

一細胞解析と in vivo CRISPR/Cas9 システムの融合による心不全リプログラミング因子スクリーニング

候 聡志

東京大学医学部附属病院 循環器内科

【研究の背景】

個々の細胞から全トランスクリプトームを網羅的に解析する scRNA-seq 解析は心不全基礎研究領域においても近年急速に普及しつつあるが、得られた膨大なデータを如何に処理し、有用な情報を抽出(新規心不全治療ターゲットの探索)するのかは未だ未解決の課題である。

【目 的】

申請者らは本研究助成を受けてこの課題の解決のため、①scRNA-seq データの解析手法の工夫による心不全治療ターゲットの絞り込み及び②ハイスループットに各遺伝子の機能検証を可能にする *in vivo* Perturb-seq 実験系の確立に取り組んだ。

【方 法 及 び 結 果】

①scRNA-seq データの解析手法の工夫による心不全治療ターゲットの絞り込み

膨大な情報量を伴う scRNA-seq のデータから効率よく病態に重要な因子を絞り込むため、解析手法の工夫や他のシングルセル解析技術との統合等について検討した。(1)まず**重み付け遺伝子共発現ネットワーク解析(WGCNA)の手法を活用して scRNA-seq のデータを再解析した**。マウス圧負荷後早期に見られる代償性心筋における遺伝子ネットワークの中で発現が保たれ、逆に圧負荷長期経過後の非代償性不全心筋で発現量が低下する遺伝子のうち、特に転写因子に絞って解析した結果、転写因子 X を同定した。TAC 手術後 8 週経過した終末期心不全状態のマウスで転写因子 X を過剰発現させると、心筋細胞サイズの肥大化と共に心室壁の代償性肥大が再度見られるのみならず、左室径や収縮能の改善も認められ、転写因子 X の心保護作用が確認された。(2)次にマウス心筋梗塞モデルを用いて、**scRNA-seq に加えて空間的遺伝子発現情報解析(Spatial transcriptomics)も行い、両者を統合解析した**。それにより、梗塞後急性期の梗塞辺縁領域にのみ *Csrp3* が一過性に発現が上昇する現象を見出した。*Csrp3* の shRNA を搭載する AAV9 ベクターを用いたノックダウン実験では梗塞後リモデリングの進行を認め、同分子の梗塞辺縁領域における発現上昇は心保護的であることが示唆された。(Ko, Komuro, et al. Spatiotemporal single-cell analysis reveals critical roles of mechano-sensing genes at the border zone in left ventricular remodelling after myocardial infarction. *Nat Cardiovasc Res. in revision*) (3)また、**scRNA-seq と(転写が活性化しているオープンクロマチン領域を同定する)scATAC-seq の統合解析も行った結果**、重症拡張型心筋症を引き起こす *LMNA* Q353R 変異では TEAD ファミリーの転写因子が核膜の変異ラミンにトラップされて転写制御の役割を果たせないことを明らかにした。(Ko, Komuro, et al. Aberrant interaction between TEAD1 and Lamin A/C impairs cardiomyocyte maturation in *LMNA*-related cardiomyopathy. *in submission*). (4)最後に、**WGCNA を応用してリガンド-受容体解析や Pathway 解析を行うことで、心筋細胞と他の非心筋細胞集団の細胞間コミュニケーションを解析**することができ、その結果、線維芽細胞の活性を調整し、心筋にも影響を与える新規分子として *Htra3* を同定した。*Htra3* KO マウスでは線維芽細胞の TGF β シグナル過剰活性化が生じ、周囲の心筋細胞にも影響して老化形質や DNA 傷害をもたらす。逆に過剰発現実験の結果、*Htra3* は心保護作用を示した。(Ko, Komuro, et al. Cardiac fibroblasts are critically involved in the development of heart failure by

inducing cardiomyocyte senescence. Nat Commun. *in revision*)

②ハイスループットに各遺伝子の機能検証を可能にする *in vivo* Perturb-seq 実験系の確立

上記の①は全て解析手法の工夫や異なる解析手法の統合により scRNA-seq 重要な因子を絞り出すための工夫であったが、より直接的に遺伝子の機能をハイスループットにスクリーニングするための実験系の確立にも取り組んだ。dCas9-KRAB-MeCP2 という gRNA 依存性に対象遺伝子をサイレンシングする分子を発現する flox マウスを作成し(まずは transgenic マウスが完成)、aMHC-Cre マウスとかけ合わせて心筋特異的 dCas9-KRAB-MeCP2 発現マウスを樹立した。これに複数の対象遺伝子に対する gRNA を各々搭載した AAV9 ライブラリーを投与・感染させることで、個々の心筋で異なる遺伝子の発現が抑制され、その心筋達を scRNA-seq で解析(Perturb-seq)することでサイレンシングにより生じた表現系を確認する方針とした。予備実験の結果、gRNA 搭載 AAV9 ベクターの感染効率が高すぎると複数種のベクターが同じ細胞に共感染して効果を判定しづらくなることから、10%未満の感染率となるようなウイルス投与量(2~5x10¹¹GC/匹)を決めた。感染した細胞で GFP を発現するようにベクター設計し、それを FACS による single cell sort する方針とした。通常、心筋細胞はその大きさ故に FACS にかけることはできないが、新生児マウスの心筋細胞は比較的小さいため、FACS のノズルを通る。各種実験の結果、生後 4 日目の新生児マウスに AAV9 を感染させ、14 日目に(新生児心臓用に改良したランゲンドルフ灌流法を用いて)マウス心筋を単離し、かつ FACS により AAV9 感染心筋(GFP+)のうち、形態が杆状に保たれている良質なものを Sort 単離できる系を確立した。いくつかの遺伝子に対する gRNA を AAV9 により導入して dCas9-KRAB-MeCP2 による対象遺伝子のサイレンシング効率を qPCR で検証した結果、いずれも AAV9 感染によって gRNA が細胞内に導入された心筋(Perturbed CM)では対象遺伝子の発現量が元々の平均の 5%未満まで抑制されていることが判明し、サイレンシングが十分機能していることが分かった。現在 transgenic ではなく、より安定的に遺伝子発現が期待できる Rosa26 locus への dCas9-KRAB-MeCP2 ノックインマウスを樹立しつつ、まずは拡張型心筋症(DCM)、肥大型心筋症(HCM)、左室緻密化障害(LVNC)、不整脈源性右室心筋症(ARVC)、先天性心疾患(CHD)の原因として報告されている全 43 遺伝子に対して、gRNA 搭載 AAV9 ベクターを各々設計・作成したので、今後それらの Perturb-seq を行う予定である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

これまで scRNA-seq データの解析によって同定したいくつかの心不全治療ターゲット因子については、いずれも創薬の対象になるのみならず、それらの発現量を解析することで心不全リスクの層別化といった precision medicine にも貢献しうるものである。例えば心臓線維芽細胞における心保護因子として同定した Htra3 については発現量が少ない症例の方が予後不良であることが解析の結果分かった。また、心筋細胞 scRNA-seq の解析で見出した、不全化心筋細胞に特徴的な DNA damage 応答は心不全の予後予測に有用であることは既に報告した(JACC Basic Transl Sci. 2019; 4(6): 670-680.)他、不全化心筋細胞が分泌する様々な老化関連サイトカインも予後の層別化に役立つことが分かった(Ko, Komuro, et al. Cardiac fibroblasts are critically involved in the development of heart failure by inducing cardiomyocyte senescence. Nat Commun. *in revision*)。現在構築を進めている *in vivo* Perturb-seq の系については、将来的に心疾患の病態解明を大きく進めるのに寄与するのみならず、簡単に臓器特異的・時期特異的 dCas9-KRAB-MeCP2 発現マウスを作成できることから、他の研究領域にも役立つものであると考えられる。