

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591097

研究課題名(和文)次世代エピゲノム解析および超微細構造解析を応用した難治性心不全発症機序の解明

研究課題名(英文)A New Diagnostics Method for Refractory Heart Failure

研究代表者

朝野 仁裕 (ASANO, YOSHIHIRO)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：60527670

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：臨床検体保存システムから得たヒト重症不全心筋細胞の細胞核ヘテロクロマチンの超微細構造解析を行った。画像解析と心不全可逆性マーカーの病理指標開発のため、クロマチン超微細構造の画像解析法を確立した。電子顕微鏡によりクロマチン構造を計測する本方法は、極めて高い感度特異度を示すこと、心エコー計測値、心臓線維化等の従来指標とは相関を示さない新しい計測値であることがわかった。また、心不全病態遺伝子発現解析のみならず、蛋白分離精製技術を用い生化学的機序の解明と心臓生体試料のクロマチン免疫沈降法を開発し、心不全特異的エンハンサー領域を新規同定するとともに生体イメージング可能な心不全モデルマウスを作成した。

研究成果の概要(英文)：Higher order structures in the cell nucleus have been demonstrated to change during development and differentiation. Such structural remodeling occurred in the cell nucleus can be observed as changes in high electron density areas called chromatin by electron microscopy. Alterations in nuclear chromatin structure have been reported some relation with physiological changes. Based on our experimental findings of chromatin remodeling as an upstream of pathological gene expression in cardiomyocytes, we focused on changes in nuclear chromatin structure of cardiomyocytes in patients with dilated cardiomyopathy (DCM). Using our original quantitation methods to analyze the ultrastructure of chromatin, we conducted a retrospective observational study assessing the ability to identify the DCM patients with severe heart failure at risk for poor outcomes, and to make an accurate and an early determination of the indication for some ventricular assist devices to support the failing heart.

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

(1) 遺伝子転写の細胞内記憶メカニズム：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り、転写因子上流に作用するエピジェネティック制御機序は細胞機能に重要な役割を果たすことが示され、発生・分化、再生、癌に関する研究分野で中心的研究が行われてきた。

(2) エピジェネティック制御が臓器共通に病態機序として働くことへの理解の深まり：細胞に共通して、環境の変化に応じたエピゲノム修飾変化が生じることが報告された。さらに神経系や免疫系などの生理機能/病態変化に対しても、同様に変化を生じ得ることが示された。

(3) 分裂性細胞のダイナミックな核内クロマチン構造変化と非分裂細胞との差違：分裂性細胞においては、生命現象に付随する遺伝子発現変化において、クロマチンリモデリングは速やかに生じるものと示唆されるが、心筋細胞を代表とする、非分裂性細胞におけるクロマチン動態は未だ十分明らかではない。

2. 研究の目的

(1) 従来の独創的手法：独自の心臓・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、常に新たな研究手法（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。

(2) 心不全病態に關与する核蛋白の同定：研究代表者は 2004 年に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形成蛋白質 HP1 との相互作用を明らかにした。さらに HP1 に関する詳細な分子機序も明らかにした。

(3) 次世代超高速 DNA シーケンサーおよび超微細構造観察が可能な電子顕微鏡解析の導入：最新技術の導入により、クロマチン高次構造変化とゲノムワイドなエピゲノム変化情報を連動させ、生物学的意義を理解するシステムを確立した。

(4) 研究代表者が構築した臨床検体保存システムから得たヒト重症心不全組織を対象に、H23 年度に運用を開始した次世代超高速 DNA シーケンスとそのパイオインフォマティクス解析を利用することで、本研究に適したエピゲノム変化を認める臨床検体を選定する。心臓移植や人工心臓植込み適応となる臨床病態症例を中心とした、重症心不全心筋細胞の細胞核ヘテロクロマチンの超微細構造解析を行う。非分裂細胞である心筋細胞特異的な DNA メチル化変化を同定し、分子生物学的意義を解明する。

3. 研究の方法

(A) クロマチン構造解析技術を利用した核クロマチン高次構造分類

(1) マウス心不全モデルによる評価：

マウス心不全組織を用いて透過型電子顕微鏡電子顕微鏡像によるクロマチン構造の構造分類を行う。さらに構造変化の分子生物学的意義を解明するため、急速凍結ディープエッチ電子顕微鏡法による超微細構造観察を行う。液化ヘリウムに浸した純銅上に試料を圧着、凍結破断後氷を昇華させる。

電子線トモグラフィーに急速凍結ディープエッチング法を組み合わせることで、立体的三次元的かつ nm 単位まで観察可能なハイコントラストな微細構造を観察することができる。

マウス圧負荷心不全モデルマウスを用い、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解析し、電子顕微鏡画像の病理学的分類を完成させ、ヒト検体解析に対する基礎的検討とする。

(2) ヒト不全心筋組織：

マウスにおいて確立した至適条件を利用し、ヒト病理検体を用いて同様のクロマチン高次構造解析を行う。

(B) 次世代エピゲノム解析結果を利用した特異的 DNA メチル化解析

(1) マウス不全心筋組織：

圧負荷心不全マウス心臓組織を用い、ABI SOLiD システムおよび Illumina HiSeq2000 の各システム機器を利用した、心不全エピジェネティック修飾変化 ChIP-seq および遺伝子発現変化 RNA-seq を既に行い、独自の「心不全エピゲノム統合データベース」として構築している。インフォマティクス解析についても独自に手法を確立している。

エピゲノムデータ情報とともに検討 A にて取得した電子顕微鏡構造解析クロマチン構造変化の定量データを比較し、それらの相関性を明らかにする。

(2) ヘテロクロマチン構造変化を来した心不全病態、病期を同定する。

(3) ヒト心不全組織検体を用いて in vivo エピジェネティック修飾変化 (ChIP-seq) および遺伝子発現変化 (RNA-seq) により構築されたゲノムデータベースを用い、構造解析結果によるクロマチン構造変化の定量データとの相関を明らかにする。

(4) 選定された対象心不全症例を用いて DNA メチル化解析を実施する (図 3 参照)。正常

ヒト心筋組織検体および心不全組織検体 (N=12) および正常非心臓組織検体を用いる。メチル化解析には Illumina 社 Infinium HumanMethylation450 BeadChip kit を用いる。同製品は 45 万か所のメチル化部位が高密度に Chip 上にデザインされており、精度の高いメチル化解析をゲノムワイドに行う。

4. 研究成果

難治性重症心不全の発症分子機序を解明し、心不全エピゲノム臨床診断法の確立を目指すため、国内有数の重症心不全組織検体、先進的次世代エピゲノム解析技術、独創的な超微細構造解析技術(心筋病理)を利用し、分子生物学と病理学を臨床診療に応用する研究を行った。

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り、転写因子上流に作用するエピジェネティック制御機序は細胞機能に重要な役割を果たすことが示され、発生・分化、再生、癌に関する研究分野で画期的な進展が数多くみられている。さらに環境の変化に応じたエピゲノム修飾変化が生じることが報告された。臨床分野に関連しても生理機能/病態変化に対するエピゲノム変化も多く示されてきた。

本研究においては、従来研究代表者らにより、エピゲノム関連分子を新規に同定し、心不全病態とエピゲノム変化の関連を提唱されてきた内容の発展的研究である。心筋症発症における細胞核クロマチンリモデリングおよびエピゲノムの重要性を世界に先駆け報告し(Nat Genet 2004)、独自の解析技術を開発しエピゲノム研究へ応用することに成功した。マウスの知見をヒトへ応用し、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が心不全病態変化に強く相関すること、クロマチン構造の変化は遺伝子発現や組織性状変化よりも上流でとらえられること、ヘテロクロマチンの領域サイズを表す定量計測法「クロマチンスコア」測定法を確立したことを報告した。心不全病態遺伝子発現解析(J Clin Invest 2007)のみに留まらず、独自の蛋白分離精製技術を用い生化学的機序の解明を行った(J Biol Chem 2010)、心臓生体試料のクロマチン免疫沈降法を独自に開発し、心不全特異的エンハンサー領域を世界で初めて同定に成功した。

(A) クロマチン構造解析技術を利用した核クロマチン高次構造解析: マウスにおいて確立した至適条件を利用し、ヒト病理検体を用いて同様のクロマチン高次構造解析を行った。透過型電子顕微鏡電子顕微鏡像によるクロマチン構造分類によりクロマチン定量法を開発した。その概念をヒト臨床に応用する

検討も行った。ヒト重症心不全組織 63 症例を用い、重症不全心筋細胞の細胞核ヘテロクロマチンの超微細構造解析により重症度分類を行う事に成功した。移植待機期間の長い我が国における、長期罹患最重症心不全は世界でも類を見ない。申請者の所属する研究機関は心臓移植拠点病院として重症心不全の最新の内科的治療と最先端の外科的治療(人工心臓、心臓移植、細胞シート治療)が実施され、長期間経時的に複雑なエピゲノム解析に必要な十分量の心臓検体が保存されており、約 150 検体を超える高精度な解析に必要な数の検体保存を行うことができた。画像解析と心不全可塑性サロゲートマーカーの病理指標の開発として細胞核クロマチン超微細構造の新規画像解析法を確立し、心不全病態と関連する分子修飾を報告した(論文投稿中)。画像解析と心不全可塑性サロゲートマーカーの病理指標の開発として細胞核クロマチン超微細構造の新規画像解析法を確立し、心不全病態と関連する分子修飾を報告した。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がわかった。

(B) 次世代シーケンス解析結果を利用した心臓病態特異的エピゲノム解析: ヒト心不全組織検体およびマウス組織検体を用いたエピジェネティック修飾変化(ChIP-seq)、遺伝子発現変化(RNA-seq)のゲノムデータベースを構築した。心不全特異的な発現を示す Nppb、Nppa 遺伝子の発現制御を行うエンハンサー領域の同定に成功した。さらにその領域を組み込んだベクターを作成し、心不全モニタリング同定が可能なレポーター遺伝子発現トランスジェニックマウスの樹立に成功した。(FASEB J 2014、特許出願済)

解析検体入手および解析方法の難しさから、臨床心臓エピゲノム研究は未だ黎明期にある。本研究において、豊富なヒト心臓検体と in vivo 解析法、超高速 DNA シーケンサー解析により、独自に臨床検体解析システムを構築した。さらに心不全病態におけるクロマチン構造変化の重要性を、世界に先駆けて解析し、臨床診療に結び付く基礎的研究基盤を整えた。心臓移植や人工心臓植込み適応となる臨床病態症例を中心とした、臨床検体保存システムから得たヒト重症心不全組織を対象に、重症不全心筋細胞の細胞核ヘテロクロマチンの超微細構造解析を行い、非分裂細胞である心筋細胞特異的な DNA メチル化変化を同定し、分子生物学的意義を解明した。慢性病態経過の中で非分裂性を有す心筋細胞が示す特有のエピジェネティック分子機序の病態意義を明らかにし、最新顕微鏡技術による超微細構造解析をガイドに、心不全病態特異的な構造変化を追究することで、心臓エピ

ゲノム臨床診断の新しい研究基盤を築くことができた。

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 8 件) 全て査読有

1) 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 Pdlm5.

Nature Communication. 2015;30;6:6137.

2) Hayashi T, Asano Y* (corresponding author), 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 YI, Ogura T, Kitakaze M, Komuro I, Sakata Y, Tsukihara T, Yoshikawa S, Takashima S.

Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. 112(5),1553-8

3) Asanuma H, Sanada S, Asakura M, Asano Y, Kim J, Shinozaki Y, Mori H, Minamino T, Takashima S, Kitakaze M. Carperitide induces coronary vasodilation and limits infarct size in canine ischemic hearts: role of NO.

Hypertens Res. 2014 Aug;37(8):716-23.

4) Kioka A, Kato A, Makoto 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* (corresponding author), Takashima S*.

Evaluation of intra-mitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014 Jan 7;111(1):273-8.

5) Matsuoka K, Asano Y* (corresponding author), 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.

6) Imai A, Gotoh K, Asano Y* (corresponding author), Yamada N, Motooka D, Fukushima M, Kanzaki M, Ohtani T, Sakata Y, Nishi H, Toda K, Sawa Y, Komuro I, Horii T, Iida T, Nakamura S, Takashima S.

Comprehensive metagenomic approach for detecting causative microorganisms in culture-negative infective endocarditis.

Int J Cardiol. 2014 Mar 15;172(2):e288-9.

7) Takahama H, Shigematsu H, Asai T, Matsuzaki T, Sanada S, Fu HY, Okuda, Yamato M, Asanuma H, Asano Y, Asakura M, Oku N, Komuro I, Kitakaze M, Minamino T. Liposomal amiodarone augments anti-arrhythmic effects and reduces hemodynamic adverse effects in an ischemia/reperfusion rat model.

Cardiovasc Drugs Ther. 2013 Apr;27(2):125-32.

8) Takahashi A, Asakura M, Ito S, Min KD, Shindo K, Yan Y, Liao Y, Yamazaki S, Sanada S, Asano Y, Ishibashi-Ueda H, Takashima S, Minamino T, Asanuma H, Mochizuki N, Kitakaze M. Dipeptidyl-Peptidase IV Inhibition Improves Pathophysiology of Heart Failure and Increases Survival Rate in Pressure-Overloaded Mice.

Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2013 May 15;304(10):H1361-9.

〔学会発表〕(計 12 件)

1) 第 11 回日本再生医療学会総会

「パネルディスカッション 再生医療に貢献する技術」心筋細胞の可塑性を判断する病理学的臨床指標の開発、朝野仁裕、2012 年 6 月 14 日、横浜

2) 第 29 回国際心臓研究学会(ISHR)日本部会総会、Featured Research Session 2、Title : Quantitative ChIP-sequence Analysis Reveals the Differentially Altered Active Epigenomic States in Murine Pressure-overloaded Failing Hearts、Shuichiro Higo, Yoshihiro Asano* (*; corresponding author)、2012 年 10 月 27 日、福岡

3) 米国心臓協会学術集会 American Heart Association Scientific Sessions 2012、

- Oral session : Novel Regulators of Cardiac Hypertrophy、 Title : Comprehensive quantitative epigenome mapping reveals the differential induction of histone H3 lysine 4 trimethylation marks in pressure-overloaded murine hearts、 Shuichiro Higo, Yoshihiro Asano* (*; corresponding author)、2012年11月5日、Los Angeles、USA
- 4) 第77回日本循環器学会学術集会、Young Investigator's Award Finalists Lectures 1st winner、 Title : G0/G1 Switch Gene 2 Promotes Mitochondrial ATP Production and Protects Cardiomyocytes from the Energy Crisis under Hypoxia、 Hidetaka Kioka, Yoshihiro Asano* (*; corresponding author), et al.,2013年3月15日、横浜
- 5) 第35回心筋生検研究会、Young Investigator's Award Finalists Lectures 1st winner、Y-9 心筋細胞核クロマチン形態は拡張型心筋症患者の予後不良予測因子となりうる、神崎万智子、朝野仁裕* (*; corresponding author)、2013年11月1日、東京
- 6) 第17回日本心不全学会学術集会、Young Investigator's Award Finalists Lectures 1st winner、YIA-BA-5 Heart Failure Specific Enhancer Regulates the Expression of Natriuretic Peptides、 Ken Matsuoka, Yoshihiro Asano* (*; corresponding author), et al., 2013年11月29日、埼玉大宮
- 7) 第78回日本循環器学会学術集会、Young Investigator's Award Finalists Lectures (Clinical study)、Morphometric and Quantitative Analysis in Cardiomyocyte's Nucleus were Associated with Poor Outcome in Patients with Idiopathic Dilated Cardiomyopathy、Machiko Kanzaki, Yoshihiro Asano* (*; corresponding author), et al., 2014年3月20日、東京
- 8) 第78回日本循環器学会学術集会シンポジウム、 Title : Research Strategies of Whole Exome Sequencing ~ Practical Approaches for 110 Patients (32 families) with Hereditary Cardiomyopathy and Arrhythmia ~、Yoshihiro Asano、2014年3月20日、東京
- 9) 第62回日本心臓病学会学術集会、シンポジウム 13 感染性心内膜炎の診断と治療のパラダイムシフト、培養陰性感染性心内膜炎に対する次世代シーケンサーを用いたメタゲノム診断、朝野仁裕、2014年9月26日(金) 仙台
- 10) 第62回日本心臓病学会学術集会、シンポジウム 4 心不全患者に対する多面的アプローチ、重症慢性心不全の病態可塑性判断を可能にする心臓病理エピゲノム診断指標の開発、朝野仁裕、2014年9月26日(金) 仙台
- 11) 第31回国際心臓研究学会 (ISHR) 日本部会、Symposium 2 「Heart Failure Research Update」 A New Diagnostics Method for Refractory Heart Failure、Yoshihiro Asano、2014年11月29日(土)、名古屋
- 12) 第44回日本心臓血管作動物質学会、シンポジウム S3-3 心不全研究のカッティング・エッジ、「拡張型心筋症の病態不可逆性を予測する新規心臓エピゲノム診断指標の開発」、朝野仁裕、2015年2月7日(土) 高松
- 〔図書〕(計 5 件)
- 1) 朝野仁裕、小室一成. 心不全の原因診断の進歩、心不全 (診断と治療 100 巻 9 号) 2012
- 2) 朝野仁裕. 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 (伊藤浩先生 編集・南光堂) 2012
- 3) 朝野仁裕、小室一成. 特集「エクソーム解析 成果と将来」「全エクソーム解析による難治性、循環器疾患の原因遺伝子の同定」医学のあゆみ 出版社: 医歯薬出版株式会社 2013. Vol. 245, No.5 415-421.
- 4) 朝野仁裕、循環器専門医 「特集 II: 第78回日本循環器学会学術集会」, 5. 網羅的ゲノム研究は循環器病学の臨床をいかに変えたか 遺伝/臨床/疫学情報のリンケージ「遺伝性循環器疾患の原因遺伝子同定における超高速シーケンサーを用いた全エクソーム解析戦略」2015年南光
- 5) 朝野仁裕、「循環器内科」第77巻第4号 (2015年4月)特集/循環器疾患の分子遺伝学、4. 心不全における分子遺伝学 Molecular Genetics of Heart Failure、2015年、科学評論社
- 〔産業財産権〕
出願状況 (計 1 件)

名称：心不全の重症度を無侵襲で経時的に正確に定量評価可能なマウス
発明者：高島成二、朝野仁裕、松岡研、塚本蔵
権利者：同上
種類：特許
番号：特願 2013-228824
出願年月日：2013 年 11 月 1 日
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ

<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・助教
研究者番号：60527670

(2)研究分担者：

肥後修一郎 (HIGO Shuichiro)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：00604034

(3)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

(4)研究分担者：

南野哲男 (MINAMINO Tetsuo)
大阪大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30379234

(5)研究分担者：

加藤久和 (KATO Hisakazu)
大阪大学・大学院医学系研究科・特任研究員
研究者番号：30589312

(6)研究分担者：

扇田久和 (OGITA Hisakazu)
滋賀医科大学・医学部・教授
研究者番号：50379236

(7)研究分担者：

真田昌爾 (SANADA Shoji)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70593797