

令和元年6月20日現在

機関番号：84404

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16034

研究課題名（和文）エピゲノム情報を用いた拡張型心筋症と拡張相肥大型心筋症の鑑別法に関する研究

研究課題名（英文）Study of differential diagnosis for dilated cardiomyopathy and dilated phase of hypertrophic cardiomyopathy

研究代表者

錦織 充広 (Nishigori, Mitsuhiro)

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・その他・特任研究員

研究者番号：00633645

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）： 拡張型心筋症（DCM）と拡張相肥大型心筋症（dHCM）は、類似した重症心不全の症状を示すが、突然死のリスクなどが異なり、治療方針の決定のためには両者の鑑別診断が不可欠である。本研究では、「DCMとdHCMを生体分子量により明確に区分し、確定診断に利用可能な新規バイオマーカーを確立すること」を目的として、左心室組織のエピゲノム解析（DNAメチル化）より見出したDCM/dHCM鑑別診断用のマーカー候補遺伝子について、個々のメチル化サイト（CpGサイト）のメチル化率を高精度・高感度に定量し、判別法を作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究のマーカー遺伝子について、心筋生検時の微量の残余組織等から抽出した核酸試料を用いることで、病歴が不明の場合でも、DCMとdHCMの確定診断の客観事実に基づき行うことが可能となる。DNAメチル化サイトを5箇所程度の測定であれば、遺伝子診断などと比較して低コストであり、この診断法を実用化できれば、社会的意義は大きい。

研究成果の概要（英文）： Since dilated cardiomyopathy (DCM) and dilated phase of hypertrophic cardiomyopathy (dHCM) show similar symptoms of severe heart failure, the risk of sudden death is higher in dHCM. Thus the differential diagnosis of the two diseases is essential. In this study, to clearly distinguish DCM and dHCM by biomolecules and establish novel biomarkers that can be used for definitive diagnosis, biomarker candidate genes for differential diagnosis of DCM / dHCM found from epigenome analysis of left ventricular tissue were focused and the methylation rate of the CpG sites were quantified with high accuracy and high sensitivity.

研究分野：オミックス解析

キーワード：エピゲノム 鑑別診断 拡張型心筋症 拡張相肥大型心筋症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

日本では、急速な高齢化に伴い慢性心不全患者が年々増加しており[1]、心不全は循環器疾患における最大の克服すべき課題である。日本のコホート研究によれば、心不全の20-25%が心筋症を基礎疾患としており[2]、拡張型心筋症(DCM)では若年発症で急性増悪を繰り返し、致死性不整脈による突然死や動脈の血栓塞栓症を生ずる可能性がある。一方、肥大型心筋症(HCM)でも一部の症例が拡張相へ移行し(拡張相肥大型心筋症:dHCM)、重症化の原因となる。DCMとdHCMの病態は類似しており、病歴が不明の場合には両者の鑑別診断は困難な場合がある。特に、dHCMは突然死のリスクが高く、拡張相への移行・進展の抑制が必要となるため、DCMとdHCMの鑑別診断が治療方針の決定に重要であるが[3]、生体分子による明確な判定基準は未確立である。

2. 研究の目的

本研究では、「DCMとdHCMを生体分子量により明確に区分し、確定診断に利用可能な新規バイオマーカーを確立すること」を目的として、左心室組織のエピゲノム解析(DNAメチル化率)より見出したDCM/dHCM鑑別診断用のマーカー候補遺伝子について、個々のメチル化サイトのメチル化率を高精度・高感度に定量し、判別法を作成する。

3. 研究の方法

(1) マーカー候補遺伝子のDNAメチル化率の解析

マーカー候補遺伝子のプロモーター領域のDNAメチル化サイト(計18箇所)のメチル化率を個別に測定し、DCMとdHCMを最も明確に区別可能なメチル化サイトのセットを絞り込む。エピゲノム解析データより見出した、DCM/dHCMを区分するための8個のマーカー候補遺伝子について、プロモーター領域に存在し、DCM/dHCMの比較で有意差($p=0.05$)のあった18箇所のDNAメチル化サイト(CpGサイト)のメチル化率を個々に測定する。DNAメチル化アレイ解析に用いたDNAの残余サンプル(主に心移植を受けた症例の左心室組織より抽出したDNA)を用いる。DNAメチル化率の個別の測定方法としては、検出する配列に依存せず測定可能なバイサルファイト・シークエンス法を基本とし、パイロシークエンス法(PyroMark、Qiagen)を用いる。各CpGサイトのメチル化率から、比較検定、判別分析などの統計解析を実施し、DCM/dHCMの区分が可能なCpGサイトの組み合わせを選出する。

(2) DNAメチル化マーカーの有効性の検証

病理診断が確定した検証用試料について、1で選択したメチル化サイトのセットのメチル化率を測定し、上記のマーカーの有効性を検証する。検証用試料からDNAを抽出し、(1)で決定したCpGサイトのメチル化率を測定する。

(3) マーカー候補遺伝子のmRNA発現量の解析

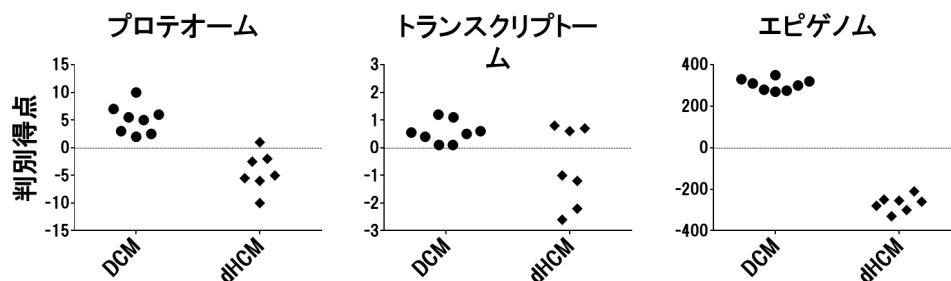
左室組織におけるマーカー候補遺伝子のmRNA発現量を測定し、DCMとdHCMで発現量に差が見られた場合、この情報を組み入れた判別法を検討する。(1)と同一症例のtotal RNAサンプルから(トランスクリプトーム解析の残余試料など)合成したcDNAをテンプレートとして、デジタルPCR(QX200、Bio-Rad)での定量を行う。プライマーやアニーリング温度の条件検討を行い、最適条件での測定を実施する。mRNA発現量の情報を変数として加え、検証用試料での予測精度が向上するかを検討する。

4. 研究成果

(1) マーカー候補遺伝子のDNAメチル化率の解析

マーカー候補遺伝子については、DCMとdHCMを含む主に心移植の左室組織のエピゲノム(DNAメチル化アレイ)、トランスクリプトーム、プロテオームデータを用いてDCM/dHCMの鑑別診断用バイオマーカーとして同定された。病理診断でDCMおよびdHCMと診断された症例の区分をオミックス解析データの数理解析により検証した結果、エピゲノムデータが、両者を最も明確に区分可能であると判明した。

図：オミックスデータを用いたDCMとdHCMの判別



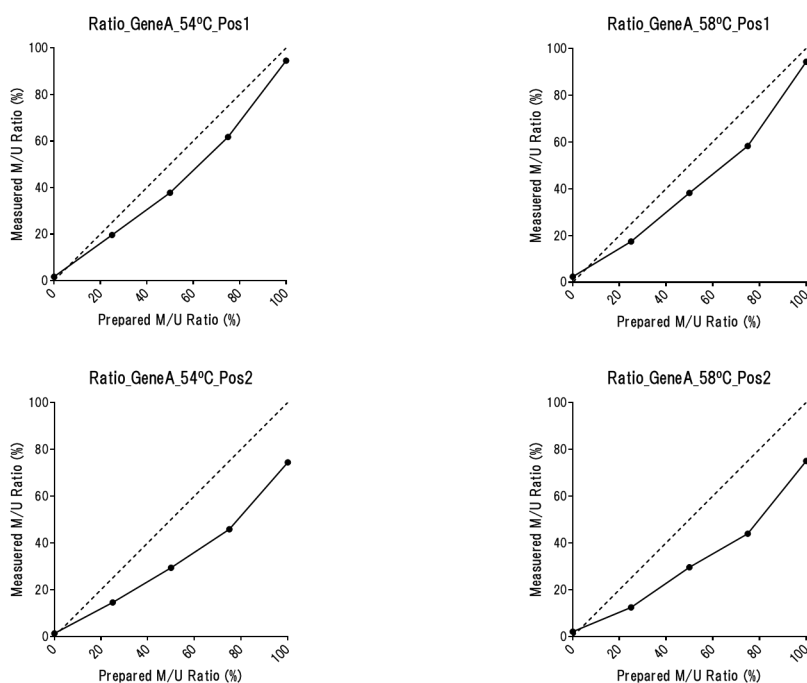
そこで、DCM/dHCM 間でエピゲノムが変動するパスウェイ上の遺伝子から、DCM/dHCM の区分を可能とする遺伝子を絞り込んだ。Training Data Set より選出した変動遺伝子の中から、Test Data Set で DCM/dHCM の区分が可能なマーカー候補遺伝子を最終的に 8 種類見出した。

表：マーカー候補遺伝子の機能・発現部位

遺伝子	機能/特徴	細胞内局在
Gene A	細胞間接着因子	細胞膜
Gene B	ペプチドホルモン前駆体	細胞外分泌
Gene C	転写因子	核
Gene D	DNA修復関連因子	核
Gene E	mRNAスプライシング因子	細胞質
Gene F	心肥大関連因子	細胞質
Gene G	転写因子	核
Gene H	心筋発達関連因子	核

DCM/dHCM の比較で有意差のあった 18 個の CpG サイトのメチル化率を個々に測定するため、パイロシーケンス法による測定系の構築を実施した。まず、バイサルファイト (BS) 処理した DNA を鋳型として標的配列を PCR により増幅するためのプライマーを各々、設計した。BS 変換後の DNA は PCR 効率が悪い場合が多いが、プライマー配列や濃度、PCR 時のアニーリング温度を各標的 CpG サイトについて最適化した結果、8 個の CpG サイトで十分な増幅が可能となった。そこで、これらのプライマーを用いたパイロシーケンスを実施し、各 CpG サイトのメチル化率の定量性を評価した。さらに、メチル化率が最も高精度に定量可能であった標的 CpG サイトについて、DCM および dHCM 患者の心筋組織より抽出した DNA を用いて測定を実施し、各検体で DNA メチル化率の定量が可能であることを確認した。

図：パイロシーケンスによるメチル化率の測定



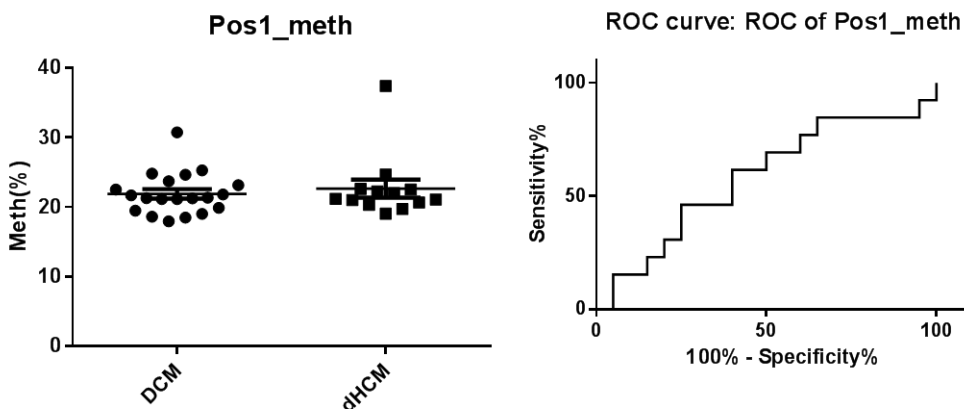
上図では、CpG サイトが完全にメチル化した DNA (M) と全くメチル化していない DNA (U) の 2 つのスタンダードサンプルを M:U = 0:100, 25:75, 50:50, 75:25, 100:0 の比率となるように調製し、パイロシーケンスより定量した結果である。理想的に破線の直線となるが、多くの CpG サイトで、定量値が低くなる傾向が見られた。この結果では、同じ GeneA の近傍にある CpG サイトでも、Position1 では定量性が比較的良好であったが、Position2 では定量性が不十分であった。測定におけるアニーリングの検証、プライマー配列の変更を行い、各 CpG サイトについて直線性の高い条件を検討した。

(2) DNA メチル化マーカーの有効性の検証

DCM および dHCM の心筋組織より抽出した DNA を用いて、(1)のパイロシーケンスにより各

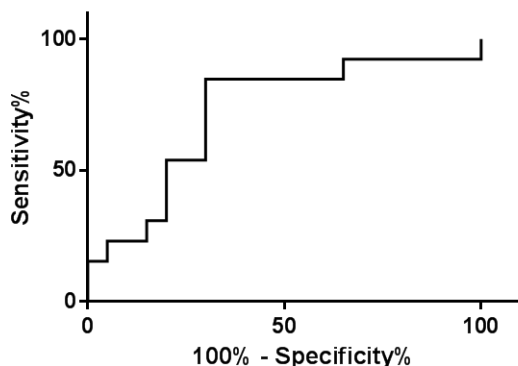
Cpg サイトのメチル化率を測定した。

図：メチル化率の測定による DCM と dHCM の層別化



1つのCpGサイトでDCMとdHCMを比較した場合、DNAのMethyl化率の差分は約10%程度であり、ROC解析を行った結果、AUC=58程度であった。したがって単独のCpGサイトの定量では不十分であり、複数のCpGサイトを組み合わせる必要があった。定量可能となったCpGサイトについて、3-5個のCpGサイトのメチル化率情報を用いて、判別分析を行い、得られた得点によりROC解析を行った結果、AUC=72まで増加した。今後、最適な組み合わせの検証、および各測定系のより高精度化を行うことで更に鑑別能を向上させることが可能になると考えられた。

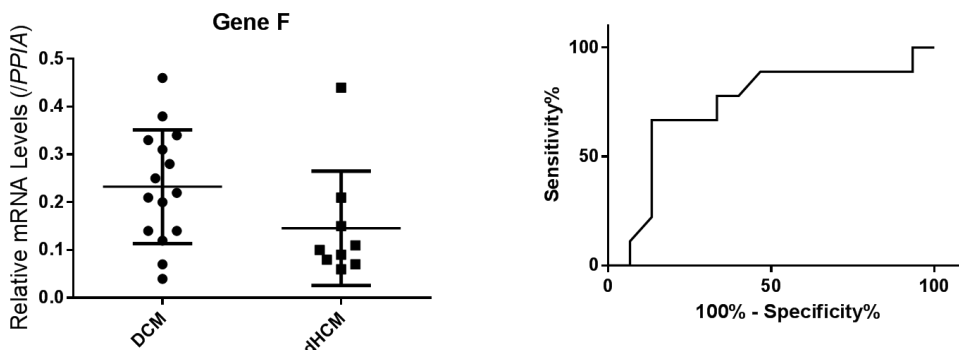
図：3つのCpGサイトを組み合わせせた場合のROC解析



(3) マーカー候補遺伝子の mRNA 発現量の解析

マーカー候補遺伝子 8 種類について、心筋組織より抽出した mRNA を用いて、デジタル PCR により発現量を比較した。

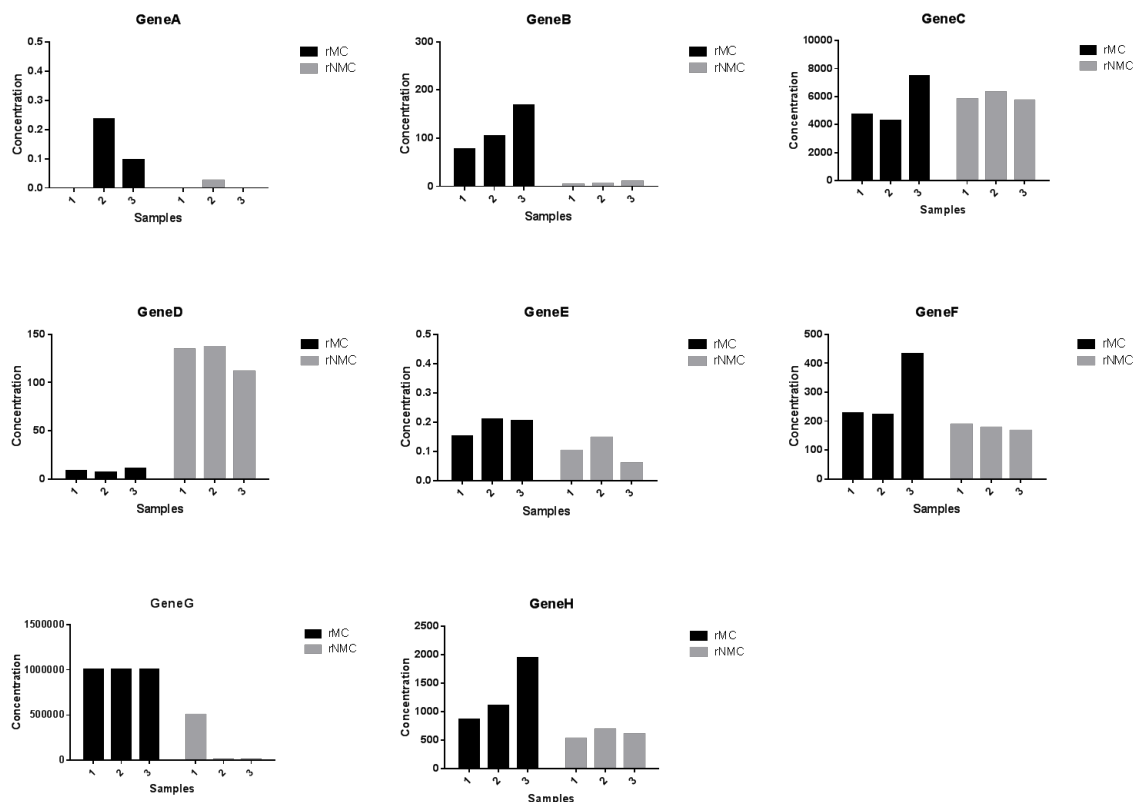
図：mRNA 発現量の測定による DCM と dHCM の層別化



その結果、2つの mRNA で有意な変動が確認され、エピゲノムの変動が mRNA の発現量を制御している可能性が示唆された。単独の遺伝子での ROC 解析では、AUC=7 程度であった。さらに、これらの mRNA の発現情報と(2)のメチル化解析情報を組み合わせることで、DCM と dHCM をより明確に区分できることが明らかとなった。

また、候補遺伝子の発現細胞を調べるため、ラットの心筋細胞 (MC) および心臓線維芽細胞 (rNMC) における発現量を比較した。

図：マーカー遺伝子の発現細胞



ラットの培養細胞を用いた解析では、遺伝子 B、G、H は MC、遺伝子 D は NMC で多く発現していた。また、遺伝子 A、E はどちらも発現量が低かった。本研究の組織試料の解析では MC と NMC を区別せずに測定を行ったが、シングルセル解析やレーザーマイクロダイセクション法などを用いて両者を区別して解析することで、より高精度、高感度の鑑別診断ができる可能性があり、今後の解析に向けた新たな情報基盤を得ることができた。

まとめ

DCM および dHCM の患者の移植摘出心もしくは剖検心より抽出した DNA、RNA 試料を用いて標的 CpG サイトのメチル化率ならびに標的遺伝子の mRNA 量の測定を実施した。一部の mRNA では心筋組織での発現量が低値であったため、比較的発現量の多い標的 mRNA のみを使用することとした。これらのデータを用いて DCM と dHCM が区別可能であるかを ROC 解析により評価した。その結果、CpG サイトのメチル化率の差 DCM/dHCM での差は想定異常に小さく、単独での区分は困難であることが明らかになった。そこで、複数の CpG サイトと mRNA 発現情報より判別分析を行うことで、DCM/dHCM の区分が可能になると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

1. [Mitsuhiro Nishigori](#), Sayaka Muto, Osamu Seguchi, Norihide Fukushima, Yoshihiko Ikeda, Hatsue Ishibashi-Ueda, and Naoto Minamino: Proteomic and Transcriptomic Analyses of Left Ventricular Tissues in Human, *Peptide Science* 2017, 216-217 (2018), 査読あり
2. Matsuo A, Nagai-Okatani C, [Nishigori M](#), Kangawa K, Minamino N: Natriuretic peptides in human heart: Novel insight into their molecular forms, functions, and use. *Peptides*, 3-17(2019), doi 10.1016/j.peptides.2018.08.006, 査読あり

[学会発表](計 4 件)

1. Mitsuhiro Nishigori, Sayaka Muto, Osamu Seguchi, Norihide Fukushima, Yoshihiko Ikeda, Hatsue Ishibashi-Ueda, and Naoto Minamino, Proteomic and transcriptomic analyses of left ventricular tissues in human dilated cardiomyopathy for identification of novel diagnostic biomarkers. 第 54 回ペプチド討論会 (2017)
2. M. Nishigori, A. Matsuo, C. Nagai-Okatani, H. Takahama, S. Takashio, T. Anzai, C. Izumi, K. Kangawa, N. Minamino: Significance of measurement of endogenous molecular forms of A-type and B-type natriuretic peptides in heart failure patients. 10th International Peptide Symposium (国際学会)
3. 南野直人、植田初江、福嶋教偉、松田均、錦織充広: 多層オミックス解析情報に基づくバイオマーカー探索: 先制医療の実現に向けて, 第 22 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 (招待講演) (2018 年)
4. Minamino N, Yagi H, Nishigori M, Murakami Y, Muto S, Ikeda S, Ishibashi-Ueda H, Morisaki T, Iba Y, Sasaki H, Minatoya K, Matsuda H: Proteome Information-based Disease Staging Paves the Way to Discover Novel Biomarkers for Evaluating Development and Progression of Aortic Aneurysm. 第 83 日本循環器病学会学術総会 (2019)

[その他]

ホームページ等

<http://www.ncvc.go.jp/omics/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。