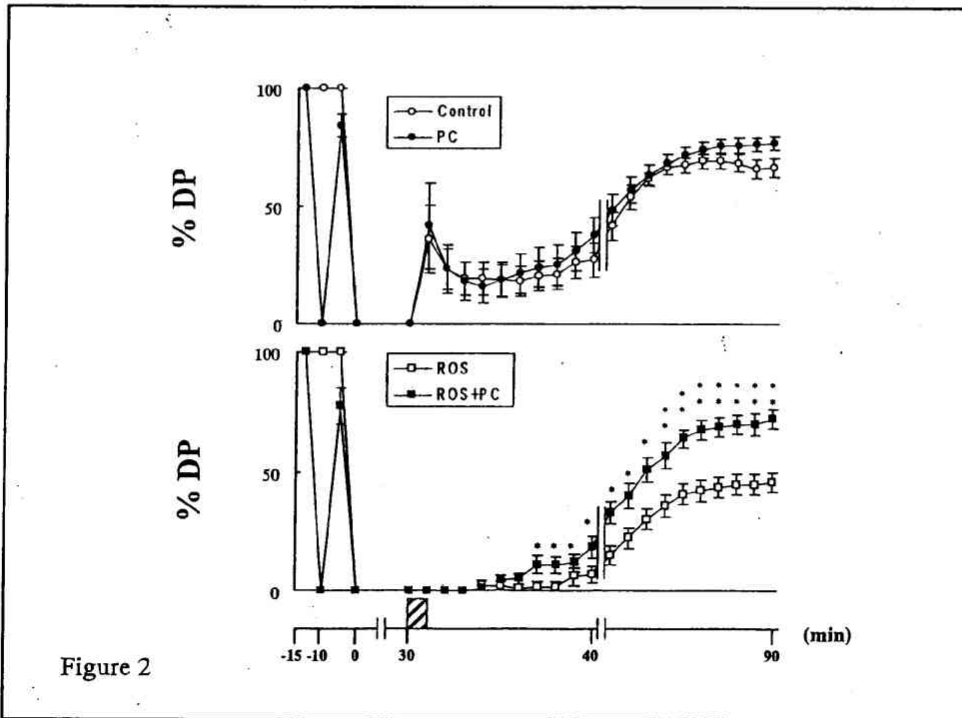
上記(1)の家兔摘出灌流心標本において、5 分虚血による虚血プレコンディショニング(PC)の前処置後に同様プロトコールを施行し、虚血再灌流心筋の障害度およびレドックス制御におよぼす PC の効果を、心筋 DNA 中の 8-OHdG 量の発現変化および活性変化の点から検討した。

Table 1. Hemodynamic Parameters

		Baseline				Reperfusion (60min)				
		LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	DP (mmHg)	CF (ml/min)	LVSP (mmHg)	LVEDP (mmHg)	DP (mmHg)	%DP (%)	CF (ml/min)
Control	(n=12)	120±6	5±1	115±6	79±13	85±7*	7±2	78±7*	67±4*	64±11
PC	(n=13)	117±6	5±1	112±6	87±13	89±5**	3±1	86±5**	77±3**	74±4
ROS	(n=14)	113±4	6±1	107±3	78±4	84±6**	34±6** ††	50±5** ††	46±4** ††	42±4** †
ROS+PC	(n=13)	117±4	6±1	110±5	81±8	93±3**	12±4#§	80±5**§	72±4**§	62±10#

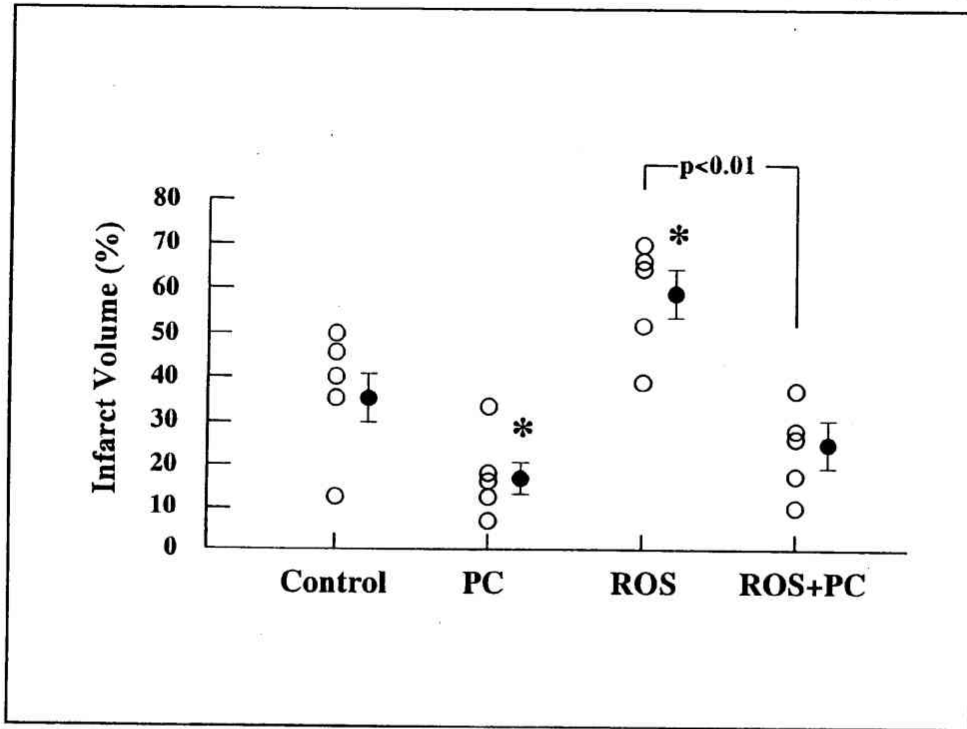
LVSP: left ventricular systolic pressure, LVEDP; left ventricular diastolic pressure, DP: developed pressure, CF: coronary flow. Values are means ± S.E.M.

*P<0.05, **P<0.01 vs Baseline, †P<0.05, ††P<0.01 vs Control, #P<0.05 vs PC, § p<0.01 vs ROS

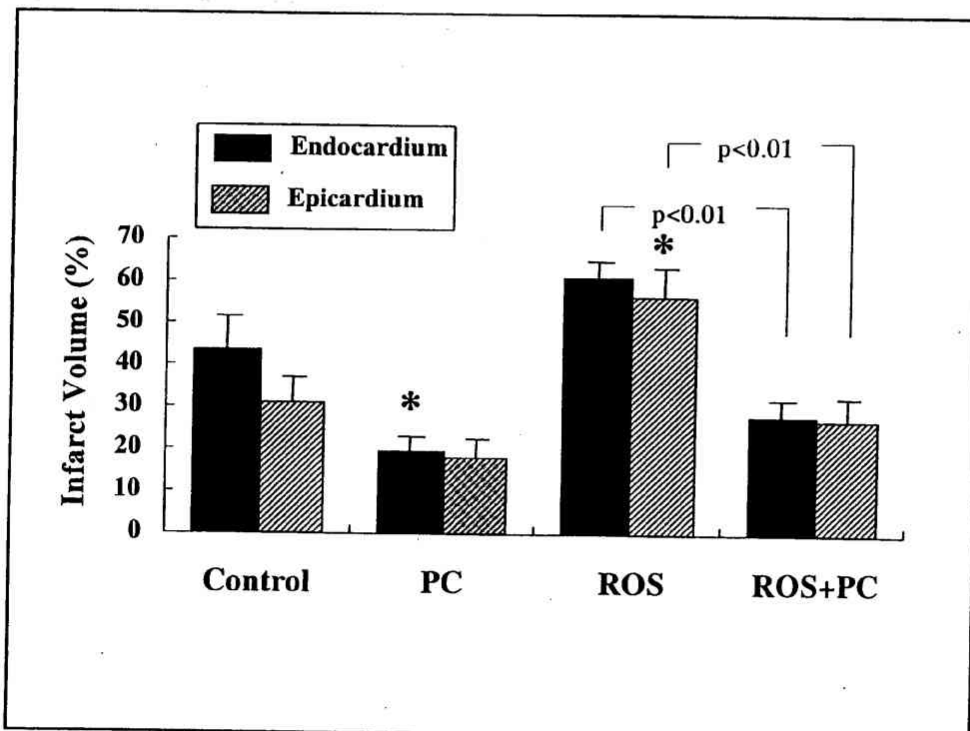


家兔摘出灌流心における発生圧 (Developed Pressure ; DP) の経時的変化

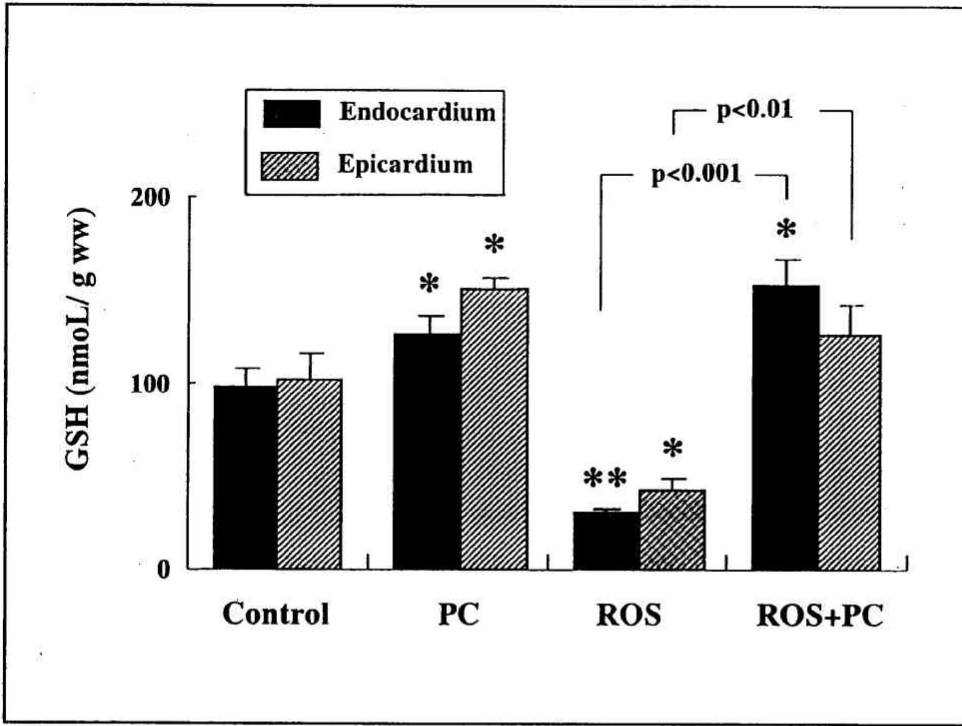
心筋梗塞サイズにおよぼすプレコンディショニング(PC)と ROS(H₂O₂)負荷の効果



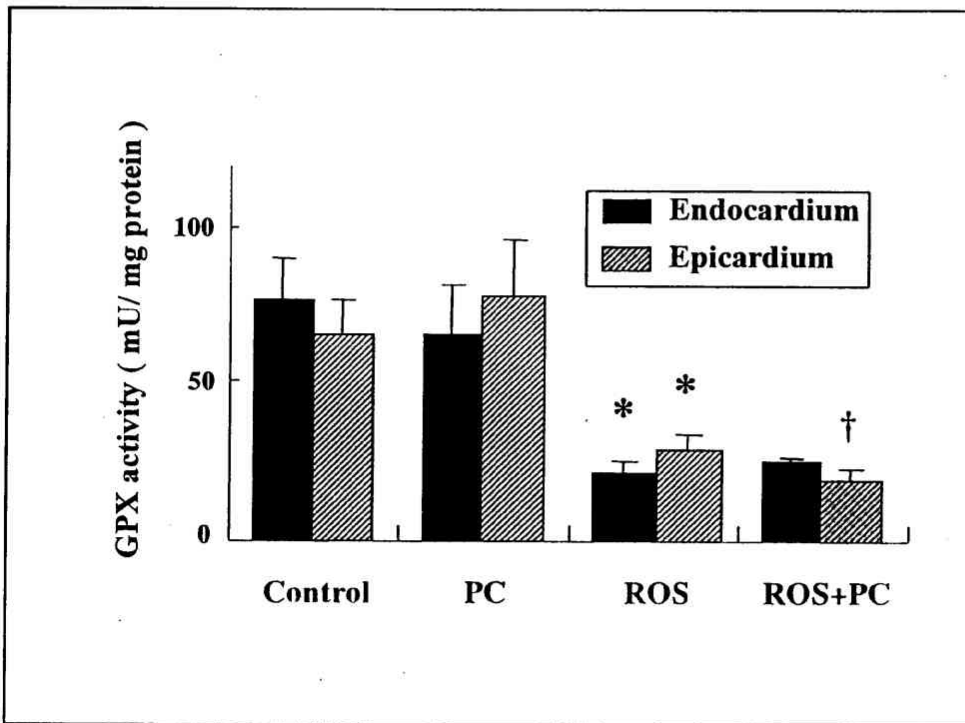
心筋梗塞サイズにおよぼす PC と ROS(H₂O₂)負荷の効果：心内膜側および外膜側の比較



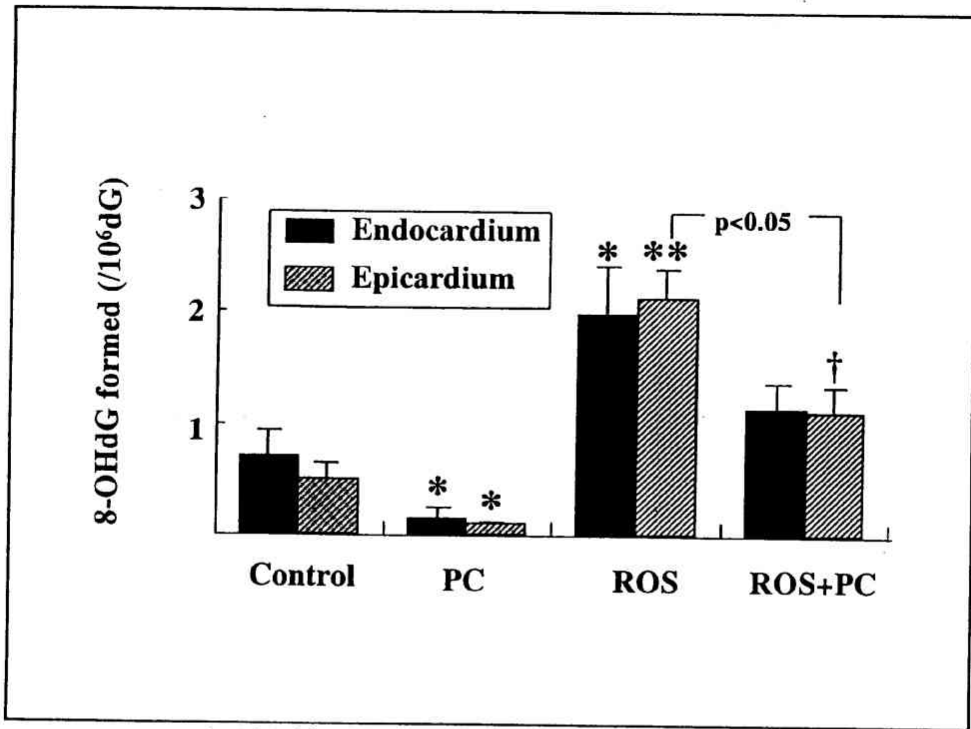
心筋 GSH 含量におよぼす PC と ROS(H₂O₂)負荷の効果



心筋 GPX 活性におよぼす PC と ROS(H₂O₂)負荷の効果



心筋 8-OHdG レベルにおよぼす PC と ROS(H₂O₂)負荷の効果



心筋組織 8-OHdG レベルにおよぼす PC と ROS(H₂O₂)負荷の効果

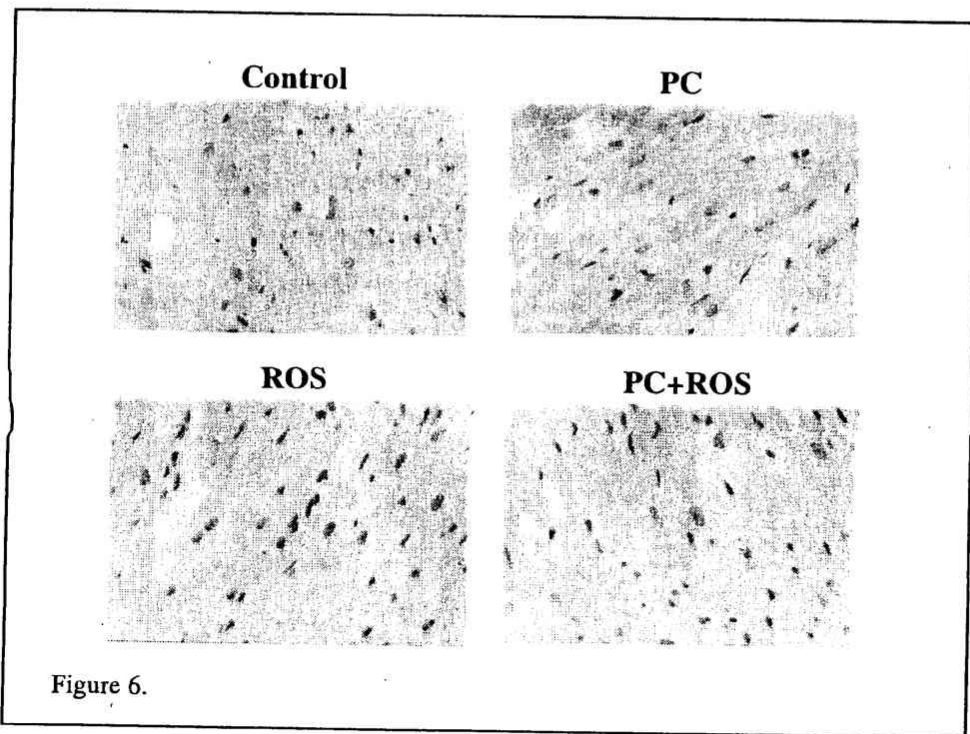


Figure 6.