

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-H24年度に立案した研究実施を目的に H25年度は継続した検討を行う。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、心不全特異的遺伝子を制御する心不全感受性エンハンサー領域の同定

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。H24 年度実施した検討の条件を optimise ののち、最終検討を実施する。

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、大阪大学と共同で動物レベルからの検討を合わせて行うことにより、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。

(倫理面への配慮)

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。この倫理規定に則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

**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、心不全特異的遺伝子を制御する心不全感受性エンハンサー領域の同定**

ゲノム領域、蛋白の病態との相関性、機能解析を H24 年度に引き続き行い、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 H25 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

筋組織変化も検討を行った。

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。

H24 年度に実施した心不全感受性エンハンサー領域検討が比較的良好に完成したことから、H25 年度も再現性を確認するとともにさらに鋭敏な結果を示す条件を見つけることができた。その結果、細胞レベルの検討および動物モデルを用いた in vivo でも共通して同様の結果がみられることが判明した。非侵襲的生体イメージングモデルのマウスを参考にして、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

3年間を通じて検討を重ねてきた分子生物が氣的機序を in vivo で検証する解析を中心に行った。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と考えられる。

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られる。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ことができた。

今回得られた領域について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も同時に行い、創薬探索の独創的なデータベースを築くことができたと考えられる。

## 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た心不全感受性のあるゲノム領域を同定した。H25 年度はそれを一層狭めることとなり、より有意な領域を同定することができた。

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い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最終年度の終了後も創薬開発に資する動物モデルの構築とその利用に向けた一貫したテーマと成り得た。

## 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) 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.
- 2) 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.

- 3) Ayako Takahashi, Masanori Asakura, Shin Ito, Kyung-Duk Min, Kazuhiro Shindo, Yi Yan, Yulin Liao, Satoru Yamazaki, Shoji Sanada, Yoshihiro Asano, Hatsue Ishibashi-Ueda, Seiji Takashima, Tetsuo Minamino, Hiroshi Asanuma, Naoki Mochizuki and Masafumi Kitakaze. Dipeptidyl-peptidase IV inhibition improves pathophysiology of heart failure and increases survival rate in pressure-overloaded mice. *Am. J. Physiol.* 304(10):H1361-1369, 2013
- 4) 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.* 27(2):125-132, 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.
- 10) 天木誠、北風政史  
DEBATE-1 大動脈弁狭窄症を有する高血圧患者における降圧薬投与-消極的な立場から  
臨床高血圧 19(1)3:34-40, 2013.
- 11) 朝倉正紀、北風政史  
臨床研究ネットワーク:循環器臨床研究ネットワーク構築の重要性  
医学のあゆみ 244(13):1196-1198, 2013.
- 12) 高橋彩子、北風政史  
COPD 患者の循環器疾患合併  
循環器内科 74(1):23-28, 2013.
- 13) 北風政史  
心血管保護を考えた高血圧治療の実践~確実な降圧か、確実なRAS抑制か?~  
八王子市医師会報 No.307(493号)4-5, 2013.
- 14) 中野敦、北風政史  
心筋疾患の診断で、MRI は心筋生検に取って代われるか？  
CIRCULATION Up-To-Date 8(6):683-706, 2013.
- 15) 北風政史  
 $\beta$  遮断薬は高齢者、糖尿病・慢性閉塞性肺疾患を合併する症例に使用禁忌か？  
臨床医のための循環器診療 No.19:32-34, 2013.
- 16) 朝倉正紀、北風政史  
特発性心筋症  
内分泌・糖尿病・代謝内科 37(5):527-533, 2013.

## 2、学会発表

### (国内)

1. 高濱博幸、今津美樹、浅沼博司、舟田晃、菅野康夫、大原貴裕、長谷川拓也、朝倉正紀、神崎秀明、安斉俊久、北風政史:  
Serum fibroblast growth factor 23 as a surrogate marker in patients with heart failure  
第 61 回日本心臓病学会学術集会 2013 年 9 月 20-22 日(熊本)
2. 進藤一紘、朝倉正紀、関庚徳、伊藤慎、高橋彩子、今津美樹、浅沼博司、北風政史  
次世代シーケンサーを用いた新規心不全関連遺伝子の探索  
第 61 回日本心臓病学会学術集会 2013 年 9 月 20-22 日(熊本)
3. 長谷川拓也、朝倉正紀、江口和男、浅沼博司、天木誠、高濱博幸、舟田晃、菅野康夫、大原貴裕、神崎秀明、橋村一彦、友池仁暢、金智隆、安斉俊久、北風政史  
BNP は冠動脈疾患発症リスクの代用マーカーとなりうるか  
第 61 回日本心臓病学会学術集会 2013 年 9 月 20-22 日(熊本)
4. 今津美樹、高濱博幸、浅沼博司、舟田晃、菅野康夫、大原貴裕、長谷川拓也、朝倉正紀、神崎秀明、安斉俊久、北風政史  
Elevation of serum fibroblast growth factor 23 in patients with heart failure: A potential clinical significance.  
第 21 回日本血管生物医学学会学術集会 2013 年 9 月 26-28 日(大阪)

### (海外)

1. Imazu, M; Takahama, H; Asanuma, H; Funada, A; Ohara, T; Hasegawa, T; Asakura, M; Kanzaki, H; Anzai, T; Kitakaze, M  
Association between plasma indoxyl sulfate levels and cardiac hypertrophy in patients with heart failure.  
ESC Congress 2013, Aug.31-Sept.4 (Amsterdam, Holland)
2. Imazu, M; Takahama, H; Asanuma, H; Funada, A; Ohara, T; Hasegawa, T; Asakura, M; Kanzaki, H; Anzai, T; Kitakaze, M

Clinical significance of serum fibroblast growth factor 23 as a surrogate marker of the cardiorenal hemodynamic state  
ESC Congress 2013, Aug.31–Sept.4 (Amsterdam, Holland)

#### 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

H23、24 年度に引き続き、大阪大学とともに共同研究を実施し、病理心筋組織の微細構造解析を行った。病態・病期におけるバイオマーカー指標の開発を行うべく、個々に存在する各データの統合し、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い病理学的鑑別診断法を確立するため、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。特に H25 年度はこれまでの集大成として新たに開発した病理指標の有用性、再現性、客観性を検証し、次なる臨床研究につなげる。

#### 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、大阪大学におけるサンプルを対象に従来の解析指標に関するノウハウを指導しながら、臨床データに連結可能な病理データへアプローチする。エピゲノム情報を統合し高い計測精度と、豊富な検体数による統計的処

理が可能なように解析を実施する。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う。

一般組織所見に関する指導も行いつつ、大阪大学に存在する標本を中心に、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、24 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、エポキシ樹脂包埋・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性に応じて行われたもののうち、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。

4) 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・神崎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。H25 年最終年度までに約 180 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、24 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解析環境の整備を行い、共同して病理

所見検討をおこなった。

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

今回我々が得た病理指標が、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有益な情報をもたらし、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一助となり得るかについては前向きリン祖父研究を実施し、より詳細な検討が必要である。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。

#### 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) Wada Y, Aiba T, Matsuyama T, Kanzaki H, Anzai T, Ishihara M, Yasuda S, Ogawa H, Ishibashi-Ueda H, Shimizu W. Clinical significance of tissue fibrosis and conduction abnormality in long-term prognosis in hypertrophic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 34:778, 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* 304:H1361-9,2013.
- 3) Yoshimuta T, Okajima T, Ishibashi-Ueda H, Mori M, Higashi M, Hayashi K, Kawashiri MA, Yamagishi M. Circumferential hyperechogenicity as an ultrasound sign of infected abdominal aortic aneurysm. *Circulation* 128:415-6, 2013.
- 4) Matsuyama TA, Tanaka H, Adachi T, Jiang Y, Ishibashi-Ueda H, Takamatsu T. Intrinsic left atrial histoanatomy as the basis for reentrant excitation causing atrial fibrillation/flutter in rats. *Heart Rhythm* 10:1342-8, 2013.
- 5) Hata H, Fujita T, Shimahara Y, Sato S, Yanase M, Seguchi O, Murata Y, Ishibashi-Ueda H, Nakatani T, Kobayashi J. Pathological Analysis of the Aortic Valve after Long-Term Mechanical Circulatory Support. *J Heart Lung Transplant* 32:S279,2013.

##### 2、学会発表

- 1) Ishibashi-Ueda H, Ikeda Y, Matsuyama T, Ohta-Ogo K, Takagi Y, Nakanishi N: Prostacyclin Analogues could reverse Histopathological Advanced Vascular Lesions of Idiopathic Pulmonary Arterial Hypertension. 第76回日本循環器学会総会, 福岡, 2012.3



- 2) 植田初江 他: 膠原病合併肺高血圧症における肺静脈病変の関与について. 剖検例と臨床データアンケート調査(厚労科研 PVOD 難治性疾患克服事業)から. 第 53 回日本呼吸器学会学術講演会、東京、2013.年 4 月
- 3) 植田初江: 慢性肺血栓塞栓症の病理. 第 102 回日本病理学会総会(ワークショップ), 札幌, 2013 年.6 月
- 4) Ishibashi-Ueda H, Ohta-Ogo K, Matsuyama T, Ikeda Y, Ogino H. Takayasu arteritis and aortic valve regurgitation: The histology of aortic valve of Takayasu arteritis at the time of valve replacement. 25th European Congress of Pathology, Lisbon, September 2013

#### 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

H23～H24 にかけて実施した、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の探索に資する研究を実施するため、心不全発症メカニズムに関する基礎臨床の多面的なデータ・研究成果を組み合わせ、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。2 年間を通じて実施してきたヒト臨床組織検体からのゲノムワイドな、DNA メチル化、超高速 DNA シーケンスによるヒストン修飾および RNA 発現に関する解析システム立てて比較を検討することにより心臓特異的、心不全特異的な分子標的の探索をおこなう。本検討を行うことにより、別分担研究者らが行っている病理学的指標との比較可能な情報プロファイルの作成が可能となるとともに、心不全病態 in vivo モデルにおける各蛋白の翻訳後修飾などの評価も行うことが可能となる。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

Genome-wideなDNAメチル化およびヒストン修飾解析および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、H24 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、検体追加解析を行っている。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を行い、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、心臓特異的メチル化部位探索および、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。さらにこれらのゲノムワイドな情報について、実際の遺伝子発現変化を参照しながら解析が実施できるように、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ヒト検体試料と同一の症例について、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) を実施した。大阪大学で実施した解析について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

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における 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。H23 年、H24 年に実施したデータをもとに、H25 年度も継続して領域探索を続けている。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 サーバーとオープンソースを中心とした特殊ソフトウェア

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ている。

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。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、他動物種の情報も合わせて参照情報とし、解析を継続している。

#### D. 考察

システムの管理は当初H23年度の行った指導を継続し、パイプラインもほぼ安定に稼働している。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H25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

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。

これらの指導は、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安定的に稼働するパイプラインの構築の一助となり、本研究の遂行に重要な役割を果たした。

#### 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) GATA factor switching from GATA2 to GATA1 contributes to erythroid differentiation.  
Suzuki M, Kobayashi-Osaki M, Tsutsumi S, Pan X, Ohmori S, Takai J, Moriguchi T, Ohneda O, Ohneda K, Shimizu R, Kanki Y, Kodama T, Aburatani H, Yamamoto M.  
Genes Cells ;18(11):921-33, 2013
- 2) The miR-17/106-p38 axis is a key regulator of the neurogenic-to-gliogenic transition in developing neural stem/progenitor cells.  
PNAS USA.; 111(4):1604-9, 2014.

2、学会発表

なし

1) 該当なし

2、実用新案登録

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定も含む)

3、その他

以上、特筆すべき事項なし

1、特許取得

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、平成23-24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実施し、心不全病態重症化により変化するクロマチン高次構造の変化を詳細に捉えることができた。

これまでの検討で得られた病理学的知見から、その携帯変化機序を御科医らかにすべく、分子生物学的に裏付ける検討も同時に行った。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、心不全のエピゲノム・遺伝子発現プロファイルを作成し、それをもとに心不全感受性ゲノム領域の同定も実施し、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した。

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

平成23～25年の3年間各年次を通じて、ヒト臨床心不全組織検体を採取保存、症例蓄積を行う。検体採取保存にあたっては、重症心不全、はじめ、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症例を蓄積すべく説明と同意書の取得を行った。

まず心筋特異的メチル化部位の同定を目的とし、不全心筋組織、正常心筋組織を比較し、さらに非心臓組織も用いて、解析を実施する。新旧各シリーズのデータを統合し、心臓特異的なメチル化部位の同定を試みた。初年度より次年度にかけて不全心筋組織約 10 検体、正常心筋組織約 5 検体解析、非心臓組織約 5-10 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。

さらにヒト臨床検体では十分対応できないデータを保管するため、均一かつ詳細な病期・病態プロフィールと連結させることができるように、細胞および動物モデルを用いた同様の検討も行い、ヒト検体による解析と連動させた実験を行った。主にマウス動物モデルにおいて、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 23-25 年度にかけて不全心筋組織、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った。

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 histone H3K4me3 および転写複合体の結合部位探索のため、RNA polymerase II、および転写制御を鑑別に有用な抗体を用いて、クロマチン免疫沈降(ChIP)-sequence 解析を行い、genome-wide な網羅的情報の蓄積にあたった。

## 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ィール作成

平成 23~25 年度にかけて心臓移植ないし心臓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。

さらに動物モデルに対しては心筋へのストレス負荷刺激時のエピゲノム、遺伝子発現指標変化も組み合わせ解析を行った。特に動物モデルマウスの遺伝子発現情報解析に加え、2~3 年度の後半にかけて心不全マウス/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 発現解析を行った。

上記項目①において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。既に本研究およびそれ以前に作成した DNA マイクロアレイデータも参考の指標にし、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 RNA sequence 解析を用いた網羅的遺伝子発現プロフィールを Genome wide に作成した。

以上、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ィールを作成した。

## 2、重症心不全病理画像解析技術の確立と臨床メ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

病理学的検索の具体的な方法は以下のとおりである。臨床診療において説明を実施、同意書を得て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臓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最重症心不全生検検体、通常心筋生検毎にグループに分けて蓄積した。特に電子顕微鏡標本作製については、2.5%グルタルアルデヒド固定以下電子顕微鏡標本完成に至るまで、広く一般的に用いられている手法を用いて試料の作成、画像撮像を行い、不全心筋細胞の細胞核クロマチン構造解析を行った。

組織標本作製の詳細を以下にのべる。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。

独自クロマチン密度解析法を確立させ、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った。以上により、クロマチン構造をデジタル化し、新規パラメータ(クロマチンスコア)として定義することし、同一症例、同一心

筋採取部位、同一標本(視野)の検体を用いながら、超高压電顕法を新規に導入し、ナノメートルレベルの解像度でヒト臨床サンプルの心筋細胞核クロマチン超微細構造を解析し、構造変化の形成機序をより緻密に解析検討した。

平成25年度は、平成23、24年度に確立した上記手法を踏襲し、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(クロマチンスコア)についても継続して検討をおこなった。検索対象となる標本は、不全心筋細胞であり、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も行った。

### 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

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った。それらの統合的解析により明らかにされた各指標および病態変化より心不全可塑性のモデル化を行い、独自に開発した微細構造解析法による病理指標、クロマチンスコアの病態・病期変化における Cut-off 値についての検討を行った。

#### 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

既知遺伝子発現変化を参考に、各症例の病期重症度の再検証を行い、従来の病理指標、新規クロマチンスコアに代表される病理学的指標と遺伝子発現変化、エピゲノム変化などの分子生物学的指標との比較をおこなった。網羅的遺伝子発現プロファイル、エピゲノムプロファイルについて、Genome-wide な DNA メチル化解析、ヒストン修飾解析(ChIP-seq)、RNA 発現解析(RNA-seq)など超高速シーケンシングにより作成した心不全関連遺

伝子発現制御プロファイルより、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抽出した。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として同定するとともに、ヒト検体を用いて心不全可塑性に関する新規マーカー探索と、その同定因子の医学的意義を検証した。

### 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)

上記検討3-①および②において確立された可塑性指標を用いて、培養心筋細胞および心不全動物モデルでの検討を行った。さらにエピゲノム関連蛋白分子に相互作用する蛋白分子の同定を目的とした検討を、超高感度 MS を用いて行い、候補となる分子に対しては心不全における分子機能・作用機序に関する解析を行った。より高感度な質量分析装置を用いて検討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と考えられた。

以上の検討は組織標本サンプルのみならず培養心筋細胞系でも実施された。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、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、その機能解析を実施し新規分子を探索することとなった。

ゲノム情報解析実験系からも、アプローチし心不全感受性ゲノム領域の同定を試みるとともに、その領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するとともに、その機能解析実施した。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こととなった。

(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に厳重に管理・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。

4) 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

H25 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。通常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。蓄積できた通常心筋生検における生体組織試料標本数は、平成 24 年 49 症例、平成 25 年 27 症例、全症例のべ通算: 206 症例であった。また、補助循環、心移植を要した最重症心不全検体数は、平成 24 年 27 症例、平成 25 年 24 症例、全症例のべ通算: 157 症例であった。

それら資料の中から、平成 23 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引き続き行うとともに、さらに平成 24 年度に行った非心臓組織 7 検体のデータも追加して、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継続して行った。

H23-24 年度に実施したヒト心不全 DNA メチル化に、マウス心不全 *in vivo* クロマチン免疫沈降(ChIP)の各解析に対して、同じ心筋組織検体を用いた別のエピゲノム修飾の情報も追加した。H24-25 年にかけては、遺伝子転写活性化を示すヒストン修飾 histone H3K3me4 および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、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エピゲノムプロファイルを作成し、実際の分子探索を行う基盤を整えることができた。

#### 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

H25 年度は H24 年度に実施したヒト不全心筋を

用いた RNA-seq 発現解析に加えて、さらにヒト検体を追加し、探索同定に至った分子に関する機序仮説の検証を行うべく、培養心筋細胞、心筋線維芽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、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するため 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解析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、独自のスクリプト追加作業も行い、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ヒト、動物両者の重症心不全組織サンプルを用いた各々の解析セット (DNA マイクロアレイデータ、ヒト心不全組織を用いた RNA-seq 解析) を実施した。実施した情報処理解析は必要に応じてゲノム Viewer で見ることとし、RNA-seq 含めて多検体のシーケンス解析に対して効率良くユーザーフレンドリーに閲覧できるようなシステムを構築した。最終的にはエピゲノム解析データと遺伝子発現解析データを、動物種間でも比較検討可能となるように、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 (H24-25 継続中)

## 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

心筋病理細胞核クロマチン密度指標 (Chromatin Score) を用いた重症心不全可塑性臨床診断指標の開発と実用化を目指すため、ヒト拡張型心筋症の組織心筋細胞核クロマチン構造変化を解析した。

① Chromatin Score が心不全病態変化に強く相関すること、②その変化は遺伝子発現や組織性状変化よりも上流でとらえられることを示し、心機能の破綻前に心不全可塑性を知ることのできる病理クロマチン計測法を開発したことを報告した。病理所見として見過ごされがちなデータでありながら、従来

にない電子顕微鏡クロマチン構造計測法を取り入れることにより、単施設後向き研究における検討結果でありながらも、極めて高い陽性予測価を示すこと、従来の心不全診断指標 (心エコー、心臓線維化、BNP 値) とも全く相関を示さない新しい指標であることがわかった。

大阪大学医学部附属病院循環器内科に入院した重症心不全症例の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実施した。平成 25 年度にかけて総数 180 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し、細胞核クロマチン超微細構造解析を行った。

核内構造観察に際しては、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ナノメートルレベルの高解像度で超微細構造解析を行った。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。試料作製と条件検討を行い、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。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、大阪大学超高圧顕微鏡センターにおいて 100~1000kV 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実施した。

一般組織所見に関する指導も行いつつ、大阪大学に存在する標本を中心に、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を行った。

### 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

独自に考案した心筋細胞核クロマチン構造変化の臨床指標と臨床検査データとの相関を見つけることにより、その構造変化がどのような生理学的意義を持つか機序を解明し、将来のより簡便な代替診断法の開発へとつなげるために、基礎的病態解析を実施した。クロマチン構造解析を実施したヒト臨床心筋組織病理検体と同一の検体を用いて、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との相関性の有無を解析した。

前項において 180 症例に対して検討した、基礎的背景および新規可塑先生判断指標としての可能性について基礎的検証を行った。独自に考案した、心筋細胞核クロマチン構造変化の臨床指標同検体をお用いて基礎的遺伝子発現、エピゲノム解析を実施し、新規病理微細構造解析法における病態・病期との関連性、心不全可塑性評価指標としての有用性を基礎的側面から検証した。

病理データ、臨床データ、エピゲノム情報とのプロフィールを統合し、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相関を明らかにする。Genome-wide な DNA メチル化解析、超高速シーケンシングによるヒストン修飾解析、RNA 発現解析と心不全関連遺伝子プロフィール作成、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し、次項にある遺伝子同定等の基盤を作成した。

#### ② 心不全エピゲノムおよび遺伝子発現プロフィールの作成

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ィールを比較し、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・遺伝子発現プロフィールへの作業も併せて行い、統合データベースとして充実させた。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。

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・遺伝子発現プロフィールを統合し、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した。クロマチンスコアにより分類された Genome-wide な DNA メチル化解析、超高速シーケンシングによるヒストン修飾解析 RNA 発現解析において作成した心不全関連遺伝子プロフィールを求めた。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実施した。心不全病態変化との相関を示す幾つかの新規候補遺伝子領域を同定し、その機能解析を行った。複数の候補領域選定を実施した。

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

上記検討3-①および②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った。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った。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た。

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、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するとともに、その領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、その機能解析を行った。本領域は、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。

心不全感受性胎児性遺伝子に対する病態特異的な遺伝子転写調節領域はこれまでに知られておらず、今回本研究において同定し得た発現調節制御エンハンサー領域は心不全刺激特異性の高い調節制御であることが判明した。心不全での発現に重要なゲノムエンハンサー領域を世界に先駆けて発見同定した。本ゲノム配列領域をレポーターベクターに組み込み(エンハンサー発現調節ベクター)、培養心筋細胞において、qPCR 刺激による内在性遺伝子の誘導とともに、非常に高い相関性を以て、本レポーター遺伝子の発現を Luciferase 発光系で検出することに成功した。培養心筋細胞実験系における検討から心不全病態エンハンサーとして同定した本領域を用いてルシフェラーゼ発現ベクターを構築し、in vitro および in vivo 実験系を確立した。

エンハンサー発現調節ベクターを用いた 96well plate の細胞実験系を作成し、遺伝子発現調整に

おける、薬剤の心筋細胞ストレスに対する反応性をルミノメーターで検証できる実験系を構築した。さらに同レポーター遺伝子を用いたトランスジェニックマウスも作成し、心不全病態特異的に発現が上昇することを確認した。本トランスジェニックマウスは、発光基質の投与により、生体のまま心不全病態の指標となる BNP 発現を計測することが可能であり、病態経時変化を同一マウスで持続的にモニタリングすることが可能な世界初の画期的なマウスであることを証明した。

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。

#### D. 考察

慢性心不全症例は罹患者数が多いため、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。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。

3年間で実施した重症心不全～最重症心不全症例を対象にした心筋生検病理サンプルを用いた、単施設後ろ向き解析は終了し手法も確立した。有意差を以て利用可能との結果を得ており、今後は多施設前