

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 大阪大学大学院医学系研究科 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。これまでに厚生労働省科学研究費補助金各研究事業において、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。

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。生理機能と関連した検討が多く、生命機能分野で報告されるとともに、循環器病態においても重要な機序に関わると類推され、ゲノムワイドな解析が待たれる。そこで、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、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。

研究分担者

北風政史
国立循環器病研究センター 部長

堤 修一
東京大学先端科学技術研究センター
特任准教授

植田初江
国立循環器病研究センター
部長(バイオバンク長併任)

山崎 悟
国立循環器病研究センター 室長

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

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。病理クロマチン指標の開発、心不全感受性遺伝子発現エンハンサーの同定、心不全新規特異的遺伝子同定、はいずれも生理機能と関連しており循環器病においても病態に関わる指標として重要であることが示唆される。これらの同定および臨床応用研究開発を目指した検討を実施する。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、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

ゲノムワイドな高解像度 DNA メチル化解析およびエピゲノム解析と関連する病理解析を行うため、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。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。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。

ヒトのみならずモデル動物による検討も追加した。均一かつ詳細な病期・病態プロファイルと連結させ

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を行い、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、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。

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 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た解析を行った。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ァイルを 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ァイルを作成した。

2、重症心不全病理画像解析技術の確立と臨床マーカーとの比較検討

細胞核超微細構造の画像解析からのエピゲノム変化指標の病理学的探索

本研究開始前より既に通常心筋生検、生体組織試料蓄積数は大阪大学において蓄積した検体を中心に：平成 21 年 40 症例、平成 22 年 46 例、補助循環心移植を要した最重症心不全生体組織試料蓄積数：平成 21 年 41 症例、平成 22 年 30 例、があり、それらのノウハウ方法を独自に活かし、本研究で更に充実した組織検体バンクを作成した。ヒト臨床不全心筋組織試料を対象とし、臨床検査データに連結可能な病理組織データとして蓄積の上、心不全臨床検査のデータ数値と連動して変化する病理マーカー指標の探索を行った。さらに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处理が可能ないように症例を選択、蓄積、解析する。病理データはデジタル数値化した情報として蓄積し、分子生物学との統合的理解を進めるための検討を行う。心不全の病態変化、Etiology に関して参考となる所見を付与し、将来二次性心筋症の鑑別を要する症例に対して発展的に応用使用可能なデータプロファイルとなるようにシステムを構築した。

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とした。その後更に検討を重ね、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。

心不全臨床検査データと連動する病理マーカー指標との比較検討

通常的心不全原因鑑別診断および病態把握のために行われた心筋生検、および心臓移植ないし心補助循環治療を行う際に採取されたヒト臨床不全心筋組織試料について、説明の実施と同意書の取得を行って後に、病理検索を実施、そのデータを解析しクロマチンスコアの群分けを行った。さらに連結可能匿名化検体として保存されている各症例の臨床診療データをもとに、細胞核クロマチン超微細構造解析結果と、臨床診療データの相関解析を行い、心不全一般の新規病理検索法として確立することとした。

3、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

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。

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解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。

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

臨床診断、病理学的情報から、心不全病態可塑性の条件を満たす症例検体を抽出する。新規心不全可塑性サロゲートマーカーとして前項にて算出法を新規に考案した病理マーカー・クロマチンスコアはもとより、さらに簡便性、有用性を有するものの開発を行うために、心不全可塑性指標として臨床病態と良く相関するパラメータとして、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、それらに結合相互作用する分子にも探索の範囲を広げた。

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とともに、クロマチンスコアによる細胞核病理指標解析それ自体が、心不全予後評価指標としての有用であるかについて、すなわち心不全病態予後・可塑性を判別する病理検討手法としての妥当性を検証した。

具体的には、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、そのヒト心不全可塑性診断における有用性を後ろ向きおよび前向き試験にて実施検討することとした。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し、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、新規可塑性サロゲートマーカーの鑑別能力を検証した。最終年度(平成 25 年度)は前年度までに候補として同定確立された可塑性指標を用いて、基礎的機能解析実験の技術に反映させ、ヒト臨床のみならず、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。

また、上記検討により候補となった分子の一つが分子が心臓酸素消費との関連性を示したことから、大動物重症心不全モデル動物を用いて検体マテリアルの提供を受け、心臓病理と分子生物学的検索を、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用いて検討した。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した。

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った。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。

(倫理面への配慮)

患者情報の解析に関しては施設の倫理委員会の承認を得た上、臨床研究倫理指針を遵守し慎重にお

こなう。その上で患者とは個別に、医師が書面に示した計画書を明示し、十分説明をしたうえで承諾を得たもののみを本研究に使用する。特に以下の点に留意する。

1) 試料提供者の個人識別情報を含む情報の保護: 診療情報を含めた個人情報と検体とは徹底した匿名化を行い、遺伝情報と個人情報の連結は個人識別情報管理者のみが可能となるように個人識別情報管理者において情報を管理する。

2) 試料提供者に対する予想される危険や不利益およびそれらが生じた場合の措置: 心筋生検試料採取は通常の診療の際に医学的必要性に応じて行われたもののうち、診療に用いない残余検体を利用することとし、危険や不利益はないと考える。誤って遺伝情報が外部に漏洩した場合、就職・結婚・保険への加入等に関して不利益をこうむる可能性が考えられるため、これを防ぐために、個人識別情報管理者を置き、同管理者は試料の匿名化を行うとともに個人情報を厳重に管理・保管し、試料提供者のプライバシーを保護する。

3) 試料提供者から採取した生体材料の取り扱いについて: 提供された試料は、個人識別情報管理者が連結匿名化し、匿名化ラベルのみ貼って保存する。これらの試料は、生体試料の包括利用同意を得ており、本研究だけでなく、将来倫理委員会で承認された他の自主臨床研究についても用いることが可能である。したがって検査済みの試料は、適宜連結可能匿名化番号を含む検体等を完全に削除した上で廃棄するが、使用可能な残余検体は匿名化されたまま施錠された保管場所で保管される。また、特に研究成果として得られた情報の管理には、外部に漏洩しないように対策を行う。

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

Genome-wide な DNA メチル化およびヒストン修飾解析

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大阪大学を中心に行い、ヒト臨床心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 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 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、DNA メチル化チップアレイを用いてゲノムワイドな高解像度 DNA メチル化解析を行うべく、それら資料の中から、平成 23 年度に DNA メチル化チップアレイを用いた検討し、不全心筋組織 5 検体、正常心筋組織 2 検体を用い、Pilot 的に DNA メチル化を検出することが可能であるかを検討し再現性の良い検出を確認の上、不全心筋組織 6 検体、正常心筋組織 2 検体に対し追加解析を行い、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。データの解析を行うとともに、平成 24 年度には非心臓組織 7 検体に対して実施した解析データを追加して、平成 25 年度にかけて、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、およびそれらの情報解析を行った。

DNA メチル化のみならず、ヒストン修飾や遺伝子転写部位を同定するため、平成 23~24 年度に実施したヒト心不全 DNA メチル化に加えて、マウス心不全 in vivo クロマチン免疫沈降(ChIP)の各解析も補完的に実施し、心筋組織検体を用いたエピゲノム修飾の情報プロファイリングを強化した。平成 24~25 年にかけては、遺伝子転写活性化を示すヒストン修飾 histone H3K4me3 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。

超高速シーケンシングによる RNA 発現解析と心不全関連遺伝子プロファイル作成

次世代シーケンサーのデータ解析パイプラインを構築するため 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(ChIP-seq 解析、DNA マイクロアレイデータ、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することとなった。

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

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

(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。Chromatin Score が心不全病態変化に強く相関すること、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でできる病

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、単施設後ろ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値を示すこと、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。

平成 23 年(初年度)は、上記の如く独自に開発したクロマチン密度解析法を用いた新規パラメータの定義確立を行うとともに、平成 25 年度までの 3 年間を通じて、より迅速客観的な指標となるように方法の改善を試みた。自動計測の基準を明確にし、さらに症例を重ねることにより詳細なクロマチン計測法の開発を行った。国立循環器病研究センターとの共同で、平成 23、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となるよう解析環境の整備も行い、病理所見検討もおこなった。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、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。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。

心不全臨床検査データと連動する病理マーカー指標との比較検討

心不全臨床データベースを作成し、連結可能匿名化された組織標本検体との詳細検討が可能となる解析環境を整えた。通常的心不全原因鑑別診断および病態把握のために行われた心筋生検、および心臓移植ないし心補助循環治療を行う際に採取されたヒト臨床不全心筋組織試料について、生検検体とともに連結可能な匿名化臨床データを蓄積した。心不全重症度の各指標をデータ化し、今後得られる予定の細胞核クロマチン構造の変化指標との照合作業を行うことが可能となった。

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 23~25 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、超高压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、エポン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、各々に対し超高压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/モリブデングリット、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、大阪大学超高電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。

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、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クロマチンスコアを算出した。予後推定の確度の高い数値を cut off 値として算出した。

重症心不全、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、心不全病態可塑性を見るため、この方法について、より一

層、詳細かつ正確性を持たせるため、検者を変えても均一となるよう客観的な方法を規定するとともに、候補となる幾つかのクロマチンスコア以外の計測パラメータを比較した。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、超高压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。

以上、最適な 2 種類の方法を最終的に選択した。クロマチンスコア指標を用いた病態分別が臨床上の有意性を持つか行った検討により、非常に可能性が高く有望な指標であることが判明した。本手法を用いることで、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できたとともに、広く普及し得るものと考えられた。

3、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

前項で我々が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関連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2- および 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性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ァイルを統合し、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し、次項にある遺伝子同定等の基盤を作成した。

心不全エピゲノムおよび遺伝子発現プロファイルの作成

次世代シーケンサーのデータ解析パイプラインを用いて、マウス・ヒト心不全 RNA-seq 解析を行い、各データと共に共通ビューワーIGVへの変換作業を行っている。既にマウスモデルに関しては、エピゲノムと遺伝子発現両プロファイルと比較し、次年度計画を前倒しし、複数の候補領域選定作業を開始した。今後の機能解析はもとよりヒト心不全エピゲノム・遺伝子発現プロファイルへの作業も併せて行い、統合データベースとして充実させた。3- 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- 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- 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ァイルを求めた。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

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、GPCR 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、病態経時的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

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

病理学的検索から、一般心不全はもとより、重症心不全症例の病態重症度を診断する際に、将来、心不全病態予後予測解析を実施することができる新規指標として、Chromatin Score計測法を開発した。中等症、軽症例のクロマチンスコア解析も実施し、本指標の有用性を広く一般心不全において検証し、新しい心不全可塑性判断に基づく新たな病期Stage分類法の開発を行うことが必要であると考えられる。

そこで、まず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った。心機能改善の可塑性を表す指標の開発は心不全診療の技術水準の向上に寄与する。生命予後はもとより、社会における活動性や生活の質の改善に役立つ診療指標の開発を行うことは、保健医療上重要であるとともに、医療経済、社会経済上のメリットが期待される。

次に、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においては、心不全病態におけるエピゲノムの重要性を遺伝子解析のみに留まらず、独自の蛋白分離精製技術を用いて生化学的機序の解明を行うことにより、今後の同分野における新しい分子探索法を提唱することができると考えられた。

そして、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で、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を実施することができる。未だそのような検討は少なく、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る。よって広い応用のためにも完成を急ぐ必要があると考えられた。とりわけクロマチンスコア計

測法の開発は、以下に述べる2つの新しい技術を組み合わせることにより新しい付加価値を生み出すことが可能である。1点目は、基礎研究への応用である。クロマチンスコア計測は、ヒト臨床検体はもとより動物モデル、培養細胞実験系でも同様に再現性高く見ることができる。別途開発された生体下イメージングによる心不全モニタリングマウスは心不全可塑性を見極めるクロマチンスコアの検討を動物モデルながら、BNP値ガイド下に心不全治療を行いながらクロマチンスコア自体の可変性を検証することが可能となった。基礎的解析を実施することで、クロマチンスコアの不可逆となる分水嶺の探索と、その病期ステージにおける特異的非侵襲診断マーカーの探索も実施することが可能である。2点目は、ゲノム解析による心不全原因検索の臨床利用である。上記新分類で可塑性を示す心筋症をゲノム解析することから、心不全重症度の遺伝的バックグラウンドを検索する。既に他施設からの原因鑑別目的の解析検体も受け入れを開始しており、臨床応用する技術としては、本研究の実施する上で多施設間のセキュアな環境で実施可能なゲノム解析システムの開発を行い、実際に各施設への導入を目指す。

E. 結論

最終年度の研究として、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について、一定の成果を得ることができた。クロマチンスコア計測法の開発、心不全病態モニタリング動物モデルの開発、遺伝子発現・エピゲノムデータベースの構築、解析プログラムの開発など、多くの成果を得ることができた。それらを創薬に活かすことが最終的な目標であり、実際に幾つかの分子標的が産学連携研究へと進めることができた。知的財産として特許申請も実施し今後の心不全感受性分子標的、心不全可塑性因子の探索研究に資する基盤を構築できたものとする。

ヒト臨床心不全特殊生体試料を利用したエピゲノム解析を行い、Genome-wideなDNAメチル化およ

びヒストン修飾解析、超高速シーケンシングによるRNA発現解析と心不全関連遺伝子プロファイルの作成を行った。修飾分子、病態サンプル別にさらにプロファイルの比較サンプルを現在もなお増やしている段階にある。

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ったが、重症心不全病理画像解析技術の確立と臨床マーカーとの比較検討を行い、細胞核超微細構造の画像解析法を新規に確立することができた。

心不全エピゲノムおよび遺伝子発現プロファイルおよびエピゲノムプロファイルから心不全病態に特異的なエピゲノム変化領域および分子修飾、DNA結合蛋白の同定にも有用な探索システムとなり、心不全可塑性を示す新規機能分子を探索するための、培養心筋細胞および心不全動物モデル組織サンプルを用いた蛋白-DNA相互作用検索が可能なアッセイ系を確立しえた。

本臨床応用、開発研究を推進することで、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に際して有用な指標を得ることができた。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クロマチンスコア計測法の開発と確立により、未だ実用化されないヒト心不全可塑性の非侵襲的検査分子指標を探索し臨床への応用を目指すことができるとの結論に至った。

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) Sakamoto A, Ishizaka N, Imai Y, Ando J, Nagai R, Komuro I. Association of serum IgG4 and soluble interleukin-2 receptor levels with

epicardial adipose tissue and coronary artery calcification. Clin Chim Acta. 2014 Jan 20;428:63-9

- 2) Oka T, Akazawa H, Naito AT, Komuro I. Angiogenesis and cardiac hypertrophy: maintenance of cardiac function and causative roles in heart failure. Circ Res. 2014 Jan 31;114(3):565-71
- 3) Kojima T, Imai Y, Komuro I. Giant coronary arteriovenous fistula between left superior pulmonary vein and left atrial appendage. Europace. 2014 Jan;16(1):39.
- 4) Takahashi T, Asano Y, Amiya E, Hatano M, Tamaki Z, Takata M, Ozeki A, Watanabe A, Kawarasaki S, Taniguchi T, Ichimura Y, Toyama T, Watanabe M, Hirata Y, Nagai R, Komuro I, Sato S. Clinical correlation of brachial artery flow-mediated dilation in patients with systemic sclerosis. Mod Rheumatol. 2014 Jan;24(1):106-11.
- 5) Nakayama A, Morita H, Miyata T, Hoshina K, Nagayama M, Takanashi S, Sumiyoshi T, Komuro I, Nagai R. Predictors of mortality after emergency or elective repair of abdominal aortic aneurysm in a Japanese population. Heart Vessels. 2014 Jan;29(1):65-70.
- 6) Fujita D, Takahashi M, Doi K, Abe M, Tazaki J, Kiyosue A, Myojo M, Ando J, Fujita H, Noiri E, Sugaya T, Hirata Y, Komuro I. Response of urinary liver-type fatty acid-binding protein to contrast media administration has a potential to predict one-year renal outcome in patients with ischemic heart disease. Heart Vessels. 2014 Feb 20.
- 5) Takata M, Amiya E, Watanabe M, Ozeki A, Watanabe A, Kawarasaki S, Nakao T, Hosoya Y, Uno K, Saito A, Murasawa T, Ono M, Nagai R, Komuro I. Brachial artery diameter has a predictive value in the improvement of flow-mediated dilation after aortic valve

- replacement for aortic stenosis. *Heart Vessels*. 2014 Feb 5.
- 6) Yamagata K, Goto Y, Nishimasu H, Morimoto J, Ishitani R, Dohmae N, Takeda N, Nagai R, Komuro I, Suga H, Nureki O. Structural basis for potent inhibition of SIRT2 deacetylase by a macrocyclic peptide inducing dynamic structural change. *Structure*. 2014 Feb 4;22(2):345-52.
 - 7) Nishizaki Y, Shimada K, Tani S, Ogawa T, Ando J, Takahashi M, Yamamoto M, Shinozaki T, Miyauchi K, Nagao K, Hirayama A, Yoshimura M, Komuro I, Nagai R, Daida H. Significance of imbalance in the ratio of serum n-3 to n-6 polyunsaturated fatty acids in patients with acute coronary syndrome. *Am J Cardiol*. 2014 Feb 1;113(3):441-5.
 - 8) 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.
 - 9) Tada Y, Ogawa M, Watanabe R, Zempo H, Takamura C, Suzuki J, Dan T, Miyata T, Isobe M, Komuro I. Neovascularization induced by hypoxia inducible transcription factor is associated with the improvement of cardiac dysfunction in experimental autoimmune myocarditis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2014 Feb;23(2):149-62.
 - 10) Gong H, Yan Y, Fang B, Xue Y, Yin P, Li L, Zhang G, Sun X, Chen Z, Ma H, Yang C, Ding Y, Yong Y, Zhu Y, Yang H, Komuro I, Ge J, Zou Y. Knockdown of nucleosome assembly protein 1-like 1 induces mesoderm formation and cardiomyogenesis via Notch signaling in murine induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2014 Mar 19.
 - 11) Imamura T, Kinugawa K, Murasawa T, Kagami Y, Endo M, Muraoka H, Fujino T, Inaba T, Maki H, Hatano M, Kinoshita O, Nawata K, Kyo S, Komuro I, Ono M. Cardiac allograft vasculopathy can be distinguished from donor-transmitted coronary atherosclerosis by optical coherence tomography imaging in a heart transplantation recipient. *Int Heart J*. 2014 Mar 28;55(2):178-80
 - 12) Imamura T, Kinugawa K, Minatsuki S, Muraoka H, Kato N, Inaba T, Maki H, Hatano M, Yao A, Komuro I. Urine sodium excretion after tolvaptan administration is dependent upon baseline serum sodium levels. *Int Heart J*. 2014 Mar 28;55(2):131-7.
 - 13) Nakayama A, Morita H, Hamamatsu A, Miyata T, Hoshina K, Nagayama M, Takanashi S, Sumiyoshi T, Komuro I. Coronary atherosclerotic lesions in patients with a ruptured abdominal aortic aneurysm. *Heart Vessels*. 2014 Mar 7.
 - 14) Hara H, Yamashita H, Nakayama A, Hosoya Y, Ando J, Iijima K, Hirata Y, Komuro I. A rare case of anomalous origin of the left anterior descending artery from the pulmonary artery. *Int J Cardiol*. 2014 Mar 1;172(1):e66-8.
- (和文業績)
- 1) 森田啓行、山田奈美恵、小室一成
医学と医療の最前線
肥大型心筋症の遺伝子診断：推進に向けての方
策 日本内科学会雑誌 102(5), 1233-1242, 2013
 - 2) 朝野仁裕、小室一成
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 Vol.245 No.5 :
415-421,2013
- 2、学会発表
- 1) 小室一成 心不全の発症機序の解明から新しい
治療へ。
日本臨床分子医学会 東京都、2013. 4. 13.
 - 2) 小室一成 補体 C1q は老化を促進する
日本細胞生物学会 名古屋、2013. 6. 21
 - 3) 小室一成 心不全治療の現状と将来展望
日本循環器学会 札幌市、2013. 11. 23
 - 4) Komuro I. Molecular mechanism of heart failure
Wihuri Research Institute, Helsinki, 2013. 8. 19.
 - 5) Komuro I. Genetic and Molecular Determinants
of Angiogenesis and Heart Failure
Korea Society for Vascular Biology and Medicine

Jeju 2013. 8. 22-23

**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

