

【目的】 高血圧や脂質異常症などの生活習慣病は動脈硬化を介して虚血性心疾患を発症させる。我々は虚血性心疾患を含んだ 17 万人以上のゲノム解析を実施して疾患関連遺伝子座を特定し、それらを用いた遺伝的リスクスコアによって虚血性心疾患の発症や心血管疾患による死亡を予測できることを実証してきた。実際に心筋梗塞を発症すると、病的な心臓リモデリングを経てその後には不整脈や心不全を生じ、命の危険にさらされる。しかしながら、心臓リモデリングは時間的・空間的にダイナミックに生じるため、その分子機序の多くは明らかでない。その機序を明らかにして介入することで、心筋梗塞後の予後を改善できる可能性がある。

【方法】 我々は以前、世界で初めて心臓のシングルセル RNA-seq 解析技術を確立して報告した。本研究では、マウスに心筋梗塞を施して 1 日後、7 日後、14 日後にランゲンドルフ灌流法によって心筋細胞を単離し、その後核を抽出してから Chromium (10X Genomics) で single-nucleus RNA-seq ライブラリを作製して NovaSeq6000 (Illumina) にてシーケンスを実施した。さらに心臓組織における空間的な細胞局在を保持したまま全遺伝子発現情報を取得する空間的トランスクリプトーム解析 (Visium (10X Genomics)) を実施した。また遺伝子機能解析のためには心筋特異的に遺伝子導入が可能な AAV9 に標的遺伝子を改変するベクターを導入してマウスに投与した。

【結果】 心筋梗塞後 (1 日後、7 日後、14 日後) の梗塞部・遠隔部における心筋細胞の single-nucleus RNA-seq 解析によって、心筋梗塞後の急性期に梗塞部で特徴的な遺伝子発現パターンを呈する細胞集団が出現することを発見した。その細胞集団は、*Ankrd1* (Ankyrin repeat domain 1) や *Csrp3* (Cysteine and glycine rich protein 3) といったメカノセンシングに関わる遺伝子を高発現していた。続いて心筋梗塞後の心臓組織を Visium により空間的トランスクリプトーム解析したところ、梗塞領域・境界領域・遠隔領域といった各領域で時間的に特徴的な遺伝子発現変化をしていることがわかった。WGCNA (重み付け遺伝子共発現ネットワーク解析) によって空間的遺伝子発現と関係する遺伝子モジュールを同定し、梗塞後境界部で急性期に活性化しているモジュールを見出し、そのネットワーク解析によって *Csrp3* などメカノセンシング関連遺伝子が中心的に位置していることがわかった。*Csrp3* 遺伝子の空間的な発現プロファイルは 1 分子 RNA *in situ* hybridization によって確認した。さらに、心筋細胞に特異的に遺伝子を導入できる AAV9 に *Csrp3* shRNA および *Csrp3* 遺伝子を導入したベクターを組み込んでそれぞれマウスに投与し、心筋梗塞を施した後の心臓機能評価および空間的トランスクリプトーム解析を実施した。*Csrp3* knockdown (KD) によって梗塞後の病的リモデリングは増悪して *Csrp3* overexpression (OE) によって改善した。さらに *Csrp3* KD で梗塞境界部に急性期に認められる *M3* 遺伝子発現が消失して *Csrp3* OE によって増強したことから、*Csrp3* を介したメカノセンシング経路は *M3* 遺伝子発現を上流から制御していることを見出した。以上より我々は、single-nucleus RNA-seq と空間的トランスクリプトーム解析を統合して梗塞境界部で急性期に活性化するメカノセンシング遺伝子群を同定し、それが *Csrp3* 遺伝子によって制御された遺伝子プログラムであることを見出し、このプログラムが梗塞後の病的な心臓リモデリングを代償的に制御していることを解明した。

心筋梗塞の時空間的シングルセル解析で明らかになった梗塞境界部の心筋メカノセンシング機構

