

201207009A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小室 一成

(東京大学大学院/大阪大学大学院)

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 小室 一成

(東京大学大学院/大阪大学大学院)

平成25(2013)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…………… 11
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…………… 15
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…………… 19
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…………… 23
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…………… 30
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…………… 34
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	39
山崎 悟	

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

Liposomal Amiodarone Augments Anti-arrhythmic Effects and Reduces Hemodynamic Adverse Effects in an Ischemia/Reperfusion Rat	43
Cardiovasc Drugs Ther 2013, Jan 24	
The less embraces the greater in detecting multiple coronary artery disease	51
Mol Cell Cardiol 2011, 821-9	
Dipeptidyl-Peptidase IV Inhibition Improves Pathophysiology of Heart Failure and Increases Survival Rate in Pressure-Overloaded Mice	53
Am J Physiol Heart Circ Physiol 2013, Mar 15	
H(2) mediates cardioprotection via involvements of K(ATP) channels and permeability transition pores of mitochondria in dogs	62
Cardiovasc Drugs Ther 2012, 26(3):217-26	
Development of anti-HB-EGF immunoliposomes for the treatment of breast cancer	72
J Control Release 2012, 160(2):274-80	
A subset of circulating microRNAs are predictive for cardiac death after discharge for acute myocardial infarction	79
Biochem Biophys Res Commun 2012, 19;427(2):280-4	
Oral treatment with nicorandil at discharge is associated with reduced mortality after acute myocardial infarction	84
J Cardiol 2012, 59:14-21	
Low Levels of Serum n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Are Associated With Worse Heart Failure-Free Survival in Patients After Acute Myocardial Infarction	92

Circ J 2012, 77(1):153-62

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 東京大学大学院医学系研究科 教授/大阪大学大学院医学系研究科 招聘教授

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最終目標に研究を行う。平成 24 年度は、昨年度(平成 23 年度)に引き続き、過去に実施した厚生労働省科学研究費補助金各研究事業における心不全の病態機序、臨床指標データ解析の成果を利用し、心不全可塑性の診断指標が開発することを目的とする。

本研究では分子生物学的検討および病理学的検討のいずれにおいても、その基礎的マテリアルとなる最重症心不全の組織検体の収集に力点を置いている。移植待機期間の長い我が国における、長期罹患最重症心不全は世界でも類を見ず、その検体は貴重である。申請者の所属する研究機関 3 施設では心臓移植拠点病院として、重症心不全の最新の内科的治療と最先端の外科的治療(人工心臓、心臓移植、細胞シート治療)が実施され、長期間経時的に複雑なエピゲノム解析に必要な十分量の心臓検体の保存が可能である。過去 5 年間で約 150 検体を蓄積し、さらに最終年度にかけて高精度な解析に必要な数の検体保存を行う。

H23 年度には病理微細構造解析、エピゲノムとも各専門的解析の作業環境整い基礎解析を終え、H24 年度に次世代超高速 DNA シーケンサーを用いた特異的エピゲノム修飾の新規同定を動物モデルおよびヒト検体を用いて行った。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できる研究を目指す。

研究分担者

北風政史
国立循環器病研究センター
部長

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)

堤 修一
東京大学先端科学技術研究センター
特任准教授

朝野仁裕
大阪大学大学院医学系研究科
助教

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
講師

山崎 悟
国立循環器病研究センター
室長

新規バイオマーカー探索とその臨床応用
「心不全特異的な新規エピゲノム関連因子の
探索と基礎橋渡し研究」

の3つの STEP から構成され、段階的に(一部
同時進行)実施を行うこととなっている。

具体的方法を以下に示す。

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

H23 年度は、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の後に採取されるヒト臨床心不全心筋組織試料を用い、ヒト 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 メチル化解析を行った。その結果と動物モデルを用いて実施した検討結果を比較し、心不全病態における特異的修飾変化領域、遺伝子転写制御領域の同定を試みる。

H23年～H24年度にかけて行った正常、心不全各4検体、各5種類の転写因子複合体やエピゲノム修飾に関するChIP-seqを行い、心不全病態可塑性を示すバイオマーカー抽出に必要な情報環境を整える。

不全心筋組織、正常心筋組織での、超高速DNAシーケンサーを用いた、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 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た、genome-wide にクロマチン免疫沈降(ChIP)-sequence 解析の結果に加えて、H24年度は検体追加と下記項目②に記載の如く RNA 発現情報、動物モデルには心筋細胞へのストレス負荷刺激時のエピゲノム、遺伝子発現変化指標も組み合わせ、総合的なエピゲノムプロファイルを作成するのに必要なデータの収集を行う。

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

H23 年度は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るヒト臨

A. 研究目的

国内数十万人が罹患する心不全臨床の最終診療手段である、補助人工心臓や心臓移植の適用有無判断の為には、病態進展と治療抵抗性を決める組織可塑性を表す新規サロゲートマーカーが必要である。

特に H24 年度においては不全心筋細胞に特徴的な細胞核形態変化または心不全特異的遺伝子のエピゲノム解析を行った結果の統合と、病理学的検討により得られたマーカー指標のヒト臨床における実用性の検証を行い、未だ実用化されないヒト心不全可塑性の判別が可能な指標としての臨床応用開発を目指す。

B. 研究方法

本研究計画は、

<第1 STEP>

基礎的研究背景の検証

「可塑性診断の指標となるエピゲノムプロファイル作成と新規サロゲートマーカーの開発」

<第2 STEP>

臨床サロゲートマーカーの早期臨床応用

「治療抵抗性心不全の診断および治療への応用」

<第3 STEP>

本研究知見を活かしたさらに

床不全心筋組織試料を用いて RNA 発現解析を行った。さらに以前に実施済みの動物モデルマウスの遺伝子発現情報解析に加え、H24 年度は心不全マウス/ラット心筋細胞遺伝子発現解析 (RNA-seq) を実施するとともに、ヒト不全心筋を用いた RNA-seq 発現解析 (正常 2、心不全 4) を行い、項目①の各データと共に共通ビューワー (IGV) 上への変換作業を行う。既に以前作成した DNA マイクロアレイデータも参考指標に、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が可能なデータプロファイルを作成する。

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

H23 年度は独自クロマチン密度解析法を確立し、新規パラメータを定義した。H24 年度は超高压電顕法を新規導入し、ナノメートルレベルの解像度で超微細構造を解析し分子生物学的意義を検討する。

用いるマテリアルは、H23 年度に使用した検体と同一症例、同一心筋採取部位、同一標本 (視野) の検体を用いることとする。既に約 120 検体 (最重症心不全検体 40 検体、通常心筋生検 80 検体) を蓄積した。臨床診療において説明と同意書の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の採取保存蓄積についても引き続き継続して行う。

具体的にはグルタルアルデヒド固定を行い、透過型電子顕微鏡観察用の標本を作成し、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。それらの標本より超高压電顕法によるナノメートルレベルの解像度で超微細構造を解析する。

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

H24 年度は 100~150 症例に対し条件 (臨床診断、病理学的) を満たす検体を抽出し、心不全予後評価指標としての有用性を検証する。昨年度 (H23 年度) に前項 1-① で実施しその研究結果として得た心不全病態予後・可塑性を判別する手法を利用する。そこで算出される暫定値を用いて、連結匿名化臨床データとの比較により心不全予後評価のより正確な Cut off 値を統計的に算出し、臨床指標との相関を確認する。

H24 年度に用いる組織検体の蓄積および利用においても、H23 年度に同様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を用いるものとし、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利用可能なように、そして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こととし、心不全一般の新規病理検索法として確立を目指す。

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

前項 1-① および 1-②、2-① および 2-② で明らかにした各指標から病理データ、臨床データ、エピゲノム情報との統合的理解を進め、病理微細構造解析による病態・病期におけるバイオマーカー指標の開発を行い各データの統合を目指す。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 値の決定を行うとともに検討症例数を増やしたレベルでの実用性についても検討する。

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

H23 年度に引き続き、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の同定を継続する。

当初の計画を前倒しし、複数の候補領域選定作業を開始した。3-①で明らかにした分子マーカー変化が顕著なヒト検体を用いて、エピゲノム・遺伝子発現プロファイルを統合し、心不全可塑性に関するマーカー探索と医学的意義を検証する。

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)

上記検討3-①②において確立された可塑性指標を用いて、培養細胞および心不全動物モデルでの検討を行う。さらにエピゲノム関連蛋白分子に着目して、その結合蛋白の同定を目的とした検討を超高感度 MS を用いて行い、機能解析とともに心不全における分子機序解析を行う。

具体的な手法は H23 年度に実施した方法と同様に継続性を以て行う。しかしながら H24 年度に大阪大学に新たに導入された質量分析装置を用いて、より高感度な解析を行うことが可能となりさらなる詳細な解析が期待できる。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に着目しする。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核蛋白および機能未知の分子を対象に、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とともに、その口湯域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

前項3、4で得られた新規指標および分子について、ヒト心不全可塑性診断での有用性について、ヒト臨床検体数を増やして指標の妥当性を検討する。

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ており、最重症心不全臨床経過から心不全病態可塑性(移植適応判断、補助人工心臓離脱や強心薬治療の継続要否)を判断する新規サロゲートマーカーの有用性を検証する。

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も、H23 年度に実施した内容に継続性を持たせてデータの収集を行う。

(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

織 4 検体)の蓄積データの解析を行うとともに、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い、それらの情報解析を行った。

H23 年度のヒト心不全 DNA メチル化に、マウス心不全 in vivo クロマチン免疫沈降(ChIP)の各解析を行った。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-seq 解析を行い、下図に示す通り転写因子複合体やエピゲノム修飾における心不全病態可塑性を示す蛋白指標を網羅的に入手することができた。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と考えられる。

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

前年度(H23 年)に整備を終えた Linux サーバーを用いた解析環境を利用し、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た。

H24 年度は培養心筋細胞におけるストレス刺激条件下での遺伝子発現変化を RNA-seq よりプロファイルするとともに、マウス/ラット心筋細胞遺伝子発現解析(RNA-seq)を実施するとともに、ヒト心不全を用いた RNA-seq 発現解析(正常 2、心不全 4)を行った。前項 1-①にある各データと統合するとともに、ゲノムビューワー(IGV)で参照も可能とした。

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の技術を確認し情報解析環境の維持管理は継続して実施した。

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

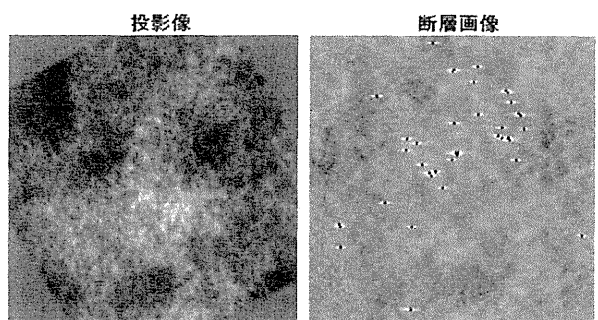
① 細胞核超微細構造の画像解析からのエピゲノム変化指標の病理学的探索

H23 年度に確立した独自クロマチン密度解析法により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、心不全可塑性判断指標となる新規パラメータを定義した(論文投稿準備中)。

H24 年度はその指標により判別可能となるクロマチン形態の超微細構造を解析するために、超高压電顕顕微鏡による撮像データの解析を行った。用いるマテリアルは、H23 年度に使用した検体と同一症例、同一心筋採取部位、同一標本(視野)の検体を用いることとした。超高压電顕顕微鏡による撮像は H23 年度において基礎的検討を済ませた条件に従って検討を実施することにより、細胞核内のクロマチン超微細構造をナノメートルレベルの解像度で再現性良くデータを得ることができた。(研究協力、大阪大学超高压電顕顕微鏡センター: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)

また、臨床診療において説明と同意書の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心不全心筋組織試料の採取保存蓄積についても引き続き継続して行った。

心筋細胞核クロマチン超高压電子顕微鏡画像



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

昨年度(H23 年度)に前項 1-①で実施しその研究結果として開発し得た手法を利用した。本年度はクロマチン密度を計測するとともに後ろ向き臨床観察研究として行ったデータ解析により算出された数値を暫定値として用い、心不全可塑性の判断が可能であるか

否かにつき検討した。連結匿名化臨床データとの比較により心不全予後評価のより正確な Cut off 値を統計的に有意差のある形で算出することができた。しかし、従来の心不全重症度指標および予後判定に用いられる臨床各指標の中で、クロマチン指標との有意な相関を示すものはなく、従来にない心不全予後や重症度とは別のパラメータであると考えられる。これら従来の指標はかならずしも心不全可塑性と相関するとは言われておらず、心不全可塑性を判断する新しい指標となり得ることが示唆された(論文投稿準備中)。

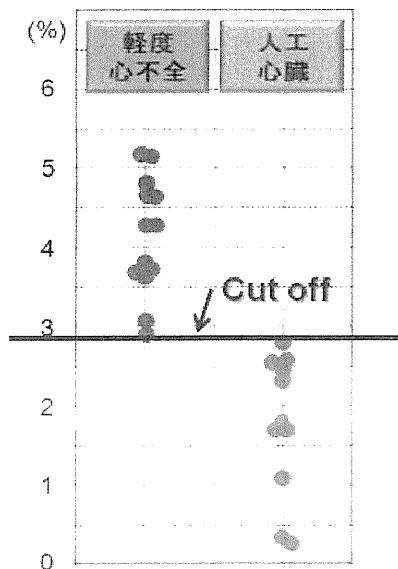
3、心不全可塑性を示す新しい診断鑑別方法の確立

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

H24 年度は 100~150 症例に対し条件(臨床診断、病理学的)を満たす検体を抽出し、前項2-①で基礎的背景を検証し、2-②で新規可塑先生判断指標としての可能性を示唆された。そこで引き続き本クロマチン計測指標をもった心不全可塑性評価指標としての有用性を検証した。

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。

核内クロマチン形態解析



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

3-①で可塑性の有無を分けた検体のうち、十分量の組織検体として保存されている検体(ヒト重症慢性心不全)を用いて RNA-seq を行う事ができた。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 解析を参考に、また別途1-②で実施のヒト検体解析の内容も参考にして、データ解析を行うとともに、各データを比較するため共通ビューワーIGVへの変換可能な形式での保存を行った。

これらより導き出される特異的遺伝子/遺伝子発現制御領域については、今後既にマウスモデルにおいて確立しているデータとも比較することにより、心不全可塑性と関連する領域探索へと研究を進める予定である。次年度計画を前倒しするとともに複数の候補領域選定作業を開始した。

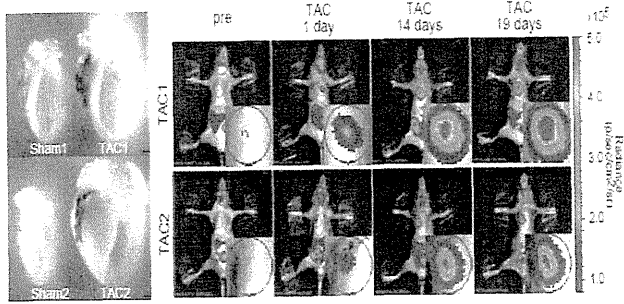
4、新規心筋可塑性評価指標の心不全病態との関連性の検索(培養細胞および動物モデルを用いた関連蛋白分子の同定)

前項3-②より同定された因子解析の一環として、心不全病態エンハンサー 非侵襲的ライブイメージング実験系の確立を目的とした、心臓特異的機能を有し、発現も比較的心臓に特異的である分子の機能解析を行っている。

心不全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するとともに、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。

本システムでは、同定した心不全関連エンハンサーを再現性良く非侵襲的に心不全病態で活性化されることを示すことができた。また同領域を組み入れた遺伝子改変マウス作成により、心不全モニタリングモデル動物を樹立することに成功した。今後心不全を惹起する刺激と、その応答機序を解明し、心不全マーカーを探索する検討に有用なモデルとなり得ることが示

峻された(論文投稿中)。



D. 考察

心不全組織可塑性の指標となる新規サロゲートマーカーの開発は、重症心不全デバイス診療を最適化し心不全診療ガイドラインへの提言に資する知見を生む。成功すれば、心臓移植、人工心臓の要否と疾患予後の的確な推定することが可能となるため、慢性心不全患者の罹患人口が多く、限界を有する心不全治療においてわずか数%たりとも予後改善が図られれば、その社会的貢献は計り知れない。多くの心不全罹患患者の医療に貢献する厚生労働行政上、意義深い研究となる。本年度進捗を見た以下の3点において考察を述べる。

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と考えられる。本研究の主幹をなす心筋細胞の細胞核クロマチン構造変化の計測指標が、Pilotデータ検証も終わり、母集団の拡大にも有意性を以て指標となり得ることが示峻されたことは非常に大きい収穫であった。

本結果を受けて、事業計画当初、そして昨年度から継続している計画を引き続き進めることとなった。

2. 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

病態に準拠したエピゲノム解析を行うために必要であった組織ChIP (In-Vivo-ChIP) 解析法は、本研究事業申請当初より独自に開発されてきたものである。機器、試薬などの進歩からプロトコルの改善変更は行

っているが、安定的に再現性の良いデータを取ることが可能となっている。

その中で得られた心臓組織病態別エピゲノムプロファイルはH23年度からH24年度にかけて免疫沈降の抗体種数も増やし、病態条件、検体数も充実させ、確度の高い詳細なものとなった。そこから得られた心不全病態感受性の高い転写制御領域(論文投稿中)はそのプロファイルの有用性を裏付けるものである。

しかしながら、ヒト臨床検体を用い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継続してプロファイルの充実に努める必要がある。

3. 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

特異的転写調節領域の同定を足掛かりとして、その in vivo live imaging を可能とするprobeを導入した動物モデルの開発や、さらには in vitroにおけるDNA結合タンパク同定に向けた高感度Nano LC MS解析法開発を行うなど、心不全病態におけるエピゲノムの重要性を臨床診断や創薬開発に結び付けることができるようデザインされている。遺伝子解析のみに留まらない、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た。

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った。Genome-wideなDNAメチル化解析、次世代シーケンサーを用いたヒストン修飾解析、RNA発現解析などを組み合わせて、サンプル種、検討条件を網羅した、心不全関連遺伝子発現、発現制御領域プロファイルが充実した。

② 細胞核クロマチン構造の計測指標の開発を行い、母集団を増やした解析においても有意差をもって分別できる心不全可塑性指標の開発がすすめられている。さらにプロファイルの比較サンプル、臨床研究デザイ

ンの進展も取り入れ、エビデンスレベルの高い指標として臨床研究を組む予定である。

③ 心不全可塑性を示す新しい、重症心不全病理画像解析技術の開発にあたって、超高圧電子顕微鏡による微細構造解析を行い、透過型電顕による撮像と相関していることが示唆された。

④ 心不全エピゲノムプロファイルから心不全関連遺伝子の発現に関わる制御領域を同定した。その検証を行うためにin vivo live imaging を可能とするprobeを導入した動物モデルの開発や、さらにはin vitroにおけるDNA結合タンパク同定に向けた高感度Nano LC MS解析法開発を行った。

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) Sakata Y, Nakatani D, Shimizu M, Suna S, Usami M, Matsumoto S, Hara M, Sumitsuji S, Kawano S, Iwakura K, Hamasaki T, Sato H, Nanto S, Hori M, Komuro I.

Oral treatment with nicorandil at discharge is associated with reduced mortality after acute myocardial infarction. *J Cardiol.* 59:14-21, 2012.

2) Yasuda N, Akazawa H, Ito K, Shimizu I, Kudo-Sakamoto Y, Yabumoto C, Yano M, Yamamoto R, Ozasa Y, Minamino T, Naito AT, Oka T, Shiojima I, Tamura K, Umemura S, Nemer M, Komuro I.

Agonist-Independent Constitutive Activity of Angiotensin II Receptor Promotes Cardiac Remodeling in Mice. *Hypertension* 59(3):627-33, 2012.

3) Nakatani D, Sakata Y, Suna S, Usami M,

Matsumoto S, Shimizu M, Sumitsuji S, Kawano S, Ueda Y, Hamasaki T, Sato H, Nanto S, Hori M, Komuro I.

for the Osaka Acute Coronary Insufficiency Study (OACIS) Investigators. Incidence, Predictors, and Subsequent Mortality Risk of Recurrent Myocardial Infarction in Patients Following Discharge for Acute Myocardial Infarction. *Circ J.* 77(2):439-46, 2012.

4) Hara M, Sakata Y, Nakatani D, Suna S, Usami M, Matsumoto S, Hamasaki T, Doi Y, Nishino M, Sato H, Kitamura T, Nanto S, Hori M, Komuro I.; for the Osaka Acute Coronary Insufficiency Study (OACIS) Investigators. Low Levels of Serum n-3 Polyunsaturated Fatty Acids Are Associated With Worse Heart Failure-Free Survival in Patients After Acute Myocardial Infarction. *Circ J.* 77(1):153-62, 2012.

5) Okada S, Yokoyama M, Toko H, Tateno K, Moriya J, Shimizu I, Nojima A, Ito T, Yoshida Y, Kobayashi Y, Katagiri H, Minamino T, Komuro I. Brain-derived neurotrophic factor protects against cardiac dysfunction after myocardial infarction via a central nervous system-mediated pathway. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 32(8):1902-9, 2012.

6) Akazawa H, Yabumoto C, Yano M, Kudo-Sakamoto Y, Komuro I. ARB and Cardioprotection. *Cardiovasc Drugs Ther.* Apr 27, 2012.

7) Sanada S, Nishida M, Ishii K, Moriyama T, Komuro I. Yamauchi-Takahara K. Smoking promotes subclinical atherosclerosis in apparently healthy men: 2-year ultrasonographic follow-up. *Circ J.* 76(12):2884-91, 2012.

8) Akazawa H, Yano M, Yabumoto C, Kudo-Sakamoto Y, Komuro I. Angiotensin II type 1 and type 2 receptor-induced cell signaling. *Curr Pharm Des.* Nov 21, 2012.

9) Ueda H, Yamada T, Masuda M, Morita T, Furukawa Y, Tanaka K, Iwasaki Y, Okada T, Kawasaki M, Kuramoto Y, Naito T, Fujimoto T, Komuro I.

Fukunami M.

Kidney Enhancement on X-Rays Following Emergency Percutaneous Coronary Procedure Predicts Poor Short- and Long-Term Clinical Outcomes. Circ J. Dec 18, 2012.

- 10) Takahama H, Shigematsu H, Asai T, Matsuzaki T, Sanada S, Fu HY, Okuda K, Yamato M, Asanuma H, Asano Y, Asakura M, Oku N, Komuro I, Kitakaze M, Minamino T.

Liposomal Amiodarone Augments Anti-arrhythmic Effects and Reduces Hemodynamic Adverse Effects in an Ischemia/Reperfusion Rat Model. Cardiovasc Drugs Ther. Jan 24, 2013.

(和文業績)

- 1) 赤澤宏、小室一成

特集 循環器疾患をアンチエイジングから考える
PART1 個体老化と心不全
Cardiovascular Frontier. 2(6)373-377.2012.

- 2) 小室一成(司会)、斎藤能彦、安村良男、坂田泰史、堀井学、桑原宏一郎

心不全治療の新展開ー利尿剤をいかに使いこなすかー
Antiaging Science. 4(2) 38-45. 2012.

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 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研究的成果を組み合わせ、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

H23に目的を継続して検討を行う。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

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、動物実験モデルからの標的分子の機能解析

重症心不全モデル動物を用いて、心臓病理と分子生物学的検索を行うための検体マテリアルを提供する。また、大阪大学で検討の分子が、心臓酸素消費との関連性を示したことから、心臓虚血再灌流モデルにおける低酸素暴露下の心筋組織サンプルを準備する。従来国立循環器病研究センターにおいて実施してきた虚血再灌流動物モデルは非常に再現性の良い結果を得ることができる安定したシステムであり、

目的とする検討条件を迅速に検索することができる。心不全病理診断における細胞核クロマチン構造の有用性について、動物でベルからの検討も合わせて行う事により、大阪大学と共同で検討を行い、細胞核クロマチンの微細構造を解析し分子生物学的意義を検討する。

病理標本採取にあたっては、具体的にグルタールアルデヒド固定を行い、透過型電子顕微鏡観察用の標本を作成し、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。

C. 研究結果

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、動物実験モデルからの標的分子の機能解析

ゲノム領域、蛋白の病態との相関性、機能解析を引き続き行い、心不全病態下の制御を受ける心不全感受性のあるゲノム領域を同定した。マウス、ラット、イヌの各心不全モデルを用いて、蛋白、遺伝子発現、病理組織の各検体を採取し、心不全病態における変化をプロファイルすることとなった。特に H24 年度は主に心臓エネルギー代謝の変化に影響を及ぼすと考えられる蛋白分子 MENT に関してその発現調節、エピゲノム変化を検討するために、実験的に心臓虚血再灌流モデルを用いて心筋組織変化を検討した。

心臓各組織に一過性に発現する遺伝子であることから、心臓を横断面につき 12 分割して各部位の蛋白、遺伝子検索のための組織標本の採取を行った。虚血を示す指標をあらかじめ設定しておき、同部位の目的分子の発現について検討を行った。結果 2 時間おきに発現の情報が見られるものの、すみやかに発現が低下することが解り、それらのさらなる詳細な時系列データととることとなった。

大阪大学で開発の非侵襲的生体イメージングモデルのマウス検討も参考にして、これらの標的遺伝子が心不全病態においてどのように発現調節されるか

について、生体モデルを用いながら今後も継続して検討することとなった。

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。

本研究により得られた心不全感受性のあるゲノム領域は、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、病態特異的な安定した実験系を基礎にデータの収集を行う事ができたからであると考え。これら基礎的検討をもとに、ゲノム領域、蛋白の病態との相関性、機能解析を引き続き行い、同様の制御を受けるゲノム領域を同定する。

今後は、今回得られた領域についてヒト臨床検体を用い、組織エピゲノム解析も含めた心臓データプロファイルの構築を継続して行う予定である。

E. 結論

心不全病態における変化をプロファイリングの結果、心不全病態下の制御を受ける心不全感受性のあるゲノム領域を同定した。

ゲノム領域、蛋白の病態との相関性、機能解析を引き続き行い、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が確立された。その応用検証が可能なように開発された非侵襲的生体イメージングモデルへとつなげることにより H25 年度に向けた継続したテーマとなった。

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) Atsuhiko Sakamoto, Masafumi Kitakaze, Shinichi Takamoto, Akiyoshi Namiki, Hiroshi Kasanuki, Saichi Hosoda and the JL-Knight study group. Landiolol, an ultra-short acting beta₁-blocker, more effectively terminates atrial fibrillation than diltiazem after open heart surgery: A prospective, multicenter, randomized, open-label study (JL-Knight study) . *Circ J* 76(5):1097-1101, 2012.
- 2) Akemi Yoshida, Hiroshi Asanuma, **Hideyuki Sasaki**, Shoji Sanada, Satoru Yamazaki, Yoshihiro Asano, Yoshiro Shinozaki, Hidezo Mori, Masanori Asakura, Tetsuo Minamino, Seiji Takashima, **Masaru Sugimachi**, Naoki Mochizuki and Masafumi Kitakaze. H₂ mediates cardioprotection via involvements of K_{ATP} channels and permeability transition pores of mitochondria in dogs. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 26(3):217-226, 2012.
- 3) Chun-Yen Chen, Masanori Asakura, Hiroshi Asanuma, Takuya Hasegawa, Jun Tanaka , Norihisa Toh, Kyung-Duk Min, Hideaki Kanzaki, Hiroyuki Takahama, Makoto Amaki, Yumi Itoh, Go Ichien, Yoko Okumoto, Toru Funahashi, Jiyoong Kim and Masafumi Kitakaze. Plasma adiponectin levels predict cardiovascular events in the observational arita cohort study in Japan—The importance of plasma adiponectin levels—. *Hypertension Res.* 35(8):843-848, 2012.
- 4) Chun-Yen Chen, Akemi Yoshida, Masanori Asakura, Takuya Hasegawa, Hiroyuki Takahama, Makoto Amaki, Akira Funada , Hiroshi Asanuma, Hiroyuki Yokoyama, Jiyoong Kim, Hideaki Kanzaki, and Masafumi Kitakaze. Serum blood urea nitrogen and plasma brain natriuretic peptide and low diastolic blood pressure predict cardiovascular morbidity and mortality following discharge in acute decompensated heart failure patients. *Circ J* 76(10):2372-2379, 2012.
- 5) Ryoichi Sohma, Teruo Inoue, Shichiro Abe, Isao Taguchi, Mikgaku Kikuchi, Shigeru Toyoda, Takuo Arikawa, Yutaka Hikichi, Shoji Sanada, Hiroshi Asanuma, Masafumi Kitakaze and Koichi Node. Cardioprotective effects of low-dose combination therapy with a statin and an angiotensin receptor blocker in a rat myocardial infarction model. *Journal of Cardiology.* 59:91-96, 2012.
- 10) Taka-aki Matsuyama, Hatsue Ishibashi-Ueda, Yoshihiko Ikeda, Kazuyuki Nagatsuka, Kotaro Miyashita, Makoto Amaki, Hideaki Kanzaki and Masafumi Kitakaze. Critical multi-organ emboli originating from collapsed, vulnerable caseous mitral annular calcification. *Pathology International* 62:496-499, 2012.
- 11) Yulin Liao, Jianping Bin, Tao Luo, Hui Zhao, Catherine Ledent, Masanori Asakura, Dingli Xu, Seiji Takashima and Masafumi Kitakaze. CB1 cannabinoid receptor deficiency promotes cardiac remodeling induced by pressure overload in mice. *Int J Cardiol.* (in press) 2012.
- 12) Akemi Yoshida, Masanori Asakura, Hiroshi Asanuma, **Akira Ishii**, **Takuya Hasegawa**, Tetsuo Minamino, Seiji Takashima, **Hideaki Kanzaki**, Takashi Washio and Masafumi Kitakaze. Derivation of a mathematical expression for predicting the time to cardiac events in patients with heart failure: A retrospective clinical study. *Hypertension Res.* 36:450-456, 2013.
- 13) Hiroyuki Takahama, Hirokazu Shigematsu, Tomohiro Asai, Takashi Matsuzaki, Shoji Sanada, Hai Ying Fu, Keiji Okuda, Masaki Yamato, Hiroshi Asanuma, Yoshihiro Asano, Masanori Asakura, Naoto Oku, Issei Komuro, Masafumi Kitakaze and Tetsuo Minamino. Liposomal amiodarone augments anti-arrhythmic effects and reduces hemodynamic adverse effects in an ischemia/reperfusion rat model. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 2013 Jan 24. [Epub ahead of print].

- 14) Akemi Yoshida, Hatsue Ishibashi-Ueda, Naoaki Yamada, **Hideaki Kanzaki**, **Takuya Hasegawa**, Hiroyuki Takahama, Makoto Amaki, Masanori Asakura and Masafumi Kitakaze.
Direct comparison of the diagnostic capability of cardiovascular magnetic resonance and endomyocardial biopsy in patients with heart failure. *European Journal of Heart Failure*. 15:166-175, 2013.

(和文)

- 1) 浅沼博司、北風政史
心血管リスク症例における海外での報告
Diabetes Frontier 23(1):53-58, 2012.
- 2) 北風政史
循環生理学・循環薬理学・分子生物学は重症心不全を救えるか
呼吸と循環 60(4):S5-S7, 2012.
- 3) 浅沼博司、北風政史
疫学研究・大規模臨床試験より得られた EBM PROactive
日本臨床 70(3):301-308, 2012.
- 4) 北風政史
急性心筋梗塞治療における現状と 新展開
大阪府内科医会会誌 21(1):22-32, 2012.
- 5) 朝倉正紀、北風政史
心筋症の分類と診断基準
循環器内科 71(6):491-495, 2012.
- 6) 高濱博幸、北風政史
リモデリング予防の薬物療法
循環器内科 72(1):113-118, 2012.
- 7) 北風政史
心血管保護を考えた糖尿病治療とは-その科学的エビデンスと臨床現場での実践-
飯塚医師会報 VOICE 127:27-28, 2012.
- 8) 浅沼博司、朝倉正紀、金智隆、北風政史
耐糖能異常は心不全と関連するか？
冠疾患誌 18:245-251, 2012.
- 9) 浅沼博司、北風政史
アデノシンと臓器障害
Heart View 17(2):55-60, 2013.

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 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

病理微細構造解析を実施し、病態・病期におけるバイオマーカー指標の開発を行い、個々に存在する各データの統合を目指すことを最終の目標とし、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できるよう研究を行う。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

病理微細構造解析を実施し、病態・病期におけるバイオマーカー指標の開発を行い、個々に存在する各データの統合を目指すことを最終の目標としている。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

電子顕微鏡検索に進めるための症例選択、および臨床マーカーとの比較検討に資する重症心不全病理画像解析データの集積

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と臨床指標のデータ収集、臨床病態評価

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することを前提に、病理データ、臨床データ、エピゲノム情報の3者を統合するために高い計測精度とともに、豊富な検体数による統計的処理が可能ないように、数値化された病理学的データとして蓄積し、分子生物学との統合的理解を進めるための検討を行った。