

統合 1 細胞解析による心不全患者の病態解明

東京大学医学部附属病院・循環器内科・野村征太郎

＜サマリー＞心不全は癌と並び世界中で多くの患者の命を脅かしている。心臓に対する慢性的な血行力学的負荷は心肥大および心不全を引き起こすことが知られているが、その詳細な分子機構は明らかでない。我々は、圧負荷心不全モデルマウスおよび心不全患者の心臓から単離した心筋細胞のシングルセルトランスクリプトーム解析を行い、心筋細胞の肥大化にはERK1/2・NRF1/2シグナルによるミトコンドリア遺伝子の発現活性化が重要であり、肥大心筋細胞は代償性心筋細胞と不全心筋細胞へ分岐し、不全心筋細胞への誘導にはp53シグナル活性化に伴った代謝・形態リモデリングが重要であることを明らかにした。また心筋遺伝子発現応答においてマウスとヒトの間の種を超えた保存性を確認し、心不全に特徴的な遺伝子発現パターンにより患者病態を層別化できることを実証した。これらの技術は、心臓疾患の詳細な病態解明に役立つだけでなく、個々の心不全患者の臨床像と連結した心臓分子病態の理解に直結し、循環器疾患における精密医療の実現に大きく貢献するものと期待される。

1. はじめに

心臓は常に血行力学的な負荷を受け、それに対応しながら全身の循環恒常性を保っている。高血圧や大動脈弁狭窄症のような圧負荷に対して、心臓は肥大して代償しようとする¹⁾。しかし慢性的な圧負荷は壁運動低下・心拡大を惹起し、心不全を誘導する²⁾。この過程において、心臓の中で心筋細胞は様々なシグナル経路を活性化させて当初は代償的に肥大（短径の増加）するが、長期的な負荷により伸長（長径の増加）を伴った収縮力低下を示す³⁾。しかし圧負荷に対する心筋細胞のどのような遺伝子発現変化が、形態的かつ機能的な異常と関連しているか（分子・形態・機能レベルの相互関係性）詳細に明らかでない。

ひとつの心筋細胞はその内部に含有された遺伝子制御により生まれる産物であり、その細胞の形態的・機能的特徴はその細胞の転写状態により制御されると考えられる。圧負荷後の転写活性化を抑制することにより、心臓の分子レベル・形態レベルのリモデリングを抑制できる⁴⁾。心筋細胞のシングルセルレベルの遺伝子発現解析により、老化に伴った転写不均一性の存在⁵⁾、負荷による脱分化や細胞周期リエントリーの可能性⁶⁾が示されており、遺伝子発現は細胞の機能情報を反映していると考えられるが、どの遺伝子プログラムが肥大や伸長といった形態的リモデリングを制御し、心肥大から心不全という機能的リモデリングを制御しているか、という本質的な問いに対する答は未だない。心不全の病態生理や本質的な治療標的を同定するためには、細胞レベルで肥大心筋細胞・不全心筋細胞の形態レベル・分子レベルの特徴を詳細に把握し、その間の細胞リモデリングの過程を詳細に理解する必要がある。さらに種を超えて保存される病態特異的遺伝子プログラムを同定できれば、心筋細胞の状態を転写状態により把握し、疾患層別化に寄与する分子病態の理解に発展させることができる。

最近我々は、圧負荷心不全モデルマウスおよび心不全患者の心臓から単離した心筋細胞のシングルセル解析を通して、肥大細胞から不全細胞へ至る心筋リモデリング過程における分子・形態・機能の関係を細胞レベルで明らかにし、疾患層別化に関連する病態特異的遺伝子プログラムを同定した⁷⁾。本稿ではその内容を紹介するとともに、シングルセル解析研究の将来展望について概説する。

2. 圧負荷心不全モデルマウスの心筋 1 細胞RNA-seqデータ取得

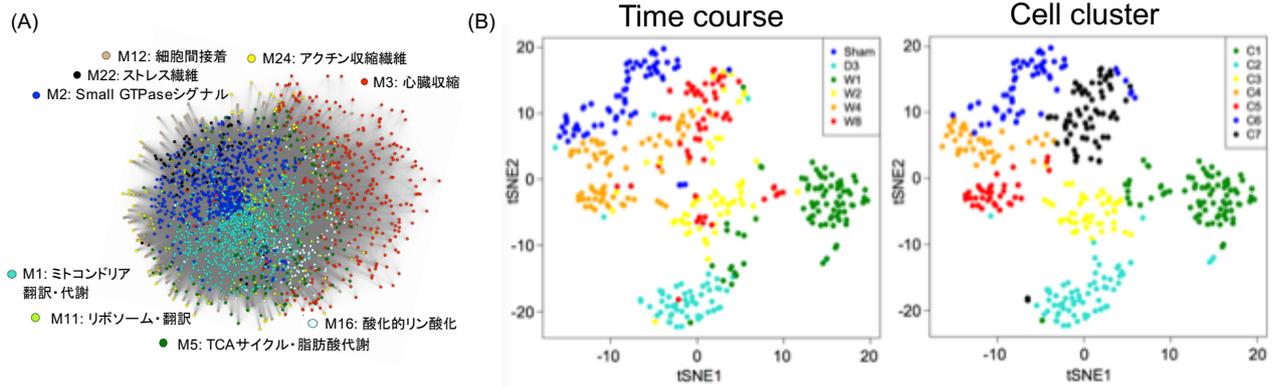
我々は横行大動脈縮窄術による圧負荷を心臓に加えて、心肥大（術後1-2週）、心不全（術後4-8週）を誘導するマウスをモデルに、心筋細胞の形態的特徴・分子的特徴が心臓機能とどのように関連するかを明らかにすることを目指した。

心筋細胞の細胞レベルの分子情報を包括的に得るために、まずシングルセルRNA-seq解析を単離心筋に適用する技術基盤を構築した。近年、微小流体装置（フリーダイン社C1など）やドロップレット作成装置（10x Genomics 社Chromiumなど）などの市販機器を用いてシングルセルcDNAライブラリを作成することが容易になってきているが、心筋細胞は長径150 μ m程度、短径50 μ m程度と非常に大きいため、いずれのプラットフォームでも解析できない。そこで我々はマニュアルピックアップとSmart-seq2法⁸⁾によるcDNAライブラリ作成技術を組み合わせて心筋シングルセルRNA-seq解析技術を構築した。

我々は圧負荷心不全モデルの圧負荷3日後、1・2・4・8週後および偽手術後にランゲンドルフ法にて心筋細胞を効率良く単離し、紡錘状の形態を保った生きた心筋細胞のみをマニュアルピックアップにて回収して、個々の心筋細胞のトランスクリプトームをSmart-seq2法⁹⁾により取得した。その後、重み付け遺伝子共発現ネットワーク解析（Weighted Gene Co-expression Network Analysis, WGCNA）⁹⁾にて心筋細胞において共発現する55個の遺伝子ネットワークモジュールを同定した。その後、機械学習アルゴリズムRandom Forests¹⁰⁾により全55モジュールのうち心筋細胞の分類に大きく寄与する9モジュールを抽出したため（図1A）、この9モジュールを用いて心筋細胞の階層的クラスタリングを行ったところ、心筋細胞を7つの細胞クラスターに分類できた。また次元圧縮アルゴリズムtSNE¹¹⁾を用いて2次元空間上

に細胞を配置したところ、この7つの細胞クラスターは綺麗に分離された（図1B）。

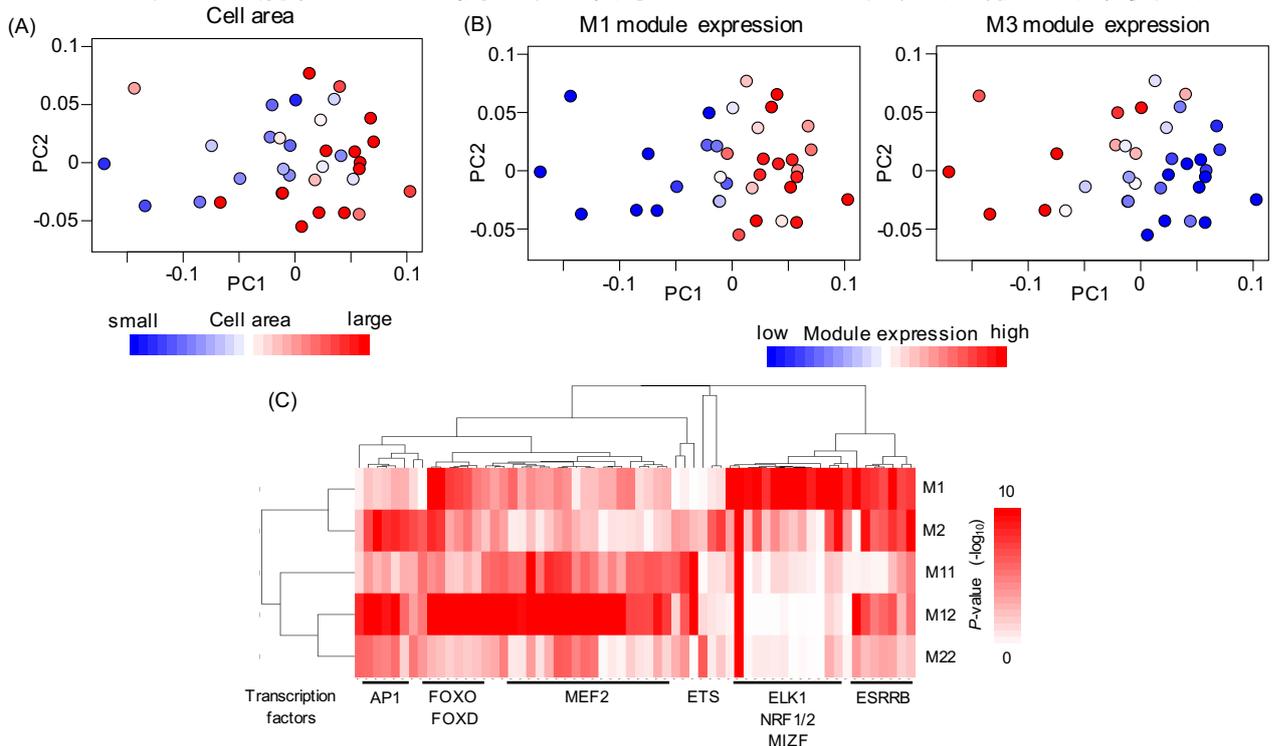
図1. 圧負荷心不全モデルマウスの心筋1細胞RNA-seq解析(文献7より改変引用)



3. 心筋細胞肥大と関連する転写ネットワークの同定

圧負荷刺激により心筋細胞は肥大することが知られているが、その細胞肥大はどのような遺伝子発現制御と関係しているか明らかでない。そこで我々は、圧負荷1週後の心肥大期にマウスから心筋細胞を単離し、細胞サイズを測定後にその細胞のシングルセルRNA-seq解析を行った。この細胞形態とトランスクリプトームの統合解析により、心筋細胞の肥大の程度はミトコンドリアにおいて翻訳・代謝を制御する遺伝子群の発現量と相関することを見出した（図2A）。また圧負荷1週後の肥大期的心筋細胞においてヒストンH3K27acのエピゲノム解析を行って上記の遺伝子群を制御する制御領域（エンハンサーやプロモーター）を検索したところ、ERK1/2によりリン酸化されるELK1/4¹²⁾、ミトコンドリア生合成を制御するNRF1/2¹³⁾の認識配列が濃縮していることがわかった（図2B）。すなわち圧負荷により活性化されるERK1/2・NRF1/2の転写ネットワークは心筋細胞の肥大とミトコンドリア生合成を同時に制御していることが明らかとなった。

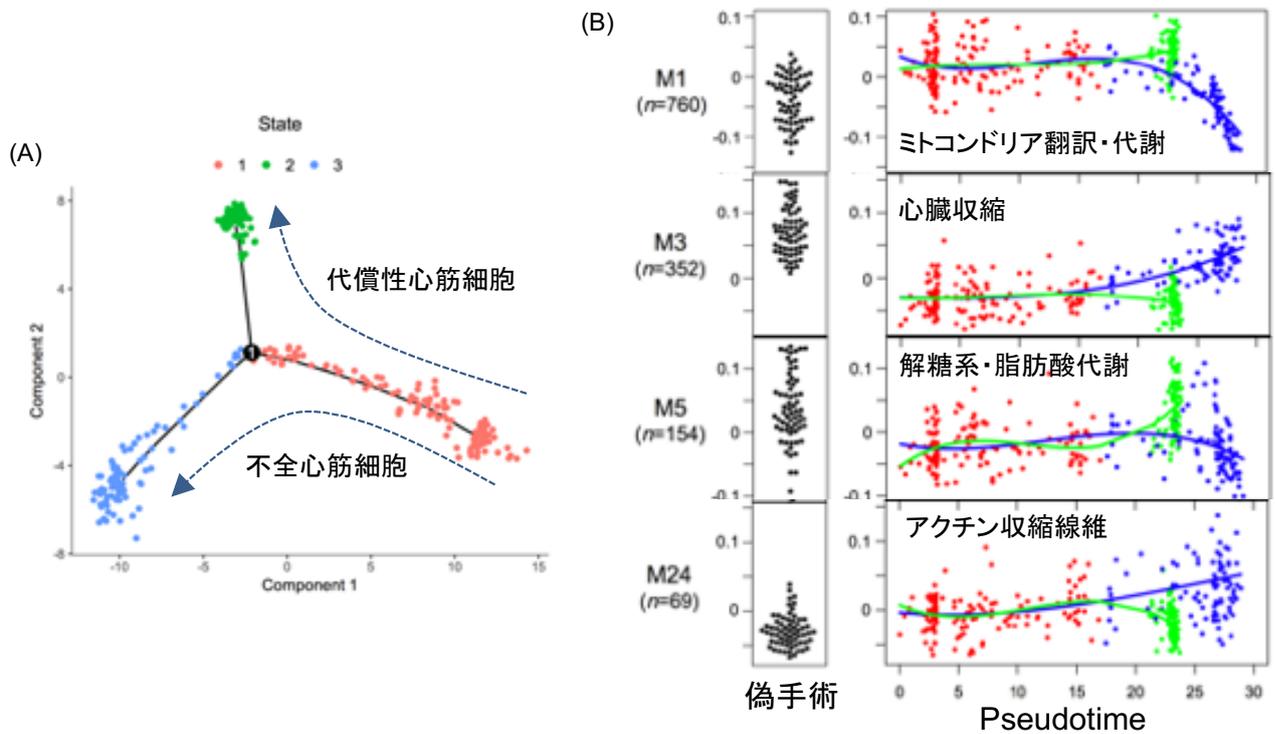
図2. 心筋細胞肥大と関連する転写ネットワークの同定(文献7より改変引用)



4. 心筋リモデリングにおける系譜追跡解析(肥大心筋細胞からの細胞系譜)

近年Monocle¹⁴⁾をはじめとして、シングルセルトランスクリプトームから細胞系譜を予測するアルゴリズムの開発が進んでいる。我々も、ベイズ推定を用いたトピックモデルに基づいたCellTree¹⁵⁾という細胞系譜アルゴリズムを開発している。本研究において系譜追跡解析を行ったところ、慢性的な圧負荷により肥大心筋細胞が代償性心筋細胞と不全心筋細胞へと分岐して心筋リモデリングが進むことを明らかにし（図3A）、この代償性心筋細胞と不全心筋細胞を分ける遺伝子発現プロファイルを同定した（図3B）。代償性心筋細胞では圧負荷により上昇したミトコンドリア翻訳・代謝制御遺伝子群の発現レベルが保たれているにも関わらず、不全心筋細胞ではこの遺伝子群の発現レベルが顕著に低下しており、アクチン結合分子・収縮線維遺伝子群の発現レベルが上昇していた。

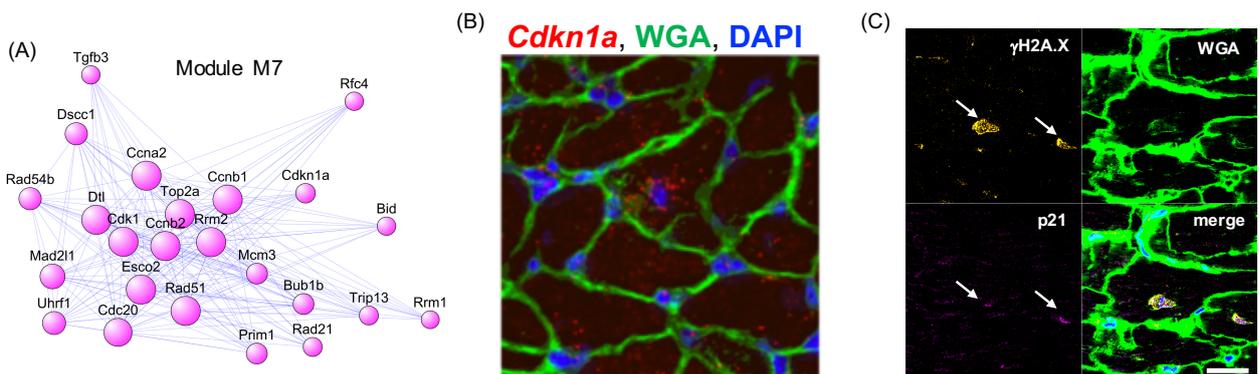
図3. 心筋リモデリングにおける系譜追跡解析(文献7より改変引用)



5. 肥大心筋における不全心筋細胞誘導シグナルの同定

そこで代償性心筋細胞と不全心筋細胞の分岐に関わる遺伝子群・シグナル経路を同定するため遺伝子ネットワーク解析を行ったところ、DNA損傷・p53シグナルに関連する遺伝子ネットワークが肥大型後半の心筋細胞において特異的に活性化していることがわかった(図4A)。p53シグナルの下流遺伝子である *Cdkn1a* (p21) 遺伝子の発現を1分子RNA *in situ* hybridization法により詳細に解析し、肥大型後半に時期特異的にこの遺伝子を強発現する細胞が出現することを確認した(図4B)。また免疫染色によりp21陽性細胞はγH2A.X (DNA損傷マーカー) 陽性細胞であることがわかり、DNA損傷応答に伴うp53シグナル活性化が圧負荷後の肥大型後半に時期特異的に現れることを明らかにした(図4C)。

図4. 肥大心筋における不全心筋細胞誘導シグナルの同定(文献7より改変引用)

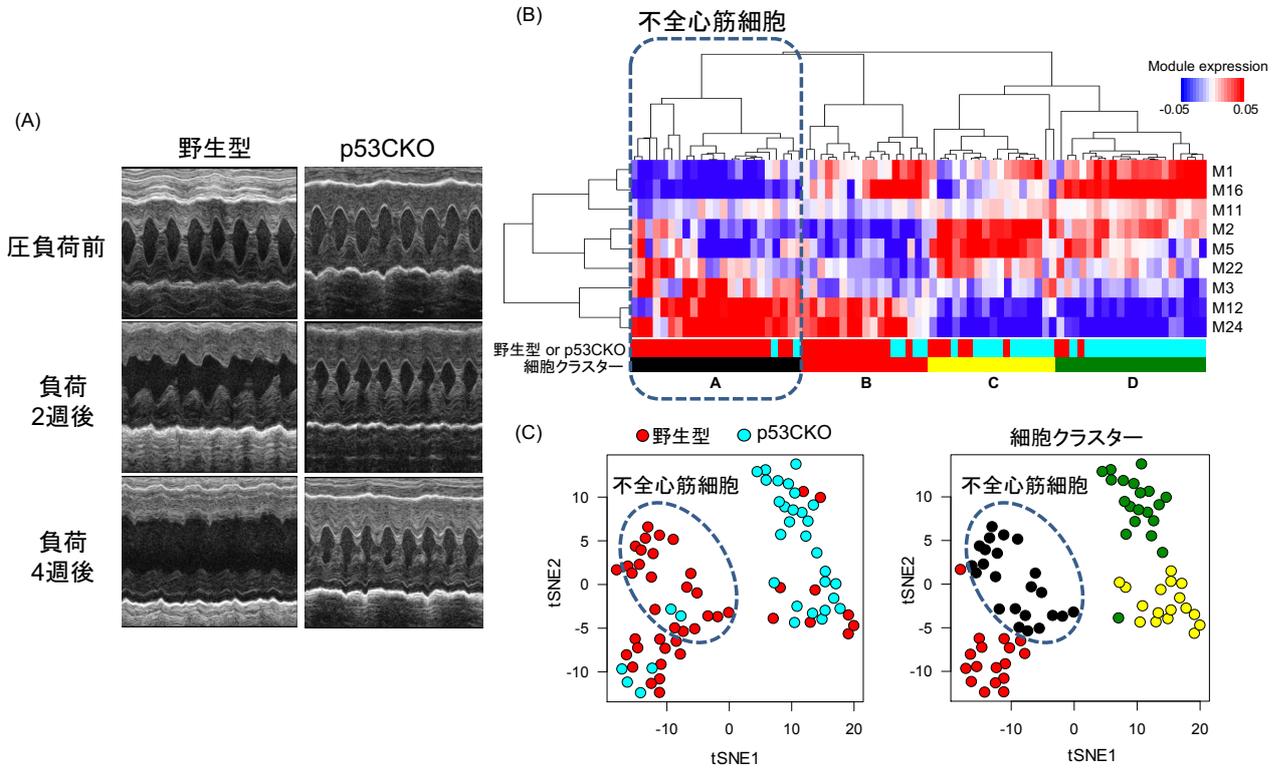


6. 心筋特異的p53ノックアウトマウスの解析

我々のグループは以前、全身性p53ノックアウトマウスにおいて心不全誘導が生じないこと⁶⁾を示したが、心臓線維芽細胞において虚血により活性化するp53が血管内皮細胞への形質転換を促して心臓循環を改善する、という報告がなされ、どの細胞のp53シグナルが心不全誘導を制御しているか不明であった¹⁷⁾。そこで我々は心筋細胞特異的p53ノックアウトマウス(p53CK0マウス)を作成して圧負荷後の心機能解析を行ったところ、このマウスでは心肥大は呈するものの心不全を生じないことがわかった(図5A)。また圧負荷2週後(野生型では肥大から不全への移行期)にp53CK0マウスおよび野生型マウスの心筋細胞を単離してsingle-cell RNA-seq解析を行ったところ、野生型マウスの心筋細胞は肥大型心筋細胞から代償性心筋細胞だけでなく不全心筋細胞へリモデリングを起こしている一方で、p53CK0マウスの心筋細胞は肥大型心筋細胞の状態からほぼ代償性心筋細胞のみへ移行していた(図5B)。また不全心筋細胞で特徴的なミトコンドリア翻訳・代謝制御遺伝子群の発現低下やアクチン結合分子・収縮線維遺伝子群の発現上昇が野生型マウスの心筋細胞では圧負荷2週後に見られる一方で、p53CK0マウスの心筋細胞では圧負荷2週

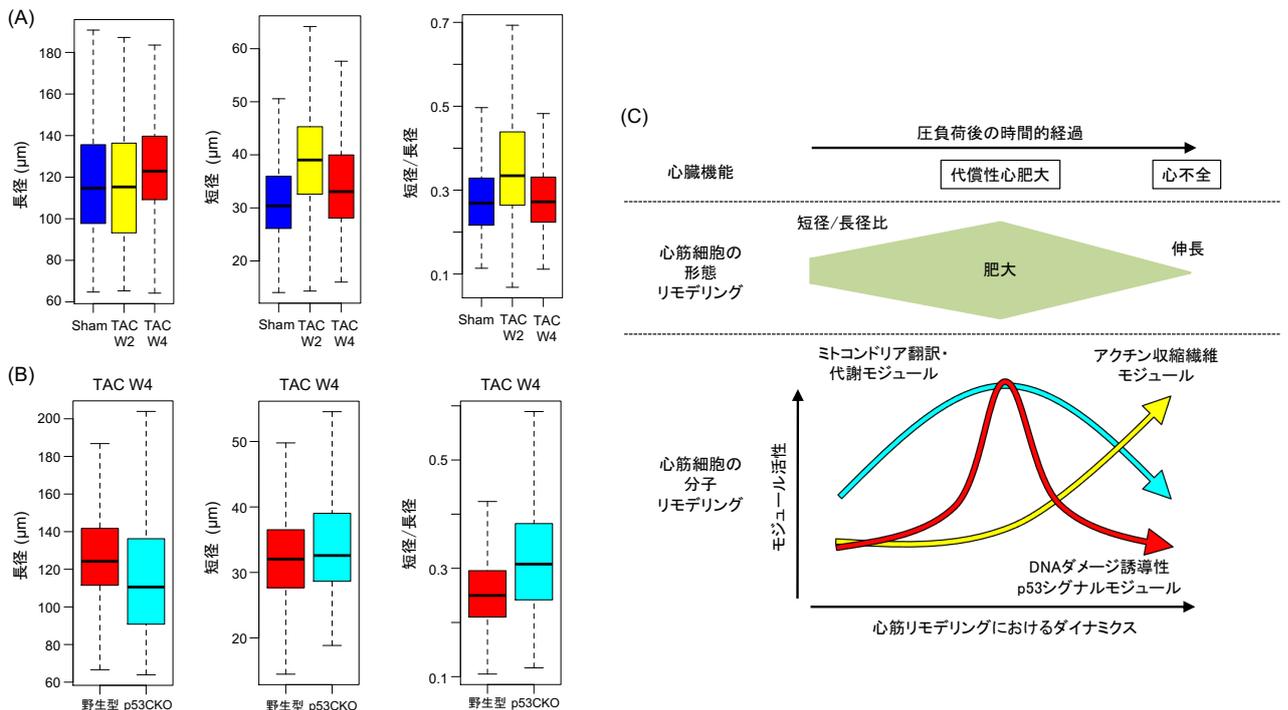
後でも全く見られなかった (図5C)。すなわち圧負荷後の肥大期後半に一過性にみられるp53シグナル活性化は不全心筋細胞誘導において必要である。圧負荷心不全モデルでは心肥大期には心筋細胞の短径が長くなり (肥大) 心不全期には長径が長くなる (伸長) が、p53CK0マウスに圧負荷手術を施した後に単離した心筋細胞では野生型マウスの不全期心筋細胞で見られる心筋伸長が生じない。すなわちp53シグナル活性化は不全心筋細胞で特徴的な心筋伸長をも制御していることがわかる。

図5. 心筋特異的p53ノックアウトマウスの解析 (文献7より改変引用)



以上をまとめると、心筋細胞は圧負荷に応じて、分子レベル・形態レベル・機能レベルで連動してリモデリングを起こしている (図6)。圧負荷直後に生じるミトコンドリア翻訳・代謝遺伝子群の発現は細胞肥大と直接関係しており、それはERK1/2・NRF1/2シグナルの転写ネットワークにより制御されている。また肥大心筋細胞から代償性心筋細胞と不全心筋細胞への分岐の際に活性化されるDNAダメージ・p53シグナルは肥大心筋細胞から不全心筋細胞へと分子レベル・形態レベル・機能レベルで変化する上で必要である。

図6. 圧負荷後の心筋リモデリングにおける形態・機能・分子レベルの関係性 (文献7より改変引用)

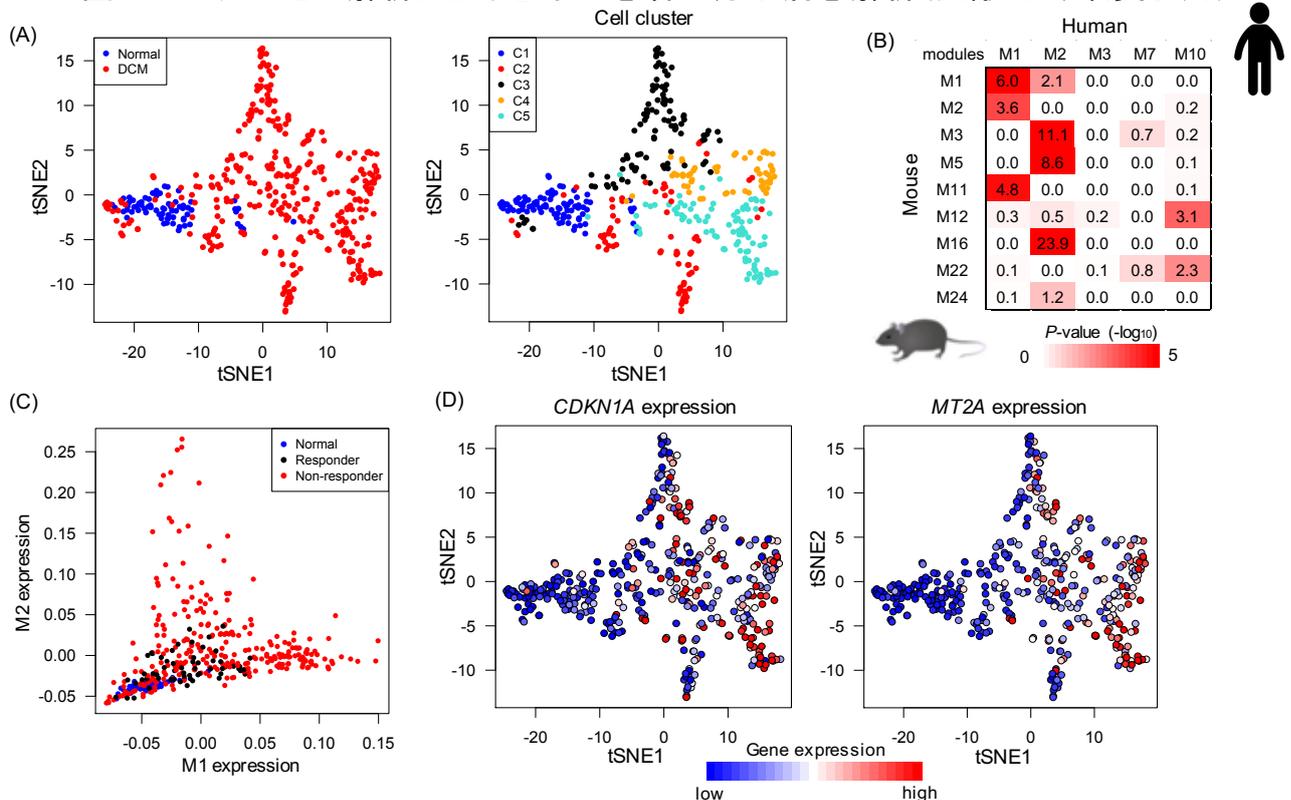


7. シングルセル解析の臨床応用

続いて、これまで構築してきた心筋シングルセル解析技術を心不全患者の心臓病態解析に応用した。我々は拡張型心筋症 (Dilated cardiomyopathy, DCM) 患者が左室補人工心臓 (Left Ventricular Assist Device, LVAD) の植込み術を受ける際に心臓組織から心筋細胞を単離してSmart-seq2法によるシングルセルRNA-seq解析を行った。WGCNA⁹⁾により17の遺伝子モジュールを抽出し、Random Forests¹⁰⁾により細胞分類に寄与する5つのモジュールを同定し、階層的クラスタリングにより心筋細胞は5つの細胞集団に分類された (図7A)。健常者の心筋細胞はひとつのクラスターに濃縮している一方で、DCM患者の心筋細胞は複数のクラスターに分類され、DCM心筋細胞は転写不均一性が大きいことがわかった。

さらにマウスの解析で得られた遺伝子モジュールとヒトの解析で得られた遺伝子モジュールの間のオーバーラップを解析したところ、ヒトの解析で得られる5つのモジュールのうちM1 (翻訳・細胞間接着・タンパク分解・細胞分裂遺伝子群) とM2 (ミトコンドリア・心筋収縮遺伝子群) によってマウスにおけるモジュール遺伝子の大半が説明可能であることがわかった (図7B)。そこでDCM患者のLVAD植込み術後の心機能の改善の程度とM1/M2の心筋遺伝子発現プロファイルの関係性を解析したところ、M1/M2遺伝子発現が高い心筋細胞を有する患者ではLVAD植込み術後の心機能の改善がみられない一方、M1/M2遺伝子発現が低い心筋細胞を有する患者は健常者と同様の遺伝子発現パターンでありリバースリモデリングを起こす可能性があることを見出した (図7C)。すなわち心筋遺伝子発現パターンにより心筋細胞の可逆性を評価できる可能性がある。またM1遺伝子群に含まれる*CDKN1A* (p21) は酸化ストレス応答により発現上昇するMetallothioneinファミリー¹⁸⁾の遺伝子と相関が高く (図7D)、M1遺伝子の発現上昇という心筋細胞の機能不可逆性は酸化ストレス応答と関係することが示唆された。

図7. シングルセル解析による心不全患者の分子病態解析 (文献7より改変引用)



8. おわりに

上記のように、我々はアステラス病態代謝研究会の助成により心臓疾患のシングルセル解析技術を構築した。今後はこの技術をさらに向上させて、時空間的な系譜追跡や細胞間相互作用の解析への応用、疾患層別化につながる臨床応用などを目指して研究をさらに発展させていく予定である。この場をもってアステラス病態代謝研究会に心より感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Komuro, I. & Yazaki, Y. Control of cardiac gene expression by mechanical stress. *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 55- 75 (1993).
- 2) Mudd, J. O. & Kass, D. A. Tackling heart failure in the twenty-first century. *Nature* **451**, 919- 928 (2008).
- 3) Haque, Z.K. & Wang, D.Z. How cardiomyocytes sense pathophysiological stresses for cardiac remodeling. *Cell. Mol. Life Sci.* **74**, 983- 1000 (2017).
- 4) Anand, P. *et al.* BET bromodomains mediate transcriptional pause release in heart failure. *Cell*

154, 569- 582 (2013).

- 5) Bahar, R. *et al.* Increased cell-to-cell variation in gene expression in ageing mouse heart. *Nature* **441**, 1011- 1014 (2006).
- 6) See, K. *et al.* Single cardiomyocyte nuclear transcriptomes reveal a lincRNA-regulated de-differentiation and cell cycle stress-response in vivo. *Nat. Commun.* **8**, 225 (2017).
- 7) Nomura, S. *et al.* Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure. *Nat. Commun.* **9**, 4435 (2018).
- 8) Picelli, S. *et al.* Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nat. Protoc.* **9**, 171- 181 (2014).
- 9) Langfelder, P. & Horvath, S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics* **9**, 559 (2008).
- 10) Breiman, L. Random forests. *Mach. Learn.* **45**, 5- 32 (2001).
- 11) Van der Maaten, L. & Hinton, G. Visualizing data using t-SNE. *J. Mach. Learn. Res.* **9**, 2579- 2605 (2008).
- 12) Babu, G. J., Lalli, M. J., Sussman, M. A., Sadoshima, J. & Periasamy, M. Phosphorylation of elk-1 by MEK/ERK pathway is necessary for c-fos gene activation during cardiac myocyte hypertrophy. *J. Mol. Cell Cardiol.* **32**, 1447- 1457 (2000).
- 13) Wu, Z. *et al.* Mechanisms controlling mitochondrial biogenesis and respiration through the thermogenic coactivator PGC-1. *Cell* **98**, 115- 124 (1999).
- 14) Qiu, X. *et al.* Reversed graph embedding resolves complex single-cell trajectories. *Nat Methods.* **14**, 979- 982 (2017).
- 15) duVerle DA *et al.* CellTree: an R/bioconductor package to infer the hierarchical structure of cell populations from single-cell RNA-seq data. *BMC Bioinformatics.* **17**, 363 (2016).
- 16) Sano, M. *et al.* p53-induced inhibition of Hif-1 causes cardiac dysfunction during pressure overload. *Nature* **446**, 444- 448 (2007).
- 17) Ubil E *et al.* Mesenchymal-endothelial transition contributes to cardiac neovascularization. *Nature.* **514**, 585-590 (2014).
- 18) Perkins, A., Nelson, K.J., Parsonage, D., Poole, L.B. & Karplus, P.A. Peroxiredoxins: guardians against oxidative stress and modulators of peroxide signaling. *Trends Biochem. Sci.* **40**, 435- 445 (2015).