様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　４ 年　 ５ 月 １４ 日現在

機関番号：１２６０１
研究種目：若手研究
研究期間：2019～2021
課題番号：１９Ｋ１７５８７

研究課題名（和文）心筋梗塞後組織修復及びリモデリングにおける一細胞レベル病態ダイナミクスの解明

研究課題名（英文）Single-cell pathological dynamics in tissue repair and remodeling after myocardial infarction

研究代表者
候　聡志（Ko, Toshiyuki）

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：００８３６０５９

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は心筋梗塞の病態理解のため、時間的・空間的なとランスクリプトーム解析を行うことを目指した。心筋梗塞時の心臓内の時空間的遺伝子発現制御を調べるため、健常時お及び心筋梗塞後1, 7, 14日目の心臓組織に対してシングル核RNA-seq及びspatial transcriptome解析を行った。その結果、梗塞後の超急性期に虚血辺縁領域特異的にメカノストレスに反応する遺伝子群の発現上昇を認めた。また、これとは別に、心臓線維芽細胞に対するシングルセルRNA-seqの解析結果から見出したHtra3という遺伝子が圧負荷，虚血の双方において心保護的役割を果たすことも明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義
本研究で認められたメカノストレス関連遺伝子やHtra3はいずれも心筋梗塞においては心保護的な役割を果たしており、新規治療ターゲットであると言える。また、本研究で取得したシングルセル・シングル核RNA-seqやSpatial transcriptomeのデータが今後論文として公開されれば、今後他の研究にもpublic dataとして利用されることで、一層この分野の研究進展に資するものであると思われる。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to perform spatiotemporal transcriptome analysis to understand the pathophysiology of myocardial infarction. To investigate the spatiotemporal regulation of gene expression in the heart after myocardial infarction, we performed single-nucleus RNA-seq and spatial transcriptome analysis on heart tissue on days 1, 7, and 14 after myocardial infarction or sham surgery. These analyses revealed that the expression of mechano-stress-responsive genes were up-regulated specifically in the ischemic border zone during the acute phase of post-infarction period. In addition, we found that Htra3, a gene identified by single-cell RNA-seq analysis of cardiac fibroblasts, plays a cardioprotective role in both pressure overload and ischemia.

研究分野：心不全

キーワード：心不全　心筋梗塞　シングルセル解析　空間的遺伝子発現解析

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

１．研究開始当初の背景

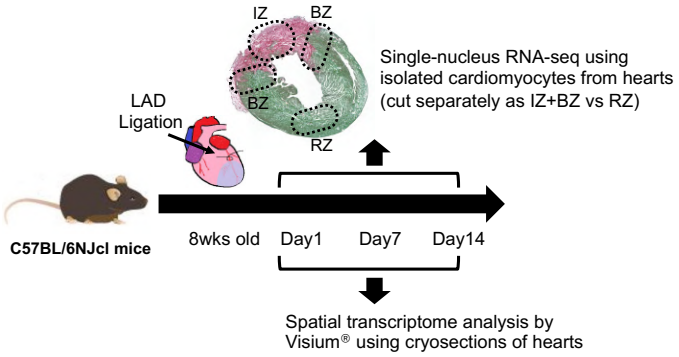
心筋梗塞は血行再建治療後にも徐々に心筋細胞の脱落や間質線維化（リモデリング）が進行して慢性期に心不全を引き起こすため、医療的にも医療経済的にも非常に問題となっている。その制圧のためにも細胞・分子レベルでのリモデリングや心不全に関する病態メカニズムの解明が必要不可欠である。組織損傷の適応・修復機構は様々な細胞・分子が複雑に連関するダイナミックな生命現象であり、近年ではシングルセル解析によってその理解は大きく進んだ。例えばシングルセル RNA-seq（scRNA-seq）解析により癌患者組織における悪性細胞の形質転換や非悪性細胞（線維芽細胞など）との連携の様子が明らかになった（Tirosh et al. *Science* 2016; Purum et al. *Cell* 2017）。本研究申請者らは心不全病態研究にシングルセル解析技術を応用するため、過去に技術開発・確立に取り組んできた。具体的には、マウス心臓から単離した心筋細胞や非心筋細胞の scRNA-seq 解析を行う技術，さらには心不全患者の単離心筋細胞に応用して分子病態を解析する技術などを開発・確立してきた（Nomura, Ko et al. *Nat Commun*. 2018）。一方で心筋梗塞後の心臓では刻々と病態を形成する各種細胞，シグナル分子が変化しており、また梗塞巣・梗塞境界領域・非梗塞領域といった位置による違いも大きく影響するため、従来の scRNA-seq だけでは分子病態の全容を明らかにすることはできず、時空間的遺伝子発現解析も求められる。過去には心筋梗塞を対象とした RNA-seq による網羅的な解析も多く試みられてきたが、多くがシングルセルレベルではないのに加えて、経時的に細かく解析されたものも少なかった。また、RNA *in situ* hybridization や免疫染色、さらには次世代シークエンサーを用いた空間的遺伝子発現解析の報告もあるが、やはり網羅的解析でなかったり、解像度が足りなかったり、梗塞巣のみに限局した解析であったりと、不十分であった。

２．研究の目的

上記の問題点に対して、本研究では主に時空間的に網羅的な遺伝子発現解析を行うことで、心筋梗塞後の病態解明を目指した。本研究を通して得られる各種細胞のトランスクリプトームの経時的変化や位置別トランスクリプトームの情報を解析することで、心筋梗塞後に生じるリモデリングや心不全において、具体的にどのタイミングでどの細胞種のどんな因子が重要であるかが明らかとなり、虚血性心不全の新規治療法を創出する基盤になり得ると考えた。

３．研究の方法

マウスの左冠状動脈前下行枝(LAD)を結紮することで心筋梗塞モデルを作成し、偽手術及び梗塞発症後 1，7，14 日目と経時的に領域ごとに心筋細胞のシングル核 RNA-seq（snRNA-seq）を行った他、同様のタイミングで心臓組織を採取して空間的遺伝子発現解析（10X Genomics 社 Visium）も行った。また、様々な解析を通して見出して心保護因子の心筋梗塞における役割の確認検証を行うため、マウス心筋梗塞モデルを用いて追加の解析を行った。

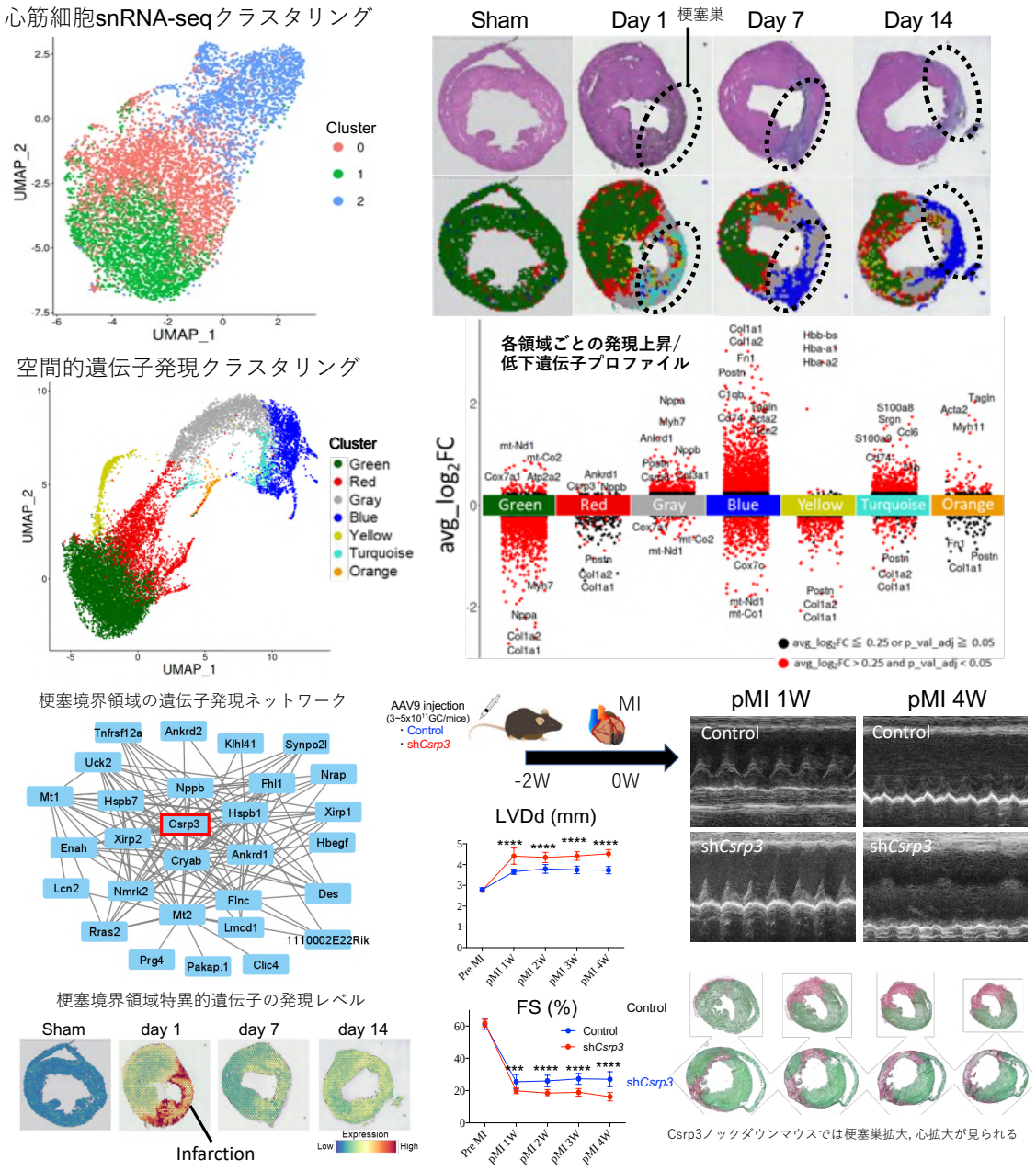


４．研究成果

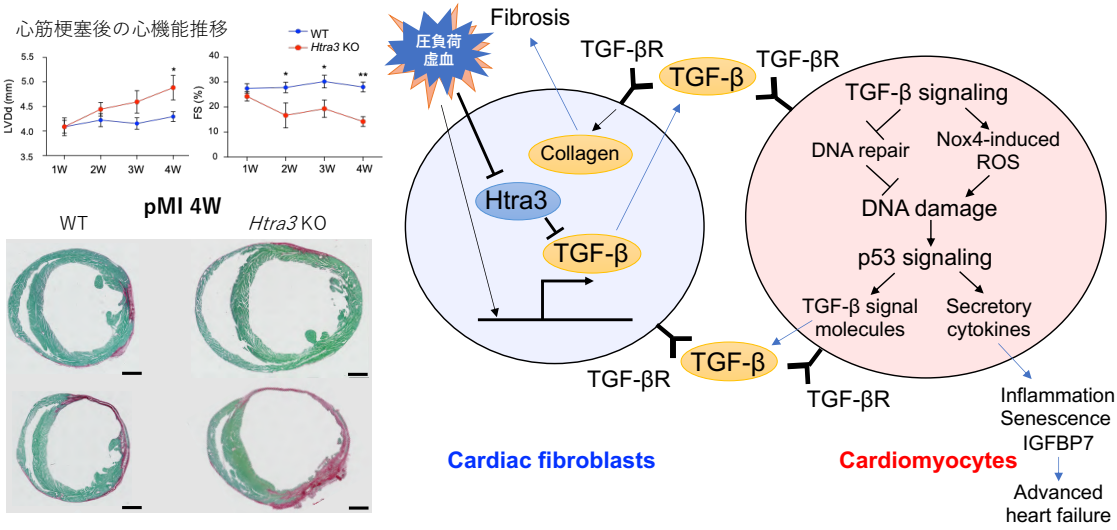
心筋細胞 snRNA-seq の結果から、同じ心筋細胞であっても遺伝子発現情報に基づいて解析すると、いくつかの細胞集団に分かれることが分かり、特に心筋細胞集団 2（Cluster2）は梗塞後の急性期において梗塞巣＋梗塞境界領域に多く認められており、他とは明らかに異なるものであった。また、Visium を用いて行った空間的遺伝子発現解析では HE 染色で認められた梗塞巣・梗塞境界領域・非梗塞領域といった病理的特徴に沿った領域ごとに明らかに遺伝子発現情報の差異を認め、かつ梗塞後のタイミングによっても遺伝子発現情報は異なっていた。両者の情報を統合解析することで、心筋細胞 snRNA-seq で見られた Cluster2 の細胞集団は空間的には梗塞境界領域に存在することが明らかとなった。

梗塞境界領域に着目して、重み付け遺伝子共発現ネットワーク解析（WGCNA）という手法を用いることで、同領域において中心的な役割を果たす遺伝子発現プロファイルを同定したところ、メカノストレス受容に関するような心筋サルコメア構成遺伝子（*Csrp3*, *Ankrd1*, *Cryab* 等）が多く含まれていた。その何れも変異によって心筋症を生じうる重要な因子であり、梗塞後急性期においてこれらの発現上昇が何を示唆するのかを調べるため、そのうちの一つである Csrp3 を shRNA を搭載させたアデノ随伴ウイルスベクター（AAV9-sh*Csrp3*）を利用してノックダウンして

心筋梗塞モデルを作成して検証した。その結果、対象群と比較して梗塞後により顕著なリモデリング拡大，心拡大，心機能低下を示したため、こうしたメカノストレス受容関連遺伝子の発現上昇は心保護的であることが示唆された。



また、心臓線維芽細胞の scRNA-seq 解析の結果、同細胞集団の遺伝子発現ネットワークの中に Htra3 という機能未知の遺伝子が含まれていることが分かった。Htra3 のノックアウトマウスを作成し、心筋梗塞モデルにより機能検証すると、Htra3 ノックアウトマウスは有意に心機能が悪いことが分かり、Htra3 欠損線維芽細胞の scRNA-seq や免疫ブロッティングをはじめとした解析により、Htra3 は TGF β を分解することにより TGF β シグナルを抑制することが分かった。また、Htra3 の発現は心臓線維芽細胞にかなり限局して認められるが、Htra3 欠損下で圧負荷や虚血のストレスが加わると、TGF β シグナルが過剰に活性化してしまうために間接的に心筋細胞にも ROS 産生・DNA 損傷蓄積といった影響が生じることが明らかとなった。こうして不全化した心筋細胞は健常時には見られないような様々な老化関連炎症性サイトカインを発現しており、重症度別の心不全症例を対象とした血清プロテオーム解析の結果、不全化心筋細胞から発現される老化関連炎症性サイトカインの量は心不全予後を予測するのに有用であることが分かった。


心筋梗塞後の心機能推移
WT
Htra3 KO
LVDd (mm)
FS (%)
1W
2W
3W
4W
pMI 4W
WT
Htra3 KO
Fibrosis
圧負荷
虚血
TGF-βR
TGF-β
TGF-βR
Collagen
Htra3
TGF-β
TGF-β signaling
DNA repair
Nox4-induced
ROS
DNA damage
p53 signaling
TGF-β signal
molecules
Secretory
cytokines
TGF-β
TGF-βR
TGF-βR
Inflammation
Senescence
IGFBP7
Advanced
heart failure
Cardiac fibroblasts
Cardiomyocytes

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕　計6件（うち査読付論文　5件／うち国際共著　1件／うちオープンアクセス　5件）

１．著者名 T Ko, S Nomura, S Yamada, K Fujita, T Fujita, M Satoh, C Oka, M Katoh, M Ito, M Katagiri, T Sassa, B Zhang, S Hatsuse, T Yamada, M Harada, H Toko, E Amiya, M Hatano, O Kinoshita, K Nawata, H Abe, T Ushiku, M Ono, M Ikeuchi, H Morita, H Aburatani, I Komuro	４．巻
２．論文標題 Cardiac fibroblasts regulate the development of heart failure　via Htra3-TGF-β-IGFBP7 axis	５．発行年 2022年
３．雑誌名 Nature Communications	６．最初と最後の頁 inpress
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 M Ishizuka、M Harada、S Nomura、T Ko、Y Ikeda、J Guo、S Bujo、H Yanagisawa、M Satoh、S Yamada、H Kumagai、Y Motozawa、H Hara、T Fujiwara、T Sato、N Takeda、N Takeda、K Otsu、H Morita、H Toko、I Komuro	４．巻 11
２．論文標題 CXCR7 ameliorates myocardial infarction as a β-arrestin-biased receptor	５．発行年 2021年
３．雑誌名 Scientific Reports	６．最初と最後の頁 3426
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-83022-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

１．著者名 Toko Haruhiro、Morita Hiroyuki、Katakura Masanori、Hashimoto Michio、Ko Toshiyuki、Bujo Satoshi、Adachi Yusuke、Ueda Kazutaka、Murakami Haruka、Ishizuka Masato、Guo Jiaxi、Zhao Chunxia、Fujiwara Takayuki、Hara Hironori、Takeda Norifumi、Takimoto Eiki、Shido Osamu、Harada Mutsuo、Komuro Issei	４．巻 10
２．論文標題 Omega-3 fatty acid prevents the development of heart failure by changing fatty acid composition in the heart	５．発行年 2020年
３．雑誌名 Scientific Reports	６．最初と最後の頁 15553
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-72686-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

1．著者名 Yamaguchi Toshihiro、Sumida Tomokazu S.、Nomura Seitaro、Satoh Masahiro、Higo Tomoaki、Ito Masamichi、Ko Toshiyuki、Fujita Kanna、Sweet Mary E.、Sanbe Atsushi、Yoshimi Kenji、Manabe Ichiro、Sasaoka Toshikuni、Taylor Matthew R. G.、Toko Haruhiro、Takimoto Eiki、Naito Atsuhiko T.、Komuro Issei	4．巻 11
2．論文標題 Cardiac dopamine D1 receptor triggers ventricular arrhythmia in chronic heart failure	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Nature Communications	6．最初と最後の頁 4364
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-18128-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1．著者名 候　聡志	4．巻 24
2．論文標題 DNA損傷評価に基づく拡張型心筋症患者の精密医療	5．発行年 2020年
3．雑誌名 Heart View	6．最初と最後の頁 994-1000
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18885/HV.0000000322	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 －

1．著者名 Ko T, Fujita K, Nomura S, Uemura Y, Yamada S, Tobita T, Katoh M, Satoh M, Ito M, Domoto Y, Hosoya Y, Amiya E, Hatano M, Morita H, Fukayama M, Aburatani H, Komuro I.	4．巻 4(6)
2．論文標題 Quantification of DNA damage in heart tissue as a novel prediction tool for therapeutic prognosis of patients with dilated cardiomyopathy.	5．発行年 2019年
3．雑誌名 JACC: Basic to Translational Science	6．最初と最後の頁 670-680
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jacbts.2019.05.010.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 －

〔学会発表〕　計8件（うち招待講演　2件／うち国際学会　3件）

1．発表者名 Toshiyuki Ko
2．発表標題 Aberrant Interaction Between TEAD1 and Lamin A/C Impairs Cardiomyocyte Maturation in LMNA-related Cardiomyopathy
3．学会等名 日本循環器学会（招待講演）（国際学会）
4．発表年 2022年

１．発表者名
Toshiyuki Ko

２．発表標題
Single-cell multiomic analysis of both knock-in mouse and iPSCMs identifies the mechanism of maturation abnormality in heart caused by LMNA Q353R mutation

３．学会等名
International Society for Heart Research日本部会

４．発表年
2021年

１．発表者名
Toshiyuki Ko

２．発表標題
Cardiac Fibroblasts are Critically Involved in the Development of Heart Failure by Inducing Cardiomyocyte Senescence

３．学会等名
American Heart Association（国際学会）

４．発表年
2021年

１．発表者名
Toshiyuki Ko

２．発表標題
Single-Cell Analysis to Explore the Molecular Pathology of Heart Failure

３．学会等名
日本循環器学会（招待講演）

４．発表年
2021年

１．発表者名
Toshiyuki Ko

２．発表標題
Mechanical Stress on Cardiac Fibroblasts Triggers Phenotypic Conversion in Cardiomyocytes Leading to Heart Failure

３．学会等名
日本循環器学会

４．発表年
2021年

１．発表者名
Toshiyuki Ko

２．発表標題
Single cell RNA-seq of human cardiomyocytes revealed DNA damage response as a novel predictor for therapeutic prognosis in heart failure patients with dilated cardiomyopathy

３．学会等名
International Society for Heart Research World Congress 2019（国際学会）

４．発表年
2019年

１．発表者名
Toshiyuki Ko, Seitaro Nomura, Masaru Hatano, Issei Komuro

２．発表標題
Quantification of DNA Damage in Heart Tissue as　A Novel Prediction Tool for Therapeutic Prognosis

３．学会等名
第23回日本心不全学会学術集会

４．発表年
2019年

１．発表者名
Toshiyuki Ko, Seitaro Nomura, Masaru Hatano, Issei Komuro

２．発表標題
DNA傷害定量評価に基づく拡張型心筋症患者の治療予後予測

３．学会等名
第67回日本心臓病学会学術集会

４．発表年
2019年

〔図書〕　計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

―

６．研究組織

	氏名 （ローマ字氏名） （研究者番号）	所属研究機関・部局・職 （機関番号）	備考

７．科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕　計0件

８．本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関