

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790757

研究課題名(和文)次世代シーケンサーによるエピゲノム解析を用いた新規心不全治療ターゲット分子探索

研究課題名(英文)Quantitative Epigenome Mapping to Identify Therapeutic Target in Heart Failure

研究代表者

肥後 修一郎(Higo, Shuichiro)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00604034

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、高速シーケンス技術を用いた心不全の新たな治療標的探索を目標とした。圧負荷をかけたマウス心不全モデルを作成し、転写活性化の目印であるヒストン修飾(H3K4me3)のエピゲノム解析とRNAシーケンシング法による発現解析を施行した。我々は独自の定量化アルゴリズムを開発し、H3K4me3修飾が、転写因子の転写開始点に特に集積することを見出した。心不全において発現が上昇する遺伝子群に対し、H3K4me3定量値によるフィルタリングを行ったところ、機能未知の転写因子を見出した。現在本因子が心不全の進展に関与しているとの仮説を立て、創薬シーズ候補とし機能解析を継続中である。

研究成果の概要(英文)：To explore a therapeutic target for preventing the progression of heart failure, we established the novel screening method using next generation sequencer. Pressure-overloaded hearts of mice were applied to RNA-sequence and trimethylated histone H3 Lysine 4 (H3K4me3) ChIP-sequence analysis. We developed a quantification algorithm for H3K4me3 marks which enables absolute comparison between control and the pathological conditions. We demonstrate that H3K4me3 accumulated at the genes functionally involved in transcriptional regulation, although the expression levels of these genes were low. We applied the additional H3K4me3 filtering to the transcriptionally upregulated genes in failing hearts and found the genes specifically marked by H3K4me3 under prolonged hypertrophic stimuli. Among them, we identified a transcription factor with significant H3K4me3 enrichment in failing hearts. From these data, now we are currently advancing functional analysis of this molecule.

研究分野：医歯薬学

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：エピゲノム 高速シーケンサー 心不全

1. 研究開始当初の背景

心不全は現代社会において依然予後不良な疾患であり、その克服のためには、従来の薬物治療薬に続く新たな治療法の探索が急務である。心不全の病態に迫り、新たな治療ターゲットの同定のためには、心臓の特異性に着目した、バイアスのかからない網羅的・探索的スクリーニングが必要と考えられる。心筋細胞の遺伝子発現の網羅的解析に関しては、従来より DNA マイクロアレイによる多くの報告がなされているが、外部環境に応じて時間・空間的に適切に転写を制御するメカニズムについては不明な点が多い。そのなかで、ヒストン修飾の変化やクロマチン動態を検出しえるエピゲノム解析は、転写レベルの変化にとどまらない新たな情報変化を検知し得るものであり、近年技術発展の著しい次世代シーケンサー技術を組み合わせた網羅的解析は、探索手段として有力な方法と考えられる。我々はこれまでの研究課程において、心臓組織を対象としたクロマチン免疫沈降(ChIP)法によるエピゲノム解析法を確立してきた。我々は、これら解析手技と、次世代シーケンサー解析を組み合わせ、循環器研究への応用として、心筋細胞、及び病態心不全組織におけるエピゲノム制御機構の解明を試みたいと考えた

2. 研究の目的

1. ラット培養心筋細胞での条件検討の後、マウス圧負荷心不全組織を用いて、心臓組織におけるエピゲノムやクロマチンの変化を、ChIP 法により明らかにする。対象として、活性化エピゲノムの代表的な収修飾であるトリメチル化ヒストン H3 リジン 4 (H3K4me3) を解析する。

2. 上記解析により得られたゲノム DNA サンプルから、次世代シーケンサー解析用 DNA ライブラリ作成の系を確立する。次世代シーケンサー解析には、高純度かつ適切な断片化サイズに精製された DNA が必要であり、その判定のための測定系、ライブラリ作成に必要なワークフローの確立を行う。その後のシーケンスランについては、大阪大学共同研においてプロトコル化されており、専門の技術職員による解析が可能となっている。

3. 次世代シーケンサーによる DNA 配列データの取得後には、リファレンスゲノム上へのマッピング、さらにその後の Linux PC を用いたデータ解析が必要であり、そのための *in silico* 解析系の確立を行う。RNA シークエンスを同時に行い、得られた発現データとエピゲノムデータから総合的なデータベース構築を目指す。そのなかから、病態特異的なヒストン修飾変化、心臓特異的転写制御に関わる機能エレメントの同定を試み、新たな治療ターゲット分子の探索へとつなげていく。本研究は探索研究であるが、同定目標を複数設定することにより、また、解析途中において注目すべきヒストン修飾や転写因子につ

いて適宜考察を繰り返すことにより、さらに *in silico* 解析法を常に更新していくことにより、特異的事象を見出すことを試みる。

3. 研究の方法

1. ラット培養心筋細胞を用いた *in vitro* の系、及びマウス組織を用いた *in vivo* の系において、ChIP 法による解析手技の確立

新生仔ラット培養心筋細胞を用い、細胞のホルムアルデヒドクロスリンク、核分画の適切な可溶化、超音波破砕による DNA の断片化、フェノールクロロホルム抽出処理、RNA 除去・DNA 精製の各段階において、至適条件の検討をまず予備実験として行う。ヒストン修飾抗体を用いた ChIP 処理の後、活性化遺伝子近傍に設計したプライマーによる定量 PCR 評価を行う。良好な結果が得られれば、そのデータを踏まえマウス心臓組織での検証を行う。

2. 次世代シーケンサー用ライブラリ DNA 作成ワークフローの確立

次世代シーケンサー用ライブラリには、適切な長さに断片化された高純度の DNA が必要であり、数段階のステップの選別・精製を行う必要がある。各段階において予備実験を行いながら、シーケンサー解析が可能な精製 DNA を得るプロトコルを確立する。

3. 次世代シーケンサーを用いた解析の実行

大阪大学共同研には、次世代シーケンサーである ABI SOLiD 4 が導入されている。本機器を用い、ChIP 法により得られたライブラリ DNA のシーケンス解析を行うための系を確立していく。予備実験結果をもとに、シーケンステストランを行い、心臓組織特異的なヒストン修飾変化をとらえ、引き続き病態間での比較解析、さらなる機能制御エレメントの同定を目標に、ChIP シークエンス条件設定を行っていく。

4. *in silico* 解析系の確立

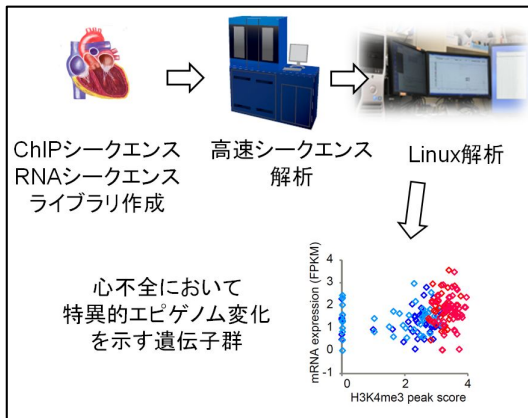
次世代シーケンス解析により得られるデータは膨大であり、またマッピング以後の解析には、専用 Linux サーバーの構築、専門的なバイオインフォマティクスの知識が必要となることが予想される。シーケンスラン以後の解析処理について、各種オープンソース解析プログラムの取得、専用サーバー構築を進めていく予定である。

5. RNA シークエンスによる遺伝子発現データの取得、エピゲノムデータとの相関解析

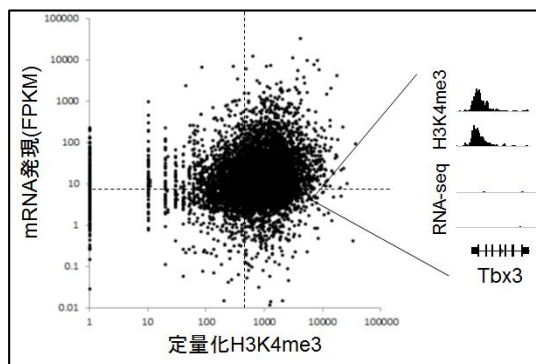
ヒストン修飾マッピングにより得られたエピゲノムデータを、実際の遺伝子発現レベルと比較することで、転写調節への影響、機能エレメントの同定を試みていく。従来のマイクロアレイと比較して、RNA シークエンスを行うことで、微細な発現変化を示す遺伝子の同定も可能となることが予想され、包括的なデータベース構築から、ターゲット分子探索を目指す。

4. 研究成果

当初研究計画に則り、培養細胞を用いた条件検証実験の後、マウス心臓組織を対象とした ChIP シークエンスからのライブラリ作成技術を確立した。また Linux 解析サーバーを導入し、次世代シークエンス解析から得られる膨大な配列情報の処理・解析技術を確立した。更に、独自のアルゴリズムからのエピゲノムの定量方法、RNA シークエンス結果と組み合わせた定量的プロファイリング方法を確立した（下図）



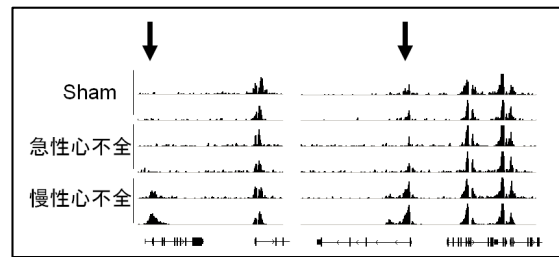
具体的には、横行大動脈結紮法を用いた圧負荷不全心マウスを作成し、得られた心臓組織をもとに H3K4me3 ChIP シークエンス、RNA シークエンスを施行した。まず正常心臓組織において、得られた H3K4me3 定量値プロファイルと RNA シークエンスによる発現データの詳細な相関解析を行った。その結果、従来単に“転写活性化遺伝子の目印”とみなされていた H3K4me3 修飾において、その集積の程度に差異があることが判明した。特に、転写因子やクロマチン修飾因子の発現量は RNA シークエンス解析上低値であるにも関わらず、その転写開始点には多くの H3K4me3 修飾が集積していることが判明した（下図）



二方向プロファイル解析

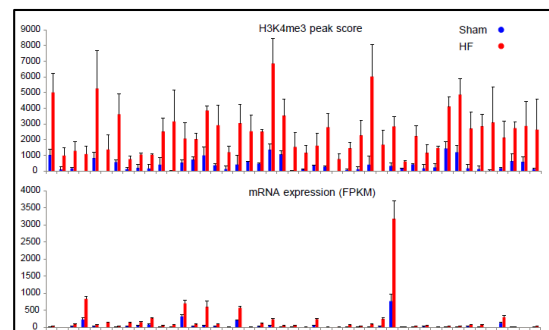
転写因子における H3K4me3 集積

このことから、H3K4me3 修飾は特に転写因子の検出において鋭敏である可能性が示唆された。一方、心不全において mRNA 転写レベルが上昇する遺伝子群に対し、さらに H3K4me3 定量値の増加という2つ目のプロファイルによるフィルターをかけることで、遺伝子発現変化は微細ながら、慢性心不全において病態に關与する機能因子の検出を試みた。その結果、慢性心不全において H3K4me3 が誘導される 45 個の遺伝子を検出した（下図）。



不全心において

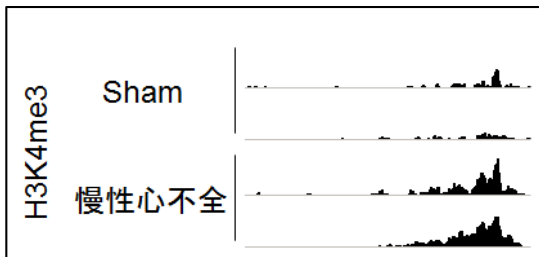
H3K4me3 が誘導される遺伝子群



H3K4me3 が誘導される 45 遺伝子に

おける H3K4me3 スコアと
mRNA 発現レベル

上述の遺伝子集団のなかで、我々は心血管病態において過去の報告がない機能未知の転写因子 X を見出した。転写因子 X の H3K4me3 修飾は圧負荷が持続した慢性心不全において顕著に誘導され（次頁図）、コピー数は少ないものの mRNA 発現量も顕著に上昇していた。そこで、X が何らかの非心筋細胞において圧負荷心不全の進行に伴い誘導され、リモデリングの進展に關与しているとの仮説を立て、X を創薬シーズ候補遺伝子とし今後その機能解析を試みる予定である。最初に細胞局在、組織での細胞由来の同定が必要と考え、リコンビナントタンパク質を用いて新たなウサギポリクローナル抗体の作成を試みる。今後さらに培養細胞を用いたタンパク質局在、誘導因子の探索等の基礎データ構築を進めていく予定である。



転写因子 X における
H3K4me3 の誘導

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 3 件)

1. Shintani Y, Drexler HC, Kioka H, Terracciano CM, Coppen SR, Imamura H, Akao M, Nakai J, Wheeler AP, Higo S, Nakayama H, Takashima S, Yashiro K, Suzuki K. Toll-like receptor 9 protects non-immune cells from stress by modulating mitochondrial ATP synthesis through the inhibition of SERCA2. EMBO Rep. 2014 Mar 7.
2. 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, 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 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. 2014 Jan 7;111(1)

〔学会発表〕(計 4 件)

1. Shuichiro Higo, Yoshihiro Asano, Seiji Takashima, Masafumi Kitakaze, Issei Komuro. Comprehensive quantitative epigenome mapping reveals the differential induction of histone H3 lysine 4 trimethylation. AHA scientific sessions 2012. Losangels, USA. 3rd~7th, Nov, 2012
2. Shuichiro Higo, Yoshihiro Asano, Seiji Takashima, Masafumi Kitakaze, Issei Komuro. Quantitative ChIP-sequence Analysis Reveals the Differentially Altered Active Epigenomic States in Murine Pressure-overloaded Failing Hearts. 第 29 回 ISHR 日本部会総会. 九州大学福岡. 2012 年 10 月 26 日
3. Shuichiro Higo, Yoshihiro Asano, Seiji Takashima, Issei Komuro. Quantitative Epigenome Mapping Reveals the Differentially Induced Histone H3 Lysine 4 Trimethylation Marks in Pressure-overloaded Failing Hearts. Molecular Cardiovascular Conference II. 北海道赤井川村キ口口. 2012 年 9 月 7 日~2012 年 9 月 9 日
4. 肥後 修一郎、朝野 仁裕、増村 雄喜、坂田 泰史、澤 芳樹、北風 政史、小室 一成、高島 成二 定量的エピゲノム解析を用いた心臓線維芽細胞における細胞周期制御因子の同定 第 51 回日本臨床分子医学会 2014 年 4 月 11 日、12 日

〔図書〕(なし)

〔産業財産権〕

出願状況(なし)

取得状況(なし)

6. 研究組織

(1)研究代表者

肥後 修一郎 (HIGO Shuichiro)

大阪大学大学院医学系研究科

先進心血管治療学助教

研究者番号：00604034

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし