

研究報告書

「エピジェネティック治療を目指した心不全の病態解明」

研究タイプ：通常型

研究期間：平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者：金田 るり

1. 研究のねらい

慢性心不全は、高血圧、虚血性心疾患、心筋症、弁膜症などの様々な循環器疾患の終末像であり、重症心不全の予後は、悪性腫瘍と同様極めて不良である。 β 遮断薬やレニン・アンジオテンシン・アルドステロン系抑制薬は慢性心不全の予後を改善するが、重症例に対しては、補助循環装置や心臓移植などの非薬物療法に頼らざるを得ないのが現状である。人口の高齢化に伴い、心不全による死亡率のさらなる上昇が予測され、心不全の新規治療法の開発は急務の課題である。

不全心筋では、正常心筋と比較し、心筋構造蛋白の胎児型アイソフォームへの変換やミトコンドリア機能関連遺伝子・酸化的リン酸化・線維化などに関与する多数の遺伝子発現変化が観察される。本研究者は、この多数の遺伝子発現変化の背景として、エピジェネティック制御が重要なのではないかと考えた。これまで、心肥大・心不全の基礎研究領域では、エピジェネティックな変化のうち、ヒストンのアセチル化を中心に研究が進められてきた。治療への応用に関しても、ヒストン脱アセチル化酵素 (histone deacetylase: HDAC) 阻害薬は、心肥大や線維化などの心臓リモデリングを抑制すると報告されている。しかしながら、我々がこれまでに行った疾患モデル動物の左室心筋を試料とした解析結果では、不全心筋では正常心筋と比較し、ヒストンのアセチル化よりもヒストン H3 リシン 4 のトリメチル化 (H3K4me3) あるいはヒストン H3 リシン 9 のトリメチル化 (H3K9me3) の分布が大きく異なっていた。そこで、この H3K4me3 あるいは H3K9me3 を慢性心不全特異的エピジェネティック変化ととらえ、これらを制御することが、慢性心不全の予後改善につながるのではないかと考えた。

2. 研究成果

(1) 概要

慢性心不全特異的エピジェネティック変化の 1 種ととらえた H3K9me3 の制御が心不全モデル動物の予後を改善し得るか否か検討した。*Chaetomium* 種の真菌から抽出された chaetocin (H3K9me2 から H3K9me3 へ変換するメチル基転移酵素である Suv39h1 の活性阻害薬) は、Dahl ラットの血圧には影響を及ぼさず、心肥大から心不全への移行を遅らせることにより、心不全ラットの累積生存期間を有意に延長した。DNA マイクロアレイ解析では、不全心筋で発現低下し、chaetocin 投与で復する遺伝子群に、ミトコンドリア機能に関与する遺伝子や酸化還元反応に関与する遺伝子が多数含まれており、全体として、chaetocin 投与は不全心筋において ATP 産生方向へ遺伝子発現変化を向かわせることが示唆された。ChIP-seq 解析では、慢性心不全時に局所的に生じる、ミトコンドリア機能関連遺伝子近傍を含めたリピート領域の過剰なヘテロクロマチン形成を、chaetocin が復することで、予後改善に繋がったと思われる。ミトコンドリア呼吸鎖の respiratory control rate (RCR) でみる実際のミトコンドリア機

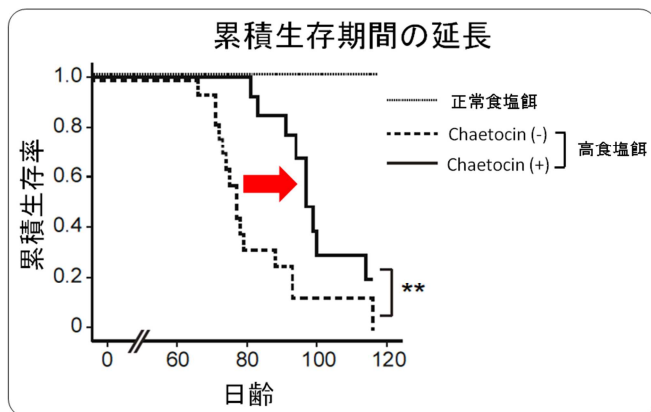
能も chaetocin 投与群で有意な改善を示した。

これまで、エピジェネティックな変化のうち、ヒストンのアセチル化に着目されてきた心肥大・心不全領域において、H3K9me3 変化も病態に重要であり、H3K9 メチル基転移酵素阻害薬も HDAC 阻害薬に加え心臓リモデリング抑制に有望であることが示唆された。

(2) 詳細

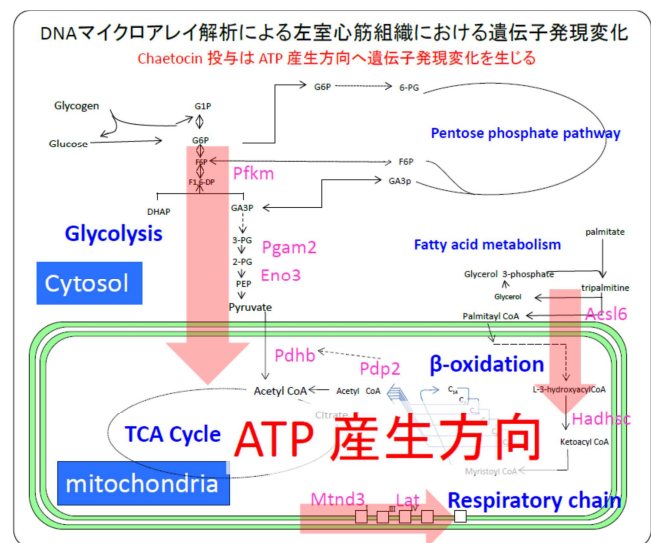
疾患モデル動物における chaetocin の心不全予後改善効果

以前に行った、心不全の疾患モデル動物である Dahl ラットの左室心筋を試料とした ChIP-chip 解析の結果では、正常心と不全心間で、全プローブの H3K9me2 のシグナル強度の相関係数は保たれていたが、H3K9me3 は相関係数が低下した。そこで、H3K9me2 から H3K9me3 へ変換するメチル基転移酵素活性を阻害する薬剤を使用することで、心不全の予後改善効果が得られるのではないかと考えた。Chaetomium 種の真菌から抽出された chaetocin は、H3K9me2 から H3K9me3 へ変換するメチル基転移酵素である Suv39h1 の活性を阻害する。Chaetocin を Dahl ラットに腹腔内投与し、予後改善効果を検討した。Chaetocin は、Dahl ラットの血圧には影響を及ぼさず、心不全期の心重量・体重比の増加を抑制し、心不全のバイオマーカーとして知られる左室心筋内の心房性ナトリウム利尿ペプチド遺伝子 (*Nppa*) の発現亢進を抑えた。心臓超音波では、chaetocin 投与により、左室の壁厚は変化させず、左室収縮末期径を縮小することにより、左室収縮能を改善し、心不全ラットの累積生存期間を有意に延長した。これらの結果から、chaetocin は、心肥大から心不全への移行を遅らせることにより、予後を改善したと考えられた。



Chaetocin の作用機序解明

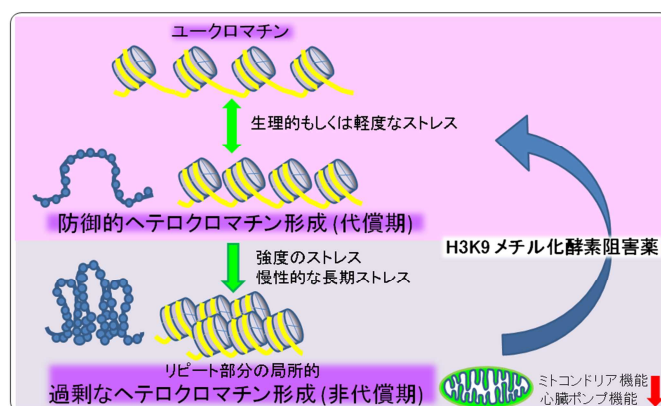
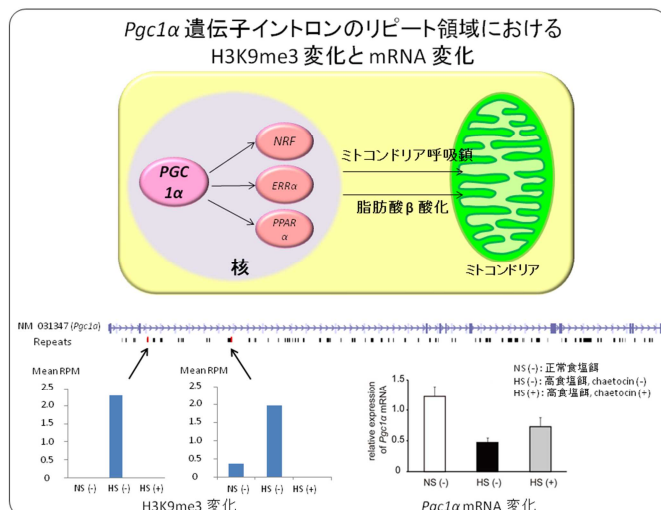
H3K9 のメチル化はヘテロクロマチン形成に関与し、遺伝子発現は低下する方向に働くことから、chaetocin の作用機序解明を目的に行った DNA マイクロアレイ解析では、不全心筋で発現低下し、chaetocin 投与で復する遺伝子群を抽出した。その結果、ミトコンドリア機能に関与する遺伝子や酸化還元反応に関与する遺伝子が多数含まれていた。全体として、chaetocin 投与は不全心筋において ATP 産生方向へ遺伝子発現変化を向かわせることが示唆された。



ChIP-seq 解析では、H3K4me3 は、これまでの報告と同様、転写開始点 (transcriptional start site: TSS) 近傍でピークを有し、mRNA の発現変化と平行に変動していたのに対し、H3K9me3 では mRNA 発現と逆相関するような TSS 近傍の著明な変動は観察されなかった。H3K9 のメチル化はペリセントロメアやテロメア形成などのヘテロクロマチン形成に関与し、リピート領域における H3K9 のメチル化の変化は、癌化やストレス応答反応にも関与することが知られていることから、リピート領域に焦点を当て、H3K9me3 変化の解析を行った。Input (RPM) に対し、不全心筋の H3K9me3 (RPM) が 100 倍以上で、かつ、不全心筋において、正常心筋よりも H3K9me3 レベルが高いリピート領域は、6550 リピート認められたのに対し、input (RPM) に対し正常心筋の H3K9me3 (RPM) が 100 倍以上で、かつ、正常心筋において、不全心筋よりも H3K9me3 レベルが高いリピート領域は、335 リピートのみであった。これらのうち、chaetocin 投与により、正常心と同方向へ K9me3 レベルが復するリピートの割合は、不全心で K9me3 レベルが増加するリピートに関しては、99%以上であるのに対し、不全心で K9me3 レベルが低下するリピートに関しては 10%であった。不全心筋で K9me3 の増加がみられ、chaetocin 投与で抑制がみられたリピート領域には、ミトコンドリア機能関連遺伝子近傍が複数含まれていた。特に、ミトコンドリア生成やエネルギー産生の鍵因子である *Pgc1α* 遺伝子のイントロン部分のリピート領域の二か所で不全心筋において H3K9me3 レベルが上昇し、chaetocin 投与で抑制されるのに逆相関して、mRNA の発現変化が伴っていたのは、興味深い結果と考える。ミトコンドリア呼吸鎖の respiratory control rate (RCR) でみる実際のミトコンドリア機能も chaetocin 投与群で有意な改善を示した。

本研究成果から、慢性心不全時の左室心筋では、リピート領域の過剰なヘテロクロマチン形成が生じ、ミトコンドリア機能関連遺伝子のサイレンシングを伴って、ポンプ機能低下に関与している可能性があると考えられた。H3K9 のメチル基転移酵素阻害薬は、過剰なヘテロクロマチン状態を抑制することで、慢性心不全の予後改善に寄与する可能性が示唆された。

これらの結果は、HDAC 阻害薬に加え、ヒストン H3K9 のメチル化制御も心臓リモデリング抑制に有望であることを示す新知見となった。



3. 今後の展開

ヒストン H3K9 メチル基転移酵素阻害薬である chaetocin は、心肥大から心不全への移行を遅らせ、疾患モデル動物において慢性心不全の予後を改善した。本研究成果により、HDAC 阻害薬に加え、ヒストン H3K9 メチル化の制御による“エピジェネティック治療”も心不全新規治療として、有望であると推測される。しかしながら、臨床応用を視野に入れた場合には、克服すべき問題点、解明すべき課題も残る。第一に、chaetocin は毒性を有するため、可能な限り毒性を抑える工夫が必要である。また、chaetocin の作用機序として、ヒストン H3K9 メチル化抑制のほかに、マイルドな酸化ストレス刺激として、ROS を産生し、プレコンディショニング効果を生じた可能性もあり、それぞれの寄与について明らかにする必要がある。さらには、chaetocin 以外のエピジェネティック修飾薬の中にも、正常心に近い核内クロマチン状態の保持に寄与する類似薬剤が存在する可能性もあり、広く探索を行う価値があると考えられる。

これまで、レニン・アンジオテンシン・アルドステロン系抑制薬や β 遮断薬などで長期予後の改善がみられなかった症例や、長期薬剤投与で耐性を示した心不全症例の中にも、作用機序の異なる新規“エピジェネティック治療”に感受性を有する症例があるのではないかと推測する。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

疾患特異的エピジェネティック変化を標的としたヒストン修飾酵素阻害薬による予後改善効果の評価と作用機序の解明に関しては、一定の成果が得られたと考える。これまで、心臓リモデリング抑制に対しては、HDAC 阻害薬の有効性のみが報告されるなか、本研究成果により、H3K9 メチル化の制御も有望であることを示すことができた。また、H3K9me3 の ChIP-seq 解析の結果からは、心不全時に生じるクロマチン状態の変化について、新たな仮説を打ち立てることができた。本研究で使用した阻害薬(chaetocin)は毒性を有するが、毒性の少ない類似薬剤が使用可能となれば、慢性心不全の新規治療法として有望であり、臨床応用に向け新たな展開が見込まれる。

一方、研究課題立案当初のアイデア通りには成果が得られなかった部分もある。ヒストン修飾酵素阻害薬は広範囲のクロマチン領域に作用し、好ましくない副作用を生じることが予想されたため、より時空間的に選択性・特異性の高いエピジェネティック制御をめざし、疾患特異的エピジェネティック変化を制御し得る機能性 RNA の同定も試みる計画を立てた。しかしながら、CLIP 法を用いた(ヒストン修飾酵素に結合する)RNA の同定やバイオインフォマティクス解析技術を用いた様々な方向からのアプローチを試みたものの、当該機能性 RNA の同定には至らなかった。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

心不全モデルラットにおいて、H3K9me3に分布の変化が認められることから、SUV39阻害薬(ケトシン)を投与することで治療効果が得られることを見出した。効果があった理由として、ケトシン投与でミトコンドリア機能に関する遺伝子群や酸化還元反応に関与する遺伝子の発現が回復することを観察した。ミトコンドリア関連の遺伝子近傍のリピート領域において不全心筋でH3K9me3の増加が見られ、ケトシン投与でその抑制が見られた。得られた結果は状況証拠であり、リピート配列が心不全を引き起こす因果関係を検証する必要がある。In vivoのみの結果は評価が困難であり、場合によっては評価が可能な系に持ち込み検証する必要がある。また、ケトシンに関して毒性を抑えた誘導体が開発されているので試みることを勧めます。今後ともエピジェネティックな治療の可能性を探って欲しいと思います。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Liu Y*, **Kaneda R*** (* equal contribution), Leia TW, Subkhankulova T, Tolmachov O, Minchiotti O, Schwarz RJ, Barahona M, Schneider MD. *Hhex* and *Cer1* mediate the Sox17 pathway for cardiac mesoderm formation in embryonic stem cells. *Stem Cells* 2014, 32(6), 1515-1526.
2. Nishiyama T, **Kaneda R**, Ono T, Tohyama S, Hashimoto H, Endo J, Tsuruta H, Yuasa S, Ieda M, Makino S, Fukuda K. miR-142-3p is essential for hematopoiesis and affects cardiac cell fate in zebrafish. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012, 425(4), 755-761.

(2) 特許出願

特記事項なし

(3) その他の成果(主要な学会発表)

1. **Kaneda R**, Ono T, Fukuda K. Histone methyltransferase inhibitor to reduce mitochondrial dysfunction in failing heart. The 4th International Symposium on Dynamics of Mitochondria from molecular mechanisms to physiological functions and diseases, October 28 ~ November 1, 2013, Japan
2. **Kaneda R**, Ono T, Fukuda K. Histone methyltransferase inhibitor improves prognosis in chronic heart failure. ~Analysis of histone H3 lysine 9 methylation-status on repetitive loci ~ Keystone Symposia Conference, C5: Chromatin Mechanisms and Cell Physiology (Workshop), March 23~28, 2014, Germany
3. **Kaneda R**, Ono T, Fukuda K. A naturally occurring product isolated from fungi of Chaetomium species improves prognosis in chronic heart failure. Crossing Boundaries: Linking Metabolism to Epigenetics (Short talk), May 1-2, 2014, USA
4. **金田るり**、小野智彦、福田恵一. Epigenetic therapy as a potential novel treatment for chronic heart failure. 第18回 日本心不全学会学術集会 (シンポジウム), 2014年10月10

日, 大阪

5. **金田るり**、小野智彦、福田恵一. 慢性心不全特異的エピジェネティック変化を標的とした心不全新規治療法開発の試み. 第 18 回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会 (シンポジウム), 2014 年 11 月 22 日, 横浜