

向き臨床研究としての検証が必要である。

開発を行った病理画像解析ソフトウェアは検者間、サンプル間などのバリデーションも検証済みを終え実用できる段階にある。今後は、他施設、多施設での実施による施設間変化の有無についての検証、および拡張型心筋症にとどまらず、その他の心不全にも有用であるかについて検証を行う事で、さらに利用価値が高まるものと考えられる。

ゲノム解析に関する部内および院内システムは構築済みである。今後心筋病理組織試料とゲノム試料に関して、臨床データとともに多施設から授受運用が可能なセキュアな環境にある研究システムを開発した。

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。本年度同定した心不全感受性ゲノム領域、および現在もお解析中の相互作用蛋白の病態との相関性、機能解析を行い、臨床病態に非常に良く相関すると示唆された。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。

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H24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相関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。それらの方法を応用することで、創薬探索に資する解析手法として利用できることが明らかとなった。

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) Imai A, Gotoh K, Asano Y* (corresponding author), Yamada N, Motooka D, Fukushima M, Kanzaki M,

- Ohtani T, Sakata Y, Nishi H, Toda K, Sawa Y, Komuro I, Horii T, Iida T, Nakamura S, Takashima S.
Comprehensive metagenomic approach for detecting causative microorganisms in culture-negative infective endocarditis.
Int J Cardiol. 2014 Mar 15;172(2):e288-9.
- 2) Matsuoka K, Asano Y* (corresponding author), Higo S, Tsukamoto O, Yan Y, Yamazaki S, Matsuzaki T, Kioka H, Kato H, Uno Y, Asakura M, Asanuma H, Minamino T, Aburatani H, Kitakaze M, Komuro I, Takashima S.
Noninvasive and quantitative live imaging reveals a potential stress-responsive enhancer in the failing heart.
FASEB J. 2014 Apr;28(4):1870-9.
- 3) Kioka A, Kato A, Makoto Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki S, Matsuzaki T, Takafuji K, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Shintani Y, Yoshida M, Noji H, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y* (corresponding author), Takashima S*.
Evaluation of intra-mitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014 Jan 7;111(1):273-8.
- 4) 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 May 15;304(10):H1361-9.
- 5) Minami Y, Mizuno M, Aokage T, Asai K, Sakata Y, Yumino D, Mizuno K, Takano T; ATTEND Investigators.
Hyponatremia and in-hospital mortality in patients admitted for heart failure (from the ATTEND registry).
Am J Cardiol. 2013 Apr 1;111(7):1019-25.
- 6) Taniguchi T, Ohtani T, Mizote I, Kanzaki M, Ichibori Y, Minamiguchi H, Asano Y, Sakata Y, Komuro I.
Switching from carvedilol to bisoprolol ameliorates adverse effects in heart failure patients with dizziness or hypotension.
J Cardiol. 2013 Jun;61(6):417-22.
Int J Cardiol. 2013 Oct 12;168(5):4790-5.
- 7) Taniguchi T, Sakata Y, Ohtani T, Mizote I, Takeda Y, Asano Y, Masuda M, Minamiguchi H, Kanzaki M, Ichibori Y, Nishi H, Toda K, Sawa Y, Komuro I.
Usefulness of transient elastography for noninvasive and reliable estimation of right-sided filling pressure in heart failure.
Am J Cardiol. 2014 Feb 1;113(3):552-8.

2、学会発表

- 1) 第 35 回心筋生検研究会
Young Investigator's Award Finalists Lectures
1st winner
Y-9 心筋細胞核クロマチン形態は拡張型心筋症患者の予後不良予測因子となりうる
神崎 万智子、朝野 仁裕* (*; corresponding author)
2013 年 11 月 1 日、東京
- 2) 第 17 回日本心不全学会学術集会
Young Investigator's Award Finalists Lectures
1st winner
YIA-BA-5 Heart Failure Specific Enhancer Regulates the Expression of Natriuretic Peptides
Ken Matsuoka, Yoshihiro Asano* (*; corresponding author), et al.
2013 年 11 月 29 日、埼玉大宮
- 3) 第 78 回日本循環器学会学術集会
Young Investigator's Award Finalists Lectures (Clinical study)

Morphometric and Quantitative Analysis in Cardiomyocyte's Nucleus were Associated with Poor Outcome in Patients with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy

Machiko Kanzaki, Yoshihiro Asano* (*; corresponding author), et al. 2014年3月20日、東京

4) 第77回日本循環器学会学術集会

Young Investigator's Award Finalists Lectures
1st winner

Title : G0/G1 Switch Gene 2 Promotes Mitochondrial ATP Production and Protects Cardiomyocytes from the Energy Crisis under Hypoxia

Shuichiro Higo, Yoshihiro Asano* (*;

corresponding author), et al.
2013年3月15日、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

2件申請中(非公開特許)

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

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。

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H24年度まで実施した。H25年度は同じく分担研究を行っているチームに指導的立場でそれらの技術ノウハウを提供し円滑な研究の実施をはかる。

さらに前年度までに、細胞核クロマチン密度解析によるパラメータと、超高压電顕法における超微細構造を解析の形態像との比較を行い、細胞核クロマチン密度と心不全臨床病態の重症度との密接な関係が示唆されることが判明したことを受け、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の検討を行い、ヒト臨床研究に発展させるための研究計画のデザインなどを主に担当する。

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による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

H24 年度までに蓄積した、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さらに充実させる。臨床診断、病理学的条件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、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。

H25 年度はさらに前項において確立された可塑性指標を用いて行う基礎的機能解析実験の技術を別分担チームに提供しながら指導的立場で実施する。具体的な技術とは、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う。

2、ヒト臨床心不全における細胞核クロマチン密度が果たす心不全可塑性マーカーとして有用性

前向き臨床研究として、ヒト重症心不全症例や心臓移植症例を対象に同指標の前向き観察研究を行うこととし、有用性を確認しながら、将来心不全治療介入に用いる指標として研究へ発展させることが可能かにつき検証する。

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。

(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。

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

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による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

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 150-200 症例の中から解析に適切である約 60 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。

さらに、新規同定した心不全病態エンハンサーの機能を判定するため、前年度に確立した非侵襲的ライブイメージング実験系を用いて心不全機能解析を行った。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。これらの検討を H25 年度も引き続き実施するに当たり、分担研究者らとともに本年度は指導的立

場で実施した。

2、ヒト臨床心不全における細胞核クロマチン密度が果たす心不全可塑性マーカーとして有用性

昨年度に実施した検討をさらに臨床症例を増やし、データ、計算式、指標としての再現性、有用性に関して検証を行った。クロマチン密度計測を実施する後ろ向き臨床観察研究により得られた電子顕微鏡像からクロマチンスコアを自動計測、算出し、定性的にことなるクロマチンを有する 2 群について各群予後を鑑別できることを証明した。さらに自動測定による定量指標を 2 種開発し、それらを用いて補助人工心臓、心臓移植の cardiac event 発生との相関関係も検証した。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、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ではなく、心不全可塑性の判断が可能であるか独立した新規指標であることを証明した。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。

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とともに、さらに本年度一層の充実を図ることができた。

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ルより、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を示し、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ったものと考えられる。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値を得るとともに、それをを用いた前向き臨床研究に発展させることができた。

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、前向き臨床研究に利用することができる有意な指標を得ることができた。

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) Asanuma H, Sanada S, Asakura M, Asano Y, Kim J, Shinozaki Y, Mori H, Minamino T, Takashima S, Kitakaze M.

Carperitide induces coronary vasodilation and limits infarct size in canine ischemic hearts: role of NO.

Hypertens Res. 2014 in press.

- 2) Ando H, Asai T, Koide H, Okamoto A, Maeda N, Tomita K, Dewa T, Minamino T, OkuN.

Advanced cancer therapy by integrative antitumor actions via systemic administration of miR-499.

J Control Release. 2014 May 10;181:32-9.

- 3) 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 May 15;304(10):H1361-9.

- 4) Suna S, Sakata Y, Nakatani D, Okuda K, Shimizu M, Usami M, Matsumoto S, Hara M, Ozaki K, Mizuno H, Minamino T, Takashima S, Nishino M, Matsumura Y, Takeda H, Tanaka T, Sato H, Hori M, Komuro I.

Decreased mortality associated with statin treatment in patients with acute myocardial infarction and lymphotoxin-alpha C804A polymorphism.

Atherosclerosis. 2013 Apr;227(2):373-9.

2、学会発表

- 1) 南野哲男.

日本循環器学会学術集会総会

プレナリーセッション<循環器病学のトランスレ
ーションリサーチ>

「Academic Drug Development for Treatment of Acute Myocardial Infarction Using Nano-sized Liposomes」

2014年3月、東京

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 教授

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。

3年間の集大成として後ろ向き研究で開発したクロマチンスコア計測指標の客観性、再現性を検証し、次なる前向き臨床研究の指標となり得るか、検討する。

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・24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。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、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を用いて、超高圧電顕微細構造

解析を行うための症例選択、蓄積を行った。H25年度はそれに引き続き、より迅速客観的な指標となるよう、自動計測の基準を明確にし、さらに症例を重ねたより詳細なクロマチン計測法の開発を試みる。

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し、そのため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った。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、临床上の有意性を得られるか検討したが、H25年度はその方法を一層詳細かつ正確客観性を持たせるため、検者を変えて均一となるよう方法をより詳細に規定するとともに、幾つかのパラメータを比較し最適な2種類の方法を選択することとした。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査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

大阪大学医学部附属病院循環器内科病棟に重症心不全の精査加療目的で入院する心不全症例を対象に、説明と同意を得て後、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。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った。

ヒト心筋組織を2.5%グルター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/モリブデングリット、支持膜としてフォームパールを使用、金粒子添加を行うプロトコルで統一し、加速電圧1000kV、倍率25000倍、 -60° ～ 60° 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。

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、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 180 検体（最重症心不全検体 60 検体、通常心筋生検 120 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 25 年度はそれらの検体全て（～180 サンプル）に対し電子顕微鏡観察用のグリッド標本を作成し、臨床診断プロファイルおよび、病理学的診断データ、電顕クロマチン各指標データの統合プロファイルを作成した。

2、心不全可塑性を示す新しい診断鑑別方法の確立

前年度より引き続き、電顕クロマチン各指標データの計測に際しての再現性高品質な計測方法の開発に取り組んだ。H23 年度に確立した独自の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。不全心筋細胞の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 グループに分類した。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。より Accuracy の高い数値として cut off 値を求めることもでき、H24 年度に比しさらに症例を増やしても再現性があることを検証した。

心不全可塑性を見るため、その中からより重症、すなわち補助人工心臓装着、心臓移植適応症例となった最重症心不全症例を中心に解析し、複数の

クロマチン指標の中から、核内クロマチン面積率および核膜周囲クロマチン面積率の計測が最も再現性良く、かつ病態を見分けることができる指標として有用であることを示した。

上記 3 グループに分類した核は、超高圧電子顕微鏡による観察で異なる構造形態を呈していたことから透過型電子顕微鏡では観察し得ない、高解像度でかつ三次元構築されたクロマチン構造が観察し得たとの結果を得た。

D. 考察

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、そしてさらなる母集団を増やしより詳細に検討した検討も終わり、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。

平成23・24年度より継続的に行っている、心機能改善の可塑性を表す指標の開発は、心不全診療にとって大きな診断マーカーとしての有用性が期待される。

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ことにより、核内構造変化が細胞、組織機能に何らかの影響をおよぼし、最終的に臓器機能に結びついていることが示唆された。分担研究者らのグループで、基礎的検討を行っている、現在同定しつつあるエピゲノム指標により、同定された領域、蛋白の病態との相関性、機能解析を引き続き行い、生物学的意義も含めた統合的理解が得られるものと考えられる。

E. 結論

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。心不全可塑性病理診断法として確立し、病理組織所見と分子生物学的エピゲノム変化指標の検索を同時に同一サンプルで行うことが新しい診断分子の発見につな

がることを見出した。これらの知見は今後の前向き臨床研究の実施に非常に強い科学的事実として、有用である。

今後も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し研究を継続する予定である。

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. Ichibori Y, Nakatani D, *Sakata Y, Tachibana K, Akasaka T, Saito S, Fukushima N, Sawa Y, Nanto S, Komuro I. Cardiac Allograft Vasculopathy Progression Associated With Intraplaque Neovascularization. *J Am Coll Cardiol*, 2013, 61, e149
2. Kajimoto K, Sato N, Keida T, Mizuno M, Sakata Y, Asai K, Takano T. Association between length of stay, frequency of in-hospital death, and causes of death in Japanese patients with acute heart failure syndromes. *Int J Cardiol*, in press
3. Minamiguchi H, *Sakata Y, Ohtani T, Mizote I, Takeda Y, Mizuno H, Okuyama Y, Nakatani S, Fujita M, Watanabe T, Uematsu M, Komuro I. Usefulness of Overlapping of the E and A Waves of the Transmitral Flow as a Predictor of Responders to Cardiac Resynchronization Therapy. *Am J Cardiol*, 2013; 1: 1613
4. Taniguchi T, Ohtani T, Mizote I, Kanzaki M, Ichibori Y, Minamiguchi H, Asano Y, *Sakata Y, Komuro I. Switching from Carvedilol to Bisoprolol Ameliorates Adverse Effects in Heart Failure Patients with Dizziness or Hypotension. *J Cardiol* 2013; 25: 886
5. *Sakata Y. Visiting time and clinical findings on admission in patients with acute heart failure – Day and night, why is it so? *J Cardiol*, 2013; 61: 243
6. *Sakata Y, Ohtani T, Takeda Y, Yamamoto K, Mano T. Left ventricular stiffening as therapeutic target for heart failure with preserved ejection fraction. *Circ J*. 2013 25;77:886–92.
7. Yoshioka D, Toda K, Sakaguchi T, Miyagawa S, Nishi H, Yoshikawa Y, Fukushima S, Saito S, Saito T, Shibasaki I, Sakata Y, Ohtani T, Sawa Y. Initial report of bridge to recovery in a patient with DuraHeart LVAD. *J Artif Organs*. in press
8. Tamaki S, Mano T, Sakata Y, Ohtani T, Takeda Y, Kamimura D, Omori Y, Tsukamoto Y, Ikeya Y, Kawai M, Kumanogoh A, Hagihara K, Ishii R, Higashimori M, Kaneko M, Miwa T, Hasuma H, Yamamoto K, Komuro I. Interleukin-16 promotes cardiac fibrosis and myocardial stiffening in heart failure with preserved ejection fraction. *PLoS ONE* 8(7): e68893. doi:10.1371/journal.pone.0068893
9. Kajimoto K, Sato N, Sakata Y, Takano T on behalf of the Acute Decompensated Heart Failure Syndromes investigators. Relationship between systolic blood pressure and preserved or reduced ejection fraction at admission in patients hospitalized for acute heart failure syndromes *Int J Cardiol*, in press
10. Tsukamoto Y, Mano T, Sakata Y, Ohtani T, Takeda Y, Tamaki S, Omori Y, Ikeya Y, Saito Y, Ishii R, Higashimori M, Kaneko M, Miwa T, Yamamoto K, Komuro I. A Novel Heart Failure Mice Model of Hypertensive Heart Disease by Angiotensin II Infusion,

- Nephrectomy, and Salt Loading. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2013;305:H1658-67
11. Takeda Y, Sakata Y*, Ohtani T, Tamaki S, Omori Y, Tsukamoto Y, Aizawa Y, Shimamura K, Shirakawa Y, Kuratani T, Sawa Y, Yamamoto K, Mano T, Komuro I. Endovascular Aortic Repair Increases Vascular Stiffness and Alters Cardiac Structure and Function. *Circ J.* 2014;78:322-8
 12. Taniguchi T, Sakata Y*, Ohtani T, Mizote I, MD, Takeda Y, Asano Y, MD, Masuda Minamiguchi H, Kanzaki M, MD, Ichibori Y, Nishi H, Toda K, Sawa Y, MD, Komuro I. Usefulness of Transient Elastography for Non-invasive and Reliable Estimation of Right-sided Filling Pressure in Heart Failure *Am J Cardiol.* 2013;61: 417-22
 13. Yamamoto K, Origasa H, Suzuki Y, Takahashi T, Shinozaki T, Watanabe T, Sakata Y, Izumi C, Taira K, Hori M on behalf of the J-DHF Investigators. Relation of Risk Factors with Response to Carvedilol in Heart Failure with Preserved Ejection Fraction – A Report from the Japanese Diastolic Heart Failure Study (J-DHF)– *J Cardiol.* in press
 14. Fukushima S, Saito S, Sakata Y, Sawa Y A Case of Everolimus-Associated Chylothorax in a Cardiac Transplant Recipient. *Transplantation Proceedings.* 2013; 45: 3144-46
 15. Okuyama Y, Matsuo M, Matsuo H, Sakaguchi Y, Takai H, Horiguchi Y, Ryomoto T, Adachi S, Amano T, Togawa M, Masuda M, Minamiguchi H, Nanto S, Komuro I, Sakata Y. Introduction of Point-of-Care Testing in Japanese Outpatient Clinics Is Associated With Improvement in Time in Therapeutic Range in Anticoagulant-Treated Patients. *Circ J.* in press
 16. Sotomi Y, Sato N, Kajimoto K, Sakata Y, Mizuno M, Minami Y, Fujii K, Takano T, On behalf of the investigators of the Acute Decompensated Heart Failure Syndromes (ATTEND) Registry. Impact of pulmonary artery catheter on outcome in patients with acute heart failure syndromes with hypotension or receiving inotropes: From the ATTEND Registry. *Int J Cardiol.* 2014; 172: 165-72
 17. Yokoi K, Sumitsuji S, Kaneda H, Siegrist P, Okayama K, Ide S, Mizote I, Kumada M, Kuroda T, Tachibana K, Sakata Y, Nanto S. A Novel Homemade Snare, Safe, Economical and Size Adjustable. *Eurointervention.* in press
- ## 2、学会発表
1. 日本循環器学会
2014年3月22日(東京)
Plenary Session2 : Progress in Heart Failure Treatment
“Important Issues to be Challenged for Improvement of Left Ventricular Assist Device Therapy”
 2. 日本循環器学会
2014年3月22日(東京)
Controversy6 : Is the Prevalence of Cardiac Resynchronization Therapy in Japan Reasonable or Sufficient? “What should We Do for Increasing Rate of Responders?”
 3. 日本循環器学会
2014年3月22日(東京)
Morning Lecture13 : ステージ D 心不全における包括的治療の未来
“Important Problem is Stage D Heart Failure”
- ## H. 知的財産権の出願・登録状況
- 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

H23、24年度の検討に引き続き、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に関する検討を行う。循環器病態において重要な機序に関わると類推される分子に対し、ゲノムワイドな解析を実施し、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

H23、24年度の検討で行ってきた基礎的検討の条件検定もすすんだ。H25年度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探索のため、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い、新しい心不全可塑性の分子指標を開発する。

性を示すヒストン修飾 histoneH3K4me3 および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各4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。

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

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。

特に RNA 発現解析においては、conventional な DNAchip、Exon-array、RNA-seq の比較検討も行い、エピゲノム指標の正確な解釈の一助とする。

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

H24 年度に引き続き、version 更新強化された in-house のデータベースをもとに、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昨年度の 2 検体ずつからさらに検体数を増やし、再現性あるデータの蓄積を行った。各4検体ずつのデータ比較から、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し、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 histoneH3K4me3 および転写複合体の結合部位探索を実施した。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い、心不全特異的に変化する遺伝子群の同定とその周辺のエピゲノム変化の指標を得ることに成功した。

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

H24 年度に引き続き、さらに特に最重症心不全症例の蓄積に努めた。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した。

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

心不全エピゲノムおよび遺伝子発現プロファイルの作成

上記結果を統合し、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した。

用いたパイプラインは昨年度よりさらに情報を強化した次世代シーケンサーのデータ解析パイプラインである。以前に構築した Linux サーバシステム (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も一

定の完成を見た。

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いだ。

本研究により幾つかの有用な領域、遺伝子を同定することに成功した。現在論文作成投稿中である(従って詳細な遺伝子名等はH26年3月末時点では非公表)。

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増やすことにより再現性良いデータの取得ができ結果として特異的部位、蛋白の同定に成功した。

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) Kioka H, Kato H, Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki S, Matsuzaki T, Takafuji K, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Shintani Y, Yoshida M, Noji H, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y, Takashima S.
Evaluation of intramitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation.
Proc Natl Acad Sci U S A. Jan 7;111(1):273-278.

2. 学会発表

- 1) Morito D,(2人略), Yamazaki S,(4人略)
Structure and Function of Moyamoya Disease-Associated Protein
Mysterin/RNF213, IVBM 2014, 2013年4月
Japan(Kyoto)
- 2) Akira Funada (1人略)Satoru Yamazaki,(10人略).
Impact of the Polymorphisms of Renin-Angiotensin System on Prognosis in Hypertrophic Cardiomyopathy in the Era of Cardiac Magnetic Resonance 第77回日本循環器学会学術総会 2013年3月
- 3) 小谷友理,(1人略)、山崎 悟(3人略)
もやもや病関連タンパク質 mysterin による zebrafish の発生制御. 第8回臨床ストレス応答学会大会, 2013年11月

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

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷

Noninvasive and quantitative live imaging reveals a potential stress-responsive enhancer in the failing heart

Ken Matsuoka,^{*,†} Yoshihiro Asano,^{*,†,1} Shuichiro Higo,^{*,†} Osamu Tsukamoto,[†] Yi Yan,[†] Satoru Yamazaki,[§] Takashi Matsuzaki,^{*} Hidetaka Kioka,^{*,†} Hisakazu Kato,[†] Yoshihiro Uno,[‡] Masanori Asakura,^{||} Hiroshi Asanuma,^{||} Tetsuo Minamino,^{*} Hiroyuki Aburatani,[#] Masafumi Kitakaze,^{||} Issei Komuro,^{*} and Seiji Takashima^{*,†}

*Department of Cardiovascular Medicine and [†]Department of Medical Biochemistry and [‡]Laboratory of Reproductive Engineering, Institute of Experimental Animal Sciences, Osaka University Graduate School of Medicine, Suita, Japan; [§]Department of Cell Biology and ^{||}Department of Clinical Research and Development, National Cerebral and Cardiovascular Center Research Institute, Suita, Japan; [¶]Department of Cardiovascular Science and Technology, Kyoto Prefectural University School of Medicine, Kyoto, Japan; and [#]Genome Science Division, Research Center for Advanced Science and Technology, University of Tokyo, Tokyo, Japan

ABSTRACT Recent advances in genome analysis have enabled the identification of numerous distal enhancers that regulate gene expression in various conditions. However, the enhancers involved in pathological conditions are largely unknown because of the lack of *in vivo* quantitative assessment of enhancer activity in live animals. Here, we established a noninvasive and quantitative live imaging system for monitoring transcriptional activity and identified a novel stress-responsive enhancer of *Nppa* and *Nppb*, the most common markers of heart failure. The enhancer is a 650-bp fragment within 50 kb of the *Nppa* and *Nppb* loci. A chromosome conformation capture (3C) assay revealed that this distal enhancer directly interacts with the 5'-flanking regions of *Nppa* and *Nppb*. To monitor the enhancer activity in a live heart, we established an imaging system using the firefly luciferase reporter. Using this imaging system, we observed that the novel enhancer activated the reporter gene in pressure overload-induced failing hearts (failing hearts: 5.7 ± 1.3 -fold; sham-surgery hearts: 1.0 ± 0.2 -fold; $P < 0.001$, repeated-measures ANOVA). This method will be particularly useful for identifying enhancers that function only during pathological conditions.—Matsuoka, K., Asano, Y., Higo, S., Tsukamoto, O., Yan, Y., Yamazaki, S., Matsuzaki, T., Kioka, H., Kato, H., Uno, Y., Asakura, M., Asanuma, H., Minamino, T., Aburatani, H., Kitakaze, M., Komuro, I., and Takashima, S. Noninvasive and quantitative live imaging reveals a poten-

tial stress-responsive enhancer in the failing heart. *FASEB J.* 28, 1870–1879 (2014). www.fasebj.org

Key Words: natriuretic peptide • transcriptional regulation • *in vivo* assessment

GENE EXPRESSION IS REGULATED through the integrated action of many *cis*-regulatory elements, including core promoters, proximal promoters, distant enhancers, and insulators (1). Several methods have been used to explore the function of *cis*-regulatory elements during a variety of developmental stages (2, 3). However, the identification of gene regulatory elements with pathophysiological roles has been technically difficult because there are few appropriate models for monitoring transcriptional activity in live animals under pathological conditions.

Here, we focused on the regulatory elements that are responsive to heart failure. The natriuretic peptides, atrial natriuretic peptide (ANP) and brain natriuretic peptide (BNP), encoded by the neighboring genes *Nppa* and *Nppb* are activated in the embryonic heart, down-regulated after birth, and then reactivated during heart failure. Both peptides are well-known biomarkers that are strongly induced during heart failure and represent its severity. Cardiologists frequently use these peptides as natriuretic and vasorelaxant agents to treat various clinical conditions (4–8). Many studies have tried to elucidate the mechanisms of their transcriptional regulation because factors that regulate these

Abbreviations: 3C, chromosome conformation capture; ANP, atrial natriuretic peptide; BNP, brain natriuretic peptide; ChIP-seq, chromatin immunoprecipitation sequencing; CMV, cytomegalovirus; CR, conserved region; CTCF, CCCTC-binding factor; H3K4me1, histone H3 monomethylated at lysine 4; H3K4me3, histone H3 trimethylated at lysine 4; PE, phenylephrine; TAC, transverse aortic constriction

¹ Correspondence: Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565–0871, Japan. E-mail: asano@cardiology.med.osaka-u.ac.jp
doi: 10.1096/fj.13-245522

This article includes supplemental data. Please visit <http://www.fasebj.org> to obtain this information.