

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を行った。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へ変換し、今回作成した DNA メチル化解析データをクラスター解析および viewer 化処理を行った。

マウスモデルを用いたデータ解析に関しても、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ている。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。

#### D. 考察

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することで、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へと発展させることができる。

本年度解析において作成したデータプロファイルを参考に、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、病理組織変化などを検証し、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

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。

#### 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) Wang L, Tsutsumi S (15人略) Ueda H (7人略). Whole-exome sequencing of human pancreatic cancers and characterization of genomic instability caused by MLH1 haploinsufficiency and complete deficiency. *Genome Res.* 22(2):208-219. 2012.
- 2) Totoki Y (1人略) Yamamoto S (3人略) Tsutsumi S (14人略). High-resolution characterization of a hepatocellular carcinoma genome. *Nat Genet.* 43(5):464-469. 2011.
- 3) Waki H (11人略) Tsutsumi S (5人略). Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NFI family in adipocyte differentiation. *PLoS Genet.* 7(10):e1002311. 2011.
- 4) Kanki Y (2人略) Tsutsumi S (11人略). Epigenetically coordinated GATA2 binding is necessary for endothelium-specific endomucin expression. *EMBO J.* 10;30(13):2582-95. 2011.
- 5) Nagae G (4人略) Tsutsumi S (11人略). Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation. *Hum Mol Genet.* 15;20(14):2710-2721. 2011.
- 6) Mizutani A (1人略) Tsutsumi S (6人略). Cell type-specific target selection by combinatorial binding of Smad2/3 proteins and hepatocyte nuclear factor 4alpha in HepG2 cells. *J Biol Chem.* 286(34):29848-29860. 2011.
- 7) Tozawa H (2人略) Tsutsumi S (6人略). Genome-wide approaches reveal functional interleukin-4-inducible STAT6 binding to the vascular cell adhesion molecule 1 promoter. *Mol Cell Biol* 31(11) 2196-2209. 2011.
- 8) Morikawa M (1人略) Tsutsumi S (5人略). ChIP-seq reveals cell type-specific binding patterns of BMP-specific Smads and a novel binding motif. *Nucleic Acids Res.* 39(20), 8712-8727. 2011.
- 9) Yasui T (1人略) Tsutsumi S (3人略). Epigenetic regulation of osteoclast differentiation: possible involvement of Jmjd3 in

the histone demethylation of Nfatc1. J Bone Miner Res. 26(11), 2665-2671. 2011.

## 2、学会発表

- 1) 堤 修一、王 凌华、朴 明子、照井君典、佐々木伸也、伊藤悦朗、林 泰秀、油谷浩幸。  
MLL再構成陽性の小児急性リンパ性白血病のエクソーム解析. 第53回日本小児血液・がん学会学術集会 前橋市 2011. 11. 25.
- 2) 堤 修一、岡部篤史、油谷浩幸. 英文演題名: An epigenetic landscape by p53 activation in human genome 和文演題名: p53 活性化に伴うエピゲノム変化. 第70回日本癌学会学術総会 名古屋市 2011. 10. 3.

## 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 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)

### 研究要旨

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。心不全可塑性を示す新しく病理学的鑑別診断法の確立するため、病理組織におけるエピゲノム変化指標の検索を行うとともに、細胞核超微細構造の画像解析より新規病理学的探索を行う。臨床病態に即した変化を示す心筋細胞核クロマチン構造変化をとらえることで、心不全可塑性を示す新規重症心不全病理画像解析技術の確立ができるよう検討を行う。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っている。

#### 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、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を行う。臨床診療において説明と同意書の取得の後に得られた臨床病理標本の作製について指導的立場から実験プロトコルの検討および研究戦略の検証を行う。

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を行う。重症心不全病理検体から得られる細胞核超微細構造の病理像について指導的立場からの画像所見を確定する。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うことができるようになる。

(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

### (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設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行う。

## 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

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することとなった。

## 2、心不全可塑性を示す新しい診断鑑別方法の確立

心筋細胞核クロマチン構造変化の臨床指標が臨床病態に即した変化を示すことができた。得られたCut-off 値を元に、その指標の妥当性を臨床検査データとの相関を検討した。

## D. 考察

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。その様な中でも、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が重要であると考えられる。

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により、基礎的病態解析を組み合わせ、新規病理微細構造解析法が示され、将来の病態・病期を判断できる可能性を有すると考えられた。

## E. 結論

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。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を行い、臨床病態に即した変化を示す心筋細胞核クロマチン構造変化をとらえることができた。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。

## 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

- 1) Tsuburaya R (8人略) Ishibashi-Ueda H, Shimokawa H.  
Long-term treatment with nifedipine suppresses coronary hyperconstricting responses and inflammatory changes induced by paclitaxel-eluting stent in pigs in vivo: possible involvement of Rho-kinase pathway. *Eur Heart J*. 33(6):791-9, 2012.
- 2) Sato T, Ishibashi-Ueda H (7人略) Kitakaze M.  
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.
- 3) Kamiya CA, Kitakaze M, Ishibashi-Ueda H (4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.
- 4) Hao H, Ishibashi-Ueda H (6人略).  
Drug-eluting stent: importance of clinico-pathological correlations. *Circ J*. 75(7):1548-58, 2011.
- 5) JCS Joint Working Group.  
Guidelines for diagnosis and treatment of myocarditis (JCS 2009). *Circ J*. 75(3):734-43, 2011.
- 6) Schwenke DO (3人略) Ishibashi-Ueda H (4人略).

Exogenous ghrelin improves blood flow distribution in pulmonary hypertension-assessed using synchrotron radiation microangiography. *Pflugers Arch*. 462(3):397-406, 2011.

- 7) Nakano I (1人略) Ishibashi-Ueda H (7人略).  
Sudden death from systemic rotavirus infection and detection of nonstructural rotavirus proteins. *J Clin Microbiol*. 49(12):4382-5, 2011.

### 2、学会発表

- 1) Fujita T, Toda K, Kobayashi J, Yanase M, Seguchi O, Murata Y, Ishibashi-Ueda H, Nakatani T.  
Risk factors for post-transplant low output syndrome. 25th annual meeting of the European Association for Cardio-Thoracic Surgery. 2011, Lisbon, Portugal.  
*Eur J Cardiothorac Surg*. 2012 Feb. [Epub ahead of print].
- 2) Sato T, Yanase M, Murata Y, Seguchi O, Sunami H, Matsuyama T, Ikeda Y, Ishibashi-Ueda H, Nakatani T.  
C4d Deposition of Capillary Endothelium, as a Marker of Antibody Mediated Rejection. The 12th Congress of the Asian Society of Transplantation. 2011, Seoul, Korea.

## 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 南野哲男 大阪大学大学院医学系研究科 講師

## 研究要旨

エピゲノム分子修飾は個体発生と機能維持や、環境変化にも柔軟に対応できる機序として必要とされる、核蛋白ヒストンや DNA メチル化に代表される分子修飾を同定するため、心不全発症に関わる基礎臨床のデータプロファイルを組み合わせることにより、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。特に、病理組織像解析から、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。また、動物モデルより核内蛋白の新規スクリーニングに用いる組織サンプルを作成準備する。

### A. 研究目的

重症慢性心不全の罹患患者数は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。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。そして、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、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

ヒト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を行う。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ことができる臨床データを利用する。

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心不全心筋組織試料について、それらのリファレンスとなる臨床診療データファイルを作成する。

#### 2、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の同定を行うために、心不全動物モデルおよび培養心筋細胞モデルを作成し、心不全感受性ゲノム領域を同定、また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解析を行うための検体組織を作成する。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。

(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を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、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

ヒト臨床不全心筋組織試料については、説明と同意書の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。ヒト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を行った。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。

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。

### 2、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。

## D. 考察

ヒト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を行うにあたっては、病理解析結果と照合し各データ間で相関解析を行うことができる詳細情報を整えた臨床データを蓄積することが重要である。そうすることにより、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が可能となる。

さらに、ヒト検体同様、動物モデルにおいても、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するにあたっては、詳細な心不全病態情報を整えた組織検体を準備することで、蛋白分離精製などにも応用可能な有意差のある生化学的分子探索を行うことができる。

## E. 結論

病理組織におけるエピゲノム変化指標の検索を行うための臨床情報、組織検体の準備を行った。そ

れらを用い、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を行うことで、細胞核超微細構造の画像解析法を新規に確立することができた。

また、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の準備に用いる検体を作成した。

#### 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

- 1) Minamino T, (4人略).  
Erythropoietin, progenitor cells and restenosis. Thrombosis and Haemostasis. In press. 2012 .
- 2) Ishii T, (5人略), Minamino T, Oku N.  
Amelioration of cerebral ischemia-reperfusion injury based on liposomal drug delivery system with asialo-erythropoietin. J Control Release. Epub ahead of print. 2012.
- 3) Nishikawa K, (8人略), Minamino T.  
Development of anti-HB-EGF immunoliposomes for the treatment of breast cancer. J Control Release. Epub ahead of print. 2011.

##### 2、学会発表

- 1) 肥後修一郎、南野哲男、小室一成. 心筋梗塞患者に対するエポエチンベータ投与による心機能改善効果に関する研究-II. 第17回日本心血管インターベンション治療学会近畿地方会アワード2. 2011.8.
- 2) 南野哲男. シンポジウム<急性冠症候群の治療—Beyond the Reperfusion—Advances in the Treatment of Acute Coronary Syndrome—Beyond the Reperfusion—>心筋梗塞患者に対するエポエチンベータ投与による心機能改善効果に関する研究-II. 第75回日本循環器学会総会・学術集会 3. 2011.8.
- 3) 南野哲男. シンポジウム<急性心筋梗塞を対象とした臨床試験>心筋梗塞患者に対するエポエチンベータ投与による心機能改善効果に関

する研究-II, 第20回日本心血管インターベンション治療学会.2011.7.

#### 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 坂田泰史 大阪大学大学院医学系研究科 助教

## 研究要旨

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。かかる重要課題の克服の為、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。

そこで、臨床検体から得られるエピゲノム指標と、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。

### 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。

よる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う。ヒト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を行う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心不全心筋組織試料について、それらのリファレンスとなる臨床診療データファイルを作成に協力する。さらに説明と同意書を取得の後に連結匿名化臨床データとして利用する。

### 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

心不全一般の新規病理検索法として確立することができる臨床データを蓄積する。病理組織検査に

#### 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心不全心筋組織試料を行うため、臨床診療データを説明と同意書を取得の後に臨床データ連結匿名化可能な組織サンプルを作成する。それらを病理解析することで、細胞核クロマチン超微細構造解析を行い、各

データ間で相関解析が可能な心不全一般の新規病理検索法として確立する。

## 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

心不全臨床検査データと連動する病理マーカー指標を知るため、臨床データの蓄積を行い、データプロファイルを作成する。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との対比を行う。それらの比較検討を行い、それらの統合的解析で明らかにした各指標を探し、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。

#### (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

説明と同意書の取得を経て入手したヒト臨床心筋組織病理検体を採取する。

それらを用い、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、エボン樹脂包埋・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。

#### 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、説明と同意書の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

心不全臨床検査データと連動する病理マーカー指標を病理微細構造解析法により病態・病期に特異的な Cut-off 値を決定するため、臨床データの蓄積を行い、データプロファイルを作成した。

## D. 考察

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。

本年度解析において作成したヒト臨床心不全の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。

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

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うことが可能な臨床データプロファイルの作成を行った。

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。

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。

## 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

- 1) Hara M (4人略) Sakata Y, Komuro I.  
A case of non-cardiogenic acute pulmonary edema in a patient with POEMS syndrome-associated pulmonary arterial hypertension. *Ann Hematol.* ;90:489-90. 2011.
- 2) Aizawa Y, Sakata Y (7人略) Komuro I,

Yamamoto K.

Transition From Asymptomatic Diastolic Dysfunction To Heart Failure With Preserved Ejection Fraction: Roles of Systolic Function And Ventricular Distensibility. *Circ J.* 75; 596-602. 2011.

- 3) Shimomura Y (5人略) Sakata Y, Komuro I.  
Sildenafil and steroid therapy effectively improved POEMS syndrome-associated pulmonary arterial hypertension *Int J Hematology.* 92,774. 2010.
- 4) Wakabayashi K (6人略) Sakata Y, Yamamoto K, Daimon T, Masuyama T.  
Administration of angiotensin-converting enzyme inhibitors in associated with slow progression of mild aortic stenosis in Japanese patients *Heart Vessels.* 26:252-7. 2011.
- 5) Hashimoto T, Sakata Y (10人略) Komuro I.  
Pulmonary arterial hypertension associated with chronic active Epstein-Barr virus infection. *Intern Med.* 2011; 50: 119-24
- 6) Takeda Y, Sakata Y (7人略) Komuro I, Yamamoto K.  
Competing risks of heart failure with preserved ejection fraction in diabetic patients. *Eur J Heart Fail* 2011; 13: 664-669
- 7) Takeda Y, Sakata Y (6人略) Komuro I, Yamamoto K.  
Diabetic retinopathy is associated with impaired left ventricular relaxation. *J Card Fail.* 17:556-60. 2011.
- 8) 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(4):246-7. 2011.
- 9) Kamimura D, Ohtani T, Sakata Y (13人略) Komuro I, Yamamoto K.  
Ca<sup>2+</sup> entry mode of Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger as a new therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction. *Eur Heart J.* in press. 2011.
- 10) Katsuragi S (2人略), Sakata Y, Yamauchi-Takahara K, Komuro I.  
Adjunctive tadalafil therapy for managing pulmonary hypertension in a patient with

obesity hypoventilation syndrome J Cardiol Cases . in press.

- 11) Kainuma S (5人略) Sakata Y, Takahashi A, Uehata T, Kuratani T, Sawa Y. Implantation of a Jarvik 2000 left ventricular assist device as a bridge to eligibility for refractory heart failure with renal dysfunction. J Artif Organs. in press.
- 12) Okazaki S (4人略) Sakata Y, Sakaguchi T, Kitagawa K. Cerebral Microbleeds Predict Impending Intracranial Hemorrhage in Infective Endocarditis, Cerebrovasc Dis. 32:483-488. 2011.
- 13) Takeda Y, Sakata Y (6人略) Komuro I, Yamamoto K. Diabetic retinopathy is associated with impaired left ventricular relaxation. J Card Fail. 17:556-60. 2011.
- 14) Hara M (3人略) Asano Y, Sakata Y, Nanto S, Komuro I. Clinical impact of off-label cardiac resynchronization therapy in end-stage heart failure patients on continuous intravenous inotropes. Clin Cardiol. 34:714-20. 2011.
- 15) Minami Y (7人略) Sakata Y (3人略) Kasanuki H, Takano T. Admission time, variability in clinical characteristics, and in-hospital outcomes in acute heart failure syndromes: Findings from ATTEND registry. Int J Cardiol. 153: 102-5. 2011.
- 16) Sakata Y. The Role of Right Ventricular Function in the Development of Heart Failure- What Should We Solve? -Circ J. 76:43-4. 2011.
- 17) 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. 50:2801-5. 2011.

## 2、学会発表

- 1) 坂田泰史. Diastolic Wall Strain を用いた HFpEF 発症リスク予測の可能性 高血圧モデルによる検討. 第22回日本心エコー図学会シンポジウム 鹿児島 2011.4.21.
- 2) 坂田泰史. 心エコー図の new trend 左室駆出率が保たれた心不全におけるリスク評価

Diastolic Wall Strain を用いた検討. 第59回日本心臓病学会パネルディスカッション 神戸 2011.9.23.

- 3) 坂田泰史. 重症心不全における右室機能の役割 機能的僧帽弁修復術症例での検討. 第15回日本心不全学会シンポジウム 鹿児島 2011.10.14.
- 4) 坂田泰史. 臨床薬理と最新治療 重症心不全の最新治療:移植施設の最前線での薬物治療. 浜松市 第32回臨床薬理学会シンポジウム 2011.12.3.

## 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 朝野仁裕 大阪大学大学院医学系研究科 助教

## 研究要旨

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。本研究においては、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。

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、および病理学的解析として、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。

### A. 研究目的

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。

病理学的指標にヒト臨床検体をもとにしたゲノムワイドなエピゲノム解析を組み合わせることで、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

最重症心不全の治療、特に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の取得を行う。その後採取されるヒト臨床心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ための検体を採取する。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予定とする。

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 histoneH3K4me3 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

先項目と同じヒト臨床心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 Genome wide 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

エピゲノム分子修飾変化を捉える検討に用いた検体だけでなく、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も併せて、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。

## 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。

### (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、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 検体の解析を行い、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 histoneH3K4me3 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 上で比較可能となるよう、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、エポン樹脂包埋・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。

### 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を比較し、

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

慢性心不全患者の罹患人口は多いため、わずかな数%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きされており、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。

今回の検討により、ヒト生体サンプルを用いたクロマチン免疫沈降法も再現性および解像度が良く、シグナルを検出することができることが解った。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。

さらに心不全病態におけるエピゲノム解析ゲノム領域解析にとどまらず、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ものと考えられた。

#### E. 結論

ヒト臨床心不全のエピゲノム解析を行い、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。

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。

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アッセイ系を確立した。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。

#### 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) Nishikawa K (4人略) Asano Y (3人略) Minamino T. Development of anti-HB-EGF immunoliposomes for the treatment of breast cancer. J Control Release. in press. 2011.
- 2) 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(4): 246-7. 2011.
- 3) 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(11): 714-20. 2011.

(和文)

- 1) 朝野仁裕. 拡張型心筋症に関する新しい解析方法  
メディカルレビュー社 CARDIAC PRACTICE 22巻、3号、p 209 -212. 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 山崎 悟 国立循環器病研究センター 室長

## 研究要旨

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、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、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。

### A. 研究目的

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。ヒト臨床検体をもとにしたゲノムワイドなエピゲノム解析を行うことにより、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

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 histoneH3K4me3 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、不全心筋組織、正常心筋組織をそれぞれ 2 検体で比較し、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 RNA 発現解析を行い、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。

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し、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を作成する。

#### 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。

### (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

#### ① Genome-wideなDNAメチル化およびヒストン修飾解析

ヒト臨床不全心筋組織試料、不全心筋組織、正常心筋組織をそれぞれ2検体ずつで比較し、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ため、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 histoneH3K4me3 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 解析を行った。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RNA発現解析を行い、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。

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し、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を作成する。

### 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。

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。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。

#### D. 考察

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。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することが重要である。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。

#### E. 結論

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。

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。

#### 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

- 1) Liu W (7人略) Yamazaki S, (14人略). Identification of RNF213 as a Susceptibility Gene for Moyamoya Disease and Its Possible Role in Vascular Development. PLoS one. 6:e22542. 2011.

##### 2、学会発表

- 1) Daisuke Morito (2人略) Satoru Yamazaki (9人略). 口頭発表: Structure and function of novel AAA+/Ubiquitin ligase mysterin. Cold Spring Harbor Asia Conference "Protein Homeostasis in Health & Disease" Suzhou(China) 2011.9.26-30.
- 2) Ayako Takahashi (6人略) Satoru Yamazaki (6人略). 口頭発表: Dipeptidyl-peptidase IV Inhibitor Improved Cardiac Function and Survival in Mice with Pressure Overload Heart Failure. 第76回日本循環器学会学術集会 福岡 2012.3.16-18.
- 3) 小林 果、山崎 悟 (5人略). 口頭発表: ゼブラフィッシュモデルによるもやもや病感受性遺伝子 mysterin の機能解析. 第82回日本衛生学会学術総会 京都 2012.3.25.

#### 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