

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：84404

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K21600

研究課題名（和文）心筋細胞の老化を定義づけるエピジェネティック変動の解明

研究課題名（英文）Analysis of epigenetic disruption in cardiomyocyte senescence and disease.

研究代表者

白井 学（Manabu, Shirai）

国立研究開発法人国立循環器病研究センター・オープンイノベーションセンター・室長

研究者番号：70294121

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：心筋細胞の老化に、メカニカルストレスや加齢など様々なストレスの蓄積によるエピジェネティック制御機構の破綻が関与していることを証明するために、1細胞核RNA-seq（snRNA-seq）解析および、網羅的なヒストン修飾変動解析（Mod-spec解析）を行った。若年期、壮年期、老年期のマウス左心室組織を用いたsnRNA-seq解析の結果、加齢に応じて心筋細胞特異的に発現変動する遺伝子を同定できる可能性を見出した。また、Mod-spec解析により、加齢および心不全発症に応じて変動する新たなヒストン修飾を見出すことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの研究は、心不全病態における遺伝子異常の探索が中心に行われてきた。機能解析も胎児期、若年期の心臓を対象とした研究がほとんどで、壮年期、老年期の心筋細胞の遺伝子発現、エピジェネティック変動などの基礎的データは皆無である。高齢者のQOL向上や心疾患後の心筋細胞の機能回復・維持のためには、これまで蓄積されてこなかった、壮年期、老年期の心筋細胞の遺伝子発現、エピジェネティック変化についての網羅的な解析といった基礎情報の蓄積が必須で、本解析により得られた、老化に応じた新たなヒストン修飾変動やsnRNA-seq解析結果は、将来の心機能低下や心不全に対する新たな創薬標的探索の礎となる。

研究成果の概要（英文）：To understand cardiomyocyte senescence, we performed single nuclei RNA-seq (snRNA-seq) analysis and the Mod-spec analysis. Since birth, cardiomyocytes have been under extreme stresses, such as a mechanical stress, aging, and life-style related diseases. Accumulated stresses may induce disruption of the epigenetic regulatory mechanisms and senescence in cardiomyocytes. We found novel aging and cardiomyopathy related histone modifications and defined cardiomyocyte specific clusters during aging. From these results, we hypothesize these modifications may become new therapeutic targets for cardiomyopathy and cardiomyocyte senescence.

研究分野：循環器疾患

キーワード：老化 心臓組織 エピジェネティック変動

1. 研究開始当初の背景

超高齢化社会を迎えた日本は、平均寿命と健康寿命の間に10年もの隔りがあり、その間、約5兆円もの医療費が必要とされている。特に、将来的に患者数が250万人に迫り、パンデミックが起こると警告されている心不全は予後が悪く、5年後の生存率は70%、5年間で40%以上の患者にイベント発生が認められ、入退院を繰り返して重症化(増悪)する。これは、他の組織が損傷を受けた場合に周囲の幹細胞の増殖分化により機能再生がなされるのに対し、心筋細胞は生後ほとんど増殖せず、再生による心機能の回復が得られないことによる。そのため、個々の心筋細胞の機能保全、回復が重要である。

同一の細胞が長期にわたりその機能を維持する心筋細胞の老化は、健康長寿の実現、心不全後の機能保全の観点から重要であるにもかかわらず、現在までその分子メカニズムが正確に定義づけられていない。近年、次世代シーケンサーによる網羅的な解析技術が急速に発展し、「老化した心筋細胞」の特徴を正確に理解することが可能となった。本研究は、心不全発症・増悪のみならず、心筋細胞の老化にエピジェネティック機構の破綻が大きく関わっていると仮説し、エピジェネティック異常として特に、①染色体の構造変化、②ヒストン修飾の変動に注目する。ヒトでは蓄積することのできない、加齢や病後の心筋細胞におけるエピジェネティック変動の基礎情報について、モデル動物を用いて蓄積し、心筋細胞老化の定義づけを行う。

2. 研究の目的

心筋細胞はその高度な恒常性維持機構により、メカニカルストレス、加齢、既往症、生活習慣による動脈硬化といった様々な障害による変性から守られている。遺伝子変異が存在しても、心臓は恒常性維持機構によりその機能を保持できる場合が多く、心不全の発症・増悪はむしろ、加齢、生活習慣、炎症や感染といった様々なストレスにより蓄積したエピジェネティック異常により、恒常性維持機構が破綻することが原因と考えられるようになった。

本研究では、心筋細胞の老化、心不全発症・増悪にエピジェネティック機構の破綻が大きく関わっていると仮説し、本機構についてモデル動物を用いて詳細に解析することで、心筋細胞老化について定義づけることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) シングル核 RNA-seq (snRNA-seq) 解析:

一般的な RNA-seq 解析法では、心筋細胞における遺伝子発現と心筋細胞周囲に存在する線維芽細胞、血管を構成する内皮細胞や平滑筋細胞、心内膜細胞等における遺伝子発現を区別することができず、老化した心筋細胞を特徴づける遺伝子発現変動を確認することは困難であった。野生型および Pcgf5 KO マウスの若年期、壮年期、老年期の左心室組織を新鮮凍結し、細胞核を単離した後に snRNA-seq 解析を行うことで、加齢や心不全病態における心筋細胞の遺伝子発現変動を網羅的に解析した。

(2) 網羅的なヒストン修飾変動解析:

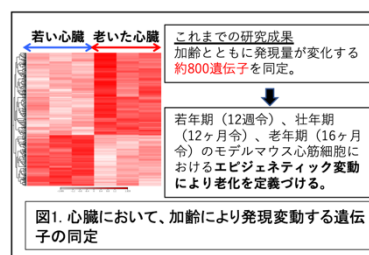
野生型マウス及び、エピジェネティック機構の制御因子である Polycomb Group 遺伝子 Pcgf5 欠損 (KO) マウスの若年期 (12 週令)、壮年期 (12 ヶ月令)、老年期 (16 ヶ月令)、それぞれの左心室組織におけるヒストン修飾変動を、Mod-spec 法を用いて解析した。本方法を用いることで、80 種類以上の異なるヒストン修飾の相対量を一度に解析することが可能で、加齢によるヒストン修飾変動を確認できるばかりでなく、心不全症状を示す Pcgf5 KO マウスと野生型マウスにおけるヒストン修飾変動を比較することで、心不全と関連するヒストン修飾変動の同定ができる。

4. 研究成果

(1) snRNA-seq 解析による、心筋細胞の加齢による遺伝子発現変動解析

これまでの研究において、若年期および壮年期の野生型マウス左心室組織を用いて RNA-seq 解析を行い、加齢により発現変化する約 800 遺伝子の同定に成功している (図 1)。しかし、左心室組織は心筋細胞だけではなく、線維芽細胞、血管を構成する内皮細胞や平滑筋細胞、心内膜細胞および免疫関連血球細胞など様々な細胞により構成されている。そのため、同定された 800 余りの遺伝子の中で、どの遺伝子が心筋細胞の老化に関連するかは不明であった。

今回、若年期、壮年期および老年期の左心室組織から抽出した核を用いて snRNA-seq 解析を行い、それぞれのステージにおいて心筋細胞のクラスターを見出すことができた (図



2)。詳細な解析は現在進行中であるが、本解析結果により、加齢に応じて、それぞれの細胞特異的に発現変動する遺伝子の同定が可能となった。

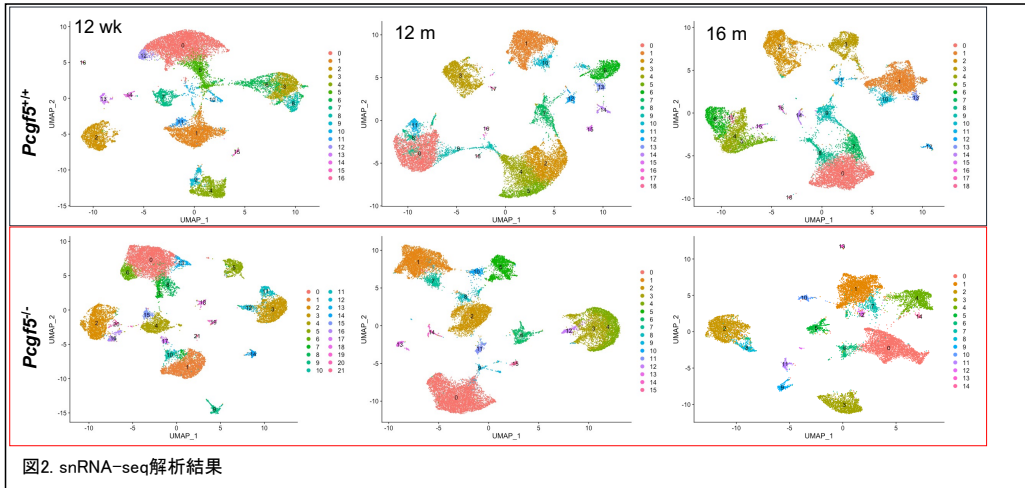


図2. snRNA-seq解析結果

(2) Mod-spec 法によるヒストン修飾変動解析

心臓はメカニカルストレス、加齢、既往症、生活習慣による動脈硬化といった様々な障害による変性から、高度な恒常性維持機構によりその機能を維持されている。長期にわたるストレスによりエピジェネティック異常が蓄積することで恒常性維持機構は破綻し、心筋細胞の老化、心不全の発症・増悪が生じると考えられることから、80種類以上の異なるヒストン修飾の変動を若年期、壮年期および老年期の野生型マウス左心室組織およびPcgf5 K0マウス左心室組織を用いて比較した。その結果、少なくとも4種類のヒストン修飾が加齢とともに変動し、5種類のヒストン修飾がPcgf5 K0マウスにおいて特異的に変動していることが確認された(図3)。今回発見されたヒストン修飾の変動は、これまでの研究されてきたヒストン修飾とは異なる新たな変動であることが確認された。本解析で得られた新たな結果は、ヒト心疾患の多くが壮年期に発症する原因を究明する基盤となることが期待される。

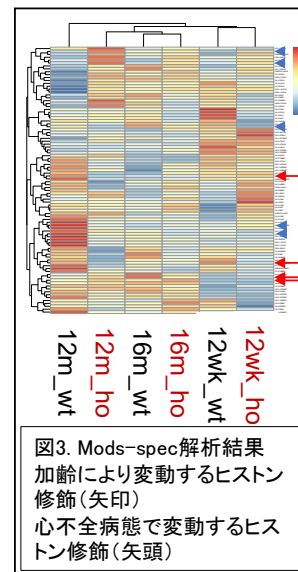


図3. Mod-spec解析結果
加齢により変動するヒストン修飾(矢印)
心不全病態で変動するヒストン修飾(矢頭)

(3) エピジェネティック変動を基にした老化の定義づけ

今回、様々なライフステージおよび、エピジェネティック機構の破綻したモデル動物を利用することで、特異的に変動するヒストン修飾が同定された。それとともに、心筋細胞特異的に発現変動する遺伝子の同定も行えるようになった。今後、遺伝子発現変動とエピジェネティック変動を関連づける詳細な解析を行うことで、エピジェネティック変動を基にした心筋組織の老化を定義づけし、心機能の低下を抑制する新たな創薬標的の探索を行う(図4)。

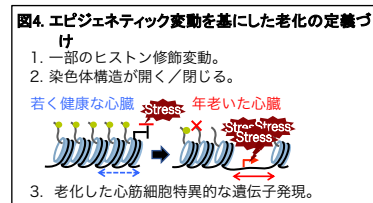


図4. エピジェネティック変動を基にした老化の定義づけ
1. 一部のヒストン修飾変動。
2. 染色体構造が開く/閉じる。
3. 老化した心筋細胞特異的な遺伝子発現。

心機能の低下を抑制する新たな創薬標的の探索を行う

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	若林 真樹 (Wakabayashi Masaki) (70552024)	国立研究開発法人国立循環器病研究センター・オープンイノベーションセンター・室長 (84404)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関