

令和 2 年 3 月 27 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09139

研究課題名（和文）心不全生体モニタリングモデルマウスを用いた重症心不全の難治化分子機序の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the irreversible mechanism of severe heart failure using biological monitoring murine heart failure model

研究代表者

朝野 仁裕（ASANO, Yoshihiro）

大阪大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：60527670

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：重症心不全の難治化の分子機序を解明するため分子生物学と病理学的解析を行い、非可逆不全心筋と可逆性心筋の分別において独自のエピジェネティック指標解析法を確立し、難治性心不全の分子探索および病態の解明を行った。心不全電顕病理組織像によるイメージング解析技術およびクロマチンスコア自動計測による定量評価法を確立し、ヒト心不全の重症度評価を行った。代表者が発見したCR9エンハンサーについてメカノトランスダクションを介した活性化機序が明らかとなり、CR9-Tgマウスを用いて心不全増悪の層別化を可能にした。本研究を進展させヒト臨床観察研究を実施することで新規不可逆性指標の開発が可能になると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心不全の可逆性に関する組織学的マーカーとして、細胞核クロマチンスコア計測法を確立することで、エピジェネティック機序が心不全に関与することを示唆した研究である。加えて、心不全病態特異的遺伝子発現を示す代表的遺伝子BNP上流にある病態特異的エンハンサーCR9を同定し、動物モデルにおいてCR9エンハンサー活性を世界で初めて確認した。我々が作成したCR9遺伝子改変マウスは心不全を生体下にモニタリングできる心不全モデル動物である。心不全病態進展機序の解明として学術的に、心不全治療薬開発および心毒性有無の検証に利用可能な疾患モデル動物を開発したことから、社会・医療経済的にも意義がある研究となった。

研究成果の概要（英文）：Molecular biology and pathological analysis were performed to elucidate the molecular mechanism of refractory severe heart failure. We established our own epigenetic index analysis method for discrimination between irreversible and reversible cardiac muscle and investigated the molecular search and pathology of refractory heart failure. Imaging analysis technique by electron microscopic histopathology and quantitative evaluation method by automatic measurement of chromatin score were established and the severity of human heart failure was evaluated. Regarding the CR9 enhancer discovered by us, the mechanotransduction mechanism through CR9 activation was clarified, making it possible to stratify heart failure exacerbation using CR9-Tg mouse. It was suggested that development of new irreversible assessment index can be developed by expanding this research and carrying out human clinical observation research.

研究分野：分子循環器病学

キーワード：エピゲノム 細胞核クロマチン 難治性心不全 分子循環器病学 臨床循環器

1. 研究開始当初の背景

特発性心筋症は特異的な治療法は確立されておらず、最重症の心不全に対する治療である心臓移植症例のうち約8割を占める。心筋保護薬に反応し心機能が改善する例や緩徐に進行する例から急速に進行する予後不良例まで多様な臨床病態を呈するが、その層別化指標は確立されていない。

① 心不全不可逆機序は未解明である：

心臓は遺伝学的要因および外界刺激などにより機能的、構造的変化が起こる。なかでも慢性増悪進行型の変化を示す非可逆生存心筋と比較的安定した病態を示す可逆生存心筋を区別する臨床診断マーカー同定の試みは多く行われたが、有効な指標は未だ無く、可逆非可逆性の分子病態は未だ明らかではなかった。

② 不可逆性の病態分子機序解明の重要性：

難治性最重症心不全に対する薬物治療および集学的デバイス技術の開発により、終末像である心臓移植を回避する技術は向上し疾患予後も幾分改善したが、多くは移植適応申請へと向かわねばならない。不可逆性の早期の見極めは移植医療の向上に必須である。即ち治療抵抗性を早期に判断する技術の開発が急務であり、あわせて未解明である病態難治化に対する分子機序の解明は大きな課題であった。

③ 重症度モニタリングモデル動物が必要：

不可逆性指標の一般応用を考える上で、心不全の増悪進行のモニタリングモデル動物の開発は大きな威力を発揮する。そのため研究代表者は、不可逆性を診断する指標の開発および心不全病態の増悪進行をモニタリングするための技術開発に数年前より取り組んできた。

④ 細胞核クロマチン超微細構造変化の発見と心不全重症度との関連性発見の経緯：

遺伝性心筋症マウスの原因遺伝子同定し、原因分子と核クロマチン蛋白質 HP1 との相互作用および分子機序も明らかにするとともに、心筋細胞核クロマチンの微細構造の変化に初めて着目した。その後マウス心不全モデル作成による心不全病期進行に伴う心筋細胞核クロマチン構造変化を初めて捉えることに成功した。

⑤ 心不全を感知する遺伝子発現エンハンサー領域 CR9 の同定とエンハンサー活性測定系の確立によるマウス心不全重症度生体評価法の確立の経緯：

心不全関連生体分子の探索や心不全病態解析による創薬開発への利用を考える上で、循環機能計測における低侵襲、簡便、個体維持を前提とした生体ライブイメージング技術の開発が必須であった。上記を克服すべく、研究代表者らは、世界に先駆けて心不全により ANP, BNP が誘導されるエンハンサー領域 CR9 を同定した。

2. 研究の目的

研究代表者が従来の基盤研究で開発したクロマチンスコアを疾患の分子機序解明に活用し、慢性増悪進行型の難治性心不全の分子病態を明らかにすることを目的とし、研究期間内に以下の内容を明らかにする。

1) 非可逆心筋と可逆心筋の分別指標確立：ヒト不全心筋のクロマチンスコアの解析を進め、臨床データにおける可逆性の判断結果に基づくクロマチンスコア Cut-off 値を算出する。

2) 新指標に基づく心不全モデル動物の重症度評価：心不全モニタリングマウスの心筋組織標本を Cut-off 値もとに分別し、遺伝子発現・蛋白発現のプロファイルを作成する。

3) 分子探索の結果得られた難治性心不全関連分子機序を明らかにする。

3. 研究の方法

これまでの成果を新たに発展させ、重症心不全の難治化病態形成分子機序に関する解明を以下3段階の【方法】に分けて行った。

ヒト重症心不全組織より心不全非可逆性を知るクロマチンスコアカットオフ値を指標として評価し、ゲノム解析と臨床情報の統合評価により、病態を原因についての関連性を検討した。さらに難治化病態を心不全生体モニタリング動物モデルで検証した。動物モデルによる検討であるため、均一な環境で心筋組織検体を得ることができ、組織解析、遺伝子発現解析から心不全非可逆性と関連する分子指標を探索した。

次世代エピゲノム解析、超微細構造解析、独自開発したクロマチン自動計測法、を利用し遺伝子・蛋白発現解析による難治化分子機序の解明のため関連分子の探索を実施した。

【方法A】

非可逆不全心筋と可逆性心筋の分別指標確立 (ヒト心不全組織クロマチンスコア解析・評価)

開発中のクロマチンスコア自動計測法の確立と、従来5年の期間で蓄積した中等症心不全～最重症心不全症例を対象にした心筋生検病理サンプル解析を実施した。本解析法では核内、核膜2種類のスコア計算が可能であり、Cut-off 値を確定させた。心移植レシピエント心などによるヒト心筋組織量に余裕のある検体は組織遺伝子発現、組織蛋白発現を見ることが出来るプロトコールに従い、同時にプロファイル解析を行った。本法をお用紙、中等症心不全にも適用解析を進めることでより詳細なクラス分類を行った。

【方法B】

新指標に基づく心不全モニタリングマウスの重症度解析 (マウス心不全モデルにおける同分別指標の評価)

難治化分子機序を明らかにするためには均一な実験系で特異的現象を取りだす必要がある。ヒト心筋生検検体では疾患背景が異なるものも多く、それを克服するためにマウス心不全組織検体を用いて電子顕微鏡によるクロマチン構造解析を行った。

クロマチン構造変化を見る際に用いるマウスは、重症度が均一な組織検体の収集を実現させるため、BNP 発現の生体定量可視化に成功した心不全生体モニタリングマウスを用いた。同マウスは、研究代表者らが新規に同定した心不全特異的BNP発現エンハンサー (CR9) を利用し独自に開発した心不全感受性生体イメージングマウス (CR9 マウス) である。同じCR9 レポーターベクターを用いた心筋細胞レポーター遺伝子アッセイ系も同時構築できており、クロマチン構造変化を来たした細胞、組織に対して注目する分子の分子機序、薬剤投与による機能変化を、同ベクターを導入した心筋細胞 (CR9 心筋細胞) または生体心臓 (CR9 マウス) の両実験系において機能解析を実施した。

この心不全感受性生体イメージングマウスを用いて、大動脈縮窄による圧負荷 (Thoracic Aortic Constriction; TAC 1w、4w、8w) を行い、組織から遺伝子、蛋白発現解析を行うとともに、心重/体重比および肺重/体重比、心エコー計測数値、心内圧値、BNP 発現値を測定の後、病態 (軽症・中等症・重症)、病期 (急性、慢性) 各条件における変化をCut-off 値を検討した。その上で、電子顕微鏡画像の病理学的分類を完成させ、ヒト検体解析において認めたクロマチン変化に相当するマウス心不全病態が再現できるように、エンハンサー活性測定を行った。

さらに心不全難治化の臨床病期 (point of no return) のみならず、①各治療による心不全改善とともにクロマチン構造が変化し得るか、②その際難治化指標をまたぐ変化を来たし得るか、について検討を行い、心不全感受性生体イメージングマウス (CR9 マウス) を用いた重症度変化のトレースを行った。

【方法C】

心不全難治化を規定する分子探索・機能解析による不可逆性病態の解明

方法Aおよび方法Bにおいて分別に成功した心筋組織検体を用いて、心不全難治化にかかわる分子を探索するため、該当する組織を蓄積し、難治化を規定するマーカーを持つ心筋と、もたない心筋に分別をした臨床情報をもとにRNA-seq解析を実施し候補分子をリスト化した。発現上昇、低下する各分子に対して、実際の組織発現の変化が認められるか確認を行うとともに、CR9 心筋細胞を用いてそれら遺伝子の発現増強、抑制による心筋細胞機能の変化を解析した。難治化に生じた心筋細胞変化と類似の現象を捉えた場合、CR9 心筋細胞における機能解析を実施し、心筋難

治化を再現することで難治化の分子生物学的意義を解析した。

4. 研究成果

【方法A】

非可逆心不全と可逆性心筋の分別指標確立 (ヒト心不全組織クロマチンスコア解析・評価)

研究代表者の基礎的事前検討のを応用し、ヒト臨床病態を層別化する新規マーカーの開発研究を実施した。重症心不全組織の心筋細胞核クロマチン構造変化を解析するため、ヘテロクロマチンの領域サイズと心不全病態変化との強い相関を明らかにするとともに、ヘテロクロマチン定量「クロマチンスコア計測法」を確立した。

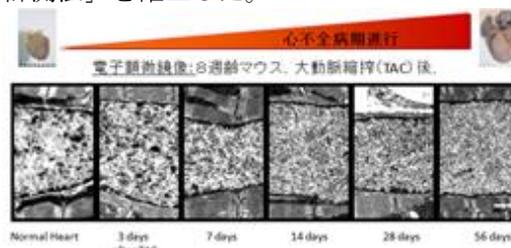


図1. 心不全病態変化に伴い変化する心筋細胞核クロマチン構造変化の発見

電子顕微鏡クロマチン構造計測による本方法は、従来にない極めて高い感度特異度を示すこと、従来の心不全指標である心エコー計測値、心臓線維化等とは相関を示さない新しい計測値であることを明らかにした。(Kanzaki. PLoS One. 2016; 11:e0148209.)

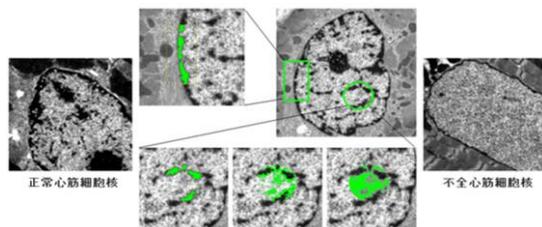


図2. クロマチンスコア計測法の開発

開発された独自の解析技術 (クロマチンスコア自動計測) を標準化するとともに、それを用いて臨床研究を実施し、クロマチンスコア自動計測法および心臓クロマチン構造の2段階評価法を確立した。心不全病理組織像から2段階画像解析を経て定量評価する「クロマチンスコア」計測法を確立に成功し、不連続な細胞核膜クロマチン構造をもつ細胞核を有する患者群 (A群) と、核膜の連続性を有する群 (N群) に分かれることを明らかにした。

さらに、疾患レジストリより得た検体群を用いて、拡張型心筋症症例のみで検討した結果、不連続な細胞核膜クロマチン構造をもつ細胞核を有する患者群 (A群) は、病理組織検査後一年後の心臓イベントを回避できない、不可逆進行性の群であることが判明した。

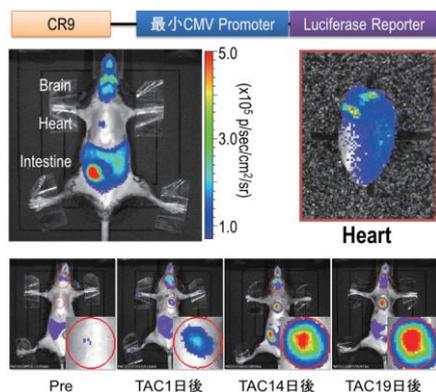
2009年～2015年に心不全の精査加療のため大阪大学医学部附属病院に入院となり、弁膜症・冠動脈疾患が除外され、心筋生検を含めた精査の結果、非虚血性心筋症（二次性心筋症も含む）と診断され、予後情報・リバースリモデリング評価が可能であった左室駆出率が低下（EF<35%）していた190例を後ろ向きに検討した結果、A群は15例、N群は175例であり、A群は、病理組織検査後一年後の心臓死、左室補助人工心臓装着の心臓イベントが高率であり、EFが50%以上に改善するリバースリモデリングを認めないことが明らかとなった。

	A群	N群	p値
EF10%以上増加かつEF>35%へ改善 かつ 心イベントなし	7%	42%	<0.01
EF>50%へ改善 かつ 心イベントなし	0%	24%	0.03
心イベントなし	53%	80%	0.02

【方法B】

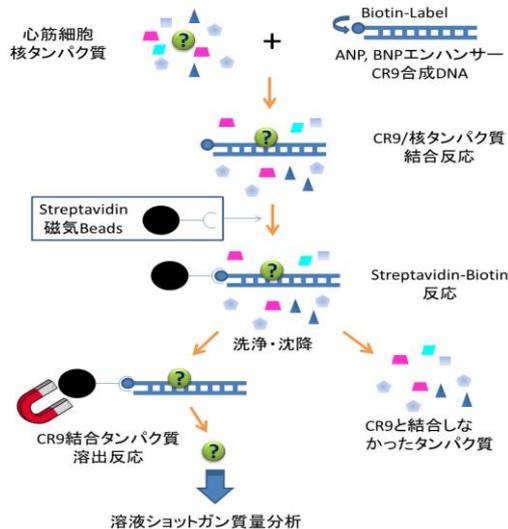
新指標に基づく心不全モニタリングマウスの重症度解析（マウス心不全モデルにおける同分別指標の評価）

研究代表者は、心不全を感知する遺伝子発現エンハンサー領域CR9を同定し、そのエンハンサー活性測定系を確立した。さらにCR9エレメントおよび最小限のCMVプロモーターがルシフェラーゼレポーター遺伝子を駆動するTgマウス系統を確立した。



この動物モデルにより、心臓におけるNppb遺伝子のCR9駆動転写活性のリアルタイム、非侵襲的、定量的およびライブイメージングを可能になった。マウスライブイメージングシステムを用いて、ドキシソルビシン（Dox）、フェニレフリン（PE）、アドレナリン（ADR）、または生理食塩水による慢性治療によって誘発された心不全の進行中の心臓におけるCR9の活性を測定した。CR9の活性は、生理食塩水群と比較して時間依存的に全ての薬物において増加した。収縮抑制薬剤による処置を施した培養心筋細胞においても、CR9の活性はPEおよびADRによって増加した。さらに、物理的心負荷は、培養心筋細胞にお

るCR9によるNppb遺伝子発現の活性を増加させた。これらエンハンサーに作用する転写因子群としての探索解析を行い、生化学およびパイオインフォマティクス分析によってCR9エレメントに蓄積し、活性化する転写因子3種を同定した（unpublished data）。

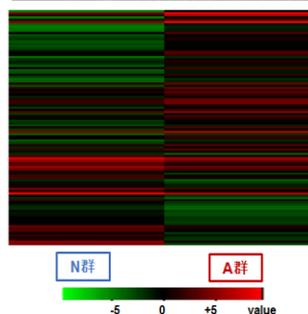


【方法C】

心不全難治化を規定する分子探索・機能解析による不可逆性病態の解明

心臓移植の適応精査により過去5年間で蓄積した移植・VAD植え込み時の最重症不全心筋組織から、病理組織、ゲノム、遺伝子発現、の情報を用いて高精度な多層的なオミックス解析を実施し、心不全のリバースリモデリングの病態機序解明と臨床応用を目的とした研究開発を行った。約30症例の超高速ゲノムシーケンス解析結果から疾患原因遺伝子変異の同定とGenotypingを行い、既知遺伝子既知変異、既知遺伝子新規変異、新規遺伝子新規変異、の3種類に分類し、遺伝子名による疾患原因の統計学的分類とともに、各群で検出される変異遺伝子の総数、既知遺伝子変異の検出率などを群間比較した。エントリーした検体からは、N群において遺伝性（家族性）症例が多いこと、また病原変異の検出数が多いことが示唆された。また、A群においては既知遺伝子変異の検出が認められなかった（unpublished data）。A群症例が十分解析数が集積できていないこともあり暫定的な結果であるが、preliminaryな結果としては、A群においては既知遺伝子変異の検出がなく、A群、N群でなんらかの疾患発症原因に偏りがある可能性も示唆されている。

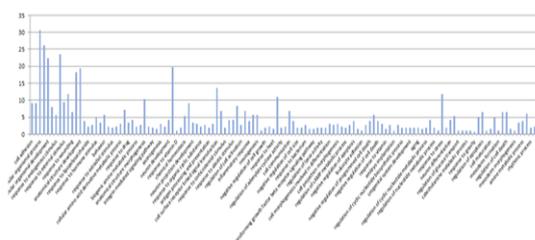
A・N群の遺伝子発現変化（群間比較）



また、心臓

移植に至った約 40 症例の症例について、心筋組織検体を用いた RNA-seq 解析を行い、既存心不全データベースとゲノム解析データから導き出される結果と統合し、A群とN群において心不全病態形成のクロマチン指標による2群層別化解析を行った結果、双方に2倍以上遺伝子発現変化を来す遺伝子群が認められた(unpublished data)。

網羅的遺伝子発現解析2群比較(RNA Sequence)



今後、遺伝子リストの中から心不全病態にかかわる遺伝子の機能解析を実施し、今後の臨床指標開発および創薬開発を行うことが可能である。上記リストに挙げられた遺伝子については、心不全重症化の病態と関わる遺伝子群が含まれることが予想され、ゲノム解析結果と、遺伝子発現解析結果、そして臨床情報との統合により、統計学的に意義のある分子マーカーの検出を目指すことができる。

<全体考察>

予後不良の不可逆進行例および可逆性リバースリモデリングを予測しうる新規サロゲートの開発は、重症心不全デバイス診療を最適化し心不全診療ガイドラインへの提言に資する知見を生むことで、難治性疾患克服を目指す知見につながる。さらにその分子機序を追究によるリバースリモデリングの病態解明、リスク層別化・予測系の構築、新規サロゲートマーカーの同定、治療標的を同定し、心不全に関する革新的知見や創薬標的の発見や新たな治療戦略の確立につながる事が可能となる。

一方、細胞および動物の心不全モニタリング系は、再現性良く低侵襲かつ簡便に、生体のまま繰り返し心不全病態を確認できるため、循環器系創薬開発研究に重要な動物モデルとなり得る。さらに、基礎・臨床両研究の立場から、BNP 遺伝子の発現調節を行う心不全特異的エンハンサーの同定は、心不全期における心臓胎児性遺伝子発現の制御機構が解明と、長年未解明であった心不全の新たな分子機序の理解へつながり、それを利用した臨床治療法の開発へも貢献が期待される。

臨床的応用への期待のみならず心不全の基礎解析においても、精密に病態重症度が分類された本モデル検体を用いて、遺伝子発現、薬剤効果、病態病理の各データを再度プロファイリングすることで、従来未発見であった新規分子の同定に至る可能性を有すると期待される。

以上より、本研究において臨床研究および

基礎的解析研究から求められた、心不全の臨床診断法及び分子指標は、新しい心不全臨床病態診断法および治療抵抗性心不全の診断法の開発に貢献することができると示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件 : 総件数)

全て査読有 ※は corresponding author

- 1) Tobita T, Asano Y (5 番目、27 人省略). Genetic basis of cardiomyopathy and the genotypes involved in prognosis and left ventricular reverse remodeling. *Sci Rep.* 2018 Jan 31;8(1):1998. doi:10.1038/s41598-018-20114-9.
- 2) Nagata Y, Yamagishi M, Asano Y, (5 番目、10 人省略). HeatFailure Phenotypes Induced by Knockdown of DAPIT in Zebrafish: A New Insight into Mechanism of Dilated Cardiomyopathy. *Sci Rep.* 2017 Dec 12;7(1):17417. doi: 10.1038/s41598-017-17572-y.
- 3) Asanuma H, Asano Y, (13 番目、15 人省略). Novel Synthesized Radical-Containing Nanoparticles Limit Infarct Size Following Ischemia and Reperfusion in Canine Hearts. *Cardiovasc Drugs Ther.* 2017 Dec;31:501-510. doi: 10.1007/s10557-017-6758-6.
- 4) Miyauchi S, Asano Y, (9 番目、11 人省略). Sphingomyelin Phosphodiesterase 3 Enhances Cytodifferentiation of Periodontal Ligament Cells. *J Dent Res.* 2017 Mar;96(3):339-346. doi:10.1177/0022034516677938.
- 5) Kondo H, Asano Y, (6 番目、16 人省略). Mutation in VPS33A affects metabolism of glycosaminoglycans: a new type of mucopolysaccharidosis with severe systemic symptoms. *Hum Mol Genet.* 2017 Jan 1;26(1):173-183. doi: 10.1093/hmg/ddw377.
- 6) Ma J, Asano Y, (5 番目、6 人省略). Histone Deacetylase Inhibitor Phenylbutyrate Exaggerates Heart Failure in Pressure Overloaded Mice independently of HDAC inhibition. *Sci Rep.* 2016 Sep 26;6:34036. doi: 10.1038/srep34036.
- 7) Kitagaki J, Asano Y, (3 番目、8 人省略). A Putative Association of a Single Nucleotide Polymorphism in GPR126 with

Aggressive Periodontitis in a Japanese Population.

PLoS One. 2016 Aug 10;11(8):e0160765.
doi: 10.1371/journal.pone.0160765.

8) Masumura Y, Asano Y, (3 番目、14 人省略). Btg2 is a Negative Regulator of Cardiomyocyte Hypertrophy through a Decrease in Cytosolic RNA. Sci Rep. 2016 Jun 27;6:28592. doi: 10.1038/srep28592.

9) Kanzaki M, Asano Y*, (2 番目、16 人省略). A Development of Nucleic Chromatin Measurements as a New Prognostic Marker for Severe Chronic Heart Failure. PLoS One. 2016;11(2):e0148209. doi: 10.1371/journal.pone.0148209.

[学会発表] (計 16 件: 総件数) **全て査読有**

1) 朝野仁裕, 多層化する循環器ゲノム研究、プレナリーセッション、第 82 回日本循環器学会学術集会、2018 年

2) 朝野仁裕, ゲノム診療が循環器医に求めるもの、教育セッション、第 123 回日本循環器学会近畿地方会、2017 年

3) 朝野仁裕, 次世代シーケンサーから見えてくる循環器疾患の病態「循環器希少難病に対する疾患ゲノム解析の実際と臨床応用」、特別講演、第 20 回小児心血管分子医学研究会、2017 年

4) 朝野仁裕, 「心筋症の遺伝子診断」、難治性遺伝性循環器疾患における全エクソーム解析と家系症例に対する臨床遺伝子診断の試み、シンポジウム、第 20 回日本心不全学会学術集会、2016 年

5) 朝野仁裕, 臨床医が学ぶ基礎医学講座「疾患ゲノム解析の進化と臨床への応用」、教育セッション、第 19 回日本心不全学会学術集会、2015 年

6) 朝野仁裕, 心筋症の遺伝子・分子医学・基礎と臨床「遺伝性心筋症における新たなゲノム情報解析による変異同定法の開発」、シンポジウム、第 1 回心筋症研究会、2015 年

[図書] (計 8 件)

1) 朝野仁裕, メジカルビュー社、「Heart View」 「心筋性状・機能診断を考える—病理と画像が意味するもの」、診る [Expertise] 遺伝子検査: ここまでわかる・ここまでできる、2017 年。

2) 朝野仁裕, 科学評論社、「循環器内科」、エピゲノム制御: 心不全病態の上流情報解析の precision medicine への応用、2017 年、

69.

3) 朝野仁裕, メジカルビュー社、「再生医療」、Precision Medicine、2017 年、

4) 朝野仁裕, 中外医学社、重症心不全の患者さんが来ました、第 10 章 遺伝子、2016 年

5) 朝野仁裕, 中外医学社、ここが知りたい、強心薬のさじ加減、急性心不全 4 章 「強心薬の効果が十分でない時の対応」、2016 年

6) 朝野仁裕, ニューサイエンス社、「細胞」、心不全研究の最前線「心不全における心筋エネルギー代謝と ATP 産生制御機構」、2016、574-577.

7) 朝野仁裕, 最新医学社、最新医学 別冊 診断と治療の ABC、「心不全」第 2 章 病態・病態生理、心筋症の原因遺伝子、2015 年、36-42.

8) 朝野仁裕, 科学評論社、「循環器内科」、循環器疾患の分子遺伝学、4. 心不全における分子遺伝学、2015 年、303-309.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

[その他] ホームページ

http://www.cardiology.med.osaka-u.ac.jp/?page_id=56

<http://www.medbio.med.osaka-u.ac.jp/>

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・講師

研究者番号: 60527670

(2) 研究分担者

塚本 蔵 (TSUKAMOTO Osamu)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 80589151

(3) 研究分担者

加藤 久和 (KATO Hisakazu)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 30589312