

## 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】

細胞一つ一つから個別にトランスクリプトーム解析を行う Single-cell RNA-seq (scRNA-seq)はこの5年程の間に大きく普及し、今や生物学研究に欠かせないものとなった。昨今の国内外の研究情勢を鑑みるに、単なる scRNA-seq 解析のみならず、そこで得られる様々な情報をうまく処理して重要な分子生物学的事象を明らかにしたり、トランスクリプトーム以外の階層の解析技術とうまく統合したりすることが重要になってきている。申請者が取り組んでいる心不全研究に当てはめて言うならば、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)するのかが喫緊の課題と言える。申請者らは本研究助成を受け、この課題に対して以下のように取り組み、本年度は一定の成果を得た。

### 【目 的】

シングルセル解析により得られたデータを処理し、新規心不全治療ターゲットを探索する

### 【方 法】

#### (1) 心筋細胞-非心筋細胞間コミュニケーションの解析

申請者等の過去の研究では心筋細胞単独に注目していたが、心臓に存在する非心筋細胞にも着目し、scRNA-seq データを用いて重み付け遺伝子共発現ネットワーク解析(WGCNA)やリガンド-受容体解析(LR 解析)、Pathway 解析といった新たな解析手法を加えることにより、非心筋細胞-心筋細胞相互作用に基づく新たな心不全の病態解明を目指した。

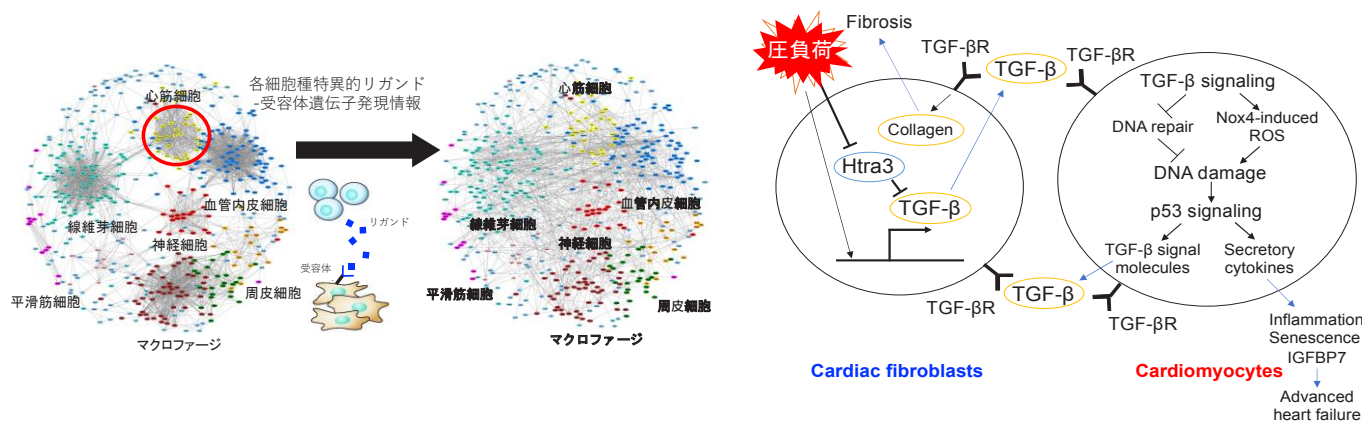
#### (2) scRNA-seq と空間的遺伝子発現解析(Spatial transcriptomics)の統合解析

scRNA-seq の最大の問題点は細胞単離の過程で元々個々の細胞が存在していた位置情報が失われる点にあるが、申請者らは組織上の細かな各領域でトランスクリプトームを調べる空間的遺伝子発現解析の手法を用いて、scRNA-seq と統合解析を試みた。

### 【結果及び考察】

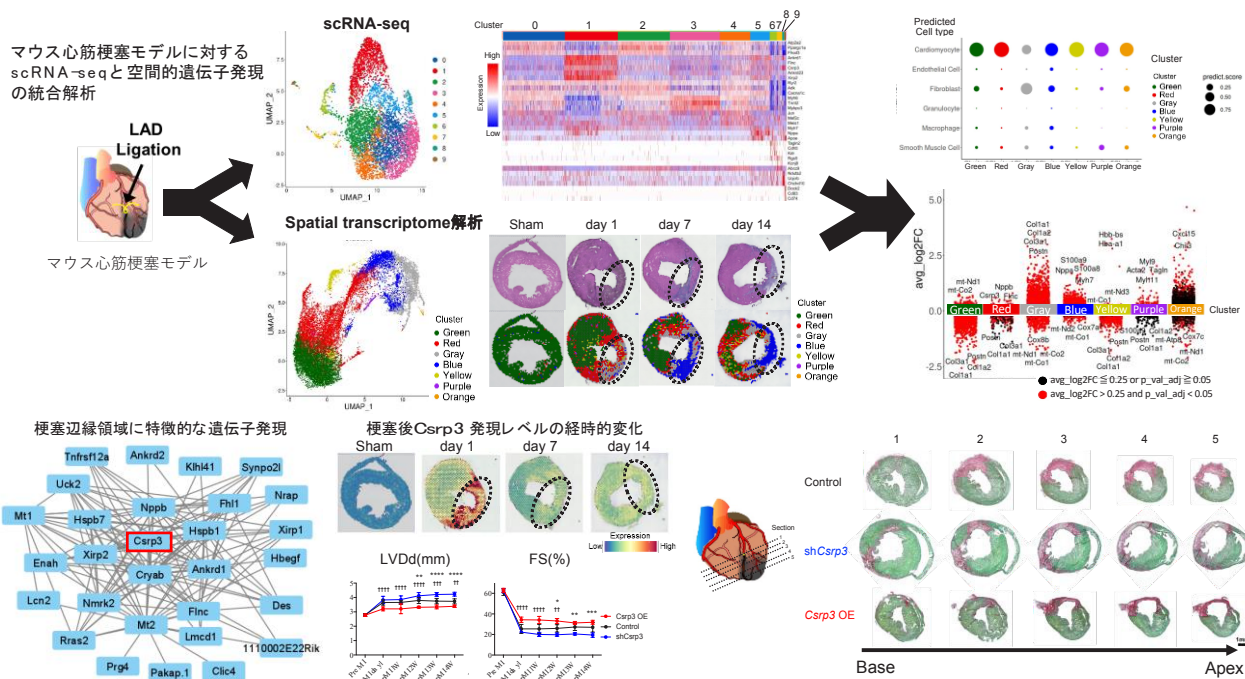
#### (1) 心筋細胞-非心筋細胞間コミュニケーションの解析

異なる細胞種の遺伝子ネットワークのうち、特にリガンド/受容体(LR)遺伝子を抜き出し、LR データベースを基に対応するリガンド-受容体(LR)同士をつなげることによって細胞種間コミュニケーションを可視化したところ、心臓においては心筋細胞-心臓線維芽細胞間のシグナル伝達のやり取りが最も盛んであることが分かった。線維芽細胞特異的に発現する *Htra3* という分子に着目し、機能解析を進めたところ、*Htra3* KO マウスは圧負荷に脆弱であり、圧負荷後に線維芽細胞で TGF  $\beta$  シグナルの過剰活性化が生じ、それがさらに心筋細胞にも影響してこれを不全心筋化させることが分かった。逆に *Htra3* の過剰発現は心保護的であり、新たな治療ターゲットであると考えられる。



(2) scRNA-seq と空間的遺伝子発現解析 (Spatial transcriptomics) の統合解析

健常及び梗塞後の心臓組織標本を“数細胞レベル”の細かい解像度で空間的遺伝子発現プロファイルの解析を行い、これを scRNA-seq と統合解析した結果、心筋梗塞後急性期に梗塞周辺領域の心筋細胞においてのみ *Csrp3* に代表されるようなメカノストレス応答遺伝子の発現増加が一過性に認められることが分かった。AAV9 ベクターにより *Csrp3* を過剰発現もしくは発現抑制させると、梗塞後リモデリングや心機能が改善もしくは悪化することが分かり、こうした梗塞後急性期における梗塞周辺領域のメカノストレス応答遺伝子プログラムの発現応答は心保護的に寄与していることが分かった。



【臨床的意義・臨床への貢献度】

- 及び(2)により判明した *Htra3* や *Csrp3* は活性化によりそれぞれ圧負荷心不全、虚血性心不全に対して心保護作用をもたらすと考えられ、新規治療ターゲットとなりうる。現在作成している gRNA 依存性に標的遺伝子の発現をそれぞれ抑制、活性化させる dCas9-KRAB-MeCP2、dCas9-TETv4 という 2 種類の遺伝子改変マウスを用いて遺伝子共発現ネットワークに登場する遺伝子群の網羅的な機能検証を進めており、さらに多くの治療ターゲットを同定しようと試みている。

【参考・引用文献（本研究助成による本年度の業績）】

1. **Ko T**, Morita H. Molecular Genomic Autopsy —Clues to Preventing Further Tragedy?—. **Circ J**. 2022 Sep 17. doi: 10.1253/circj.CJ-22-0513.
2. Yamada S, **Ko T (co-first author)**, Hatsuse S, Nomura S, Zhang B, Dai Z, Inoue S, Kubota M, Sawami K, Yamada T, Sassa T, Katagiri M, Fujita K, Katoh M, Ito M, Harada M, Toko H, Takeda N, Morita H, Aburatani H, Komuro I. Spatiotemporal transcriptome analysis reveals critical roles of mechano-sensing genes at the border zone in remodeling following myocardial infarction. **Nat Cardiovasc Res**. 2022; 1: 1072-1083.
3. Katagiri M, Yamada S, Katoh M, **Ko T**, Ito M, Komuro I. Heart Failure Pathogenesis Elucidation and New Treatment Method Development. **JMA J**. 2022;5(4):399-406.
4. **Ko T**, Morita H. Takotsubo Cardiomyopathy and Peripartum Cardiomyopathy: Similar in Features, but Different in Nature. **Int Heart J**. 63: 651-653 (2022).
5. **Ko T**, Nomura S. Manipulating Cardiomyocyte Plasticity for Heart Regeneration. **Front Cell Dev Biol**. 10: 929256 (2022)
6. **Ko T**, Nomura S, Yamada S, Fujita K, Fujita T, Satoh M, Oka C, Katoh M, Ito M, Katagiri M, Sassa T, Zhang B, Hatsuse S, Yamada T, Harada M, Toko H, Amiya E, Hatano M, Kinoshita O, Nawata K, Abe H, Ushiku T, Ono M, Ikeuchi M, Morita H, Aburatani H, Komuro I. Cardiac fibroblasts regulate the development of heart failure via Htra3-TGF- $\beta$ -IGFBP7 axis. **Nat Commun**. 13(1): 3275 (2022).