

時空間的 1 細胞トランскриプトーム解析による心不全における心臓細胞挙動の一斉同定

野村征太郎

東京大学医学系研究科 循環器内科

【研究の背景】

心不全は癌と並んで、世界中で多くの患者の生命を奪う疾患であり、心臓に慢性的な病的刺激が入り続けることによって発症する。病的刺激によって心臓は代償的に肥大するが、慢性的な刺激が入り続けると、代償機構が破綻し、心不全を発症すると考えられている^{1,2)}。その過程で心筋細胞は形態・代謝・遺伝子発現・機能などにおいてリモデリングを生じることが知られているが、この心筋細胞のリモデリングの詳細な分子機序や心不全発症への寄与については、ほとんど不明である。

【目的】

本研究は、我々が確立した 1 細胞トランскриプトーム解析を応用して、心不全発症における心筋リモデリングの詳細な分子機序およびその時間的・空間的なダイナミクス、さらにはその心肥大・心不全に与える影響を解明することが目的である。

【方法】

成熟マウスの横行大動脈を縮窄して心臓に圧負荷をかけて心肥大・心不全を誘導するモデルを用いる。我々のモデルでは術後 1–2 週後に心肥大を、4–8 週後に心不全を呈する。この過程において、術後 3 日、1・2・4・8 週後に心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流心法を用いて心筋細胞を単離し、Smart-seq²⁾を応用して心筋 1 細胞のトランскриプトーム情報を抽出して解析を行った。圧負荷を与えない偽手術を施行したマウスの心筋細胞をコントロールとして用いた。また心臓組織における空間的な遺伝子発現を解析する上で、1 分子 RNA FISH⁴⁾を用いて解析した。

【結果】

心不全モデルの 6 タイムポイントから合計 396 細胞の 1 細胞トランскриプトーム情報を得た。まず重み付け遺伝子共発現ネットワーク解析(Weighted gene co-expression network analysis)⁵⁾を行い、共発現している遺伝子グループ(モジュール)を抽出し、そのモジュールの活性の強弱によって細胞を分類した。すると、このモジュールの活性化パターンによって 396 個の心筋細胞を 7 つの細胞集団に分類することに成功した。さらに細胞間の関係性を tSNE(t-distributed stochastic neighbor embedding)⁶⁾を用いて解析することにより、この 7 つの細胞集団の時間的な流れを予測することに成功した。これにより、圧負荷後に心筋細胞が不全心筋細胞へとリモデリングする過程を 1 細胞レベルで詳細に明らかにした。

このダイナミクスを詳細に解析すると、圧負荷直後から心臓収縮に関わる遺伝子を含むモジュールの活性が低下し、その後心不全になるに伴ってその活性が回復することを見出した。また面白いことに、1 分子 RNA FISH を用いてこのモジュールの活性を測定したところ、圧負荷後に心臓の外側およびその中側の心筋細胞において、この心臓収縮に関わる遺伝子の発現がより強く低下していることを見出した。これは空間的な位置による遺伝子発現の不均一性の存在を示唆しており、心臓組織内の位置によって心筋細胞のストレスのかかり方に差がある可能性を示している。

また圧負荷後の心筋細胞の形態的変化と遺伝子発現の関係性を 1 細胞レベルで解析したところ、肥大の程度が大きい(面積の大きい)細胞において、ミトコンドリアのリボソーム・代謝の活性が強いことがわかった。これは圧負荷後にミトコンドリ

アを増やして代償しようという機構を見ているものと考えられる。さらにエピゲノム解析⁷⁾を統合することにより、ミトコンドリアのリボソーム・代謝に関わる遺伝子の上流の制御エレメントには MAPK シグナルの転写因子(ELK1/4)の認識配列が濃縮していることがわかり、このシグナルによって制御されていることが示唆された。

さらに 1 細胞トランск립トーム解析によって同定された不全心筋細胞が心肥大の時期から少数ではあるが出現することが明らかとなつたため、その時期に少数の細胞のみで活性化するネットワークを抽出し、このネットワークを制御する転写因子を同定した。このような希少な細胞が出現することを免疫染色でも確認したため、その制御因子を心筋細胞特異的にノックアウトしたマウスを作成し、そのマウスに圧負荷を加え、通常野生型マウスでは心不全が誘導される時期の心筋細胞を抽出して 1 細胞トランск립トーム解析を行ったところ、不全心筋細胞が出現しないことがわかった。また心エコー検査によって、このマウスは心肥大を生じるが、心不全を生じないことがわかった。以上の解析により、肥大心筋細胞から不全心筋細胞への心筋リモデリングを制御するシグナルを明らかにすることに成功した。

【考 察】

本研究により、圧負荷によって誘導される心筋リモデリングの時間的・空間的な挙動を明らかにした。圧負荷によって誘導されるミトコンドリアのリボソーム・代謝に関わる遺伝子群は、負荷に対して細胞がより多くのエネルギーを必要とするためにミトコンドリアを増やして対応している現象をみたものと考えられる⁸⁾。本研究により、我々はその制御シグナルおよび転写因子を同定することに成功した。今後ミトコンドリアの増殖が細胞内代謝のリモデリングをどのように誘導するかを明らかにする必要がある。また心肥大から心不全をつなぐシグナルの活性化様式も深く解析していく。

また本研究は、1細胞レベルで疾患モデルを構築する新たな手法を開発したものである。本研究の解析手法はあらゆる疾患モデルに応用可能であるだけでなく、疾患発症患者の組織検体も同様に解析できる。今後患者ごとの疾患の分子病態を解析する新たな技術へと発展が期待される。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究は、心筋細胞のリモデリングの過程を詳細に明らかにした。本研究の臨床的な意義は、心筋リモデリングの制御過程を詳細に明らかにし、その誘導シグナル・誘導因子を同定したことである。これらのシグナルや因子を制御する薬剤を作成することにより、現在存在しない心不全の本質的な治療薬へと発展することが期待される。

【参考・引用文献】

- 1) Komuro, I. & Yazaki, Y. Control of Cardiac Gene Expression by Mechanical Stress. *Annu Rev Physiol.* 55, 55-75 (1993).
- 2) Heineke J. & Molkentin JD. Regulation of cardiac hypertrophy by intracellular signalling pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8, 589-600 (2006).
- 3) Picelli, S., et al. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat Protoc.* 9, 171-181 (2014).
- 4) Wang, F., et al. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn.* 14, 22-29 (2012).
- 5) Langfelder, P. & Horvath, S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics.* 9, 559 (2008).
- 6) Van der Maaten, L. & Hinton, G. Visualizing data using t-SNE. *J. Mach. Learn. Res.* 9, 2570-2605 (2008).
- 7) Creyghton, M.P., et al. Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 107, 21931-21936 (2010).
- 8) Goffart, S., von Kleist-Retzow, J.C. & Wiesner, R.J. Regulation of mitochondrial proliferation in the heart: power-plant failure contributes to cardiac failure in hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 64, 198-207 (2004).