

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790747

研究課題名(和文)

エピジェネティック解析技術を用いた心不全の病態解明と新規治療法の確立

研究課題名(英文)

Epigenetic analysis and establishment of novel therapy for heart failure

研究代表者

金田 るり (KANEDA RURI)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：70465029

研究成果の概要(和文)：

我々はこれまでに心不全特異的なエピジェネティック変化として、ヒストン H3 リシン K4 のトリメチル化、H3K9 のトリメチル化変化を同定した。H3K9 のトリメチル化状態に影響を及ぼすことが示唆されるメチル基転移酵素阻害薬 (Chaetocin) が、遺伝性食塩感受性高血圧ラットにおいて、心不全の予後改善効果を有するか否か検討した。Chaetocin は不全期における心臓収縮能を改善させ、長期投与した動物では、生存期間も延長傾向を示した。

研究成果の概要(英文)：

We previously identified heart failure-specific epigenetic marks, trimethylation of histone H3 on lysine-4 (K4TM) or lysine-9 (K9TM) with using ChIP-on-chip analysis on the left ventricular cardiomyocytes of Dahl salt-sensitive rats which are genetically intolerant to excessive salt intake. In this project, we investigated whether administering an inhibitor of histone modifying enzyme which affects the trimethylation status on H3K9 ameliorates left ventricular dysfunction or not. Left ventricular contraction at failing stage has restored by administration of an inhibitor of H3K9 methyltransferase, Chaetocin. The inhibitor had a tendency to prolong survival term of animals. The intervention for heart failure-specific epigenetic alteration might become a novel therapeutic strategy for heart failure.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：分子心臓病態学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・循環器内科学

キーワード：心不全、エピジェネティクス、ヒストン修飾酵素阻害薬

1. 研究開始当初の背景

心臓に対する様々な液性因子刺激や物理的負荷が長期に加わると心筋収縮力の低下がもたらされ、臨床的には「心不全」と呼ばれ

る病態へと至る。一旦低下した心機能を回復することは現在でも極めて困難であり、心不全の治療法として根治的なものは心臓移植以外に未だ確立されていない。これまで国内

外から、エピジェネティックな変化のうち、核内ヒストン蛋白のアセチル化が心肥大や心不全の病態に重要な役割を果たすという報告がされてきたが、我々が行った疾患モデル動物である Dahl ラットの心筋を用いた ChIP-on-chip 解析の結果からは、心不全時にはヒストン H3 リシン K4 (H3K4) のトリメチル化 (TM) および H3K9 の TM 領域が大きく変化していることが明らかとなった。これらの心不全特異的なダイナミックなエピジェネティック変化は、心不全におけるグローバルな遺伝子発現変化を制御している可能性があると考えた。

2. 研究の目的

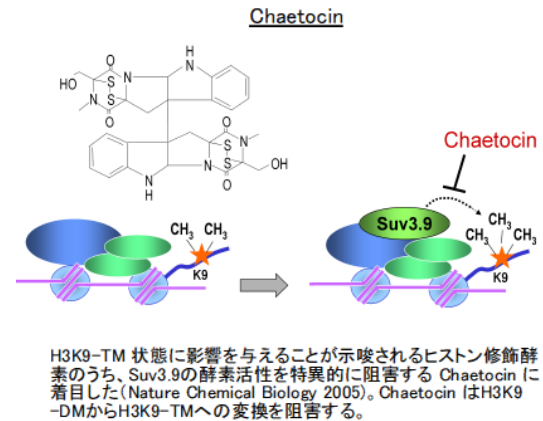
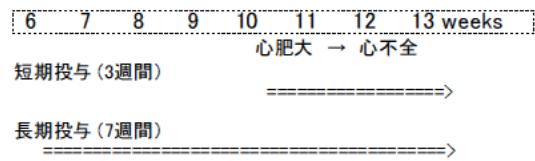
心不全特異的なエピジェネティック変化である H3K4TM, H3K9TM 状態に影響を及ぼすことが予測されるヒストン修飾酵素阻害薬が、疾患モデル動物の心不全の予後を改善するか検討する。実際に心不全の予後改善効果を有するのであれば、これまで心不全の病態に深く関わることで報告されてきた遺伝子や低分子 RNA のうちいかなるものの発現変化に影響を及ぼし予後改善させたのか明らかにする。

3. 研究の方法

遺伝性食塩感受性高血圧ラットである Dahl ラットを 6 週齢から低食塩餌 (0.3% 食塩含有) もしくは高食塩餌 (8% 食塩含有) に分類し飼育した。

H3K9 メチル基転移酵素 Suv3.9 に対する活性阻害薬である Chaetocin は Sigma-Aldrich Japan より購入し、dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich Japan) に溶解後、短期投与群には 10 週齢から、長期投与群には 6 週齢から、0.25mg/kg の濃度で腹腔内投与した。コントロール群には DMSO のみを投与した。

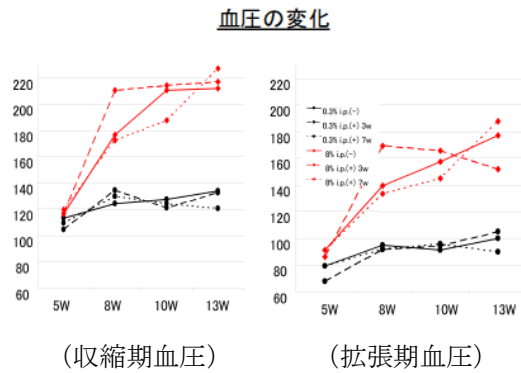
Chaetocin 投与プロトコール



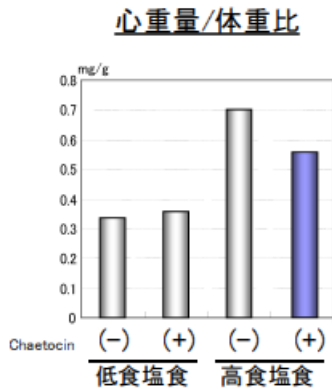
8 週、10 週、13 週齢の時点で Softron 社の非観血式自動血圧測定装置を用いて tail-cuff 法により血圧を測定した。不全期 (13 週齢) において、Visual Sonics 社の Vevo を用いて、セボフルレン吸入麻酔下に、左室収縮能を左室駆出率 (ejection fraction: EF) の値で評価した。不全期ラットの心臓組織を抽出後、心重量/体重比を測定し、左室心筋から Ambion 社の mirVana を用いて RNA を抽出した。RNA 1ug から cDNA を合成後、7500 real-time PCR System (Applied Biosystems) により glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gapdh) を中間補正遺伝子とし、natriuretic peptide A (Nppa) 遺伝子の発現量を定量評価した。PCR に用いたプライマー&プローブセットは、Applied Biosystems 社の Rn 01775763 (Gapdh), Rn 00561661 (Nppa) を使用した。一部のクールにおいては、生存期間を評価するために、高食塩負荷群のラットがすべて死亡するまで飼育を継続した。

4. 研究成果

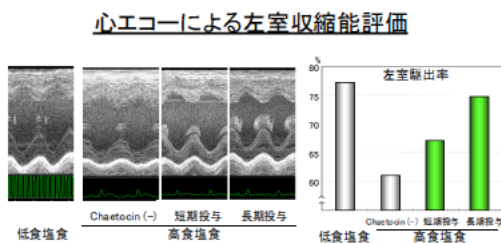
(1) 高食塩負荷群のラットの血圧は、負荷後数週間で速やかに上昇した。Chaetocinの投与は、長期投与・短期投与のいずれにおいても血圧に明らかな変化を及ぼさなかった。



(2) 高食塩負荷に伴い、不全期（13週齢）における心重量/体重量比は増加したが、Chaetocin 投与により抑制傾向を示した。

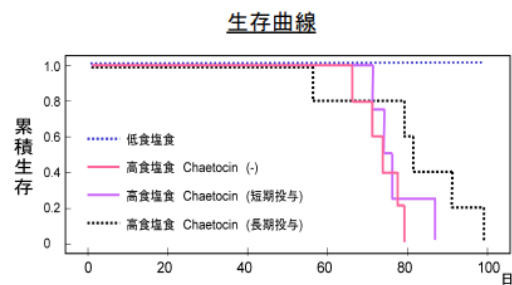


(3) 心エコーによる左室駆出率 (ejection fraction: EF) は、Chaetocin 短期投与で改善傾向を示し、7週間の長期投与でほぼ正常まで復する結果が得られた。



(4) Real-time RT-PCR法によるNppa遺伝子の発現量は、高食塩負荷で増加したが、Chaetocin 投与で約60%程度までの抑制傾向を示した。

(5) 累積生存期間を検討したクール（各群 n=4~5）においては、Chaetocin の投与期間に比例して、生存期間の延長傾向が認められた。



心不全特異的エピジェネティック変化の一種として同定したヒストンH3K9のTM状態を制御するヒストンメチル基転移酵素 Suv3.9 の活性阻害は、不全期心筋の収縮能を改善し、心不全の予後を改善する可能性が示唆された。

これまで、心疾患の病態に深く関与すると報告されてきたアセチル化に影響を及ぼすヒストン脱アセチル化酵素の阻害薬のみならず、ヒストンメチル基転移酵素阻害薬の活用は、心不全の新規治療薬として、今後検討を深める価値があると考えられる。

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0件)

[学会発表] (計2件)

- (1) 小野智彦、金田るり、他. Epigenetic therapy for heart failure. Keystone Symposia, 2011年2月24日、コロラド州、アメリカ合衆国
- (2) 金田るり、他. H3K9メチル基転移酵素阻害薬による心不全改善効果の検討. 第33回日本分子生物学会年会、2010年12月10日、神戸

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金田 るり (KANEDA RURI)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：70465029

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

小野 智彦 (ONO TOMOHIKO)
慶應義塾大学・医学部・研究員 (非常勤)
研究者番号：80571249

西山 崇比古 (NISHIYAMA TAKAHIKO)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：20464844