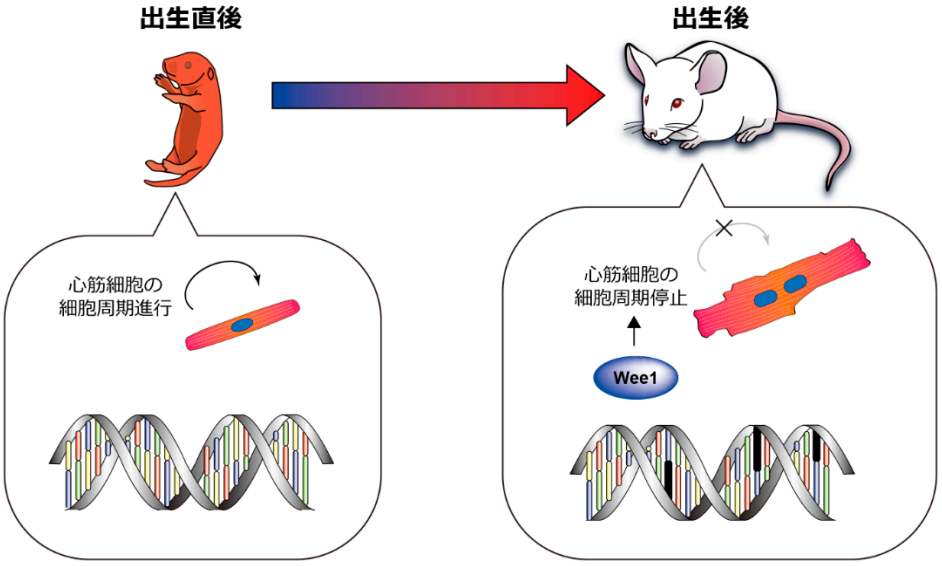
31　DNA損傷応答による心筋細胞の細胞周期制御	木村　航

【目的】哺乳類の成体の心臓は損傷を受けた心筋を再生する能力を持たない。近年、胎仔期および新生仔期のマウスに心臓再生能があり、しかしそれは生後一週間以内に失われることが報告された。哺乳類の心筋細胞は、出生後に嫌気的解糖系からミトコンドリア好気呼吸へとエネルギー代謝が大きく転換する。この代謝の切り替わりは生後一週間以内に起こり、かつ前述のように ROS の産生および DNA 酸化損傷を含む酸化ストレスの蓄積を伴っている。我々はミトコンドリア由来の ROS を除去することで心筋細胞が増殖可能である時期、および心筋が再生能を維持している時期が出生後に延長することを見出した。これらの知見から、我々は DNA 損傷応答経路の心筋細胞の細胞周期制御機構を明らかにすることを目的として本研究を行った。

【方法】新生児及び成体マウスを用いて、DNA 損傷応答経路活性化の検出と阻害を、それぞれウェスタンブロット・免疫組織染色、および低分子阻害剤のインジェクションにより行った。さらに心筋細胞の細胞周期について、免疫組織染色を用いて解析した。

【結果】生化学的解析により、マウス生後心筋において出生後一週間以内に ROS 産生が増加していた。それに伴い、心筋細胞において核 DNA 酸化損傷および DNA 損傷応答が同期間中に増加していた。これらの結果は、マウス新生児心臓でのミトコンドリア好気呼吸の増加に伴う ROS の蓄積が DNA 酸化損傷および DNA 損傷応答を活性化していることを示唆するものであった。続いて、マウス新生児で DNA 損傷応答のエフェクターキナーゼである Wee1 タンパク量を検討したところ、P1 から P7 にかけて心筋内で増加していた。また Wee1 阻害剤である MK-1775 を P0 から二週間皮下投与したところ、心筋細胞の細胞分裂の増加が観察された。以上の結果は、生後の心筋細胞において好気呼吸の増加に伴う ROS レベルの上昇が DNA 損傷応答経路を介して細胞周期停止を誘導するという仮説を強く支持するものであった。続いて、ミトコンドリア代謝を抑制することによって成体の心筋細胞の細胞周期を制御できるかどうかを検討するため、成体マウスを 2 週間の間 7%酸素濃度下に置いた。するとミトコンドリアにおけるクレブス回路および脂肪酸 β 酸化に関わる酵素群の減少が見られた。さらに、低酸素状態の心臓において、コントロールの心臓と比較して ROS レベルの低下と、DNA 酸化損傷および DNA 損傷応答経路の両者が抑制されていること、そして心筋細胞の細胞増殖が増加していることを見出した。低酸素暴露による心筋細胞増殖の増加は、酸化 DNA 損傷の減少が直接の原因であることが強く示唆された。

DNA 損傷応答経路による出生後の心筋細胞の細胞周期停止



31. DNA 損傷応答による心筋細胞の細胞周期制御

木村　航

理化学研究所 生命機能科学研究センター 心臓再生研究チーム

Key words：心筋細胞，細胞周期，DNA 損傷，酸化ストレス，心筋梗塞

緒　言

心不全は全世界における主要な死因のひとつである。心不全の病態生理学的機序を考える上で重要な事実は、我々哺乳類の成体の心臓は損傷を受けた心筋を再生する能力を持たないことである。対照的に、胎児期・新生児期には心筋損傷に対する再生能力を有する。この心臓再生能の有無を決定づけている要因のひとつは心筋細胞の増殖能力であり、心筋細胞の細胞周期を制御する機構の解明は多くの研究者を惹きつけてやまない研究課題となっている。近年、胎仔期および新生仔期のマウスに心臓再生能があり、しかしそれは生後一週間以内に失われることが報告された［1］。新生仔マウスでの心筋再生は既存の心筋細胞の増殖によるものであり、また出生後に心筋再生能が失われる時期は、心筋細胞が二核化し細胞周期を停止する時期と一致している［2］。したがって心筋細胞の増殖能と心臓再生能はおおむね一致しているとみなすことができる。

ミトコンドリア好気呼吸はその副産物として生じる活性酸素種（ROS）が生体内分子の酸化によるダメージ（酸化ストレス）の原因となり、とりわけゲノム DNA に対する酸化損傷を残したまま細胞周期を進めることは細胞にとって危険である。哺乳類の心筋細胞は、胎児環境から出生後の環境への大きな転換に適応すべく嫌気的解糖系からミトコンドリア好気呼吸へとエネルギー代謝が大きく転換する。この代謝の切り替わりは生後一週間以内に起こり、かつ前述のように ROS の産生および DNA 酸化損傷を含む酸化ストレスの蓄積を伴っている。我々はミトコンドリア由来の ROS を除去することで心筋細胞が増殖可能である時期、および心筋が再生能を維持している時期が出生後に延長することを見出した［3〜5］。これらの知見から、我々は DNA 損傷応答（DDR）経路が生後の心臓における心筋細胞の細胞周期停止を維持するとの仮説をたてた。本研究はこの仮説の検証を目標として実行された。

方法，結果および考察

1.　マウス心筋細胞における DNA 損傷応答の活性化

ミトコンドリア好気呼吸と心筋再生能との関連を明らかにするため、我々はまず出生後二週間までのマウスおよび成体ゼブラフィッシュの心室におけるミトコンドリア DNA コピー量を qRT-PCR にて測定した。その結果ミトコンドリア DNA コピー量はマウスにおいては生後二週間で直線的に増加し、成体ゼブラフィッシュではマウス出生直後のそれよりもさらに低いことがわかった。続いて電子伝達系を担う複合体が局在するミトコンドリア内膜（クリステ）の性状を透過型電子顕微鏡にて精査したところ、マウス生後一日目（Postnatal day 1、P1 以下では生後の日齢を P0、P1、P2…のように表記する）の心筋では、マウス P7 でのそれよりもクリステ密度が低く構造的に　も未発達であった。さらに、マススペクトロメトリーによりマウス心筋における嫌気的・好気的代謝にかかわる酵素のタンパク量を P1 から P7 にかけて包括的に測定したところ、嫌気的解糖に必要な酵素は大多数が減少し、対してミトコンドリア Krebs 回路および脂肪酸β酸化に関わる酵素群のほとんどが増加していた。これらの結果は、哺乳類において心臓再生能とミトコンドリア好気呼吸との間に相関があることを示している。特にマウス新生児では、嫌気的解糖系から酸化的リン酸化への代謝の転換が起こる時期が、心臓再生能喪失が起こる時期と正確に対応していることは興味深いと思われた。

続いて、マウス生後心筋においてミトコンドリア好気呼吸の増加に伴い ROS と酸化ストレスが増加しているか

どうか検討した。DHE、dihydrorhodamine 123 および H2DCF を用いたアッセイは、いずれも P1 から P7 にかけての心筋での ROS の増加を示していた。また心筋細胞における核 DNA 酸化損傷および DNA 損傷応答を、それぞれ抗 8-oxoG 抗体、抗リン酸化 ATM 抗体を用いた定量的解析により検討したところ、いずれも P1 から P7 にかけて増加していることが明らかになった。これらの結果は、マウス新生児心臓でのミトコンドリア好気呼吸の増加に伴う ROS の蓄積が DNA 酸化損傷および DNA 損傷応答を活性化していることを示唆するものであった（図 1）。

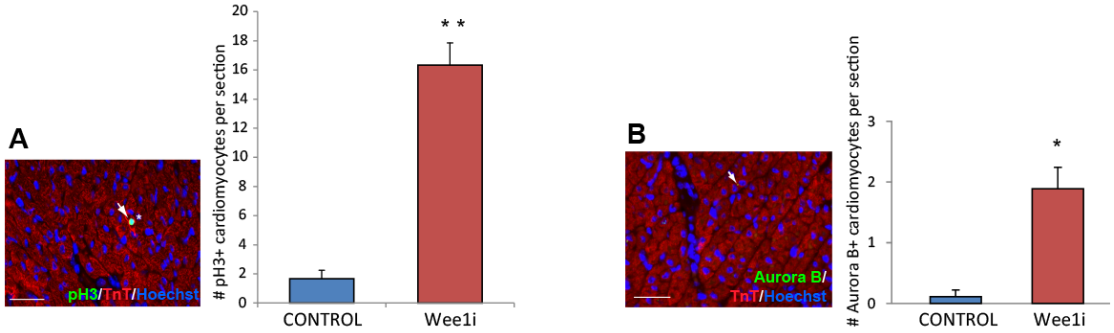


図 1．DNA 損傷応答の阻害は心筋細胞増殖期間を延長する

A) Wee1 kinase 阻害剤処理により M 期マーカーpH3 陽性の心筋細胞数が増加する。

B) Wee1 kinase 阻害剤処理により心筋細胞において cytokinesis マーカーAurora B の cleavage furrow への集積が増加する。スケールバー：50 μm、Student's t-test 使用（*p < 0.05、**p < 0.01）。

2. DNA 損傷応答の抑制による心筋細胞の細胞周期停止抑制

続いて、ROS による DNA 損傷応答経路の活性化が心筋細胞の細胞周期停止を引き起こしているかどうか検討した。DNA の損傷による ATM/ATR の活性化は Wee1 キナーゼの活性化を介して CDK1 依存性の G2−M 移行を抑制することが知られている。マウス新生児で Wee1 タンパク量を検討したところ、P1 から P7 にかけて心筋内で増加しており、P7 での NAC 処理マウスや mCAT トランスジェニックマウスではそれぞれのコントロールと比較し減少していることが確認された。また Wee1 キナーゼの特異的な阻害剤である MK-1775 を P0 から二週間皮下投与したところ、ROS の除去と同様、心筋細胞のサイズ減少ならびに細胞分裂の増加、さらに心筋細胞数の増加と単核の細胞数の増加（二核・多核の細胞数の減少）が観察された。したがって Wee1 キナーゼの阻害は生後の心筋の増殖期間を延長するのに十分であることが示された。以上の結果は、生後の心筋細胞において好気呼吸の増加に伴う ROS レベルの上昇が DNA 損傷応答経路を介して細胞周期停止を誘導するという仮説を強く支持するものであった。

続いて、ミトコンドリア代謝を抑制することによって成体の心筋細胞の細胞周期を制御できるかどうかを検討するため、成体マウスを 2 週間の間 7%酸素濃度下に置いた。するとミトコンドリアにおけるクレブス回路および脂肪酸 β 酸化に関わる酵素群の減少が見られた。さらに、低酸素状態の心臓において、コントロールの心臓と比較して ROS レベルの低下と、DNA 酸化損傷および DNA 損傷応答経路の両者が抑制されていることを見出した。さらに BrdU の取り込み、リン酸化ヒストン H3（pH3Ser10）、Aurora B キナーゼの分裂溝への局在、RNA シークエンシングによる細胞周期関連遺伝子の発現の検討により心筋細胞の細胞周期について解析したところ、いずれも低酸素処理により細胞増殖が増加していることを見出した。以上のような心筋細胞の細胞周期再エントリーは、酸化ストレス剤である Diquat（ジクワット）の低酸素曝露マウスに対する顕微注入により抑制された。したがって、低酸素暴露による心筋細胞増殖の増加は、酸化 DNA 損傷の減少が直接の原因であることが強く示唆された（図 2）。

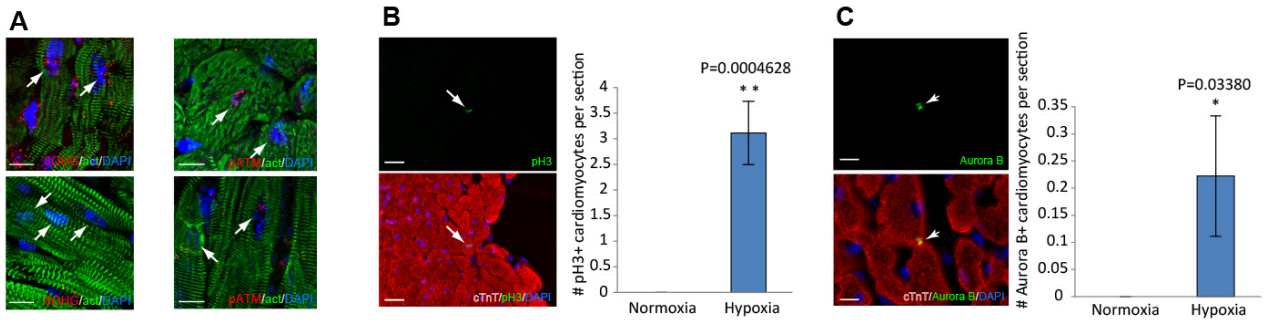


図 2. 酸化 DNA 損傷の抑制により心筋細胞の細胞周期エントリーが誘導される

A) 成体マウスの長期低酸素処理により心筋細胞において 8OHG（左、酸化 DNA 損傷）、pATM（右、DNA 損傷応答経路）の減少が見られる。スケールバー：10 μm。

B) 長期低酸素処理により M 期マーカーpH3 陽性の心筋細胞数が増加する。スケールバー：20 μm。

C) 長期低酸素処理により心筋細胞において cytokinesis マーカーAurora B の cleavage furrow への集積が増加する。スケールバー：10μm、Student's t-test 使用（* $p < 0.05$、** $p < 0.01$）。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、テキサス大学の Hesham Sadek 博士、中田祐二博士（現アラバマ大学）、Diana Canseco 博士、Bao Puente 博士らである。

文　献

1) Porrello, E.R., et al., Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart. Science, 2011. **331**(6020): p.1078-80. PMID: 21350179

2) Soonpaa, M.H., et al., Cardiomyocyte DNA synthesis and binucleation during murine development. Am J Physiol, 1996. **271**(5 Pt 2): p. H2183-9. PMID: 8945939

3) Puente, B.N., et al., The oxygen-rich postnatal environment induces cardiomyocyte cell-cycle arrest through DNA damage response. Cell, 2014. **157**(3): p. 565-79. PMID: 24766806

4) Kimura, W., et al., Hypoxia fate mapping identifies cycling cardiomyocytes in the adult heart. Nature, 2015. **523**(7559): p. 226-30. PMID: 26098368

5) Nakada, Y., et al., Hypoxia induces heart regeneration in adult mice. Nature, 2017. **541**(7636): p. 222-227. PMID: 27798600