

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 4月 1日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究（A）

研究期間：2009～2011

課題番号：21689022

研究課題名（和文） 心筋細胞におけるクロマチンリモデリング制御機構の解明と細胞機能維持への試み

研究課題名（英文） A Study for Epigenetic Regulation to Maintain Cardiac Homeostasis

研究代表者

朝野 仁裕（ASANO YOSHIHIRO）

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60527670

研究成果の概要（和文）：

重症心不全の治療抵抗性を診断するのに必要な臨床診断技術を開発するため、心不全病態解析のためのエピゲノム統合データベース構築を目指し、クロマチン高次構造解析と病理研究を組み合わせた基礎的検討を含めた臨床心臓エピゲノム研究を行った。従来の心不全動物モデルを用いた病態解析のみならずヒト臨床最重症心不全の組織検体を用いて、ゲノム構造の病理学的、分子生物学的にゲノムワイドな解析を行った。心不全病態における“持続的細胞記憶メカニズム”を先駆けて提唱するとともに、エピゲノムの組織解析技術を独自に開発した。

研究成果の概要（英文）：

Sustained gene activation, such as “cardiac fetal gene reactivation”, has an important role in the mechanism underlying exacerbations of chronic heart failure. However, the maintenance mechanism of its expressional activation has not yet been fully elucidated. We first found evidence for heterochromatin disruption in the nucleus of failing cardiomyocytes and paradoxical depression of cis-acting transcription factors, despite elevated levels of target cardiac fetal genes, suggesting that epigenetic gene regulation might be involved in this phenomenon. In addition, we newly developed in vivo chromatin immunoprecipitation assay, which has hardly been applied in the field of cardiac tissue. The proven alteration in transcriptional sensitivity by epigenetic gene modification was found to play a significant role in the “nuclear memory” mediating heart failure, raising the hope for the novel pathological understanding for chronic diseases.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
2011年度	2,800,000	840,000	3,640,000
総計	13,400,000	4,020,000	17,420,000

研究分野：医歯薬

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：分子心臓病態学、エピゲノム、ヘテロクロマチン、クロマチン免疫沈降法、胎児性遺伝子、ヒストン修飾

1. 研究開始当初の背景

本邦死亡原因第2位の慢性心不全は、罹患人口の多さ、内科的心不全治療の限界、50%といわれる5年生存率、医療費の増大などの理由から、基礎医学・臨床医学両分野より克服に向けた研究が行われてきた。しかし心不全の慢性期病態変化（特に難治性変化）の分子機序解明についての検討は殆ど行われていない。難治性心不全の病態を理解し治療法の開発を行うための基礎的研究基盤を築くことは、最重要課題の一つである。

難治性重症慢性心不全の多くは人工心臓・心臓移植を享受することができない。そのため未だ不明である心不全病態増悪の分子生物学的機序の解明は急務である。慢性負荷されるストレスシグナルは心筋細胞の遺伝子発現プロファイルを変えることが広く知られている。転写因子の活性化が強く影響する一過性刺激とは異なり、慢性期にみられるこのような遺伝子発現活性化・抑制の維持にはクロマチンヒストンをはじめとする蛋白翻訳後修飾やDNAメチル化などのエピジェネティックな機序を考慮しなければならない。

申請者らはこれまで心臓・血管系細胞における新規機能分子のクローニングまたはメカニズムの解析をテーマに、常に新たな研究ツール（蛋白精製法・Zebrafish実験系など）を開発導入し成果を残してきた（Shintani Y. EMBO J 2006.; Seguchi S. J Clin Invest 2007.）。なかでもヒト遺伝性心筋症モデルマウスのクローニング解析においては、その責任遺伝子・変異型 LAMR1 が核内蛋白質 HP1 α と相互作用し核クロマチン構造のリモデリングを惹起し心筋変性を来すことを筆頭著者として明らかにし（Asano Y. Nat Genet 2004.）、エピジェネティックな因子が心筋細胞においても生死を分かつ重要な分子メカニズムとして機能していることを示した。さらに新規機能分子クローニングとしてDNA損傷応答に関与する核蛋白 ATM の心臓における新規リン酸化基質として p32 を同定した（Kato H. BBRC 2007.）。ヒト重症慢性心不全病理組織において細胞核クロマチン構造の崩壊を示唆する所見を見出し、不全期遺伝子プロファイル変化が生じる機序として、不全心筋細胞の核内ストレス応答シグナル伝達と核クロマチンリモデリングに伴うエピジェネティック制御機構の破綻が細胞機能低下を導いているという仮説を立て、本研究を企画立案するに至った。

2. 研究の目的

我々は遺伝性右室心筋症モデルマウスの責任遺伝子同定をきっかけに、心筋細胞変性

の原因として Heterochromatin Protein 1 (以下 HP1) の介在とクロマチンリモデリングの関係を明らかにした (Nat Genet. 2004.)。次に培養細胞および不全心筋組織を用いて心不全の慢性病態変化に伴う遺伝子発現変化とクロマチンリモデリングに相関関係があることを動物モデルで解明した。またヒト重症慢性心不全の病態に連動して遺伝子発現プロファイルが大きく変化すること (J Clin Invest. 2007.)、及びそのプロファイル変化と心筋細胞核クロマチンの形態変化が密接に関連することを報告した。しかしその変化が惹起される分子メカニズムは十分解明されていない。

本研究は、不全心筋細胞核クロマチン崩壊の機序の解明、HP1 など鍵となる分子の機能解析、エピジェネティック因子介入による細胞機能低下阻止または細胞機能の回復を目的などの基礎的分子機構の解明を行う。心不全病態形成にエピジェネティック機序が密接に関係するという概念を確立し、標的因子の中から心不全病態の制御が可能な分子を選択し、診断治療へ応用することを最終の目標とする。

3. 研究の方法

申請者らの行った心筋症における細胞核クロマチンリモデリング研究 (図1, Asano et al. Nat Genet 2004) を発展させ、慢性心不全遺伝子発現プロファイル変化を惹起する細胞核クロマチンリモデリングとその病態変化の関係を明らかにしてきた。

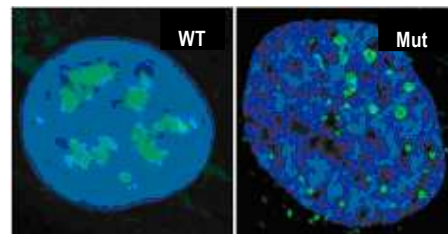


図1. 心筋症心筋細胞核クロマチン構造変化 (Asano Y et al. Nat Genet 2004.36.123.)

(1) 心筋細胞のストレス応答により細胞核クロマチン崩壊 (クロマチンリモデリング) が惹起される機序の解明

マウス・ラット心筋細胞、心不全動物モデル(マウス・イヌ)及びヒト慢性心不全組織を用いて細胞核構造を比較解析する。

① 培養心筋細胞における核クロマチン構造変化の病態に伴う推移の解析

図1に示すように核クロマチン構造の変化はユークロマチン (転写活性化部位) とへ

テロクロマチン（転写抑制部位）領域の変化として捉えられた。これらの構造変化が生じる機序を解明する。遺伝子転写活性化部位の量的評価はこれまでの検討により RNA polymerase II foci を独自に開発した簡易解析ソフトおよび公共のソフトウェアによりカウント算出できることが判明している。不全心筋細胞および心不全組織の核構造と病態の変化を追跡し、病態変化との関係を明らかにする。

② In Vivo 不全心筋細胞における核クロマチン構造変化の病態に伴う推移の解析

マウス心不全モデルおよびヒトへの応用を考慮するため大動物イス心不全モデル（高頻度ペーシング）及びヒト心筋生検組織サンプルを用いて、電子顕微鏡標本を作製し、病態変化に伴う心筋細胞の核内構造解析を行う。心不全病態モデルはもとより心筋細胞を用いたこれらに類似する検討はこれまで全くない。病態進展機序理解のため mRNA レベルおよび蛋白レベルのクロマチンリモデリング因子変化時系列プロファイルを作成する。

(2) 心不全病態モデルにおけるエピジェネティック修飾変化（ヒストン修飾・DNA メチル化）の解明

① クロマチン免疫沈降法（ChIP 法）によるヒストン修飾情報解析

検討（1）と同条件下の細胞を用いて GeneChip 解析、ChIP-seq 解析を行い、核クロマチン構造変化に連動する遺伝子発現・転写因子結合・ヒストン修飾を比較解析する。既に心不全病態と強く相関する胎児性遺伝子（ANP、BNP、 β MHC）を選択し、プロモーター領域の preliminary な解析を終了した。本検討に用いるヒストン修飾蛋白（H3K4-Me、H3K9-Ac、H3K9-Me、etc.）に対する特異性の高い抗体を用いた条件検討を行う。当該領域 DNA 結合蛋白も同時に検討し、感受性の高い遺伝子領域について転写調節領域、ゲノムコード領域、遺伝子間隙領域にも検索部位を広げて当該ゲノム領域の全体的な把握に努める。

② DNA メチル化アレイ法による DNA メチル化情報解析

心筋細胞においても Dnmt3a、3b の発現が認められているが（図 2）、DNA メチル化情報変化に関する検討はこれまで類がなく、得られた結果は新規性に富むものと考えられる。そこで（2）-①での検討と同じ領域におい

て、DNA メチル化アレイ解析法による DNA メチル化情報の変化の有無を明らかにする。

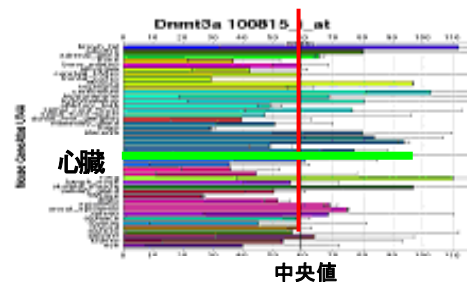


図2. Mouse GeneChip 解析による Dnmt3a の組織別発現分布比較ヒストグラム心臓における発現は比較的高値(中央値以上)で認められる。

(3) 心不全病態変化とエピジェネティック修飾変化の関係 —クロマチンリモデリング因子の変化解析

① 不全心筋における Heterochromatin Protein 1 の機能解析

心筋症モデルマウスの検討（Nat Genet 2004.）から責任遺伝子核蛋白と特異的に結合する翻訳後修飾を受けた HP1 を見出した。病態に連関する HP1 を含めたクロマチン関連蛋白の翻訳後修飾についての報告は珍しく、申請者ら独自の蛋白分離精製技術を用いて HP1 蛋白の修飾及び分子機能の解析を行う。同時に心肥大不全期における HP1 遺伝子発現および修飾変化を解析する。また、HP1 α 、 β 、 γ のサブファミリーの相補性と Euchromatin 領域における心筋細胞発現遺伝子の制御機構について検討する。

② 不全心筋における他のクロマチンリモデリング因子の探索とその機能解析

心筋細胞における遺伝子発現活性化・抑制条件下で発現変化を伴う蛋白の機能解析として、転写因子、DNA 結合蛋白、ヒストン修飾酵素などを対象に病態変化と連関する因子のスクリーニング解析を行う。さらに候補となる蛋白に関して ChIP 解析を行い、遺伝子発現に及ぼす機能解析を行い将来の心筋細胞遺伝子発現制御機構への介入に応用する。

(4) クロマチンリモデリング因子および HP1 family 分子の心筋細胞における機能解析

検討（3）において明らかとなった因子の心筋細胞および心不全病態での役割を解析するため、心筋細胞への導入・欠失実験による検討を行い、細胞機能に及ぼす効果を解析する。

4. 研究成果

(1) 心筋細胞のストレス応答により細胞核クロマチン崩壊 (クロマチンリモデリング) が惹起される機序の解明

心筋細胞ストレス応答と核クロマチン構造の変化、すなわちユークロマチン領域とヘテロクロマチン領域の変化を明らかにすることを目的として、マウス慢性心不全モデルを作成し不全心筋から単離 adult 心筋細胞を用いた検討を行い、転写 focus を評価する目的で RNA polymerase II を標的とした免疫染色を行った。

不全心筋由来の単離心筋細胞とコントロールとなる正常心筋細胞の RNA polymerase II focus を画像解析ソフトにてカウント解析を行い、不全心筋細胞の RNA polymerase II focus が優位に多いことを明らかにした。同時に心不全形成過程における不全心筋細胞核クロマチン構造について時間経過とともに電子顕微鏡像構造比較し、ヘテロクロマチン構造変換が病態進行に従って顕著なることを示した。

In Vivo 不全心筋細胞における核クロマチン構造変化の病態に伴う推移の解析: 昨年マウス心不全モデルにおける核クロマチン変化の知見を透過型電顕画像解析により得て、超高電圧電顕、CT-Tomography 解析へと進めた。クロマチン構造変化の意義を心不全臨床に応用し解析した。

(2) 心不全病態モデルにおけるエピジェネティック修飾変化 (ヒストン修飾・DNA メチル化) の解明

検討 (1) と同様の細胞を用いてマイクロアレイ法による遺伝子発現解析を行い、エピゲノム解析を行う上で比較できる遺伝子プロファイルを作成した。

心不全と強く関連する胎児性遺伝子 (ANP、BNP) の遺伝子内全ゲノム領域を対象に、核クロマチン構造変化に影響を及ぼすと考えられる転写因子・ヒストン修飾変化についてクロマチン免疫沈降法による解析を行った。胎児性遺伝子プロモーター領域に特に遺伝子転写活性化に寄与すると考えられるヒストン修飾 (H3K4-Me、H3K9-Ac) が変化するとともに転写因子が結合集積すること明らかにした。

不全心筋組織を用いた DNA メチル化情報解析を終了した。現在、ヒト心不全検体による ChIP-seq (クロマチン免疫沈降法を用いた高速 DNA シーケンサー解析) のデータとともに統合プロファイルを作成中である。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 (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の技術を確立し、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稼働開始した。

(3) 心不全病態変化とエピジェネティック修飾変化の関係 —クロマチンリモデリング因子の変化解析

ヘテロクロマチン領域に存在し、histone H3K9me3 との結合が報告されている蛋白 HP1 には α 、 β 、 γ の 3 つのアイソフォームが存在し、多様な機能を担い遺伝子発現制御メカニズムのひとつとして翻訳後修飾が示唆されている。カラム分画処理において病態に連動する変化を認めた HP1 について、翻訳後修飾解析を行った。HP1 α 、 β 、 γ のサブファミリーにおける HP1 修飾変化を見出し、アミノ酸変異体を用いた機能解析を行った。逆相 HPLC、アミノ酸変異体解析、質量分析により、新規翻訳後修飾として、システイン残基を介した分子間ジスルフィド結合を見出した。HP1 α の C133、HP1 γ の C177 が特異的修飾残基として同定され、HP1 β はジスルフィド結合を形成しなかった。in vitro、in vivo ともに、HP1 γ は容易に酸化されジスルフィドダイマーを形成するのに対し、HP1 α は酸化ダイマーは形成されず、その構造上の酸化感受性の差異が示唆された。

(4) クロマチンリモデリング因子および HP1 family 分子の心筋細胞における機能解析

血管内皮細胞からのスクリーニングにより、酸化状態にて分子間ダイマーを形成した HP1 γ は転写共抑制因子 TIF1 β と強固に結合することが分かった。生化学的解析、転写レポーター解析により、酸化状態下で、HP1 γ は TIF1 β をクロマチン上に捕捉し、その転写抑制機能を解除することが分かった。アイソフォーム特異的な酸化応答性は、HP1 の多様な機能に寄与し、酸化環境下における遺伝子転写制御に関わることが示唆された (図 3)。

心臓特異的発現を示す機能未知遺伝子を同定し、その機能解析実験系を立ち上げ、基礎的分子生物学的機序解析とともにヒト臨床指標となり得るかにあつてのスクリーニング解析を現在も行っている。

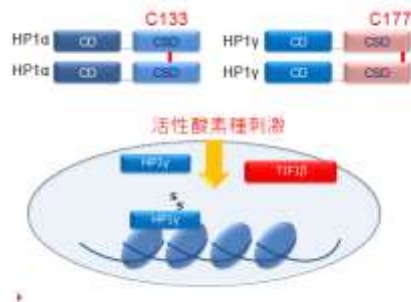


図3. HP1ファミリー分子のシステインによるジスルフィド結合部位同定と生体内酸化作用による二量体形成によるエピジェネティック修飾と転写制御の模式図 (Higo, Asano, et al. J Biol Chem. 2010.)

(5) 研究全体のまとめ

循環器疾患における酸化状態における遺伝子発現制御は重要である。本結果を踏まえ病態変化におけるHP1の分子機能解析を進め、新しいエピゲノム制御の機序を明らかにする予定である。昨年来進めている動物モデル心不全、ヒト心不全におけるエピゲノム修飾因子の解析をおこない病態進展との関係を明らかにする予定である。

エピジェネティクス研究の進展に伴い、DNAやヒストン修飾など細胞固有のクロマチンリモデリングによる遺伝子発現制御機構が明らかとなった。転写因子制御の上流にて作用するエピジェネティック制御は細胞内記憶メカニズムとして重要な役割を果たしており、発生・分化、再生、癌などの研究分野で盛んに研究が行われている。クロマチンリモデリングは生理的発生・分化の過程で適切な遺伝子発現変化に必要であるが、成長後のヒトやマウスにおいても（終分化後の細胞においても）、環境の変化に応じてクロマチン修飾の変化が生じることが報告された。神経系や免疫系において組織機能変化とエピジェネティック修飾変化が相関することが報告されたが、実験手法の複雑さから、慢性疾患の病態変化や循環器領域における重要性についての報告はない。しかし近年の解析方法の進歩は様々な学問分野での研究を可能にし、新しい着眼点として今後が期待されている。以上の成果について一部既に報告済みであるとともに、現在論文投稿中である。

5. 主な発表論文等 (研究代表者には下線)

〔雑誌論文〕(計11件)

① Nishikawa K, Asai T, Shigematsu H, Shimizu K, Kato H, Asano Y, Takashima S, Mekada E, Oku N, Minamino T. Development of anti-HB-EGF immunoliposomes for the treatment of breast cancer. J Control Release. 2011 Oct 14. in press 査読有.

② Hara M, Mizote I, Nakaoka Y, Tanaka H, Asano Y, Sakata Y, Komuro I. A case of non-cardiogenic acute pulmonary edema in a patient with POEMS syndrome-associated pulmonary arterial hypertension. Ann Hematol. 2011 Apr;90(4):489-90. 査読有.

③ Muratsu J, Hara M, Mizote I, Asano Y, Sakata Y, Saito S, Matsumiya G, Sawa Y, Komuro I. The impact of cardiac resynchronization therapy in an end-stage heart failure patient with a left ventricular assist device as a bridge to recovery. A case report. Int Heart J. 2011;52(4):246-7. 査読有.

④ Hara M, Mizuno H, Mizote I, Nakatani D, Asano Y, Sakata Y, Nanto S, Komuro I. Clinical impact of off-label cardiac resynchronization therapy in end-stage heart failure patients on continuous intravenous inotrope. Clin Cardiol. 2011 Nov;34(11):714-20. 査読有.

⑤ Nakano A, Kato H, Watanabe T, Min KD, Yamazaki S, Asano Y, Seguchi O, Higo S, Shintani Y, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Kaibuchi K, Mochizuki N, Kitakaze M, Takashima S. AMPK controls the speed of microtubule polymerization and directional cell migration through CLIP-170 phosphorylation. Nature Cell Biology. 2010 Jun;12(6):583-90. 査読有.

⑥ Higo S, Asano Y, Kato H, Yamazaki S, Nakano A, Tsukamoto O, Seguchi O, Asai M, Asakura M, Asanuma H, Sanada S, Minamino T, Komuro I, Kitakaze M, Takashima S. Isoform-specific intermolecular disulfide bond formation of heterochromatin protein 1 (HP1). J Biol Chem. 2010 Oct 8;285(41):31337-47. 査読有.

⑦ Sawada T, Minamino T, Fu HY, Asai M,

Okuda K, Isomura T, Yamazaki S, Asano Y, Okada K, Tsukamoto O, Sanada S, Asanuma H, Asakura M, Takashima S, Kitakaze M, Komuro I. X-box binding protein 1 regulates brain natriuretic peptide through a novel AP1/CRE-like element in cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 2010 Jun;48(6):1280-9. 査読有.

⑧ Fu HY, Okada KI, Liao Y, Tsukamoto O, Isomura T, Asai M, Sawada T, Okuda K, Asano Y, Sanada S, Asanuma H, Asakura M, Takashima S, Komuro I, Kitakaze M, Minamino T. Ablation of C/EBP Homologous Protein Attenuates Endoplasmic Reticulum-Mediated Apoptosis and Cardiac Dysfunction Induced by Pressure Overload. *Circulation.* 2010 Jul 27;122(4):361-9. 査読有.

⑨ Shimomura Y, Hara M, Mizote I, Nakaoka Y, Tanaka H, Asano Y, Sakata Y, Komuro I. Sildenafil and steroid therapy effectively improved POEMS syndrome-associated pulmonary arterial hypertension. *Int J Hematol.* 2010 Dec;92(5):774-6. 査読有.

⑩ Tsukamoto O, Fujita M, Kato M, Yamazaki S, Asano Y, Ogai A, Okazaki H, Asai M, Nagamachi Y, Maeda N, Shintani Y, Minamino T, Asakura M, Kishimoto I, Funahashi T, Tomoike H, Kitakaze M. Natriuretic peptides enhance the production of adiponectin in human adipocytes and in patients with chronic heart failure. *J Am Coll Cardiol.* 2009 Jun 2;53(22):2070-7. 査読有.

⑪ Asai M, Tsukamoto O, Minamino T, Asanuma H, Fujita M, Asano Y, Takahama H, Sasaki H, Higo S, Asakura M, Takashima S, Hori M, Kitakaze M. PKA rapidly enhances proteasome assembly and activity in vivo canine hearts. *J Mol Cell Cardiol.* 2009 Apr;46(4):452-62. 査読有.

[学会発表] (計2件)

① 朝野仁裕、心不全におけるクロマチンリモデリング制御と細胞機能維持機構の解明、成人病の病因・病態の解明に関する研究助成 第17回研究発表会、2011.7.2、大阪

② 朝野仁裕、心不全の新しい病態解析法新しい心筋 viability 評価法の開発による治療

抵抗性心不全へのアプローチ、大阪ハートクラブ学術講演会、2011.5.18、大阪

[図書] (計6件)

① 朝野仁裕、南光堂、心不全の原因・病態に迫る検査「遺伝子診断はどのような症例に行うべきか？」変貌する心不全診療、2012.

② 朝野仁裕、小室一成、診断と治療社、心不全の原因診断の進歩、心不全、100(9).2012.

③ 朝野仁裕、メディカルレビュー社、拡張型心筋症に関する新しい解析方法、CARDIAC PRACTICE 22(3).209-12.2011.

④ 朝野仁裕、小室一成、医歯薬出版、最新・心不全 Update — 研究と臨床の最前線、心不全の先端的研究トピックス、心不全のジェネティクスとエピジェネティクス、医学のあゆみ、232(5).593-598.2010.

⑤ 朝野仁裕、中外医学社、心不全におけるクロマチンリモデリングの役割、Annual Review 循環器、89-94.2010.

⑥ 朝野仁裕、先端医学社、Altered epigenetic memory with chromatin disruption in the end-stage failing heart. 分子心血管病、110(1).80-82.2009.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朝野 仁裕 (ASANO YOSHIHIRO)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：60527670

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし