

令和元年6月3日現在

機関番号：33703

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09509

研究課題名(和文) 心筋細胞の肥大核におけるエピジェネティック修飾とその病態的意義の探索

研究課題名(英文) Epigenetic modification in hypertrophied nuclei of the cardiomyocytes and its pathophysiological significance

研究代表者

竹村 元三 (Genzou, Takemura)

朝日大学・歯学部・教授

研究者番号：40283311

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)：心不全を呈する拡張型心筋症75症例、コントロール20症例の心筋生検標本を用いて5-methylcytosine(メチル化DNA)の免疫染色ならびに免疫電顕を施行した。メチル化DNAの増加は心筋細胞に限定され、その局在はヘテロクロマチンに集中していた。メチル化DNAは左室リモデリングの程度と正の相関を、左室機能と負の相関を示した。

心不全モデル動物として $\alpha$ -Sarcoglycan欠損心筋症マウスを用いた。10週令のマウスにDNAメチル化阻害薬5-Azacytidine 1 mg/kg/dayを投与したところ、6週後の生存率は無治療群では69%に対し治療群で100%と上昇を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

心筋細胞の肥大した核は従来その機能的意味が不明であったが、エピジェネティック変化ならびに病態との関連を明らかにすることでその意味の重要性を明らかにすることができる。

心不全動物モデルを用いて、エピジェネティック介入(DNAメチル化阻害薬)により心筋症の病態に変化が見られれば現実的かつ新しい心不全治療法のヒントがえられる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Methylated DNA was immunohistochemically detected in human endomyocardial biopsies. DNA methylation was greater in failing heart due to dilated cardiomyopathy (DCM, n=75) than in nonfailing hearts (n=20), of which increase was noted only in cardiomyocytes but not in other cell types. Methylated DNA predominantly localized on nuclear heterochromatin. DNA methylation was significantly correlated with hemodynamic parameters.

We treated 10-week-old delta-sarcoglycan deficient mice, an animal model of DCM, with 5-azacytidine, an inhibitor of DNA methylation at a dose of 1 mg/kg/day. Six weeks later, the survival rate was 100% in the treated mice while it was 69% in the vehicle-treated mice. We are now promoting the animal experiment by incorporating more mice and analyzing the cardiac tissue of the sacrificed mice pathologically and biochemically.

研究分野：循環器内科

キーワード：エピジェネティクス クロマチン・リモデリング DNAメチル化 心不全 拡張型心筋症

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

負荷を受けた心筋細胞は代償性肥大を来すが、肥大心や不全心的心筋細胞核もまた肥大のみならず著しい変性所見すなわち核クロマチンの凝集と核膜の皺襞の増大を呈する (Bizarre nucleus = 「奇怪な核」とも呼ばれる)。我々は以前からこのような核の形態学的変化(特に超微形態)に注目し、ヒト病的心臓の心筋細胞の核肥大をグレーディングしたが(Koda et al. *Circ J.* 2006)、不全心における核肥大の病態生理学的意義についてはよく判っていないのが現状である。

このような心筋細胞の肥大した核はエピジェネティック変化の表現型であるという可能性を我々は思いついた。すなわち一般的に核クロマチン凝集はヘテロクロマチンの増加を意味し、DNAメチル化、マイクロRNA発現やヒストンの化学修飾を反映しているといわれており、かつDNAの発現調節は細胞膜や核膜の構造変化により制御されるケースが証明されているからである。ヒト不全心筋でエピジェネティック変化を検討し、核形態や病態(心機能、リモデリング)との関連を探索することは学術的に意義深いと思われる。次に心不全の動物モデルを用いてエピジェネティック介入を行い、核肥大の病態的意義解明を深め、同時に心不全に対する新しい治療法開発の可能性を探索したい。

## 2. 研究の目的

まず、ヒト不全心における心筋細胞核肥大においてエピジェネティック変化(特にDNAメチル化の頻度と核内分布)を検討し、心機能や心筋病理など病態との関連を明らかにすること。次に心筋細胞核肥大を伴う動物の心不全モデルにおいて薬物的エピジェネティック介入が、核肥大そのものや心機能、リモデリング、遺伝子発現調節などの病態に影響するか否かを検討し、新しい心不全治療法の可能性を検証すること。

## 3. 研究の方法

### (1) ヒト心筋生検標本の検討

(1-1) 心筋生検標本と臨床データの収集最近10年間に岐阜大学循環器内科と岐阜ハートセンターにて施行された心筋生検症例約500例をサーベイし病態ごとに分類整理

### (1-2) 評価項目

- ・ 一般病理学的再評価：心筋細胞肥大、核肥大、変性、線維化等
- ・ 免疫染色：エピジェネティック変化についてメチル化DNAを抗5-methylcytosine抗体にて免疫組織化学的に同定
- ・ 電子顕微鏡/免疫電顕：核肥大を定量的に評価し、メチル化DNAの超微形態的局在を検討

(1-3) 核肥大、エピジェネティック修飾、ならびに病態(機能のおよび病的)の関連を検討

### (2) 核肥大を呈する心不全モデルにおけるエピジェネティック介入の検討

#### (2-1) モデル動物

-サルコグリカン欠損心筋症マウス

#### (2-2) エピジェネティック介入薬剤の候補

DNAメチル化阻害薬:アザシチジンを投与

#### (2-3) 心不全予防ならびに治療効果の検討

-サルコグリカン欠損マウスならびに同週令のバックグラウンドマウスに対し浸透圧ミニポンプにて4週間の薬剤投与を行い心不全発症予防ならびに治療効果を検討

#### (2-4) 核肥大、エピジェネティック変化、

臨床病態(心機能とリモデリング)の関連の検討

上記試料を病理学的かつ生化学的に検討し心不全病態とのパラメーター間の関連を調査

#### 4 . 研究成果

(1)心不全を呈する拡張型心筋症 75 症例、コントロール 20 症例の心筋生検標本を用いて 5-methylcytosine (メチル化DNA)の免疫染色ならびに免疫電顕を施行した。メチル化DNAの増加は心筋細胞に限定され、その局在はヘテロクロマチンに集中していた。メチル化DNAは左室リモデリングの程度と正の相関を、左室機能と負の相関を示した。

(2)心不全モデル動物として -Sarcoglycan 欠損心筋症マウスを用い、10 週令のマウスにDNAメチル化阻害薬 5-Azacytidine 1 mg/kg/day を投与したところ、6 週後の生存率は無治療群では69%に対し治療群で 100% と上昇を認めた。

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Okada H, Takemura G, Suzuki K, Oda K, Takada C, Hotta Y, Miyazaki N, Tsujimoto A, Muraki I, Ando Y, Zaikokuji R, Matsumoto A, Kitagaki H, Tamaoki Y, Usui T, Doi T, Yoshida T, Yoshida S, Ushikoshi H, Toyoda I, Ogura S. Three dimensional ultrastructure of capillary endothelial glycocalyx under normal and septic conditions. *Critical Care*. 2017; 26:261. DOI 10.1186/s13054-017-1841-8
2. Takemura G, Kanamori H, Okada H, Tsujimoto A, Miyazaki N, Miyata S, Ohta H, Kawase Y, Ono M, Mochizuki M, Kobayashi S, Onoue K, Nakano T, Sakaguchi Y, Matsuo H, Yano M, Saito Y. Mitochondrial deformity confined to a single cardiomyocyte in human endomyocardial biopsy specimens: Report of 4 cases. *J Cardiol Cases*. 2017 Aug 30;16(5):178-182. doi: 10.1016/j.jccase.2017.07.011.
3. Takemura G, Kanamori H, Okada H, Tsujimoto A, Miyazaki N, Takada C, Hotta Y, Takatsu Y, Fujiwara H. Ultrastructural aspects of vacuolar degeneration of cardiomyocytes in human endomyocardial biopsies. *Cardiovasc Pathol*. 2017 Jul 4;30:64-71. doi: 10.1016/j.carpath.2017.06.012.
4. Inagawa R, Okada H, Takemura G, Suzuki K, Ando Y, Oda K, Takada C, Hotta Y, Miyazaki N, Tsujimoto A, Zaikokuji R, Yano H, Matsumoto A, Doi T, Yoshida T, Yoshida S, Ushikoshi H, Toyoda I, Ogura S. Ultrastructural alteration of pulmonary capillary endothelial glycolcalyx under septic condition. *Chest*. 2018 Aug;154(2):317-325. doi: 10.1016/j.chest.2018.03.003.
5. Ando Y, Okada H, Takemura G, Suzuki K, Takada C, Tomita H, Zaikokuji R, Hotta Y, Miyazaki N, Yano H, Muraki I, Kuroda A, Fukuda H, Kawasaki Y, Okamoto H, Kawaguchi T, Watanabe T, Doi T, Yoshida T, Ushikoshi H, Yoshida S, Ogura S. Brain-specific ultrastructure of capillary endothelial glycocalyx and its possible contribution for blood brain barrier. *Sci Rep*. 2018 Nov 30;8(1):17523. doi: 10.1038/s41598-018-35976-2.
6. Takemura G, Kanamori H, Okada H, Watanabe T, Miyazaki N, Tsujimoto A, Goto K, Maruyama R, Fujiwara T, Fujiwara H. Anti-apoptosis in nonmyocytes and pro-autophagy in cardiomyocytes: Two strategies for mitigating heart failure through regulation of cell death and cell degeneration. *Heart Fail Rev*. 2018 Sep;23(5):759-772. doi: 10.1007/s10741-018-9708-x.
7. Takemura G, Onoue K, Nakano T, Nakamura T, Sakaguchi Y, Tsujimoto A, Miyazaki N, Watanabe T, Kanamori H, Okada H, Kawasaki M, Fujiwara T, Fujiwara H, Saito Y. Possible process for disposal of degenerative cardiomyocytes in human failing hearts: phagocytosis by a neighbor. *ESC Heart Fail*. 2019 Feb; 6(1): 208-2016. doi: 10.1002/ehf2.12383.

〔学会発表〕(計 2 件)

1. 2018ESC (2018.8.25-29. Munich, Germany) Best Poster: Watanabe T, Okada H, Kanamori H, Miyazaki N, Tsujimoto A, Nawa T, Tanaka T, Kawasaki M, Fujiwara T, Fujiwara H, Takemura G. In situ nuclear DNA methylation in human failing hearts with dilated cardiomyopathy.
2. 第 83 回日本循環器学会学術集会 (2019.3.29-31. 横浜) Watanabe T, Okada H, Kanamori H, Miyazaki N, Tsujimoto A, Takada C, Suzuki K, Nawa T, Tanaka T, Kawasaki M, Ogura S, Hotta Y, Fujiwara T, Fujiwara H, Takemura G. In Situ Nuclear DNA Methylation in Human Failing Hearts with Dilated Cardiomyopathy.

〔図書〕(計 3 件)

1. 竹村元三：「診断モダリティとしての心筋病理」 総論 6. 病理組織標本の観察法 b) 電子顕微鏡的評価 (編集)心筋生検研究会 (監修)和泉徹・廣江道昭 南江堂 2017
2. 竹村元三：循環器内科専門医バイブル 1 心不全 第 2 章 心不全を診るー心不全の診断心筋生検 pp.106-113 (総編集・専門編集)小室一成 中山書店 東京 2018 年 4 月 1 日
3. 竹村元三：日本臨床増刊「心不全 (第 2 版) 上巻ー最新の基礎・臨床研究の進歩ー」 アポトーシス・ネクローシス・オートファジー関連細胞死 pp.294-300 (編集)筒井裕之 日本臨床社 東京 2018 年 12 月 31 日

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

該当なし

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：金森 寛充

ローマ字氏名：KANAMORI, Hiromitsu

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：医学部附属病院

職名：講師

研究者番号 (8 桁)：20456502

研究分担者氏名：岡田 英志

ローマ字氏名：OKADA, Hideshi

所属研究機関名：岐阜大学

部局名：医学部附属病院

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：30402176

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：松尾 仁司

ローマ字氏名：MATSUO, Hitoshi

研究協力者氏名：宮崎 渚

ローマ字氏名：MIYAZAKI, Nagisa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。