

201107010A

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

臨床心不全エピゲノム診断における組織可塑性指標となる
新規サロゲートマーカーの開発と治療への応用に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小室 一成

(大阪大学大学院)

平成24(2012)年3月

厚生労働科学研究費補助金

創薬基盤推進研究事業

臨床心不全エピゲノム診断における組織可塑性指標となる
新規サロゲートマーカーの開発と治療への応用に関する研究

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小室 一成

(大阪大学大学院)

平成24(2012)年 3月

目 次

I. 総括研究報告

臨床心不全エピゲノム診断における組織可塑性指標となる
新規サロゲートマーカーの開発と治療への応用に関する研究…………… 1
小室一成

II. 分担研究報告

臨床心不全エピゲノム診断における組織可塑性指標となる
新規サロゲートマーカーの開発と治療への応用に関する研究…………… 12
北風政史

臨床心不全エピゲノム診断における組織可塑性指標となる
新規サロゲートマーカーの開発と治療への応用に関する研究…………… 16
堤 修一

臨床心不全エピゲノム診断における組織可塑性指標となる
新規サロゲートマーカーの開発と治療への応用に関する研究…………… 20
植田初江

臨床心不全エピゲノム診断における組織可塑性指標となる
新規サロゲートマーカーの開発と治療への応用に関する研究…………… 23
南野哲男

臨床心不全エピゲノム診断における組織可塑性指標となる
新規サロゲートマーカーの開発と治療への応用に関する研究…………… 26
坂田泰史

臨床心不全エピゲノム診断における組織可塑性指標となる
新規サロゲートマーカーの開発と治療への応用に関する研究…………… 30
朝野仁裕

臨床心不全エピゲノム診断における組織可塑性指標となる

新規サロゲートマーカーの開発と治療への応用に関する研究..... 35

山崎 悟

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 38

IV. 研究成果の刊行物・別刷

p53-induced adipose tissue inflammation is critically involved in the development of insulin resistance in heart failure..... 45

Cell Metab 2012,15(1): 51-64

Heat shock transcription factor 1 protects heart after pressure overload through promoting myocardial angiogenesis in male mice..... 59

Mol Cell Cardiol 2011, 821-9

Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NFI family in adipocyte differentiation..... 68

PLoS Genet 2011, 7(10):e1002311

Epigenetically coordinated GATA2 binding is necessary for endothelium-specific endomucin expression..... 84

EMBO J 2011, 10;30(13):2582-95

Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation 98

Hum Mol Genet 2011, 15;20(14):2710-2721

Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures..... 110

Am J Physiol Heart Circ Physiol 2011, 301(5): H1723-41

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)

総括研究報告書

臨床心不全エピゲノム診断における組織可塑性指標となる 新規サロゲートマーカーの開発と治療への応用に関する研究

研究代表者 小室一成 大阪大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨

本研究は研究代表者および分担者らが世界に先駆け証明した心不全におけるエピゲノム機序の重要性に関する新知見について、心不全発症メカニズムに関する基礎臨床の多角的な研究性成果を組み合わせ、臨床心不全エピゲノム診断における組織可塑性指標となる新規サロゲートマーカーの開発と治療への応用を目標に研究を行う。これまでに厚生労働省科学研究費補助金各研究事業において、心不全動物モデル開発、病態機序解析、ヒト疫学調査などで得た研究成果をもとに、未だ実用化されていない心不全可塑性の診断指標が開発されれば、治療の負担を軽減し、内科外科の最先端治療を精緻に実行することが可能になると期待される。

核蛋白ヒストンや DNA メチル化に代表されるエピゲノム分子修飾は個体発生と機能維持に必要であるが、環境変化にも柔軟に対応できる機序として注目されている。生理機能と関連した検討が多くの生命機能分野で報告されるとともに、循環器病態においても重要な機序に関わると類推され、ゲノムワイドな解析が待たれる。そこで、DNA メチル化、超高速 DNA シーケンスによるヒストン修飾と RNA 発現、細胞核超微細構造の各解析と臨床指標との比較を検討するとともに、各分子修飾の動物病態モデルにおける評価を行う。さらに心不全のエピゲノム・遺伝子発現プロファイルを作成し、病態と関連する核内蛋白の新規スクリーニングを行い、同定した心不全可塑性サロゲートマーカーの臨床心不全への有用性を検討する。

高齢化社会の進行と生活習慣病の進行に伴い増加した心不全患者の治療は保険医療上の重要課題である。21 世紀に入り充実したゲノム情報をもとに次世代のエピゲノム基盤研究を行うことにより、テーラーメイド医療の発展に貢献すべく研究を行う。

研究分担者

北風政史
国立循環器病研究センター
部長

堤 修一
東京大学先端科学技術研究センター
特任准教授

植田初江
国立循環器病研究センター
部長(バイオバンク長兼任)

南野哲男
大阪大学大学院医学系研究科
講師

坂田泰史
大阪大学大学院医学系研究科
助教

朝野仁裕
大阪大学大学院医学系研究科
助教

山崎 悟
国立循環器病研究センター
室長

A. 研究目的

国内数十万人が罹患する心不全の心保護治療に加え、今後需要拡大が予想される補助人工心臓や移植医療の適応判断に際しては、病態進展と治療抵抗性を決める心筋可塑性を表す新規サロゲートマーカーが必要である。ヒトのゲノムワイドなエピゲノム解析を行い未だ実用化されていない、心不全可塑性の分子指標を開発する。

B. 研究方法

1、ヒト臨床心不全特殊生体試料を利用したエピゲノム解析

① Genome-wide な DNA メチル化およびヒストン修飾解析

心臓移植ないし心補助循環治療を行う際に説明と同意書取得の後に採取されるヒト臨床不全心筋組織試料を用い、DNA メチル化チップアレイを用いたゲノムワイドな高解像度 DNA メチル化解析を行う。不全心筋組織、正常心筋組織をそれぞれ 4 検体以上で比較し、さらに非心臓組織を用いて心筋特異的メチル化部位の同定も併せて行う。

同じ心筋組織検体を用いて超高速 DNA シーケンサーを用い、遺伝子転写活性化を示すヒストン修飾 histoneH3K3me4 および抑制性を示す指標として histoneH3K27me3、さらに転写複合体の結合部位探索のため RNA polymerase II、ほか有意な転写制御を鑑別可能な抗体を用いて、genome-wide にクロマチン免疫沈降(ChIP)-sequence 解析を行い、病態変化にともなう転写因子複合体やエピゲノム修飾のゲノム上の感受性領域を検討する。

② 超高速シーケンシングによる RNA 発現解析と心不全関連遺伝子プロファイル作成

心臓移植ないし心補助循環治療を行った際に説明と同意書取得の後に採取されるヒト臨床不全心筋組織試料を用いて RNA 発現解析を行う。既に以前作成した DNA マイクロアレイデータを参考指標に、新たに最重症心不全サンプルを用いてエピゲノム解析結果と比較可能な遺伝子発現プロファイルを生体試料に RNA sequence 解析を実施し心臓特異的エピジェネティック因子変化部位の解析に利用する。

2、重症心不全病理画像解析技術の確立と臨床マ

ーカーとの比較検討

① 細胞核超微細構造の画像解析からのエピゲノム変化指標の病理学的探索

臨床診療において説明と同意書取得の後に通常的心不全原因鑑別診断および病態把握のために行われる心筋生検、および心臓移植ないし心補助循環治療を行う際に採取されるヒト臨床不全心筋組織試料、約 100 検体(最重症心不全検体 30 検体、通常心筋生検 70 検体)を用いて、グルタールアルデヒド固定を行い、電子顕微鏡標本を作成し不全心筋細胞の細胞核クロマチン構造解析を行う。通常電子顕微鏡画像のデジタル密度解析を行うためにフォーマット化情報処理解析を行い、細胞核クロマチンの病態別サブタイプを同定するとともに、より精細な構造解析を同時に行う。

② 心不全臨床検査データと連動する病理マーカー指標との比較検討

通常的心不全原因鑑別診断および病態把握のために行われた心筋生検、および心臓移植ないし心補助循環治療を行う際に採取されたヒト臨床不全心筋組織試料について、説明と同意書取得の後にその元となる臨床診療データを連結匿名化が可能な臨床データとして利用し、細胞核クロマチン超微細構造解析結果と照合し各データ間で相関解析を行い、心不全一般の新規病理検索法として確立する。

3、心不全可塑性を示す新しい診断鑑別方法の確立

① 心筋細胞核超微細構造の画像解析からのエピゲノム変化指標の病理学的探索

Genome-wide な DNA メチル化解析、ヒストン修飾解析、超高速シーケンシングによる RNA 発現解析と心不全関連遺伝子プロファイル作成、細胞核超微細構造の画像解析からのエピゲノム変化指標、そしてその心不全臨床検査データと連動する病理マーカー指標の比較検討を行い、それらの統合的解析で明らかにした各指標と、病理微細構造解析法における病態・病期における Cut-off 値の決定を行う。

② 心不全エピゲノムおよび遺伝子発現プロファイルの作成

Genome-wide な DNA メチル化解析、ヒストン修飾解析、超高速シーケンシングによる RNA 発現解析において作成した心不全関連遺伝子プロファイルから、

心臓特異的機能変化を持つと考えられる遺伝子リストを作成し、心不全可塑性に関するエピゲノム診断に用いる分子マーカーを同定する。

4、新規心筋可塑性評価指標の心不全病態との関連性の検索(培養細胞および動物モデルを用いた関連蛋白分子の同定)

心臓特異的機能変化を持つと考えられる遺伝子リストから心不全可塑性に関するエピゲノム診断分子マーカーとして選定した標的分子のうち、DNA 結合を示す転写因子などの機能を有すると推定される新規分子について、心不全動物モデルおよび培養心筋細胞モデルから、心不全感受性ゲノム領域を同定するとともに、その分子に相互作用する蛋白を超高感度 Nano LCMS など次世代質量分析機器を用いて同定し、その機能解析を行う。将来的なヒト心不全への診断治療標的としての開発を検討する。

5、新規心不全可塑性サロゲートマーカーのヒト臨床心不全に対する有用性の検討

エピゲノム分子修飾、病理組織変化、病態特異的発現を示す遺伝子、その分子に結合相互作用する分子のうち、臨床心不全可塑性指標として良く相関するパラメータを本研究における新規心不全可塑性サロゲートマーカーとして位置づけ、そのヒト心不全可塑性診断における有用性を前向き試験にて実施検討する。

心不全鑑別診断または外科治療時などに採取した心筋組織検体からの病態診断、および心不全病態可塑性すなわち心機能回復に関する臨床経過の実際を検証する。すなわち、補助人工心臓からの離脱における本可塑性指標による鑑別の有用性、長期カテコラミンサポート治療の継続の成否を決定する本可塑性指標の有用性などさまざまな臨床有用性について、新規可塑性サロゲートマーカーの鑑別能力を検証する。

(倫理面への配慮)

患者情報の解析に関しては施設の倫理委員会の承認を得た上、臨床研究倫理指針を遵守し慎重におこなう。その上で患者とは個別に、医師が書面に示した計画書を明示し、十分説明をしたうえで承諾を得たもののみを本研究に使用する。特に以下の点に留意する。

1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護:

診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者において情報を管理する。

2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置: 心筋生検試料採取は通常の診療の際に医学的必要に応じて行われたもののうち、診療に用いない残余検体を利用することとし、危険や不利益はないと考える。誤って遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益をこうむる可能性が考えられるため、これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

3) 試料提供者から採取した生体材料の取り扱いについて: 提供された試料は、個人識別情報管理者が連結匿名化し、匿名化ラベルのみ貼って保存する。これらの試料は、生体試料の包括利用同意を得ており、本研究だけでなく、将来倫理委員会で承認された他の自主臨床研究についても用いることが可能である。したがって検査済みの試料は、適宜連結可能匿名化番号を含む検体等を完全に削除した上で廃棄するが、使用可能な残余検体は匿名化されたまま施錠された保管場所で保管される。また、特に研究成果として得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策を行う。

動物実験においても愛護上の問題点を考慮の上、施設の審査結果を本研究について得た。この倫理規定にのっとり動物愛護上の配慮を十分行って実験をおこなう。

C. 研究結果

1、ヒト臨床心不全特殊生体試料を利用したエピゲノム解析

① Genome-wide な DNA メチル化およびヒストン修飾解析

心臓移植ないし心補助循環治療を行う際に説明と同意書取得を行い、ヒト臨床心不全心筋組織試料を採取した。それら資料の中から、DNA メチル化チップアレイを用いてゲノムワイドな高解像度 DNA メチル化解析を行うべく、不全心筋組織 5 検体、正常心筋組織 2 検体を用い、Pilot 的に DNA メチル化を検出することが可能であるかを検討した。当初の目的通り想

定されるメチル化部位について再現性の良い検出を確認し、さらに追加解析を行った。不全心筋組織 6 検体、正常心筋組織 2 検体に対し解析を行い、総計、不全心筋組織 11 検体、正常心筋組織 4 検体のデータを蓄積することができた。心筋特異的メチル化部位の同定も併せて行うことを目的として、さらに非心臓組織 7 検体のデータを用いて、不全心筋組織の DNA メチル化変化領域の部位プロファイリングを行った。

DNA メチル化のみならず、ヒストン修飾や遺伝子転写部位を同定するため、同じ心筋組織検体を用いて遺伝子転写活性化を示すヒストン修飾 histoneH3K3me4 および抑制性を示す指標である histoneH3K27me3、そして転写複合体の結合部位探索のため RNA polymerase II の Genome-wide にクロマチン免疫沈降(ChIP)-sequence 解析を行うべく、条件検討を行っている。病態変化にともなう転写因子複合体やエピゲノム修飾のゲノム上の感受性領域を検討することが可能となる。

② 超高速シーケンシングによる RNA 発現解析と心不全関連遺伝子プロファイル作成

次世代シーケンサーのデータ解析パイプラインを構築した LINUX サーバー(OS: CentOS 6.0, 64bit, Intel core i7-2600 4core)とオープンソースを中心とした特殊ソフトウェアの導入により、データのクオリティチェック、リファレンスマッピング、アプリケーションごとの解析を行うべく、スクリプト作業を行い、膨大なデータ解析に対応できる情報解析環境を本研究システムに構築し得た。

それらの解析環境を用いて重症心不全組織サンプルを用いた DNA マイクロアレイデータおよびヒト心不全組織を用いた RNA-seq 解析データを同時にゲノム Viewer で見ることができる情報処理解析を行っている。また RNA-seq についても現在多検体のシーケンス解析を行っている過程にあり、最終的にはエピゲノム解析データと同一ゲノム Viewer 上で比較可能なように、データプロファイルを作るための情報解析スクリプトを作成中である。

2、重症心不全病理画像解析技術の確立と臨床マーカーとの比較検討

① 細胞核超微細構造の画像解析からのエピゲノム変化指標の病理学的探索

説明と同意書取得を経て入手したヒト臨床心筋組織病理検体を用いて、心筋細胞核のクロマチン構造

変化と病態の変化に伴う分子生物学的現象の相関に関する研究を行った。ヒト心筋組織を 2.5%グルタルアルデヒド溶液で固定し、エポキシ樹脂包埋・電子染色をした試料で、日立透過型電子顕微鏡 H-7650 を用いて、細胞核のクロマチン構造の観察を行った。現在の画像解像度では、CCD カメラや解析ソフトウェアの限界もあり、40~50nm 程度までの解像度が限界であるが、より高解像度の構造変化の観察、および立体構造、すなわち細胞核クロマチン・核内マトリックス・核膜の裏打ちの各構造解析、および 1~10nm 大のクロマチン高解像度解析(ヌクレオソームの凝集・崩壊等)を行うべく、大阪大学超高電圧顕微鏡センターにおいて 100kv~1000kV 電圧の観察及び TEM トモグラフィーを用いた微細構造解析を開始した。

② 心不全臨床検査データと連動する病理マーカー指標との比較検討

心不全臨床データベースを作成し、組織標本検体との連結匿名化が可能な情報解析環境を整えた。通常的心不全原因鑑別診断および病態把握のために行われた心筋生検、および心臓移植ないし心補助循環治療を行う際に採取されたヒト臨床不全心筋組織試料について、説明と同意書取得の後にその元となる臨床診療データを連結匿名化が可能な臨床データとして蓄積している。心不全重症度の各指標をデータ化し、今後得られる予定の細胞核クロマチン構造の変化指標との照合作業を行う予定である。

3、心不全可塑性を示す新しい診断鑑別方法の確立

① 心筋細胞核超微細構造の画像解析からのエピゲノム変化指標の病理学的探索

心筋細胞核クロマチン構造変化の臨床指標を独自に考案し、その指標の妥当性を臨床検査データとの相関を見つけることにより、基礎的病態解析を開始している。新規病理微細構造解析法における病態・病期を判断できることを目標とする。

② 心不全エピゲノムおよび遺伝子発現プロファイルの作成

次世代シーケンサーのデータ解析パイプラインを用いて、マウス・ヒト心不全 RNA-seq 解析を行い、各データと共に共通ビューワー IGV への変換作業を行っている。既にマウスモデルに関しては、エピ

ゲノムと遺伝子発現両プロファイルと比較し、次年度計画を前倒しし、複数の候補領域選定作業を開始した。今後の機能解析はもとよりヒト心不全エピゲノム・遺伝子発現プロファイルへの作業も併せて行い、統合データベースとして充実をはかる。

4. 心不全の細胞および動物モデルを用いた新規可塑性評価指標による心筋 viability 評価と新規疾患関連蛋白分子の同定

心臓特異的機能変化を持つ標的の同定およびその標的分子の機能解析を行い、新規機能を有する分子を同定するための動物モデル、および培養心筋細胞を用いた蛋白、ゲノム相互作用実験解析系を構築した。特定のゲノム配列とモデルとなる結合蛋白について、細胞核抽出分画からの DNA 結合を効率よく網羅的に質量分析同定できるようになり、今後標的領域などを対象に、心筋細胞特異的 DNA 結合蛋白の同定するための実験系が確立された。

D. 考察

1. 画像解析と心不全可塑性サロゲートマーカーの組み合わせによるヒト臨床応用開発、および新たな心不全可塑性サロゲートマーカーの開発

心機能改善の可塑性を表す指標の開発は心不全診療の技術水準の向上に寄与する。生命予後はもとより、社会における活動性や生活の質の改善に役立つ診療指標の開発を行うことは、保健医療上重要であるとともに、医療経済、社会経済上のメリットが期待される。

2. 次世代質量分析解析技術の応用とエピゲノム研究へ応用による分子同定研究モデルの構築

心不全病態におけるエピゲノムの重要性を遺伝子解析のみに留まらず、独自の蛋白分離精製技術を用いて生化学的機序の解明を行うことにより、今後の同分野における新しい分子探索法を提唱することができる。

3. 心臓生体試料のクロマチン免疫沈降法の独自開発とその解析データプロファイルの構築

ヒト臨床検体を用いた病態に準拠した組織エピゲノム解析は未だ少なく、本研究によって構築される心臓データプロファイルは、様々な研究に利用することが可能であり、広い応用のためにも完成を急ぐ必要

がある。

慢性心不全患者の罹患人口は多いため、わずか数%の予後改善効果たりとも、その社会的貢献は計り知れないものがある。本年度解析において作成したデータプロファイルより、心不全特異的に変化を示すエピゲノム分子およびその修飾、病理組織変化などがあることが示唆されている。次年度は現在同定しつつあるこれら領域、蛋白の病態との相関性、機能解析を引き続き行う。それらの指標は現時点で臨床病態に非常に良く相関すると示唆されており、今後その組織学的意義を解明することにより生物学的検証が進むものと考えられる。

E. 結論

- ① ヒト臨床心不全特殊生体試料を利用したエピゲノム解析を行い、Genome-wideなDNAメチル化およびヒストン修飾解析、超高速シーケンシングによるRNA発現解析と心不全関連遺伝子プロファイルの作成を行った。修飾分子、病態サンプル別にさらにプロファイルの比較サンプルを現在もなお増やしている段階にある。
- ② 心不全可塑性を示す新しく病理学的鑑別診断法の確立を行うため、病理組織におけるエピゲノム変化指標の検索を行った。重症心不全病理画像解析技術の確立と臨床マーカーとの比較検討を行い、細胞核超微細構造の画像解析法を新規に確立した。
- ③ 心不全エピゲノムおよび遺伝子発現プロファイルおよびエピゲノムプロファイルから心不全病態に特異的なエピゲノム変化領域および分子修飾、DNA結合蛋白の同定を行った。
- ④ 心不全可塑性を示す新規機能分子を探索するための、培養心筋細胞および心不全動物モデル組織サンプルを用いた蛋白-DNA相互作用検索が可能なアッセイ系を確立した。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1、論文発表

(英文原著)

- 1) Shimizu I (9人略) Komuro I (1人略)
Minamino T.
p53-induced adipose tissue inflammation is critically involved in the development of insulin resistance in heart failure. *Cell Metab.*15(1): 51-64, 2012.
- 2) Yasuda N (8人略) Minamino T (2人略) Shiojima I (3人略) Komuro I.
Agonist-Independent Constitutive Activity of Angiotensin II Receptor Promotes Cardiac Remodeling in Mice. *Hypertension.* 59(3): 627-33, 2012.
- 3) Ikeda H, Shiojima I (5人略) Komuro I.
Increased Akt-mTOR signaling in lung epithelium is associated with respiratory distress syndrome in mice. *Mol Cell Biol.* 31: 1054-65, 2011.
- 4) Shioyama W (19人略) Komuro I.
Docking Protein Gab1 Is an Essential Component of Postnatal Angiogenesis After Ischemia via HGF/c-Met Signaling. *Circ Res.* 108: 664-75, 2011.
- 5) Zou Y (14人略) Shiojima I (1人略) Komuro I, (1人略).
Ryanodine Receptor Type 2 Is Required for the Development of Pressure Overload-Induced Cardiac Hypertrophy. *Hypertension.* 58 (6): 1099-110, 2011.
- 6) Zou Y (15人略) Komuro I (1人略).
Heat shock transcription factor 1 protects heart after pressure overload through promoting myocardial angiogenesis in male mice. *J Mol Cell Cardiol.* 51: 821-9, 2011.
- 7) Taneike M (14人略) Komuro I (1人略).
Calpain protects the heart from hemodynamic stress. *J Biol Chem.* 286: 32170-7, 2011.
- 8) Wu X (9人略) Minamino T, Komuro I.
Role of Jagged1 in arterial lesions after vascular injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 31: 2000-6, 2011.
- 9) Yamamoto R (8人略) Komuro I.
Angiotensin II type 1 receptor signaling regulates feeding behavior through anorexigenic corticotropin-releasing hormone in hypothalamus. *J Biol Chem.* 286: 21458-65, 2011.
- 10) Aoki A (16人略) Komuro I (3人略).
SNPs on chromosome 5p15.3 associated with myocardial infarction in Japanese population. *J Hum Genet.* 56: 47-51, 2011.
- 11) Takano H (6人略) Komuro I.
Effects of valsartan and amlodipine on home blood pressure and cardiovascular events in Japanese hypertensive patients: a subanalysis of the VART. *J Hum Hypertens.* 13-Oct, 2011.
- 12) Masuda D (16人略) Komuro I (1人略)
Fasting Serum Apolipoprotein B-48 Can be a Marker of Postprandial Hyperlipidemia. *J Atheroscler Thromb.* 18(12): 1062-70, 2011.
- 13) Kamimura D (15人略) Komuro I (1人略).
Ca²⁺ entry mode of Na⁺/Ca²⁺ exchanger as a new therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J.* 2011.
- 14) Hasegawa H (6人略) Komuro I.
Effects of telmisartan and losartan on cardiovascular protection in Japanese hypertensive patients. *Hypertens Res.* 34(11): 1179-84, 2011.
- 15) Yamashita T (7人略) Komuro I (6人略).
IL-6-mediated Th17 differentiation through ROR γ t is essential for the initiation of experimental autoimmune myocarditis. *Cardiovasc Res.* 91: 640-8, 2011.
- 16) Iwakura T (8人略) Komuro I (3人略).
STAT3/Pim-1 signaling pathway plays a crucial role in endothelial differentiation of cardiac resident Sca-1⁺ cells both in vitro and in vivo. *J Mol Cell Cardiol.* 51: 207-14, 2011.
- 17) Gong H (13人略) Komuro I (2人略).
Urotensin II inhibits the proliferation but not the differentiation of cardiac side population cells. *Peptides.* 32:1035-1041, 2011.
- 18) Ohno K (8人略) Komuro I (6人略).
Unique "delta lock" structure of telmisartan is involved in its strongest binding affinity to angiotensin II type 1 receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 404:434-437, 2011.
- 19) Hanada H (18人略) Komuro I (1人略).
Establishment of chemiluminescence enzyme immunoassay for apolipoprotein B-48 and its clinical applications for evaluation of impaired

- chylomicron remnant metabolism. *Clin Chim Acta*. 413:160–165, 2011.
- 20) Shiozaki M (4人略) Sakata Y, Komuro I, (1人略).
Longitudinal Risk of Cardiovascular Events in Relation to Depression Symptoms After Discharge Among Survivors of Myocardial Infarction. *Circ J*. 75:2878–2884, 2011.
- 21) Takeda Y, Sakata Y (7人略) Komuro I (1人略)
Competing risks of heart failure with preserved ejection fraction in diabetic patients. *Eur J Heart Fail*. 13:664–669. 2011.
- 22) Kurotobi T (9人略) Komuro I.
The significance of the shape of the left atrial roof as a novel index for determining the electrophysiological and structural characteristics in patients with atrial fibrillation. *Europace*. 13:803–808. 2011.
- 23) Nakamura K (5人略) Komuro I.
Left atrial wall thickness in paroxysmal atrial fibrillation by multislice-CT is initial marker of structural remodeling and predictor of transition from paroxysmal to chronic form. *Int J Cardiol*. 148:139–147, 2011.
- 24) Uehara M (6人略) Komuro I.
Comparison of three techniques for evaluation of de novo asymptomatic pulmonary arterial thrombosis following deep vein thrombosis in total knee arthroplasty. *Int J Cardiol*. 148:11–16, 2011.
- 25) Uehara M (13人略) Komuro I.
Detailed distribution of acute pulmonary thromboemboli: Direct evidence for reduction of acquisition length and radiation dose for triple rule-out CT angiography. *Int J Cardiol*. 147:234–238, 2011.
- 26) Miyazaki S (6人略) Komuro I.
Cardiac sarcoidosis complicated with atrioventricular block and wall thinning, edema and fibrosis in left ventricle: Confirmed recovery to normal sinus rhythm and visualization of edema improvement by administration of predonisolone. *Int J Cardiol*. 150:e4–10, 2011.
- 27) Kudo K (7人略) Komuro I.
Reversible left ventricular wall thickening during recovery procedure in takotsubo cardiomyopathy demonstrated by multislice computed tomography. *Int J Cardiol*. 149:e97–99, 2011.
- 28) Narumi H (5人略) Komuro I.
Effects of valsartan and amlodipine on cardiorenal protection in Japanese hypertensive patients: the Valsartan Amlodipine Randomized Trial. *Hypertens Res*. 34:62–69, 2011.
- 29) Hara M (3人略) Asano Y, Sakata Y, Komuro I.
A case of non-cardiogenic acute pulmonary edema in a patient with POEMS syndrome-associated pulmonary arterial hypertension. *Ann Hematol*. 90:489–490, 2011.
- 30) Takahashi A (9人略) Komuro I (1人略).
Quantitative evaluation of right atrial volume and right atrial emptying fraction by 320-slice computed tomography compared with three-dimensional echocardiography. *Int J Cardiol*. 146:96–99, 2011.
- 31) Uehara M (7人略) Komuro I.
Quality of coronary arterial 320-slice computed tomography images compared with 16-slice computed tomography images in subjects with chronic atrial fibrillation. *Int J Cardiol*. 149:e90–93. 2011.
- 32) Nomura S (7人略) Komuro I.
Cardiac sarcoidosis evaluated by multimodality imaging. *Int J Cardiol*. 150:e81–84, 2011.
- 33) Kawakubo M (15人略) Komuro I.
Relationship of natriuretic peptide and transthoracic echocardiographic findings in 135 subjects with muscular dystrophy. *Int J Cardiol*. 145:506–514, 2011.
- 34) Yajima R (6人略) Komuro I (1人略).
Distinguishing focal fibrotic lesions and non-fibrotic lesions in hypertrophic cardiomyopathy by assessment of regional myocardial strain using two-dimensional speckle tracking echocardiography: Comparison with multislice CT. *Int J Cardiol*. 2011 Feb 25, 2011.
- 35) Ueda H (12人略) Komuro I (1人略).
Prevention of Contrast-Induced Nephropathy by Bolus Injection of Sodium Bicarbonate in Patients With Chronic Kidney Disease Undergoing Emergent Coronary Procedures. *Am J Cardiol*. 107:1163–1167, 2011.
- 36) Kuramoto Y (12人略) Komuro I (1人略).

- Usefulness of Cardiac Iodine-123 Meta-Iodobenzylguanidine Imaging to Improve Prognostic Power of Seattle Heart Failure Model in Patients With Chronic Heart Failure. *Am J Cardiol.* 107:1185-1190, 2011.
- 37) Kadohira T (3人略) Komuro I. Coronary Artery Endothelial Dysfunction Associated With Sleep Apnea. *Angiology.* 62:397-400, 2011.
- 38) Aizawa Y, Sakata Y (7人略) Komuro I (1人略). Transition from asymptomatic diastolic dysfunction to heart failure with preserved ejection fraction. *Circ J.* 75:596-602, 2011.
- 39) Hashimoto T, Sakata Y (10人略) Komuro I. Pulmonary arterial hypertension associated with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Intern Med.* 50:119-124, 2011.
- 40) Hori Y (10人略) Komuro I (2人略). Presence of structural heart disease and left ventricular dysfunction predict hospitalizations for new-onset heart failure after right ventricular apical pacing. *Europace.* 13:230-236, 2011.
- 41) Minamiguchi H (4人略) Komuro I. Low atrial septal pacing with dual-chamber pacemakers reduces atrial fibrillation in sick sinus syndrome. *J Cardiol.* 57:223-230, 2011.
- 42) Hara M (3人略) Asano Y, Sakata Y, Komuro I. A case of non-cardiogenic acute pulmonary edema in a patient with POEMS syndrome-associated pulmonary arterial hypertension. *Ann Hematol.* 90:489-490, 2011.
- 43) Takahashi A (9人略) Komuro I (1人略). Quantitative evaluation of right atrial volume and right atrial emptying fraction by 320-slice computed tomography compared with three-dimensional echocardiography. *Int J Cardiol.* 146:96-99, 2011.
- 44) Kataoka A (6人略) Komuro I (1人略). A case of fulminant myocarditis ultimately diagnosed by tenascin C staining. *Int J Cardiol.* Oct 10, 2011.
- 45) Kurotobi T (10人略) Komuro I. Local Coronary Flow is Associated with an Unsuccessful Complete Block line at the Mitral Isthmus in Patients with Atrial Fibrillation. *Circ Arrhythm Electrophysiol.* 4:838-843, 2011.
- 46) Muratsu J (2人略) Asano Y, Sakata Y (3人略) Komuro I. The impact of cardiac resynchronization therapy in an end-stage heart failure patient with a left ventricular assist device as a bridge to recovery. A case report. *Int Heart J.* 52:246-247, 2011.
- 47) Takeda Y (7人略) Komuro I (1人略). Diabetic retinopathy is associated with impaired left ventricular relaxation. *J Card Fail.* 17:556-560, 2011.
- 48) Nomura S (8人略) Komuro I (1人略). Dilated cardiomyopathy with centronuclear myopathy in a young male. *Int J Cardiol.* 150:213-216, 2011.
- 49) Nakatani K (14人略) Komuro I (1人略). Serum apolipoprotein B-48 levels are correlated with carotid intima-media thickness in subjects with normal serum triglyceride levels. *Atherosclerosis.* 218:226-232, 2011.
- 50) Kitahara H (3人略) Komuro I. Effect of pioglitazone on endothelial dysfunction after sirolimus-eluting stent implantation. *Am J Cardiol.* 108:214-219, 2011.
- 51) Takaoka H (3人略) Komuro I (1人略). Comparison of image characteristics of plaques in culprit coronary arteries by 64 slice CT and intravascular ultrasound in acute coronary syndromes. *Int J Cardiol.* May 3, 2011.
- 52) Kurotobi T (10人略) Komuro I. Electrophysiological features of atrial tachyarrhythmias after the creation of a left atrial roof line during catheter ablation of atrial fibrillation. *Int Heart J.* 52:929-7, 2011.
- 53) Ueda H (12人略) Komuro I (1人略). Prevention of contrast induced nephropathy by bolus injection of sodium bicarbonate in patients with chronic kidney disease undergoing emergent coronary procedures. *Am J Cardiol.* 107:1163-1167, 2011.
- 54) Minamiguchi H (4人略) Komuro I. Low atrial septal pacing with dual-chamber pacemakers reduces atrial fibrillation in sick sinus syndrome. *J Cardiol.* 57:223-230, 2011.
- 55) Kataoka A (8人略) Komuro I. Differentiation of pseudodyskinesia of inferior left ventricular wall from inferior myocardial infarction by assessment of regional myocardial

- strain using two-dimensional speckle tracking echocardiography. *Int J Cardiol.* 152:362-368, 2011.
- 56) Kataoka A (10人略) Komuro I.
Quantitative evaluation of left atrial volumes and ejection fraction by 320-slice computed-tomography in comparison with three- and two-dimensional echocardiography: A single-center retrospective-study in 22 subjects. *Int J Cardiol.* 153:47-54, 2011.
- 57) Masuda M (7人略) Komuro I (1人略).
The Impact of Atrial Fibrillation Ablation on Left Atrial Function: Association with Baseline Left Atrial Function. *Pacing Clin Electrophysiol.* Dec 8, 2011.
- 58) Hara M (3人略) Asano Y, Sakata Y (1人略) Komuro I.
Clinical impact of off-label cardiac resynchronization therapy in end-stage heart failure patients on continuous intravenous inotrope. *Clin Cardiol.* 34:714-720, 2011.
- 59) Sasaki K (3人略) Sakata Y, Komuro I.
A case of thyroid storm with multiple organ failure effectively treated with plasma exchange. *Intern Med.* 50:2801-2805, 2011.
- 60) Yuasa-Kawase M (12人略) Komuro I (1人略).
Patients with CD36 Deficiency Are Associated with Enhanced Atherosclerotic Cardiovascular Diseases. *J Atheroscler Thromb.* Nov 10, 2011.
- 61) Kobayashi N (10人略) Komuro I, Arano Y (2人略).
Toward in vivo imaging of heart disease using a radiolabeled single-chain Fv fragment targeting tenascin-C. *Anal Chem.* 83:9123-9130, 2011.
- 62) Odaka K (8人略) Komuro I (1人略).
In vivo tracking of transplanted mononuclear cells using manganese-enhanced magnetic resonance imaging (MEMRI). *PLoS One.* 6:e25487, 2011.
- 63) Sakata Y (13人略) Komuro I.
Oral treatment with nicorandil at discharge is associated with reduced mortality after acute myocardial infarction. *J Cardiol.* 59:14-21, 2012.
- 64) Uchiyama R (4人略) Komuro I (1人略).
Role of regulatory T cells in atheroprotective effects of granulocyte colony-stimulating factor. *J Mol Cell Cardiol.* Jan 18, 2012.
- 65) Hasegawa H (4人略) Komuro I.
Effect of Switching from Telmisartan, Valsartan, Olmesartan, or Losartan to Candesartan on Morning Hypertension. *Clin Exp Hypertens.* Jan 17, 2012.
- 66) Fukushima N (10人略) Komuro I.
A crucial role of activin A-mediated growth hormone suppression in mouse and human heart failure. *PLoS One.* 6:e27901, 2012.
- 67) Iwashita M (11人略) Komuro I (3人略).
Valsartan, independently of AT1 receptor or PPAR γ , suppresses LPS-induced macrophage activation and improves insulin resistance in cocultured adipocytes. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 302:E286-296, 2012.
- 68) Ma H (9人略) Komuro I (2人略).
Association of Stat3 with HSF1 plays a critical role in G-CSF-induced cardio-protection against ischemia/reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol.* Mar 6, 2012.
- 69) Kameda Y (4人略) Komuro I (1人略).
Effects of Pitavastatin on Pressure Overload-Induced Heart Failure in Mice. *Circ J.* Feb 23, 2012.
- (和文業績)
- 1) 小室一成. 陳旧性心筋梗塞. 今日の診断指針 第6版. 838-849. 2011.
 - 2) 小室一成. 心不全治療の最前線「総論:心不全はエベレストである」*Bio Clinica.* 26(3):16-17,2011.
 - 3) 赤澤宏、小室一成. 特集 高血圧学会治療の未来への展開 II.治療 2. 合併症のある高血圧の治療 3)心臓病. *日本内科学会雑誌* 100 (2)394-399,2011.
 - 4) 赤澤宏、小室一成. 5.患者背景を考慮した配合剤の選択と使い分けのアポイント 2)ARB/CCB配合剤. *Progress in Medicine.* 31(1),2011.
 - 5) 森下竜一、小室一成. 第5回 臨床最前線 *Cardiovascular Frontier.* 2(1): 67-71, 2011.
 - 6) 小室一成. 座談会「心不全を新しい視点が考える」*Cardiovascular Frontier.* 2(3): 7-11, 2011.
 - 7) 赤澤宏、小室一成. 第2章 慢性炎症と生活習慣病 4.心疾患と慢性炎症. *実験医学増刊* 29(10):88(1566)-93(1571), 2011.

- 8) 小室一成、池田隆徳、小林義典、山下武志. 座談会 変革期にある心房細動診療—最新動向と今後の展望. *Nikkei Medical*. 6:68-71, 2011.
- 9) 森下竜一(司会)、小室一成、堀内正嗣、益崎裕章、光山勝慶. 座談会 沖縄クライシスに学ぶ今後の研究課題と治療戦略 —メタボリックシンドロームを中心として—. *Pharma Medica*. 29(6):72-78, 2011.
- 10) 赤澤宏、小室一成. 第2章 慢性炎症と生活習慣病 4.心疾患と慢性炎症. *実験医学増刊* 29(10):88-93, 2011.
- 11) 小室一成(司会)、石坂信和、塩島一朗、寺崎文生. 座談会 心臓細動治療の現状と今後の展開. *Pharma Medica*. 29(7):101-105, 2011.
- 12) 赤澤宏、小室一成. 特集 心臓の謎に迫る RAS 抑制はなぜ心不全に有効なのか? *Angiotensin Research*. 8(3):120-124, 2011.
- 13) 赤澤宏、小室一成. 特集 心血管病予防からみた高血圧の最新治療戦略 心不全と高血圧治療. *月間循環器* 1(1):77-83, 2011.
- 14) 森下竜一(司会)、Juan Carlos Lopez、室原豊明、小室一成. 特別座談会「トップジャーナルにアクセプトされる論文とは—Nature Medicine 編集長に聞く—」*Cardio-Lipidology*. 5(2):37-46, 2011.
- 15) 小室一成. メタボ時代の高血圧との付き合い方 高血圧は死に至る“サイレントキラー(静かな殺し屋)”*Beautiful-aging Festa 2011 別冊*.
- 16) 小室一成(司会)、奥山裕司、塩島一朗、山下武志. 座談会 これからの心房細動治療. *Nikkei Medical*. 8:112-115. 2011.
- 17) 小室一成、李鍾國. 特集 心不全診療—予防と治療の最前線 心不全再生治療の現状と展望. *日本医師会雑誌* . 140(4):777-780. 2011.
- 18) 小室一成. 特集 心筋症—研究と診療の現状と課題 総論. *CARDIA CPRACTICE*. 22(3):199. 2011.
- 19) 小室一成(司会)、竹村元三、森田啓行、山岸正和. 特集 心筋症—研究と診療の現状と課題 座談会 心筋症—発症原因から新しい治療法を考える. *CARDIAC PRACTICE*. 22(3):243-251. 2011.
- 20) 小室一成(企画編集). 循環器治療薬の選択と適性使用. *月刊循環器 CIRCULATION*. 1(2):10-11. 2011.
- 21) 小室一成(司会)、堀内正嗣(コメンテーター)、野出孝一(コメンテーター). メタボリックシンドローム合併高血圧治療における‘メタボサルタン’への期待. *Medical Tribune* . 44(35):20-21. 2011.
- 22) 小室一成(司会)、苅尾七臣、森下竜一、佐田政隆. 心血管イベント抑制を目指す高血圧治療における‘メタボサルタン’への期待. *日経メディカル* 553:135-138. 2011.

2、学会発表

- 1) 小室 一成. 心不全の新しい発症機序と治療. 小児循環器学会 福岡市 2011-7.6-8.
- 2) 小室 一成. Mechanism and Regeneration Therapy for Heart Failure. 心不全学会 鹿児島市 2011.10.13-15.
- 3) 小室 一成. Anti-hypertensive erapy for Patients Complicated with Heart Diseases. 高血圧学会 宇都宮市 2011.10.20-22.
- 4) 小室 一成. ARB の最新知見. 高血圧学会 宇都宮市 2011.10.20-22.
- 5) 小室 一成. Aging as a cause of vascular injury. 血管生物医学会 東京都 2011.12.8-10.
- 6) 小室 一成. 心筋保護と左室リモデリングの抑制を目的とした薬物治療. 日本循環器学会 福岡市 2012.3.16-18.
- 7) 小室 一成. VART-家庭血圧サブ解析からの最新知見. 日本循環器学会 福岡市 2012.3.16-18.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

1、特許取得

公開番号 : 特開 2011-084571
 公開日 : 平成23年4月28日
 出願番号 : 特願 2011-007128
 出願人 : 積水メディカル会社 N/A
 大門 雅夫
 出願日 : 平成23年1月17日
 発明人 : 大門 雅夫
 南野 徹
 橋本 謙二
 小室 一成

2、実用新案登録

なし

3、その他

以上、特筆すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
分担研究報告書

臨床心不全エピゲノム診断における組織可塑性指標となる
新規サロゲートマーカーの開発と治療への応用に関する研究

研究分担者 北風政史 国立循環器病研究センター 部長

研究要旨

本研究は分担者らが世界に先駆け証明した心不全におけるエピゲノム機序の重要性に関する新知見について、心不全発症メカニズムに関する基礎臨床の多角的な研究性成果を組み合わせ、臨床心不全エピゲノム診断における組織可塑性指標となる新規サロゲートマーカーの開発と治療への応用を目標に研究を行う。心不全動物モデル開発、病態機序解析、ヒト疫学調査などで得た研究成果をもとに、未だ実用化されていない心不全可塑性の診断指標が開発されれば、治療の負担を軽減し、内科外科の最先端治療を精緻に実行することが可能になると期待される。

エピゲノム指標と遺伝子発現指標をリファレンスに、病理学的指標を組み合わせ、細胞核超微細構造の各解析と臨床指標との比較を検討するとともに、各分子修飾の動物病態モデルにおける評価を行う。高齢化社会の進行と生活習慣病の進行に伴い増加した心不全患者の治療は保険医療上の重要課題である。21世紀に入り充実したゲノム情報をもとに次世代のエピゲノム基盤研究を行うことにより、テーラーメイド医療の発展に貢献すべく研究を行う。

A. 研究目的

今後需要拡大が予想される慢性心不全、難治性心不全への治療方法である、補助人工心臓や移植医療の適応判断に際しては、病態進展と治療抵抗性を決める心筋可塑性を表す新規サロゲートマーカーが必要である。

ヒトのゲノムワイドなエピゲノム解析を行い病理学的指標との対比から、未だ実用化されていない、心不全可塑性の分子指標を開発する。

B. 研究方法

1. 重症心不全病理画像解析技術の確立と臨床マーカーとの比較検討

細胞核超微細構造の画像解析からのエピゲノム変

化指標の病理学的探索

臨床診療において説明と同意書の取得を行い採取がおこなわれる検体は、心不全原因鑑別診断および病態把握のために行われる心筋生検、および心臓移植ないし心補助循環治療を行う際に採取されるヒト臨床不全心筋組織試料をもとに行う。それら臨床診断および臨床データの評価を行い、的確なデータベースを指導的立場で構築する。

2. 心不全可塑性を示す新しい診断鑑別方法の確立

心筋細胞核超微細構造の画像解析からのエピゲノム変化指標の病理学的探索

細胞核超微細構造の画像解析からのエピゲノム変化指標を得るために、心不全臨床検査データと、それに連動する病理マーカー指標の比較検討を行う。病理微細構造解析法における病態・病期におけ

る Cut-off 値の決定を行う上で必要な臨床データ評価および解析を指導的立場から実施する。

心不全エピゲノムおよび遺伝子発現プロファイルの作成

超高速シーケンシングによる RNA 発現解析を行う上で参考にするための DNA マイクロアレイ解析 (GeneChip 解析)を行う。

(倫理面への配慮)

患者情報の解析に関しては施設の倫理委員会の承認を得た上、臨床研究倫理指針を遵守し慎重におこなう。その上で患者とは個別に、医師が書面に示した計画書を明示し、十分説明をしたうえで承諾を得たもののみを本研究に使用する。特に以下の点に留意する。

1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護: 診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者において情報を管理する。

2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置: 心筋生検試料採取は通常の診療の際に医学的必要性に応じて行われたもののうち、診療に用いない残余検体を利用することとし、危険や不利益はないと考える。誤って遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益をこうむる可能性が考えられるため、これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

3) 試料提供者から採取した生体材料の取り扱いについて: 提供された試料は、個人識別情報管理者が連結匿名化し、匿名化ラベルのみ貼って保存する。これらの試料は、生体試料の包括利用同意を得ており、本研究だけでなく、将来倫理委員会で承認された他の自主臨床研究についても用いることが可能である。したがって検査済みの試料は、適宜連結可能匿名化番号を含む検体等を完全に削除した上で廃棄するが、使用可能な残余検体は匿名化されたまま施錠された保管場所で保管される。また、特に研究成果として得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策を行う。

動物実験においても愛護上の問題点を考慮の上、施設の審査結果を本研究について得た。この倫理規定にのっとり動物愛護上の配慮を十分行って実験をおこなう。

C. 研究結果

1. 重症心不全病理画像解析技術の確立と臨床マーカーとの比較検討

細胞核超微細構造の画像解析からのエピゲノム変化指標の病理学的探索

臨床診療において説明と同意書の取得および採取がおこなわれた検体に対して、心不全原因鑑別診断および病態把握の結果と既知・従来の臨床診断マーカーをもとにした臨床診断および臨床データの評価を行い、基礎臨床統合データベースの作成において指導を行った。

2. 心不全可塑性を示す新しい診断鑑別方法の確立

心筋細胞核超微細構造の画像解析からのエピゲノム変化指標の病理学的探索

心筋細胞核クロマチン構造変化の臨床指標を独自に考案し、その指標の妥当性を臨床検査データとの相関を見つけることができた。その数値と臨床データの相関を考慮する上で、基礎的病態解析に必要な臨床情報の整理が必要であった。今後は新規病理微細構造解析法における病態・病期を判断できることを目標とする。

心不全エピゲノムおよび遺伝子発現プロファイルの作成

次世代シーケンサーのデータ解析パイプラインを用いて、マウス・ヒト心不全 RNA-seq 解析を行い、各データと共に共通ビューワーIGVへの変換作業を行っているが、その際に参考となるデータを得るため、RNA-seq ではなく、あくまで従来法におけるデータとして、DNA マイクロアレイを行った。

既にマウスモデルに関しては、エピゲノムと遺伝子発現両プロファイルを比較し、次年度計画を前倒し複数の候補領域選定作業を開始した。今後の機能解析はもとよりヒト心不全エピゲノム・遺伝子発現プロファイルへの作業も併せて行い、統合データベースとして充実をはかる予定である。

D. 考察

画像解析と心不全可塑性サロゲートマーカーの組み合わせによるヒト臨床応用開発、および新たな心不全可塑性サロゲートマーカーの開発を行う上で、

心機能改善の可塑性を表す指標の開発は心不全診療の技術水準の向上に寄与する。生命予後はもとより、社会における活動性や生活の質の改善に役立つ診療指標の開発を行うことは、保健医療上重要であるとともに、医療経済、社会経済上のメリットが期待される。

慢性心不全患者の罹患人口は多いため、わずか数%の予後改善効果たりとも、その社会的貢献は計り知れないものがある。本年度解析において作成したデータプロファイルより、心不全特異的に変化を示すエピゲノム分子およびその修飾、病理組織変化などがあることが示唆されている。次年度は現在同定しつつあるこれら領域、蛋白の病態との相関性、機能解析を引き続き行う。それらの指標は現時点で臨床病態に非常に良く相関するとしされており、今後その組織学的意義を解明することにより生物学的検証が進むものと考えられる。

E. 結論

ヒト臨床心不全特殊生体試料を利用したエピゲノム解析を行い、Genome-wide な DNA メチル化およびヒストン修飾解析、超高速シーケンシングによる RNA 発現解析と心不全関連遺伝子プロファイルの作成を行う際に必要な、臨床診断および臨床データの評価を行った。

心不全可塑性を示す新しく病理学的鑑別診断法の確立を行うため、病理組織におけるエピゲノム変化指標の検索を行い、重症心不全病理画像解析技術の確立と臨床マーカーとの比較検討から、細胞核超微細構造の画像解析法を新規に確立した。

F. 健康危険情報

現在まで有害の事象なし

G. 研究発表

1、論文発表

(英文原著)

- 1) Sakamoto A, Kitakaze M (4人略) JL-KNIGHT, study group. Landiolol, an Ultra-Short-Acting $\beta(1)$ -Blocker, More Effectively Terminates Atrial Fibrillation Than Diltiazem After Open Heart Surgery. *Circ J*. Feb 23 2012.
- 2) Kitakaze M (4人略).
- 3) Sanada S, Kitakaze M, Komuro I. The less embraces the greater in detecting multiple coronary artery disease. *Circ J*. 76(2): 299-300. 2012.
- 4) Liu W (7人略) Yamazaki S (9人略) Kitakaze M (4人略). Identification of RNF213 as a susceptibility gene for moyamoya disease and its possible role in vascular development. *PLoS One*. 6(7): e22542. 2011.
- 5) Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 301(5): H1723-41. 2011.
- 6) Xuan W (6人略) Kitakaze M. Detrimental effect of fractalkine on myocardial ischaemia and heart failure. *Cardiovasc Res*. 192(3): 385-93. 2011.
- 7) Ohara T (9人略) Kitakaze M. Dynamic changes in plasma total and high molecular weight adiponectin levels in acute heart failure. *J Cardiol*. 58(2): 181-90. 2011.
- 8) Liao Y (8人略) Kitakaze M. Deficiency of type 1 cannabinoid receptors worsens acute heart failure induced by pressure overload in mice. *Eur Heart J*. in press. 2011.
- 9) Kamiya CA, Kitakaze M (5人略). Different characteristics of peripartum cardiomyopathy between patients complicated with and without hypertensive disorders. -Results from the Japanese Nationwide survey of peripartum cardiomyopathy-. *Circ J*. 75(8): 1975-81. 2011.
- 10) Nakajima I (7人略) Kitakaze M. Pre- and post-operative risk factors associated with cerebrovascular accidents in patients supported by left ventricular assist device. -Single center's experience in japan-. *Circ J*. 75(5): 1138-46. 2011.
- 11) Sato T (12人略) Kitakaze M. Safety and tolerability of once-daily controlled-release carvedilol 10-80mg in Japanese patients with chronic heart failure. *Circ J*. 76(3): 668-74. 2012.

Utility of left ventricular systolic torsion derived from 2-dimensional speckle-tracking echocardiography in monitoring acute cellular rejection in heart transplant recipients. J Heart Lung Transplant. 30(5): 536-43. 2011.

2、学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定も含む)

- 1、特許取得
なし
- 2、実用新案登録
なし
- 3、その他
以上、特筆すべき事項なし

厚生労働科学研究費補助金(創薬基盤推進研究事業)
分担研究報告書

臨床心不全エピゲノム診断における組織可塑性指標となる
新規サロゲートマーカーの開発と治療への応用に関する研究

研究分担者 堤 修一 東京大学先端科学技術研究センター 特任准教授

研究要旨

心不全におけるエピゲノム機序の重要性に関する新知見について、心不全発症メカニズムに関する基礎臨床の多角的な研究性成果を組み合わせ、臨床心不全エピゲノム診断における組織可塑性指標となる新規サロゲートマーカーの開発と治療への応用を目標に研究を行う。

核蛋白ヒストンや DNA メチル化に代表されるエピゲノム分子修飾は個体発生と機能維持に必要であるが、環境変化にも柔軟に対応できる機序として注目されている。ヒト臨床組織検体からのゲノムワイドな解析を行うことにより、DNA メチル化、超高速 DNA シーケンスによるヒストン修飾と RNA 発現のみならず、細胞核超微細構造の各解析と臨床指標との比較を検討するとともに、各分子修飾の動物病態モデルにおける評価を行う。さらに心不全のエピゲノム・遺伝子発現プロファイルを作成し、病態と関連する核内蛋白の新規スクリーニングを行い、同定した心不全可塑性サロゲートマーカーの臨床心不全への有用性を検討する。

高齢化社会の進行と生活習慣病の進行に伴い増加した心不全患者の治療は保険医療上の重要課題である。21 世紀に入り充実したゲノム情報をもとに次世代のエピゲノム基盤研究を行うことにより、テーラーメイド医療の発展に貢献すべく研究を行う。

A. 研究目的

国内数十万人が罹患する心不全の心保護治療に加え、今後需要拡大が予想される補助人工心臓や移植医療の適応判断に際しては、病態進展と治療抵抗性を決める心筋可塑性を表す新規サロゲートマーカーが必要である。ヒトのゲノムワイドなエピゲノム解析を行い未だ実用化されていない、心不全可塑性の分子指標を開発する。

B. 研究方法

1、ヒト臨床心不全特殊生体試料を利用したエピゲノム解析

Genome-wide な DNA メチル化およびヒストン修飾解析を行う。説明と同意書の取得の後に採取されたヒト臨床不全心筋組織試料を用いて DNA メチル化チップアレイを用いてゲノムワイドな高解像度 DNA メチル化解析を行う。不全心筋組織、正常心筋組織をそれぞれ 4 検体以上で比較し、さらに非心臓組織を用いて心筋特異的メチル化部位の同定も併せて行う。

同じ心筋組織検体を用いて超高速 DNA シーケンサーを用い、遺伝子転写活性化を示すヒストン修飾 histoneH3K3me4 および抑制性を示す指標として histoneH3K27me3、さらに転写複合体の結合部位探索のため RNA polymerase II、ほか有意な転写制御を鑑別可能な抗体を用いて行った、genome-wide にクロマチン免疫沈降(ChIP)-sequence 解析データとともに、病態変化にともなう転写因子複合体やエピゲノム修飾のゲノム上の感受性領域を検討する。

2、心不全可塑性を示す新しい診断鑑別方法の確立

心不全エピゲノムおよび遺伝子発現プロファイルの統合データプロファイルを作成する。説明と同意書の取得の後に採取されたヒト臨床不全心筋組織試料を用いて行われる RNA 発現解析データと、先項にて解析した DNA メチル化解析データとを比較することで、心臓、心不全特異的エピゲノム変化部位の有無を検討する。

DNA メチル化データと、超高速シーケンシングによる RNA 発現解析と心不全関連遺伝子プロファイルとのデータを統合し比較する。Genome-wide な DNA メチル化解析、ヒストン修飾解析、超高速シーケンシングによる RNA 発現解析において作成した心不全関連遺伝子プロファイルから、心臓特異的機能変化を持つと考えられる遺伝子リストを作成し、心不全可塑性に関するエピゲノム診断に用いる分子マーカーを同定する。

(倫理面への配慮)

患者情報の解析に関しては施設の倫理委員会の承認を得た上、臨床研究倫理指針を遵守し慎重におこなう。その上で患者とは個別に、医師が書面に示した計画書を明示し、十分説明をしたうえで承諾を得たもののみを本研究に使用する。特に以下の点に留意する。

- 1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護: 診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者において情報を管理する。
- 2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置: 心筋生検試料採取は通常の診療の際に医学的必要性に応じて行われたもののうち、診療に用いない残余検体を利用することとし、危険や不利益はないと考える。誤って遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益をこうむる可能性が考えられるため、これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。
- 3) 試料提供者から採取した生体材料の取り扱いについて: 提供された試料は、個人識別情報管理者が連結匿名化し、匿名化ラベルのみ貼って保存する。これらの試料は、生体試料の包括利用同意を得ており、

本研究だけでなく、将来倫理委員会で承認された他の自主臨床研究についても用いることが可能である。したがって検査済みの試料は、適宜連結可能匿名化番号を含む検体等を完全に削除した上で廃棄するが、使用可能な残余検体は匿名化されたまま施錠された保管場所で保管される。また、特に研究成果として得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策を行う。

動物実験においても愛護上の問題点を考慮の上、施設の審査結果を本研究について得た。この倫理規定にのっとり動物愛護上の配慮を十分行って実験をおこなう。

C. 研究結果

1、ヒト臨床心不全特殊生体試料を利用したエピゲノム解析

ヒト臨床不全心筋組織試料を採取し、それら資料の中から、DNA メチル化チップアレイを用いてゲノムワイドな高解像度 DNA メチル化解析を行うべく、不全心筋組織 5 検体、正常心筋組織 2 検体を用い、Pilot 的に DNA メチル化を検出することが可能であるかを検討した。当初の目的通り想定されるメチル化部位について再現性の良い検出を確認し、さらに追加解析を行った。不全心筋組織 6 検体、正常心筋組織 2 検体について解析を行い、総計、不全心筋組織 11 検体、正常心筋組織 4 検体のデータを蓄積することができた。心筋特異的メチル化部位の同定も併せて行うことを目的として、さらに非心臓組織 7 検体のデータを用いて、不全心筋組織の DNA メチル化変化領域の部位プロファイリングを行った。

DNA メチル化のみならず、ヒストン修飾や遺伝子転写部位を同定するため、同じ心筋組織検体を用いて遺伝子転写活性化を示すヒストン修飾 histoneH3K3me4 および抑制性を示す指標である histoneH3K27me3、そして転写複合体の結合部位探索のため RNA polymerase II の Genome-wide にクロマチン免疫沈降(ChIP)-sequence 解析を行っている。それらのデータと本メチル化解析データを比較するためデータの統合解析を行った。継続して条件検討を行っている。病態変化にともなう転写因子複合体やエピゲノム修飾のゲノム上の感受性領域を検討することが可能となる。

2、心不全可塑性を示す新しい診断鑑別方法の確立