

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860558

研究課題名(和文) 多面的転写プロファイリングを用いた心臓リモデリング関連因子探索と治療応用への試み

研究課題名(英文) Molecular discovery research targeting cardiac remodeling using multi-directional transcriptional profiling and therapeutic application

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：圧負荷心不全モデルマウスを用いた検討により、心不全において活性化エピゲノムマークが誘導される遺伝子群を同定した。これら遺伝子群は心臓間質の線維化に関与し、そのなかから心臓間質線維芽細胞に特異的に発現する転写因子を見出した。本因子は心臓線維芽細胞の一部のポピュレーションに発現し、線維芽細胞の反応性増殖に関与していることが明らかとなった。また、培養心筋細胞を用いたRNAイメージングとChIPシーケンスの組み合わせから、心肥大を負に制御する因子を見出した。これらの知見より、心血管病態に関わる分子探索において、高速シーケンサー解析を用いた多面的オミクス解析が有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：For exploratory research aimed at regulatory mechanisms underlying pathological proliferation of non-cardiomyocytes during the progression of cardiac remodeling, we applied H3K4me3 mapping and RNA-sequence to pressure-overloaded hearts of mice. From the combination of Epigenomics and Transcriptomics, we identified a set of genes involved in interstitial fibrosis, and identified a transcription factor specifically expressed in interstitial cardiac fibroblasts. The transcription factor is expressed in a limited population of fibroblasts and required for reactive proliferation. Next, to clarify unknown regulating mechanisms underlying hypertrophic response in cardiomyocytes, we combined quantitative RNA imaging and ChIP-sequence and identified a negative regulator of cardiomyocyte hypertrophy. Our exploratory analysis identifies pathologically relevant molecules using a combination of multidimensional datasets and suggests the usefulness of TransOmics in cardiovascular pathophysiology.

研究分野：心不全

キーワード：心不全 心臓リモデリング 高速シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

心臓リモデリングは、虚血、弁膜症、高血圧等を要因として進行する心不全の病理像であり、心臓の線維化をもとに心腔の拡大、心収縮能の低下を伴う。その形成過程は複雑であり、心筋細胞だけでなく、線維芽細胞、血管平滑筋細胞、内皮細胞、炎症性血球細胞等様々な非心筋細胞が関与する。これまでの研究により、非心筋細胞における多くの制御因子が明らかになっているが、心臓における線維芽細胞の増生、線維化を中心としたリモデリングのメカニズムは依然明らかでなく、未知の制御因子の探索、同定は、心臓リモデリング治療法の開発における喫緊の課題である。従来より、分子探索を目的に、正常状態の心臓とリモデリングが進行した不全心の遺伝子発現の比較解析が行われてきた。しかし、心臓組織には様々な細胞種が混在しており、かつリモデリング進行に伴い、線維芽細胞をはじめとした構成細胞成分の変化が生じることから、遺伝子発現の変化がどの細胞種由来であるのか見極めが困難である。以上の理由から、組織としての心臓を解析対象とした新たな遺伝子発現変化の指標が必要と考えられる。

トリメチル化ヒストン H3 リジン 4(H3K4me3)修飾は、転写活性化遺伝子の代表的なヒストン修飾である。H3K4me3 は遺伝子転写開始点に集積し、高速シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降(ChIP)シーケンズ解析を行うことで、シャープで明瞭なピークとして得られる。我々は、このエピゲノム修飾が、心臓リモデリング進行過程において非心筋細胞での微小な発現の変化を検出する新たな指標として使用できるのではないかと考えた。また、H3K4me3 は活性化エピゲノム修飾として確立されたものだが、個々の遺伝子における集積の程度を定量的に評価した報告は少なく、その意義も依然明らかでない。

2. 研究の目的

以上より、我々は、正常心臓組織及び圧負荷心不全心臓組織を対象とし、活性化エピゲノム修飾を定量化し、mRNA 発現データと合わせた多面的なプロファイリングを行うことで、新たな遺伝子発現検出法を構築することを試みた。これまでの助成事業において、マウス心臓組織を対象とした ChIP シーケンズからのライブラリ作成技術、Linux 解析サーバーを用いた膨大な配列情報の処理・解析技術を確認した。また、独自のアルゴリズムからのエピゲノムの定量方法、RNA シーケンズ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、心不全において特異的なエピゲノム変化を示す遺伝子群の絞り込みに成功した。以上の結果を踏まえ、本事業の目的について、候補遺伝子群のなかか

ら特定の遺伝子の絞り込みを行い、その機能解析から心疾患治療ターゲットとしての可能性を探索すること、を挙げた。本助成事業においては、下記 4 段階のステップを経た心疾患治療創薬のためのシーズ発掘及びその機能解析を実施した。

1. ChIP シーケンズを用いたマウス心臓組織における活性化エピゲノム定量法の確立
2. RNA シーケンズ解析により得られた mRNA 発現データにエピゲノムプロファイルを付加することによる、多面的な心疾患病態関連遺伝子の層別化
3. Linux サーバーを用いた in silico 解析系の構築と創薬シーズ遺伝子の検索・同定
4. 生化学解析、細胞イメージング、遺伝子改変ノックアウトマウスを用いた創薬シーズ候補遺伝子の機能解析

以上の段階を経て、将来的な臨床応用に必要な基礎データの構築及びそのために必要な実験系の確立、実践を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

正常心・圧負荷不全心の ChIP シーケンズ・RNA シーケンズデータに公開データベースの情報を加えた総合的なプロファイリングの実施

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 シーケンズ、RNA シーケンズを施行する。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、微細な変化、特にリモデリング心において新たに出現する細胞集団、更にはその細胞集団における機能因子の検出を試みる。予備的検討において、数十個の遺伝子集団が検出されているが、WEB 上で公開されているマウス全臓器エクソアレイデータベースと照合することで、心筋細胞の特異性・非特異性によりさらにフィルターをかけることを目指す。

創薬シーズ候補遺伝子の同定及び機能解析に向けた基礎データ構築

上述の遺伝子集団のなかで、心血管病態に関与する因子の探索を試みる。また、特異的抗体を作成し、その細胞内局在、組織局在を検出する。

創薬シーズ候補遺伝子の導入・ノックダウンとイメージング技術を組み合わせた機能解析

アデノウイルスを用いた強制発現、あるいは siRNA を用いたノックダウンによる細胞形質の解析を実施する。大阪大学共同研には各種イメージング機器が整備されており、特にイメージングサイトメーターを用いた細胞解析は、特異抗体による染色と組み合わせる

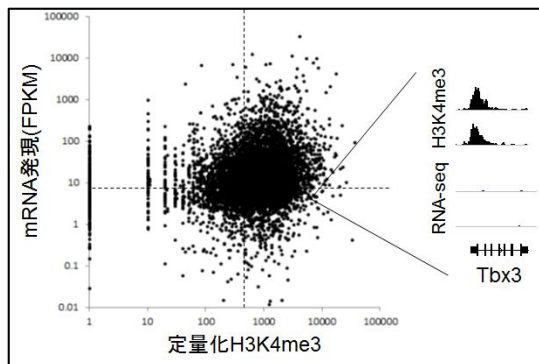
ことで形質解析における強力なツールとなり得る。現時点で培養細胞を用いた染色像の取得に成功しているが、今後更なる条件の検討、刺激条件下での解析等を予定している。

高速シークエンサー解析を更に組み合わせた創薬シーズ候補遺伝子の内在性ターゲット探索及びノックアウトマウスの作成

リモデリング進行に対する治療を目標とした場合、ターゲット分子が生体内のどのような機構を制御しているのか、どのような分子に影響を与えるのかについて、詳細な解明が必要である。強制発現あるいはノックダウン条件下での RNA シークエンス解析、あるいは、転写因子である場合は、特異抗体を用いた ChIP シークエンス解析による直接のターゲット探索を試みる。あわせて、ノックアウトマウスを作成し、発生段階・病的状態双方における生体内機能の解析を行う。

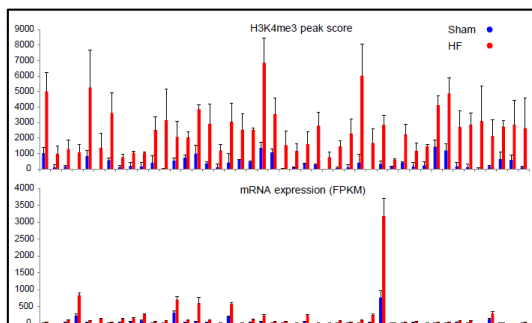
4. 研究成果

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、高速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。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(下図)。

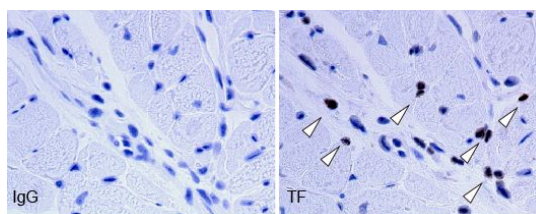


このことから、H3K4me3 修飾が、特定の遺伝子群の検出において鋭敏である可能性が示唆された。一方、心不全において mRNA 転写レベルが上昇する遺伝子群に対し、さらに

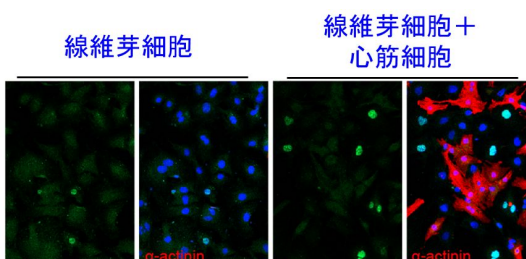
H3K4me3 定量値の増加という2つ目のプロファイルによるフィルターをかけることで、遺伝子発現変化は微細ながら、慢性心不全において病態に關与する機能因子の検出を試みた。その結果、慢性心不全において H3K4me3 が誘導される遺伝子を検出した(下図)。



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を見出した。本転写因子の 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、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、本因子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、機能解析を試みた。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し、その局在を確認したところ、圧負荷心不全間質組織において発現の亢進を認めた(下図)。

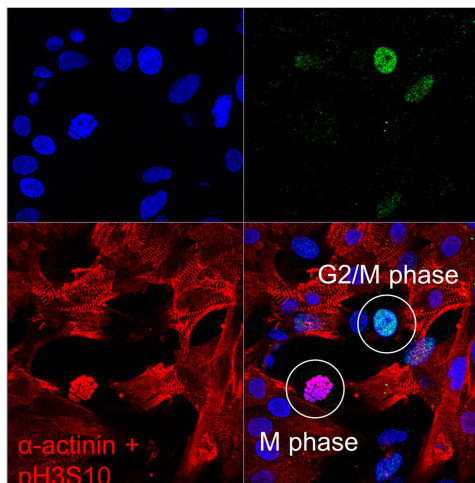


ラット新生仔心臓から単離した培養細胞を用いた免疫染色では、興味深いことに本因子は心筋細胞でなく非心筋細胞に、特に線維芽細胞の一部の細胞群に発現していることが明らかとなった(下図)。

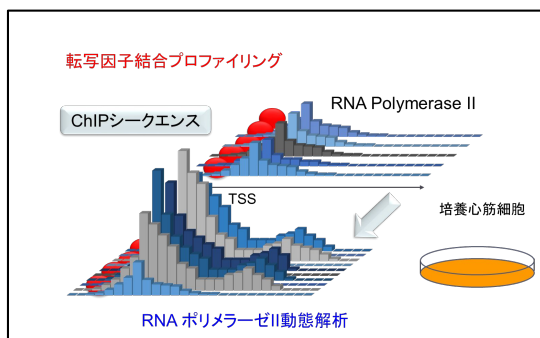


更に、ノックダウン実験から線維芽細胞の反応性増殖に關与していること、RNA シークエンスを組み合わせた解析から、下流ターゲットとして細胞周期関連遺伝子が關与して

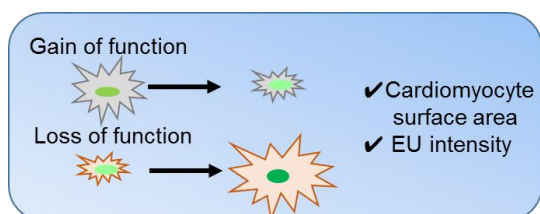
いる可能性があることが判明した(下図)。何故一部の線維芽細胞にのみ発現するのか、また病態における役割が何かを明らかにするために、遺伝子改変マウスを用いた解析を継続中である。



更に、今回の研究で確立した高速シーケンサーを用いた解析系を用い、現在反応性心肥大の新たなメカニズムをターゲットとし解析を進めている。心臓は、圧負荷・容量負荷に対して心筋細胞を代償性に肥大させ、心拍出力を確保する。心筋肥大の発生機序の解明は古くからの循環器研究の対象であるが、我々は、強力に同化を促進する転写因子を培養心筋細胞に強制発現させることで、既知の経路とは異なる視点から心肥大の分子メカニズムに迫ることを試みている。



培養心筋細胞を用いた定量的 RNA イメージング、及び ChIP シーケンスを用いることで、心肥大を負に制御する因子を見出した。本因子は mRNA の脱アデニル化複合体に結合し、細胞質に局在する RNA 量を制御することで、心筋細胞肥大を退縮させることが明らかとなり、現在更に機能解析を進めている(下図)



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5件)

1. Kanzaki M., Asano Y., Ishibashi-Ueda H., Oiki E., Nishida T., Asanuma H., Kato H., Oka T., Ohtani T., Tsukamoto O., Higo S., Kioka H., Matsuoka K., Sawa Y., Komuro I., Kitakaze M., Takashima S. & Sakata Y. A Development of Nucleic Chromatin Measurements as a New Prognostic Marker for Severe Chronic Heart Failure. PLoS one 11, e0148209, doi:10.1371/journal.pone.0148209 (2016).
2. Yan Y., Tsukamoto O., Nakano A., Kato H., Kioka H., Ito N., Higo S., Yamazaki S., Shintani Y., Matsuoka K., Liao Y., Asanuma H., Asakura M., Takafuji K., Minamino T., Asano Y., Kitakaze M. & Takashima S. Augmented AMPK activity inhibits cell migration by phosphorylating the novel substrate Pdlim5. Nature communications 6, 6137, doi:10.1038/ncomms7137 (2015).
3. Hayashi T., Asano Y., Shintani Y., Aoyama H., Kioka H., Tsukamoto O., Hikita M., Shinzawa-Itoh K., Takafuji K., Higo S., Kato H., Yamazaki S., Matsuoka K., Nakano A., Asanuma H., Asakura M., Minamino T., Goto Y., Ogura T., Kitakaze M., Komuro I., Sakata Y., Tsukihara T., Yoshikawa S. & Takashima S. Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 112, 1553-1558, doi:10.1073/pnas.1419767112 (2015).
4. Shintani Y., Drexler H. C., Kioka H., Terracciano C. M., Coppen S. R., Imamura H., Akao M., Nakai J., Wheeler A. P., 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 reports, doi:10.1002/embr.201337945 (2014).
5. 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 journal : Biology, doi:10.1096/fj.13-245522 (2014).

〔学会発表〕(計5件)

1. Yuki Masumura, Shuichiro Higo、Yoshihiro Asano, Hisakazu Kato, Yi Yan, Osamu Tsukamoto, Hidetaka Kioka, Takaharu Hayashi, Yasunori Shintani, Satoru Yamazaki, Tetsuo Minamino, Masafumi Kitakaze, Issei Komuro, Seiji Takashima, Yasushi Sakata. Single Cell Imaging Analysis Clarifies RNA Quantity Control Mechanism in Cardiomyocytes. 第80回日本循環器学会学術集会 Young Investigator's Award Finalists Lectures (Basic Research) 2016年3月18日-3月20日 宮城県仙台市
2. Shuichiro Higo, Yuki Masumura, Yoshihiro Asano, Issei Komuro, Masafumi Kitakaze, Yasushi Sakata and Seiji Takashima. Molecular Discovery Research using TransOmics in Cardiovascular Pathophysiology. 第79回日本循環器学会学術集会 シンポジウム 2015年4月24日-4月26日 大阪府大阪市
3. Shuichiro Higo, Yoshihiro Asano, Yuki Masumura, Yasushi Sakata, Masafumi Kitakaze, Seiji Takashima. Meox1 is a Cell-cycle Oscillator Required for Mitotic Transition and Proliferation in Cardiac Fibroblasts. 第5回 Molecular Cardiovascular Conference II 2014年9月5日、6日 兵庫県神戸市
4. Shuichiro Higo, Yoshihiro Asano, Yuki Masumura, Yasushi Sakata, Masafumi Kitakaze, Seiji Takashima. Meox1 is a Cell-cycle Oscillator Required for Mitotic Transition and Proliferation in Cardiac Fibroblasts. BASIC CARDIOVASCULAR SCIENCES 2014 SCIENTIFIC SESSIONS. 2014年7月14日~17日 Las Vegas, Nevada, USA
5. 肥後 修一朗、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 YIA session 2014
年4月11日、12日 東京都

6. 研究組織

(1)研究代表者
肥後 修一朗 (HIGO SHUICHIRO)
大阪大学大学院医学系研究科
助教

研究者番号：00604034

(2)研究分担者
なし

(3)連携研究者
なし