

令和元年5月31日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16018

研究課題名(和文)心不全におけるセルフリーDNAのメチル化の検討

研究課題名(英文)Significance of cell-free DNA in heart failure

研究代表者

三阪 智史(Misaka, Tomofumi)

福島県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：50793080

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：マウスの大動脈縮窄による圧負荷心モデルを作成し、1週後の肥大心および4週後の不全心を用いた。DNAのバイサルファイト処理後、メチル化・非メチル化特異的PCRによるDNAメチル化解析では、Atp2a2やDux4のCpGアイランドでは肥大心・不全心ともコントロールと比べて差を認めなかった。ヒト血清中よりセルフリーDNAを抽出し、LINE1プライマーを用いたリアルタイムPCRでセルフリーDNAの定量解析を行った。心不全患者では心不全を有さない対象と比較して、セルフリーDNAの有意な増加を認めた。セルフリーDNAのメチル化解析では、デジタルPCRが必要であり、さらなる解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

循環血中セルフリーDNAは主に悪性腫瘍において研究が行われているが、心臓、とくに心不全におけるその意義については明確ではない。本研究では、心不全患者では、心不全を有さない対象と比較して、セルフリーDNAの有意な増加を認めた。方法論としてさらなる検討が必要であるが、心不全の病態・重症度に応じた特異的なDNAメチル化を同定しその程度を評価し得れば、メチル化セルフリーDNAが新たなバイオマーカー・予後指標になる可能性があると考えられ、引き続き解析を進める予定である。

研究成果の概要(英文)：The pressure-overload heart model by transverse aortic contraction in mice was generated. Analysis was performed by using the hypertrophic hearts at 1 week and failing hearts at 4 week after surgery. After bisulfite-conversion of the DNA was conducted, DNA methylation analysis by real-time PCR by methylation and unmethylated specific primers showed there were no differences between these diseased hearts and normal hearts in CpG island in ATP2A2 and Dux4. Next, cell-free DNA (cfDNA) were isolated from the serum samples of the patients with heart failure. Quantitative analysis of cfDNA by real-time PCR using LINE1 primer, levels of cfDNA were significantly increased in heart failure patients compared to the subject without heart failure. In the methylation analysis of cfDNA, due to the small amount of cfDNA, digital PCR would be needed to conduct further analysis of cfDNA methylation.

研究分野：心不全

キーワード：心不全 エピジェネティクス メチル化 セルフリーDNA

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

1. 研究開始当初の背景

心疾患は、単一遺伝子で決定される例は多くはなく、ほとんどは環境要因や遺伝的素因が複雑に影響し発症する多因子疾患である。環境因子がどのように遺伝子情報に作用するかについては、エピジェネティクスといわれる DNA の配列変化によらない遺伝子発現を制御・伝達するシステムが重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。主なメカニズムとして DNA メチル化とヒストン修飾があるが、心疾患におけるヒストン修飾については、これまで多く研究されているのに対して、DNA メチル化の詳細、とくに心不全におけるその意義についてはいまだ明確ではない。DNA メチル化は主に CG ジヌクレオチドの C5 位置のシトシン残基において起こる。DNA メチル化は、発生学的に胚の発達に重要であり、また異常 DNA メチル化は、悪性腫瘍で大きく関与している (N Engl J Med. 2008; 13358: 1148-1159)。加齢においてもメチル化模様は変化する (Aging Cell. 2015; 14: 924-932)。一方、心疾患における DNA メチル化については、その意義についてはまだ一定の見解は得られていない。特発性心筋症や (Embo Mol Med. 2013; 5: 413-429)、先天性心疾患 (Epigenetics. 2015; 10: 167-177) においては、特定領域のメチル化異常が報告されているが、心不全の病態において、心臓リモデリングの進行におけるその意義については明らかではない。

そして、血液中に存在する細胞内 DNA 以外のセルフリー DNA のメチル化に着目した。悪性腫瘍において、がん細胞の細胞死によりがんゲノム DNA が血中に漏出し、それを検出することで早期診断のマーカーとなることが報告されている (Br J Cancer. 2015; 28: 476-483)。母体血液中には胎児 DNA が存在しこれを利用して出生前診断として海外で臨床応用されており (Genet Med. 2011; 13: 913-920)、またセルフリー DNA が心肺停止症例の予後因子となると報告されている (Critical Care. 2010; 14: R47)。がん患者において、セルフリー DNA のある特定のメチル化を検査し、それが新しい早期診断のマーカーとなるだけでなく、予後予測因子ともなることが示唆されている (Front Mol Biosci. 2015; 2: 13, Anticancer Res. 2015; 35: 997-1007)。さらに、がんのみでなく、アルコール性脂肪肝患者でセルフリー DNA の PPAR のプロモーター領域にメチル化増加を認め、アルコール性脂肪肝の診断および重症度判定に有用であると報告された。心不全の病態においては、心筋細胞が非可逆的に障害を受けると、心筋細胞のトロポニンが血中に流出され、それを測定することで、心不全のリスク評価だけでなく、治療指標となると認識されている (Circulation . 2001; 103: 369-374)。心不全の病態・重症度に応じた特異的な DNA メチル化を同定しその程度を評価し得れば、メチル化セルフリー DNA が新たなバイオマーカー・予後指標になる可能性があると考えられる。また、現在、DNA メチル化阻害剤は骨髄線維症の治療に用いられているが、ラットのカテコラミン誘発性心筋症モデルに有効との報告があり (Cardiovasc Res. 2014; 101: 373-382)、DNA メチル化阻害剤が新しい心不全治療薬としての可能性がある。セルフリー DNA のメチル化測定の結果、メチル化の増加を認めた症例には、DNA メチル化阻害剤が新たな治療法の選択肢となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究ではマウス心不全モデルおよびヒト心不全の血液検体を用いて、DNA メチル化解析を行い、それが心不全の病態においてどのような変化するかヒト血液サンプルのセルフリー DNA のメチル化を解析することで、それが新たな心不全のバイオマーカーとなるか検討する。

3. 研究の方法

1) マウス大動脈狭窄による圧負荷心不全モデルの作成

マウスの大動脈弓部に狭窄を作成し左室に圧負荷をかけると、左室は肥大し、長期的には非代償性の心不全に陥る。術後 1、4 週後に心臓超音波検査を行い、心機能を評価し、マウスをサクリファイスし、心重量・肺重量を測定する。手術 1 週後の心機能低下を認めないマウス心不全肥大モデルとして扱う。

2) マウス不全心における DNA メチル化解析

心臓を摘出し、DNA を抽出する。抽出した DNA をバイサルファイト処理により非メチル化シトシンをウラシルへと変換する。心臓リモデリングのプロファイルと関連性があると考えられている遺伝子のプロモーター領域、および過去の報告例を検索し、その部位のメチル化を解析する。一般的に、プロモーター領域の DNA メチル化は遺伝子の転写抑制に影響すると考えられているが、解析を行う領域として、Ca ハンドリングに関与する SERCA2、血管新生に関与する PECAM1 (PLoS One. 2010; 5: e8564, Circ Res. 2016; 118(5): 786-797) のプロモーター領域をターゲットとし、また DUX4、PITX2 の gene body 領域において、メチル化非メチル化を想定したプライマーを設計し、メチル化/非メチル化 DNA 特異的リアルタイム PCR により半定量化する。

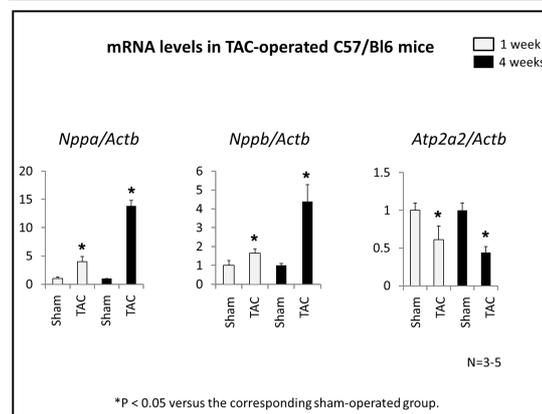
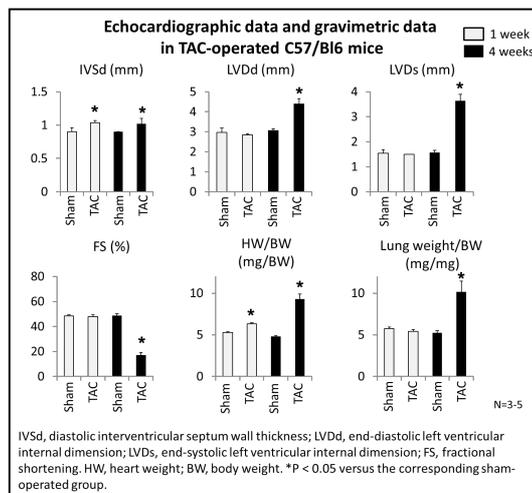
3) ヒト血清中セルフリー DNA 検体の抽出と、メチル化解析

健常者および患者血液から得た血液サンプルを、細胞成分を遠心分離し、血清中よりセルフリー DNA を抽出する。DNA は微量であるため、高効率な DNA 抽出キットを用いる (Clin Chim Acta. 2011; 20: 2085-2088)。DNA 抽出後は、バイサルファイト反応後、メチル化/非メチル化 DNA

特異的リアルタイム PCR によりメチル化を半定量化しヒト臨床像に合わせたマウスの心不全モデルを作成し、心臓から DNA を抽出し、DNA メチル化解析を行う。メチル化解析には、特定領域のメチル化/非メチル化 DNA 特異的リアルタイム PCR を用いる。さらに、ヒト血液サンプルからセルフフリーDNA を抽出し、メチル化解析を行い、臨床像と比較することで、それが新しいバイオマーカーおよび脱メチル化をターゲットとした治療対象になり得るかどうかを検討する。

4. 研究成果

1) マウス大動脈狭窄 (transverse aortic constriction, TAC) による圧負荷心不全モデルにおける DNA メチル化解析
 マウスに TAC 手術を行い、コントロールとしてはシャム手術を行った。手術 1 週間後、心エコーでの心室中隔壁厚の有意な増加および心重量・体重比の増加を認めたと左室短縮率の低下を認めない肥大心呈していた。4 週間後では左室短縮率の有意な低下および肺重量・体重比は有意な増加を認め非代償性の不全心呈していた (右図上)。肥大心および不全心の心臓組織から RNA を抽出し、RT-qPCR による mRNA を解析した。Nppa, Nppb 発現は TAC 後では有意に増加していたが、Atp2a2 は、有意に低下していた (右図下)。ついで、Atp2a2 のプロモーター領域の CpG アイランドにおけるメチル化解析を行うため、DNA のバイサルファイト処理を行った後、メチル化/非メチル化 DNA 特異的プライマーを作成して、リアルタイム PCR により半定量化した。結果、Atp2a2 のプロモーター領域における DNA メチル化は、肥大心、不全心ともコントロールと比較して差を認めず、Atp2a2 の mRNA 発現低下の regulation には、DNA メチル化は関与していないことが示唆された。さらに、過去の報告より (Circulation. 2011;124:2411-2422) Dux4 をターゲットに、同様に CpG アイランドにおいて、メチル化/非メチル化 DNA 特異的プライマーを用いたメチル化解析を行ったが、肥大心、不全心ともコントロール群と比較して差を認めなかった。



2) ヒト血清中セルフフリーDNA 検体の抽出と、メチル化解析

臨床研究プロトコールについては、福島県立医科大学倫理委員会にて承認を受けてから研究を開始した。検体の採取は文書による同意取得後に行った。セルフフリーDNA 専用スピッツを用いて、心不全患者より採血し、高効率なセルフフリーDNA 抽出キットを用いて、セルフフリーDNA を抽出した。コントロールには、心不全を認めない症例を対象とした。セルフフリーDNA の定量解析目的に、LINE1 をターゲットとしてプライマーおよび Taqman プローブを設計した。結果、心不全患者は、心不全を有さない対象と比較して、有意にセルフフリーDNA の増加を認めた。次いで、セルフフリーDNA をバイサルファイト処理し、セルフフリーDNA のメチル化解析を行った。FAM101A をターゲットに、セルフフリーDNA のメチル化解析を、メチル化/非メチル化 DNA 特異的プライマーを用いたリアルタイム PCR により半定量化したが、セルフフリーDNA が極微量であり、解析可能なデータとして得られなかった。そのため、デジタル PCR を用いた絶対定量により、継続して解析を行っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

Misaka Tomofumi, Yoshihisa Akiomi, Yokokawa Tetsuro, Sato Takamasa, Oikawa Masayoshi, Kobayashi Atsushi, Yamaki Takayoshi, Sugimoto Koichi, Kunii Hiroyuki, Nakazato Kazuhiko, Takeishi Yasuchika. Plasma levels of melatonin in dilated cardiomyopathy. Journal of Pineal Research 2019; 66: e12564-e12564.

Yoshihisa Akiomi, Abe Satoshi, Kiko Takatoyo, Kimishima Yusuke, Sato Yu, Watanabe Shunsuke, Kanno Yuki, Miyata-Tatsumi Makiko, **Misaka Tomofumi**, Sato Takamasa, Suzuki Satoshi, Oikawa Masayoshi, Kobayashi Atsushi, Yamaki Takayoshi, Kunii Hiroyuki, Nakazato Kazuhiko,

Ishida Takafumi, Takeishi Yasuchika. Association of Serum Zinc Level With Prognosis in Patients With Heart Failure. *Journal of Cardiac Failure* 2018; 24: 375-383.

Yoshihisa Akiomi, Yokokawa Tetsuro, **Misaka Tomofumi**, Oikawa Masayoshi, Kobayashi Atsushi, Yamaki Takayoshi, Sugimoto Koichi, Kunii Hiroyuki, Nakazato Kazuhiko, Takeishi Yasuchika. Soluble neprilysin does not correlate with prognosis in pulmonary hypertension. *ESC Heart Failure* 2019; 6: 291-296.

Sato Yu, Yoshihisa Akiomi, Kimishima Yusuke, Kiko Takatoyo, Kanno Yuki, Yokokawa Tetsuro, Abe Satoshi, **Misaka Tomofumi**, Sato Takamasa, Oikawa Masayoshi, Kobayashi Atsushi, Yamaki Takayoshi, Kunii Hiroyuki, Nakazato Kazuhiko, Takeishi Yasuchika. Low T3 Syndrome Is Associated With High Mortality in Hospitalized Patients With Heart Failure. *Journal of Cardiac Failure* 2019; 25: 195-203.

Kiko Takatoyo, Yoshihisa Akiomi, Kanno Yuki, Yokokawa Tetsuro, Abe Satoshi, Miyata-Tatsumi, Makiko, **Misaka Tomofumi**, Oikawa Masayoshi, Kobayashi Atsushi, Ishida Takafumi, Takeishi Yasuchika. A Multiple Biomarker Approach in Patients with Cardiac Sarcoidosis. *International Heart Journal* 2018; 59: 996-1001.

Takahashi Tomoko, Yoshihisa Akiomi, Sugimoto Koichi, Yokokawa Tetsuro, **Misaka Tomofumi**, Kaneshiro Takashi, Oikawa Masayoshi, Kobayashi Atsushi, Nakazato Kazuhiko, Ishida Takafumi, Takeishi Yasuchika. Associations between diabetes mellitus and pulmonary hypertension in chronic respiratory disease patients. *PLoS ONE* 2018; 13: e0205008.

〔学会発表〕(計 17 件)

Tomofumi Misaka, Akiomi Yoshihisa, Yasuhiro Ichijo, Takatoyo Kiko, Yusuke Kimishima, Yu Sato, Yuki Kanno, Mai Takiguchi, Tetsuro Yokokawa, Satoshi Abe, Takamasa Sato, Masayoshi Oikawa, Atsushi Kobayashi, Takayoshi Yamaki, Hiroyuki Kunii, Kazuhiko Nakazato, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi. Plasma levels of melatonin in dilated and hypertrophic cardiomyopathies. 第 83 回 日本循環器学会学術集会 2019.

三阪智史, 義久精臣, 一條靖洋, 喜古崇豊, 君島勇輔, 佐藤 悠, 菅野優紀, 滝口 舞, 横川哲朗, 阿部諭史, 佐藤崇匡, 及川雅啓, 小林淳, 八巻尚洋, 國井浩行, 中里和彦, 石田隆史, 竹石恭知. Prognostic impact of restless legs syndrome on patients with heart failure. 第 83 回 日本循環器学会学術集会 2019.

Tomofumi Misaka, Kinya Otsu, Yasuchika Takeishi. Cardio-protective role of FKBP8 during pressure overload by preventing accumulation of misfolded proteins and ER-associated apoptosis. *Cardiovascular and Metabolic Week 2018: International Society for Heart Research (ISHR), The 35th Annual Meeting of the Japanese Section* 2018.

Tomofumi Misaka, Akiomi Yoshihisa, Yasuhiro Ichijo, Takatoyo Kiko, Yusuke Kimishima, Yu Sato, Yuki Kanno, Mai Takiguchi, Tetsuro Yokokawa, Satoshi Abe, Takamasa Sato, Masayoshi Oikawa, Atsushi Kobayashi, Takayoshi Yamaki, Hiroyuki Kunii, Kazuhiko Nakazato, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi. Prognostic impact of restless legs syndrome on hospitalized heart failure patients. *Scientific Sessions of American Heart Association* 2018.

Tomofumi Misaka, Akiomi Yoshihisa, Yasuhiro Ichijo, Takatoyo Kiko, Yusuke Kimishima, Yu Sato, Yuki Kanno, Mai Takiguchi, Tetsuro Yokokawa, Satoshi Abe, Takamasa Sato, Masayoshi Oikawa, Atsushi Kobayashi, Takayoshi Yamaki, Hiroyuki Kunii, Kazuhiko Nakazato, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi. Plasma levels of melatonin in dilated and hypertrophic cardiomyopathies. *Scientific Sessions of American Heart Association* 2018.

Yusuke Kimishima, Akiomi Yoshihisa, Yasuhiro Ichijo, Yu Sato, Takatoyo Kiko, Yuki Kanno, Mai Takiguchi, Tetsuro Yokokawa, Satoshi Abe, **Tomofumi Misaka**, Takamasa Sato, Masayoshi Oikawa, Atsushi Kobayashi, Takayoshi Yamaki, Hiroyuki Kunii, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi. Change in left ventricular ejection fraction and its impact on prognosis in heart failure patients with mid-range ejection fraction. *Scientific Sessions of American Heart Association* 2018.

Koichi Sugimoto, Yusuke Kimishima, **Tomofumi Misaka**, Kazuhiko Nakazato, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi. Effect of endothelin-1 stimulation in the expression of activin receptor-like kinase-1 (ALK-1) in human pulmonary arterial endothelial cells. Cardiovascular and Metabolic Week 2018: International Society for Heart Research (ISHR), The 35th Annual Meeting of the Japanese Section 2018.

Yusuke Kimishima, Akiomi Yoshihisa, Yasuhiro Ichijo, Takatoyo Kiko, Yu Sato, Yuki Kanno, Mai Takiguchi, Tetsuro Yokokawa, Satoshi Abe, **Tomofumi Misaka**, Takamasa Sato, Masayoshi Oikawa, Atsushi Kobayashi, Takayoshi Yamaki, Hiroyuki Kunii, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi. Characteristics and outcomes of recovered left ventricular ejection fraction in heart failure patients with reduced ejection fraction. Scientific Sessions of American Heart Association 2018.

Masayoshi Oikawa, Akiomi Yoshihisa, Yasuhiro Ichijo, Takatoyo Kiko, Yusuke Kimishima, Yu Sato, Yuki Kanno, Mai Takiguchi, Tetsuro Yokokawa, Satoshi Abe, **Tomofumi Misaka**, Takamasa Sato, Atsushi Kobayashi, Takayoshi Yamaki, Hiroyuki Kunii, Kazuhiko Nakazato, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi. Scientific Sessions of American Heart Association 2018.

Koichi Sugimoto, Akiomi Yoshihisa, Tetsuro Yokokawa, **Tomofumi Misaka**, Masayoshi Oikawa, Atsushi Kobayashi, Takayoshi Yamaki, Hiroyuki Kunii, Kazuhiko Nakazato, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi. Impact of combined post capillary pulmonary hypertension based on upcoming diagnostic criteria on the prognosis of pulmonary hypertension due to left-sided heart disease. Scientific Sessions of American Heart Association 2018.

Koichi Sugimoto, Akiomi Yoshihisa, Tomoko Takahashi, Tetsuro Yokokawa, **Tomofumi Misaka**, Masayoshi Oikawa, Atsushi Kobayashi, Takayoshi Yamaki, Hiroyuki Kunii, Kazuhiko Nakazato, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi. Impact of diabetes mellitus on the prediction for pulmonary hypertension in the patients with chronic respiratory disease. Scientific Sessions of American Heart Association 2018.

Yu Sato, Akiomi Yoshihisa, Yusuke Kimishima, Takatoyo Kiko, Yuki Kanno, Tetsuro Yokokawa, Satoshi Abe, **Tomofumi Misaka**, Takamasa Sato, Masayoshi Oikawa, Atsushi Kobayashi, Takayoshi Yamaki, Hiroyuki Kunii, Kazuhiko Nakazato, Yasuchika Takeishi. Low T3 syndrome is associated with high mortality and impaired exercise capacity in hospitalized patients with heart failure. Scientific Sessions of American Heart Association 2018.

Yuki Kanno, Akiomi Yoshihisa, Yasuhiro Ichijo, Takatoyo Kiko, Yusuke Kimishima, Yu Sato, Mai Takiguchi, Tetsuro Yokokawa, Satoshi Abe, **Tomofumi Misaka**, Takamasa Sato, Masayoshi Oikawa, Atsushi Kobayashi, Takayoshi Yamaki, Hiroyuki Kunii, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi. Prognostic impact of periodic leg movements during sleep on patients with heart failure. Scientific Sessions of American Heart Association 2018.

Koichi Sugimoto, Akihiko Sato, Satoshi Suzuki, Tetsuro Yokokawa, **Tomofumi Misaka**, Kazuhiko Nakazato, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi. Senescence marker protein 30 affects phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase in hypoxia-induced pulmonary hypertension in mice. Scientific Sessions of American Heart Association 2018.

Tetsuro Yokokawa, Akiomi Yoshihisa, Yasuhiro Ichijo, Takatoyo Kiko, Yusuke Kimishima, Yu Sato, Mai Takiguchi, Satoshi Abe, **Tomofumi Misaka**, Takamasa Sato, Masayoshi Oikawa, Atsushi Kobayashi, Takayoshi Yamaki, Hiroyuki Kunii, Kazuhiko Nakazato, Takafumi Ishida, Yasuchika Takeishi. Soluble neprilysin does not correlate with outcome in hypertrophic cardiomyopathy. Scientific Sessions of American Heart Association 2018.

Tomofumi Misaka, Kinya Otsu, Yasuchika Takeishi. FKBP8 protects the heart from hemodynamic stress by preventing the accumulation of misfolded proteins and endoplasmic reticulum-associated apoptosis in mice. 第22回 日本心不全学会学術集会 2018.

Tomofumi Misaka, Kinya Otsu, Yasuchika Takeishi. FKBP8 protects the heart by preventing accumulation of misfolded protein and ER-associated apoptosis. The 2nd JCS Council Forum on Basic Cardio Vascular Research 2018.

〔図書〕(計 1 件)

三阪智史, 竹石恭知. バイオマーカーを使いこなす (特集 拡張型心筋症のすべて : 遺伝子診断から緩和ケアまで). 循環器内科 2019; 85(2): 173-178.

〔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 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

なし

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁):

なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名 :

ローマ字氏名 :

なし

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。