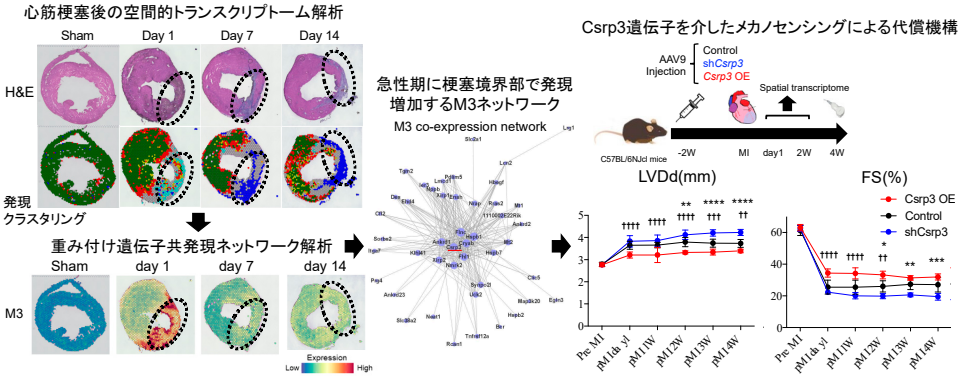
66　心筋梗塞のシングルセル解析による病態解明と治療開発	野村　征太郎

【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、その後に核を抽出してから Chromium（10X Genomics）で single-nucleus RNA-seq ライブラリを作製して NovaSeq6000（Illumina）にてシークエンスを実施した。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硬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、このプログラムが硬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



66. 心筋梗塞のシングルセル解析による病態解明と治療開発

野村　征太郎

東京大学 大学院医学系研究科 循環器内科学

Key words：心筋梗塞，心臓リモデリング，空間的シングルセル解析，メカノセンシング，*CSRP3*遺伝子

緒　言

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［1］。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［2］。本研究ではこの手法を時間的・空間的に発展させ、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、その後に single nuclei isolation kit（NI-024、Invent Biotechnologies）にて核を抽出してから Chromium（10X Genomics）で single-nucleus RNA-seq ライブラリを作製して NovaSeq6000（Illumina）にてシークエンスを実施した。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

1.　心筋梗塞における心筋細胞の single-nucleus RNA-seq 解析

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 解析の結果、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（図 1a、b）。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（図 1c）。

2.　心筋梗塞後の時空間的トランスクリプトーム解析

続いて心筋梗塞後の心臓組織を Visium（10X Chromium）により空間的トランスクリプトーム解析した（図 1a）。その結果、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り、シングルセル RNA-seq データと統合することで、同部位に存在する細胞がどういった種類の細胞かも理解できた。例えば、梗塞領域に慢性期から出現する Blue のクラスターは線維芽細胞におけるコラーゲン関連遺伝子が特徴的であり、梗塞境界部に急性期から出現する Red や Gray のクラスターは心筋細胞のメカノセンシング遺伝子が特徴的である。後者については、先ほどの single-nucleus RNA-seq の結果を空間的に高い精度で検証できたことになる（図 2b、c）。

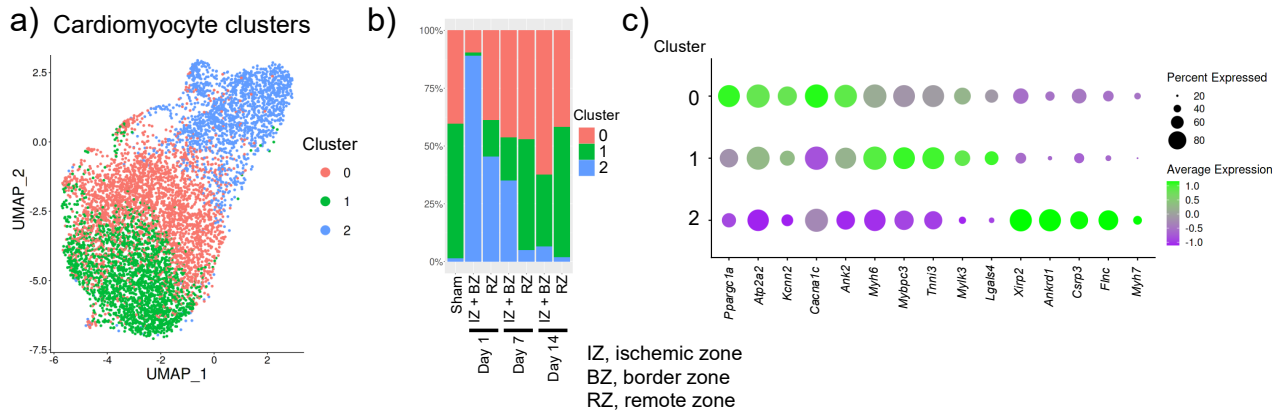


図 1. 心筋梗塞後の心筋細胞の時空間的な single-nucleus RNA-seq 解析

a) 心筋梗塞後（1 日後・7 日後・14 日後）の心筋 single-nucleus RNA-seq の UMAP 図。

b) 条件ごとの各クラスターの分布を示した棒グラフ。

c) 各クラスターの特徴的遺伝子の発現プロファイルを示したバブルプロット。

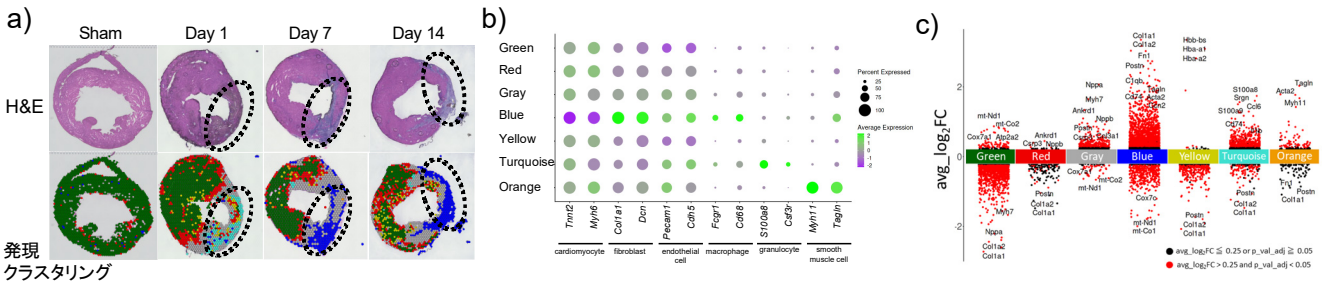


図 2. 心筋梗塞後の時空間的トランスクリプトーム解析

a) 心筋梗塞後の空間的トランスクリプトーム解析。上段は H&E 染色図、下段の spatial transcriptome のクラスタリング図。ドットの円は梗塞領域を示している。

b) 各クラスターの遺伝子発現プロファイル。

c) 各クラスターにおける特徴的な遺伝子の同定。

3. 空間的トランスクリプトームの WGCNA 解析

さらに全遺伝子発現情報を用いて WGCNA（重み付け遺伝子共発現ネットワーク解析）を実施したところ、空間的遺伝子発現と関係する遺伝子モジュールを同定することができた（図 3a）。中でも、Red や Gray のクラスターの中でも Day1 で特徴的に発現の高いモジュール *M3* は、梗塞後境界部で急性期に活性化していることがわかる（図 3b）。その *M3* のネットワークを図示すると、*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（図 3c）。

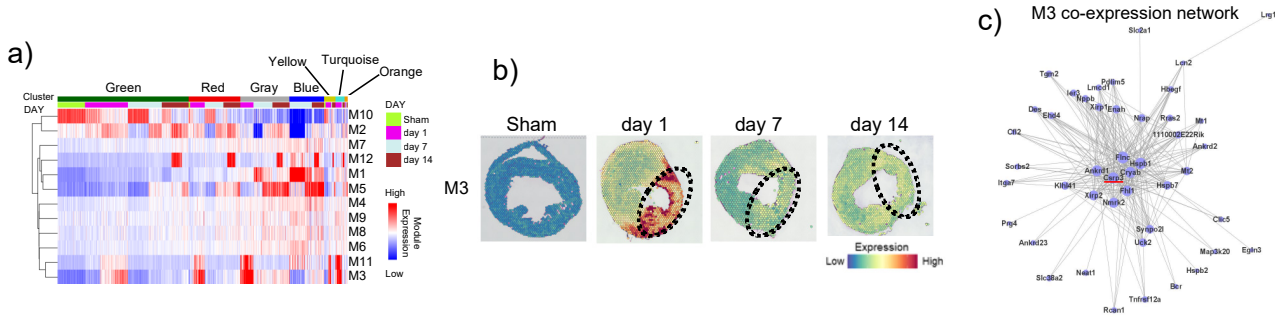


図 3. 空間的トランスクリプトームの WGCNA 解析

a) 空間的トランスクリプトームの WGCNA 解析。ヒートマップで各モジュールの発現値を示している。

b) 梗塞後境界部で急性期に活性化するモジュール *M3* の発現プロファイル。

c) *M3* の遺伝子ネットワーク。中央に *Csrp3* 遺伝子がある。

4. 1 分子 RNA *in situ* hybridization による *Csrp3* 遺伝子の空間的発現プロファイルの確認

さらに RNAscope による 1 分子 RNA *in situ* hybridization によって空間的な *Csrp3* 遺伝子の発現をシングルセルレベルで確認した。図 4a～c に示すとおり、BZ（border zone）の心筋細胞で局所的に *Csrp3* 遺伝子の mRNA を多く認め、上記の空間的遺伝子発現解析の結果の妥当性を検証した。

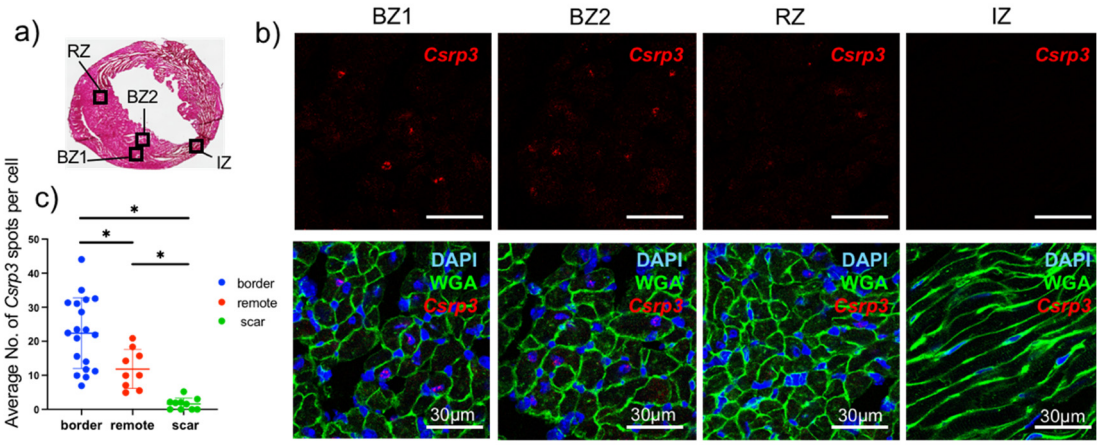


図 4. 1 分子 RNA *in situ* hybridization による空間的シングルセル遺伝子発現解析

a) 心筋梗塞 1 日後の心臓組織切片。b の解析を実施した領域を示している。

b) Csrp3 mRNA に特異的なプローブを用いた 1 分子 RNA *in situ* hybridization 解析。同時に DAPI（核）・WGA（細胞膜）を染色して各心筋細胞を分離して解析している。

c) 領域ごとの 1 細胞あたりの Csrp3 のスポット数（mRNA 分子の数）。t 検定、$P<0.01$。

5. 局所の心筋で活性化する *Csrp3* 遺伝子の心機能および遺伝子発現に与える影響

さらに Csrp3 による空間的な遺伝子発現上昇が心臓リモデリングおよび空間的トランスクリプトームに与える影響を確認するために、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（図 5a）。その結果、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（図 5b）。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（図 5c）。

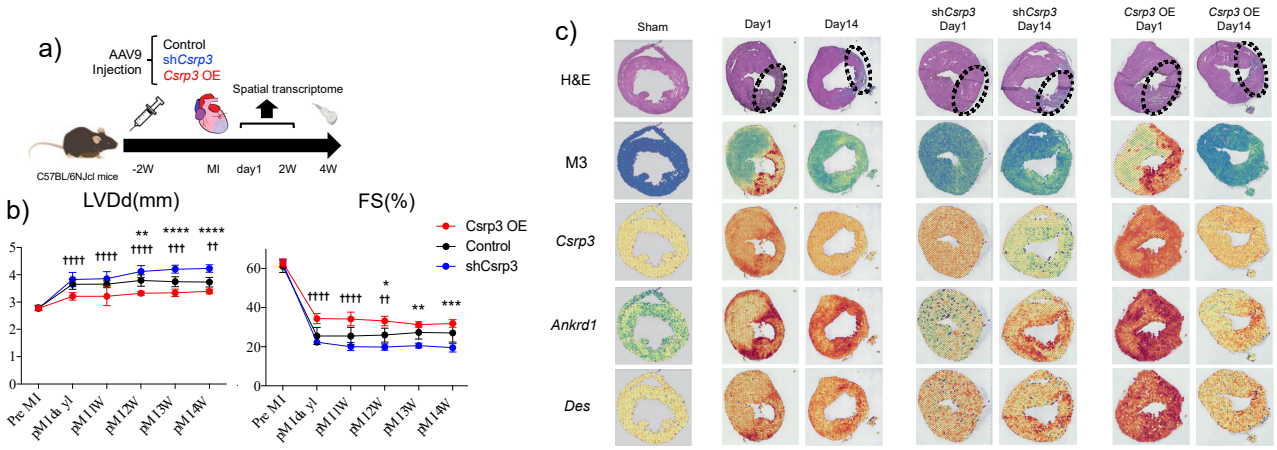


図 5. 遺伝子改変による Csrp3 の心機能・空間的遺伝子発現に与える影響の解析

a) コントロールベクター・shCsrp3・Csrp3 OE のベクターを搭載した AAV9 を打ち込んでから心筋梗塞を施して心機能解析・空間的トランスクリプトーム解析。

b) 心エコーによる心臓機能解析。二元配置分散分析のボンフェローニの多重比較検定を実施し、*P<0.05、**P<0.01、***P<0.005、****P<0.001。

c) 空間的トランスクリプトーム解析（ドットの円は梗塞巣を示している）。

考　察

我々は本研究において 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硬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、このプログラムが硬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。*Csrp3* 遺伝子は以前より心筋細胞に対する機械的刺激で発現増強することが報告されてきた［3］。ブタの心筋梗塞モデルにおいて硬塞後の境界部において心筋に対する壁ストレスが増大することが知られており［4］、これが Csrp3 発現増強の原因と示唆される。また *Csrp3* 遺伝子がコードする Muscle LIM protein (MLP) は Z disc に局在して、T-cap (Telethonin)・Ankrd1/PKCa、calcinurin、α-actinin などと相互作用しながらメカノセンサーとして機能することが知られている［5～8］。本研究では、心筋梗塞後の梗塞境界部に残存した心筋細胞において MLP を介したメカノセンシング経路が働き、メカノセンシング遺伝子群の発現を増強してこの経路にポジティブフィードバックをかけることで、心筋梗塞後の病的リモデリングの増悪を防ぐという代償機構が備わっていることを明らかにした。慢性心不全患者の心筋細胞で *Csrp3* 遺伝子の発現が低いことが報告されており［9］、*Csrp3* 遺伝子による遺伝子治療が心筋梗塞だけでなく慢性心不全に対しても有効である可能性がある。

共同研究者・謝辞

本研究の主な共同研究者は、東京大学医学部附属病院循環器内科の小室一成教授、東京大学先端科学技術研究センターゲノムサイエンス&メディシン分野の油谷浩幸シニアリサーチフェローです。また研究室の山田臣太郎先生、候聡志先生、初瀬慧先生は研究の推進に大きく貢献してくれました。この場を持って深く感謝申し上げます。

文 献

1) Koyama S, Ito K, Terao C, Akiyama M, Horikoshi M, Momozawa Y, Matsunaga H, Ieki H, Ozaki K, Onouchi Y, Takahashi A, Nomura S, Morita H, Akazawa H, Kim C, Seo JS, Higasa K, Iwasaki M, Yamaji T, Sawada N, Tsugane S, Koyama T, Ikezaki H, Takashima N, Tanaka K, Arisawa K, Kuriki K, Naito M, Wakai K, Suna S, Sakata Y, Sato H, Hori M, Sakata Y, Matsuda K, Murakami Y, Aburatani H, Kubo M, Matsuda F, Kamatani Y, Komuro I. Population-specific and trans-ancestry genome-wide analyses identify distinct and shared genetic risk loci for coronary artery disease. Nat Genet. 2020 Nov;52(11):1169-1177. doi: 10.1038/s41588-020-0705-3. Epub 2020 Oct 5. PMID: 33020668.

2) Nomura S, Satoh M, Fujita T, Higo T, Sumida T, Ko T, Yamaguchi T, Tobita T, Naito AT, Ito M, Fujita K, Harada M, Toko H, Kobayashi Y, Ito K, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Aburatani H, Komuro I. Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure. Nat Commun. 2018 Oct 30;9(1):4435. doi: 10.1038/s41467-018-06639-7. PMID: 30375404; PMCID: PMC6207673.

3) Kuhn C, Frank D, Dierck F, Oehl U, Krebs J, Will R, Lehmann LH, Backs J, Katus HA, Frey N. Cardiac remodeling is not modulated by overexpression of muscle LIM protein (MLP). Basic Res Cardiol. 2012 May;107(3):262. doi: 10.1007/s00395-012-0262-8. Epub 2012 Mar 16. PMID: 22421737.

4) Torres WM, Jacobs J, Doviak H, Barlow SC, Zile MR, Shazly T, Spinale FG. Regional and temporal changes in left ventricular strain and stiffness in a porcine model of myocardial infarction. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2018 Oct 1;315(4):H958-H967. doi: 10.1152/ajpheart.00279.2018. Epub 2018 Jul 13. PMID: 30004234; PMCID: PMC6230914.

5) Knöll R, Hoshijima M, Hoffman HM, Person V, Lorenzen-Schmidt I, Bang ML, Hayashi T, Shiga N, Yasukawa H, Schaper W, McKenna W, Yokoyama M, Schork NJ, Omens JH, McCulloch AD, Kimura A, Gregorio CC, Poller W, Schaper J, Schultheiss HP, Chien KR. The cardiac mechanical stretch sensor machinery involves a Z disc complex that is defective in a subset of human dilated cardiomyopathy. Cell. 2002 Dec 27;111(7):943-55. doi: 10.1016/s0092-8674(02)01226-6. PMID: 12507422.

6) Lange S, Gehmlich K, Lun AS, Blondelle J, Hooper C, Dalton ND, Alvarez EA, Zhang X, Bang ML, Abassi YA, Dos Remedios CG, Peterson KL, Chen J, Ehler E. MLP and CARP are linked to chronic PKCα signalling in dilated cardiomyopathy. Nat Commun. 2016 Jun 29;7:12120. doi: 10.1038/ncomms12120. PMID: 27353086; PMCID: PMC4931343.

7) Heineke J, Ruetten H, Willenbockel C, Gross SC, Naguib M, Schaefer A, Kempf T, Hilfiker-Kleiner D, Caroni P, Kraft T, Kaiser RA, Molkentin JD, Drexler H, Wollert KC. Attenuation of cardiac remodeling after myocardial infarction by muscle LIM protein-calcineurin signaling at the sarcomeric Z-disc. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Feb 1;102(5):1655-60. doi: 10.1073/pnas.0405488102. Epub 2005 Jan 21. PMID: 15665106; PMCID: PMC547821.

8) Mohapatra B, Jimenez S, Lin JH, Bowles KR, Coveler KJ, Marx JG, Chrisco MA, Murphy RT, Lurie PR, Schwartz RJ, Elliott PM, Vatta M, McKenna W, Towbin JA, Bowles NE. Mutations in the muscle LIM protein and alpha-actinin-2 genes in dilated cardiomyopathy and endocardial fibroelastosis. Mol Genet Metab. 2003 Sep-Oct;80(1-2):207-15. doi: 10.1016/s1096-7192(03)00142-2. PMID: 14567970.

9) Zolk O, Caroni P, Böhm M. Decreased expression of the cardiac LIM domain protein MLP in chronic human heart failure. Circulation. 2000 Jun 13;101(23):2674-7. doi: 10.1161/01.cir.101.23.2674. PMID: 10851202.