

中でも当施設では、一般組織所見に関する指導を標本を有する大阪大学に行う事で、心不全の病態変化、Etiologyに関して参考となる所見を付与し、検索対象としている組織検体が、二次性心筋症の鑑別を要する場合については、専門的除外検索を行うことで、病理データ、臨床データに関する検討を主に行った。

H23 年度に確立した手法を踏襲し、さらに症例サンプルの蓄積を行うとともに細胞核クロマチン計測についても継続して検討を行った。検索対象となる標本は、不全心筋細胞の細胞核クロマチン構造解析を行うため、大阪大学にて計測した電子顕微鏡像のもととなる標本部位と同一切片・部位から準備することとし、HE 標本に関する基礎的データ収集について指導した。

なお、電子顕微鏡撮像についても昨年同様、2.5%グルタルアルデヒド固定以下電子顕微鏡標本を作成するに至るまで、広く一般的に用いられている手法を用いて撮像を行うこととした。具体的にはヒト心筋組織を 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を、日立透過型電子顕微鏡 H-7650 を用いて撮像する方法である。細胞核のクロマチン構造について解析を円滑に進めるため、電子顕微鏡検体度同じ部位を標本化した光学顕微鏡組織学的観察を全ての検体について行う事により、得られた電子顕微鏡検索結果と組織学的変化所見結果との関連性を比較検証した。

(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うち、診断済みの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行う。

C. 研究結果

本研究分担研者・大阪大学/朝野らにより算出されたクロマチン指標の妥当性を検証するため、大阪大学の検体を用いて、臨床病理学的鑑別を行った。H24 年度は約 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、H23 年度に確立した独自クロマチン密度解析法を行う事が可能な 1 次解析環境の整備を行うとともに、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。

共同して病理所見作成をおこなった。

それらは大阪大学におけるクロマチン指標計測を行った検体の Etiology に関する臨床検体情報に活かされるとともに、クロマチン形態自身についても、タイプ別での分類を行うことができた(非公表データ、詳細論文作成中)。

細胞核クロマチンの画像の計測結果の評価検証、臨床病理組織検査による心筋生検組織所見についてのデータ蓄積および評価検証を継続して行った。

D. 考察

①Genome-wide な DNA メチル化およびヒストン修飾解析、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、③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、④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により、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るための病理学的データ蓄積を主たる検討、これら4つに関する情報を統合し、探索研究を行う上で、臨床病型の正確な分類とクロマチン検索を行う上での病理標本のチェックは、本研究上、必須のものである。

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ことができた。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唆されたことは非常に大きい収穫であった。

E. 結論

約 150 症例に対し条件(臨床診断、病理学的)を満たす検体を対象に、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)について、細胞核クロマチンの画像の計測および臨床病理組織検査による心筋生検組織所見評価を行い、データを蓄積した。

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) Fujita T, Toda K, Yanase M, Seguchi O, Murata Y, Ishibashi-Ueda H, Kobayashi J Nakatani T. Risk factors for post-transplant low outputsyndrome. Eur J Cardiothorac Surg. 42(3):551-6. 2012.

2、学会発表

- 1) 植田初江、池田善彦、松山高明、大郷恵子、橋村宏美
心臓移植と病理診断. 第 101 回日本病理学会総会(心筋生検研究会コンパニオンミーティング) 2012 年 4 月・東京
- 2) 植田初江、池田善彦、松山高明、大郷恵子
肺高血圧症の病理所見 第 52 回日本呼吸器学会(教育講演)2012 年 4 月・神戸
- 3) 植田初江
心臓移植の病理 —50 例の経験— 第 58 回日本病理学会秋期特別総会(B 演説)2012 年 11 月・名古屋
- 4) 植田初江、池田善彦、松山高明、大郷恵子、橋村宏美、今北正美
50 例の心臓移植の経験と病理診断. 第 34 回心筋生検研究会(モーニングセミナー)2012 年 11 月・松本
- 5) 植田初江
ステント留置後の血管治癒反応を診る:病理からみた DES 留置後変化 第 77 回日本循環器学会学術集会(トピックス)2013 年 3 月・横浜

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

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 年度に実施した Genome-wide な DNA メチル化およびヒストン修飾解析結果に対する情報解析を継続して行った。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実施した、

メチル化部位について再現性の良い検出を確認し

てのちに、検体追加解析を行うこととし、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した。それらに関する情報解析と行い、心筋特異的メチル化部位の同定も併せて行った。

さらにそれらの解析に際しては、心臓得的メチル化部位探索のため、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うため、非心臓組織 7 検体のデータを用いた解析を併せて行った。

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るヒト臨床不全心筋組織試料を用いて H23 年度にDNAメチル化解析を行った。H24 年度は、そのヒト検体試料と同一の検体試料を用いて大阪大学において行った、次世代シーケンサーを用いた心不全遺伝子発現解析(RNA-seq)を実施結果に対し、その情報解析に関するプログラム、DNAメチル化データとの統合などに関する助言指導を行った。

(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

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により実現した貴重な臨床検体から、ヒト臨床不全心筋組織試料を採取し、それら試料の中から、DNA メチル化チップアレイ、および次世代シーケンサーによる遺伝子発現解析(RNA-seq)が行われ多くのデータが得られた(H23 年度)。それらヒト不全心筋組織 11 検体、正常心筋組織 4 検体を用いた DNA メチル化解析、および、非心臓組織 7 検体のデータを用いた DNA メチル化解析、さらにヒト不全心筋を用いた RNA-seq 発現解析(正常 2 検体、心不全 16 検体)に関して、各データ比較が可能ないように、統一書式下でのデータ統合と、各データの共通ビューワー(IGV)化について大阪大学おける Linux サーバーで実施可能なように、技術指導、コンサルテーションを行った。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立し情報解析環境の維持管理は継続して実施した。

D. 考察

DNAメチル化チップ解析による解析は、迅速かつ比較的多くの検体を対象に解析するのに適している。病態に準拠したエピゲノム解析を行うにあたって、心臓組織特異的な発現制御を受けている遺伝子を探索するにあたって、本解析はヒストン修飾および転写因子複合体に対して行う組織ChIP(In-Vivo-ChIP)解析法とは異なる角度から知見を与えてくれる。本研究事業申請当初より統合的に解釈することで幅広い選択肢を持つことができると考えられる。

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。その結果、心不全特異的に変化を示すエピゲノム分子およびヒストン修飾変化を同定する上で、H23年度より解析作成してきたデータプロファイルは、重要な根拠として用いるのに有用であると考えられた。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、今後追加されるデータも含めて、継続してプロファイルの充実に努める予定である。

E. 結論

H23年度に引き続き行った、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発現解析結果を組み合わせることで、心不全特異的に変化を示すエピゲノム分子およびヒストン修飾変化を同定するのに必要な統合データベースを作成することができた。

Linuxサーバーで解析の実施が可能のように、各データの共通ビューワー(IGV)化できるデータを排出することのできる、パイプラインを組み、データのクオリティチェック、リファレンスマッピング、アプリケーション利用などを整備し得た。

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) Wang L, Tsutsumi S, Kawaguchi T, Nagasaki K, Tatsuno K, Yamamoto S, Sang F, Sonoda K, Sugawara M, Saiura A, Hirono S, Yamaue H, Miki Y, Isomura M, Totoki Y, Nagae G, Isagawa T, Ueda H, Murayama-Hosokawa S, Shibata T, Sakamoto H, Kanai Y, Kaneda A, Noda T, Aburatani H.. 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) Wang L, Tsutsumi S, Kawaguchi T, Nagasaki K, Tatsuno K, Yamamoto S, Sang F, Sonoda K, Sugawara M, Saiura A, Hirono S, Yamaue H, Miki Y, Isomura M, Totoki Y, Nagae G, Isagawa T, Ueda H, Murayama-Hosokawa S, Shibata T, Sakamoto H, Kanai Y, Kaneda A, Noda T, Aburatani H.. 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.
- 6) Mizutani A(1人略) Tsutsumi S (6人略). Cell type-specific target selection by

以上、特筆すべき事項なし

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

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、平成 23 年度に引き続き、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。

電子顕微鏡における病理細胞内超微細構造を明らかにすべく大阪大学において超高圧電子顕微鏡による病態下にあるヒト心不全心筋細胞、細胞核クロマチン構造の高次構造を撮像することに成功した。

以上の病理学的知見を分子生物学的に裏付ける検討も同時に行う。ヒト臨床検体を用いた 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 発現に関するデータを採取し、ゲノムワイドな大量データを Linux サーバーシステムで独自のパイプラインを用いて解析し、そののち細胞核クロマチン指標をもとに計測算出した新規病理指標に関する解析を行う。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。

以上より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

症例の蓄積の為、平成 24 年度は、前年(平成 23 年)に引き続き、最重症心不全の治療、特に心臓移植ないし心臓補助循環治療を行う際に説明と同意書の取得を行う。

さらに、それらの検体より、DNA メチル化チップアレイを用いた検討(不全心筋組織 11 検体、正常心筋組織 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う。

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った前年度のデータに、新しいデータを統合し、心臓特異的なメチル化部位の同定を試みる。

急性、慢性心不全マウス動物モデルの心臓組織検体を用いて、平成 23 年度に引き続き、不全心筋組織、正常心筋組織の検討をさらに条件設定を細かく変えて、データプロファイリングを行う。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の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。

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

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。

(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

H24 年度も前年度に引き続き、継続して検体収集を行い、検体バンクの充実をはかった。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、前年度に行ったDNAメチル化チップアレイを用いた検討(不全心筋組織 11 検体、正常心筋組織 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 で見ることができてい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、ヒト不全心筋を用いた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立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の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った。

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

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ち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。

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、十分な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、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、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

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唆された(論文投稿中)。

D. 考察

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。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唆されたことは非常に大きい収穫であった。

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ー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。

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

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い、修飾分子、病態サンプル別にさらにプロファイルの多サンプル比較も充実した。その結果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。

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、超高压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関連していることが示唆された。

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) 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.* 27(2):125-32. 2013.
- 2) Takahashi A, Asakura M, Ito S, Min KD, Shindo K, Yan Y, Liao Y, Yamazaki S, Sanada S, Asano Y, Ishibashi-Ueda H, Takashima S, Minamino T, Asanuma H, Mochizuki N, Kitakaze M. Dipeptidyl-Peptidase IV Inhibition Improves Pathophysiology of Heart Failure and Increases Survival Rate in Pressure-Overloaded Mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013 Mar 15.
- 3) Yoshida A, Asanuma H, Sasaki H, Sanada S, Yamazaki S, Asano Y, Shinozaki Y, Mori H, Shimouchi A, Sano M, Asakura M, Minamino T, Takashima S, Sugimachi M, Mochizuki N, Kitakaze M. H(2) mediates cardioprotection via involvements of K(ATP) channels and permeability transition pores of mitochondria in dogs. *Cardiovasc Drugs Ther.* 26(3):217-26. 2012.
- 4) Nishikawa K, Asai T, Shigematsu H, Shimizu K, Kato H, Asano Y, Takashima S, Mekada E, Oku N, Minamino T.

Development of anti-HB-EGF immuno-liposomes for the treatment of breast cancer. J Control Release. 160(2):274-80. 2012.

Cardiomyocytes from the Energy Crisis under Hypoxia 第77回日本循環器学会学術集会 2013年3月・横浜

(和文)

- 1) 朝野仁裕、小室一成
特集-心不全 心不全の原因診断の進歩
診断と治療 100(9):1558-1564. 2012. 診断と治療社
- 2) 朝野仁裕、小室一成
特集「エクソーム解析—成果と将来」
「全エクソーム解析による難治性循環器疾患の原因遺伝子の同定」
医学のあゆみ 2013年出版予定 医歯薬出版株式会社

2、学会発表

- 1) 朝野仁裕
「パネルディスカッション 再生医療に貢献する技術」心筋細胞の可塑性を判断する病理学的臨床指標の開発 第11回日本再生医療学会総会 2012年6月・横浜
- 2) 肥後修一郎、朝野仁裕
Featured Research Session 2 Title :
Quantitative ChIP-sequence Analysis Reveals the Differentially Altered Active Epigenomic States in Murine Pressure-overloaded Failing Hearts 第29回国際心臓研究学会(ISHR)日本部会総会 2012年10月・福岡
- 3) S Higo、Y Asano.
Oral session : Novel Regulators of Cardiac Hypertrophy Title: Comprehensive quantitative epigenome mapping reveals the differential induction of histone H3 lysine 4 trimethylation marks in pressure-overloaded murine hearts
米国心臓協会学術集会 American Heart Association Scientific Sessions 2012 2012年11月・Los Angeles, USA
- 4) 木岡秀隆、朝野仁裕
Young Investigator's Award Finalists Lectures
Title : G0/G1 Switch Gene 2 Promotes Mitochondrial ATP Production and Protects

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

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

臨床指標の正確な評価は、希少疾患の疾患重症度分類にも大きく寄与することができる。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。

最重症心不全を対象とした臨床データファイル作成と、それと病理検体の詳細な解析データとの相関有無を解析することにより、新しい病理指標が生まれる。それらを検証するために独自に開発した生体イメージングモデル動物を用いた実験、その検証を中心に本研究を実施した。

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

H24 年度は、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、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、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。特に、臨床データの面から見て細胞核クロマチン指標による解析が、心不全予後評価指標として

の有用であるかについて、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・可塑性を判別する病理検討手法を用いて検証する。

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)

前項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により得られた、エピゲノム関連蛋白分子、ゲノム領域について着目し、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、関与の程度がダイナミックに変化するゲノム領域に対して、近隣遺伝子の発現を制御する機能を有するか心臓病態エンハンサーとしての役割を、非侵襲的ライブイメージング実験系を確立し、それを用いることにより検討を行った。

(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に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、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。約 120 症例の中から解析に適切である約 40 症例について、心不全臨床データを解析し、組織標本検体との匿名化環境の下で、情報解析プロファイリングを行った。心不全重症度の各指標をデータ化し、本研究の病理解析分担における比較検討が可能ないように、細胞核クロマチン構造の変化指標との照合作業を行い、共同して得られた指標の変化が心不全病態へどのような関わりを示すかに関する検討を行った。結果、心不全可塑性(補助循環からの離脱など)を示す症例に関する病理指標の Cut off 値を得ることができた(論文作成中)。

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

心不全病態エンハンサーの機能を判定する、非侵襲的ライブイメージング実験系の確立を行った。エピゲノム修飾の変化する心臓病態特異的ゲノム領域が心臓特異的に発現し、心臓特異的機能を有するものである分子であることを証明するために、

心不全病態で活性化されるゲノム領域を組み入れた遺伝子改変マウスを作成し、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唆された。

D. 考察

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大阪大学循環器内科の検体収集システムを用いて行う事により、解析を行うに十分な検体数を確保することができた。

細胞核クロマチン指標と心不全臨床データとの情報解析プロファイリングを行ったところ、細胞核クロマチン指標が、心不全可塑性を示すヒト心不全臨床検査のうち臨床経過結果との間で相関性を示すことも、今年度症例の中で確認することができた。最重症心不全を検体の中心として収集することができたことが、これら指標を算出するに役立つものと考えられる。また、最重症心不全の診断について、病像の重症度から、臨床診断も詳細にならざるを得ず、そのため正確な症例分類を行う事ができたのも、本研究に利点として働いた。

細胞核クロマチン構造の変化指標との照合作業を行い、共同して得られた指標の変化が心不全病態へどのような関わりを示すかに関する検討から、心不全可塑性(補助循環からの離脱など)を示す症例に関する病理指標の Cut off 値を得ることができ、数値の検証を再度行っている。

E. 結論

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、および心不全病態に関する非侵襲的イメージングモデルマウスの確立を行い、H25 年度解析に利用できる有意なモデルとしてを築くことができた。

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, Toba K, Higo S, Nakatani D, Hikoso S, Umegaki M, Yamamoto K, Sawa Y, Aizawa Y, Komuro I. EPO-AMI-II study investigators.: Design and Rationale of Low-Dose Erythropoietin in Patients with ST-Segment Elevation Myocardial Infarction (EPO-AMI-II Study): A Randomized Controlled Clinical Trial. *Cardiovasc Drugs Ther.* 26(5):409-16. 2012.
- 2) Minamino T, Toba K, Nakatani D, Higo S, Ozawa T. Erythropoietin, progenitor cells and restenosis. *Thrombosis and Haemostasis.* 107(6); 1193. 2012.
- 3) Yoshida A, Asanuma H, Sasaki H, Sanada S, Yamazaki S, Asano Y, Shinozaki Y, Mori H, Shimouchi A, Sano M, Asakura M, Minamino T, Takashima S, Sugimachi M, Mochizuki N, Kitakaze M. H(2) mediates cardioprotection via involvements of K(ATP) channels and permeability transition pores of mitochondria in dogs. *Cardiovasc Drugs Ther.* 26(3):217-26. 2012.
- 4) Ishii T, Asai T, Oyama D, Fukuta T, Yasuda N, Shimizu K, Minamino T, Oku N.

Amelioration of cerebral ischemia – reperfusion injury based on liposomal drug delivery system with asialo-erythropoietin. J Control Release. 160(1); 81–7. 2012.

- 5) Ishii T, Asai T, Fukuta T, Oyama D, Yasuda N, Agato Y, Shimizu K, Minamino T, Oku N.

A single injection of liposomal asialo – erythropoietin improves motor function deficit caused by cerebral ischemia/reperfusion. Int J Pharm. 439(1–2):269–74. 2012.

- 6) Minamino T. Cardioprotection from ischemia /reperfusion injury: basic and translational research. Circ J. 76(5):1074–82. 2012.

2、学会発表

- 1) 南野哲男.

シンポジウム<心不全>Erythropoietin prevents cardiac remodeling after myocardial infarction: From Bench to Bedside, 第 20 回日本血管生物医学学会学術集会・The 10th Korea–Japan Joint Symposium on Vascular Biology 2012 年 12 月

- 2) 南野哲男.

シンポジウム4<From Bedside to Bench, From Bench to Bedside>心筋梗塞患者に対するエポジンベータ投与による心機能改善 効果に関する研究, 第 49 回日本臨床分子医学会学術集 2012 年 4 月

- 3) 南野哲男

トピックス<Prevention of cardiac remodeling in heart failure: present status and future perspectives > 「 Preventive effects of erythropoietin on cardiac remodeling after myocardial infarction」 第 76 回日本循環器学会総会・学術集会 2013 年 3 月・横浜

- 4) 南野哲男

JCS/ISHR joint symposium<The challenges of translation from discovery to therapy in 21st century cardiovascular medicine>「Design and Rationale of Low-Dose Erythropoietin in Patients with ST-Segment Elevation

Myocardial Infarction (EPO-AMI-II Study): A Randomized Controlled Clinical Trial」 第 76 回日本循環器学会総会・学術集会 2013 年 3 月・横浜

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

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 講師

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。

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

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

平成 23 年度に引き続き、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。さらに、平成 23 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が、平成 24 年度は、同じく臨床診療において説明と同意書の取得の後に通常の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を用いて、超高圧電顕超微細構造解析を行うための症例選択、蓄積を行う。

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

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。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用いて細胞核クロマチン超微細構造解析を行う。構造指標と臨床診療データとの相関性に関する検討を行い、心不全可塑性に関する臨床判断が可能なクロマチンスコアを算出する。Accuracy の高い数値を cut off 値と設定し、臨床上の有意性を得られるか検討する。以上の手法を用いて細胞核クロマチン構造解析が心不全一般の新規病理検索法として確立するか検討する。

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

ヒト心不全心筋病理検体を用いて、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ている。核内構造観察に際し、透過型電子顕微鏡では解像度の限界があるため、超高圧電子顕微鏡を用いた細胞核クロマチン・核内マトリックス・核膜の裏打ち構造等の高解像度解析を行う。

ヒト心筋組織を 2.5% グルタルアルデヒド溶液で固定し、エポキシ樹脂包埋した試料を用いる。

まず日立透過型電子顕微鏡(H-7650)にて、細胞核のクロマチン構造の観察を行い、クロマチン構造による違いで 3 グループに分類し、各々に対し超高圧電子顕微鏡を用いた詳細な観察を行った。

試料作製に際し、条件検討を行い、500nm 厚薄切、75 方形メッシュ/モリブデングリッド、支持膜としてフォルムバルを使用、金粒子添加を行うプロトコールで統一し、加速電圧 1000kV、倍率 25000 倍、 $-60 \sim 60^\circ$ の投影シリーズでの観察を行った。

(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の必要に応じて行われたものうち、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

平成 23 年度より継続して蓄積した約 120 検体(最重症心不全検体 40 検体、通常心筋生検 80 検体)に引き続き、新たに心移植、補助人工心臓などによる処置に伴い得ることができた検体も加えて、最重症心不全の組織検体バンクを充実させた。

平成 24 年度はそれらの検体全て(~150 サンプル)