

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 2 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19371

研究課題名(和文)心不全における心筋細胞のheterogeneityの意義とその誘導因子の解明

研究課題名(英文)Cardiomyocyte herogeneity in heart failure

研究代表者

野村 征太郎(Nomura, Seitaro)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号：10722118

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、心臓に対する圧負荷応答およびその破綻によって生じる心不全において、心筋細胞に生じる不均一性を詳細に評価し、その疾患発症における意義の解明を目指したものである。我々は圧負荷心不全マウスの心臓から単離した心筋細胞の1細胞トランスクリプトーム解析、心臓切片の1分子レベルRNA in situ hybridization解析を行うことにより、心不全過程において心筋細胞の時空間的な挙動を分子レベルで明らかにし、心不全誘導に関連する特徴的な因子を同定した。本研究は、臓器を構成する細胞集団の不均一性を解明する手段を新たに構築するのみならず、その解析法の病態解明における有用性を実証している。

研究成果の概要(英文)：This study has aimed to assess the cardiomyocyte heterogeneity during heart failure and uncover the significance of this heterogeneity for the development of heart failure. Having analyzed single-cardiomyocyte transcriptomes, we revealed the transcriptional heterogeneity in cardiomyocytes during heart failure. RNA in situ hybridization analysis showed the spatial heterogeneity in expression of genes characteristic for heart failure progression. We also identified the factors that are heterogeneously expressed as the cause of heart failure progression. This study not only establishes the method to analyze the cellular heterogeneity, but also demonstrates its usefulness in dissecting disease pathogenesis.

研究分野：循環器内科

キーワード：分子心臓学 ゲノム科学

1. 研究開始当初の背景

心臓は過度の圧負荷や虚血などのストレスを受けると、ポンプ機能が破綻し心不全を発症する。我々は、心不全で増加する補体 C1q が Wnt シグナル活性化を介して組織老化(Naito, Nomura et al., *Cell* 2012)、動脈硬化(Sumida, Nomura et al., *Nat. Commun.* in press) を誘導することを明らかにしてきた。これらの研究は、心不全発症に寄与する新たな液性因子の存在を明らかにしたものの、「心不全において(心臓の主要な構成要素である)心筋細胞がどのように個性転換を起こしているか」という細胞レベルの本質的な問いに答えることができなかった。

心不全時には、心筋細胞は胎児期に発現していた遺伝子を再発現し、収縮力の弱い不全心筋へと個性転換することが知られており、細胞の個性転換が生じていることは間違いないが、この個性転換がどの程度生じているのか、さらにはそのメカニズムや意義は明らかではない。

我々は、心不全における心筋細胞の1細胞ごとの反応の違いを明らかにするために、心不全における心筋細胞を単離して1細胞 RNA シークエンス解析を行い、心筋細胞の反応は極めて不均一(heterogeneous)であるが、心不全の疾患発症の基盤となる協調的な遺伝子ネットワークを内在したものであることを見出している。

2. 研究の目的

本研究は、心不全における心筋細胞の1細胞トランスクリプトーム/エピゲノムを統合解析することで、心筋細胞の不均一性(heterogeneity)を生み出す要因を明らかにし、心不全の病態形成に寄与する分子機構の解明につなげることを目的としたものであり、細胞の heterogeneity を標的とした心不全の新たな治療法を創出する基盤になることを目指したものである。

3. 研究の方法

成熟マウスの横行大動脈を縮窄して心臓に圧負荷をかけて心肥大・心不全を誘導するモデルを用いた。我々のモデルでは術後1-2週後に心肥大を、4-8週後に心不全を呈する。この過程において、術後3日、1・2・4・8週後に心臓を摘出し、ランゲンドルフ灌流心法を用いて心筋細胞を単離し、Smart-seq2(①)を応用して心筋1細胞のトランスクリプトーム情報を抽出して解析を行った。圧負荷を与えない偽手術を施行したマウスの心筋細胞をコントロールとして用いた。また心臓組織における空間的な遺伝子発現を解析する上で、1分子 RNA FISH(②)を用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 心不全における心筋細胞リモデリングの細胞系譜 fdf っ dfdfd

圧負荷心不全モデルの6タイムポイントから合計396細胞の1細胞トランスクリプトーム情報を得た。まず重み付け遺伝子共発現ネットワーク解析(Weighted gene co-expression network analysis)(③)を行い、共発現している遺伝子グループ(モジュール)を抽出し、そのモジュールの活性の強弱によって細胞を分類した。すると、このモジュールの活性化パターンによって396個の心筋細胞を7つの細胞集団に分類することに成功した。さらに細胞間の関係性を tSNE(t-distributed stochastic neighbor embedding)(④)を用いて解析することにより、この7つの細胞集団の時間的な流れを予測することに成功した。これにより、圧負荷後に心筋細胞が不全心筋細胞へとリモデリングする過程を1細胞レベルで詳細に明らかにした。

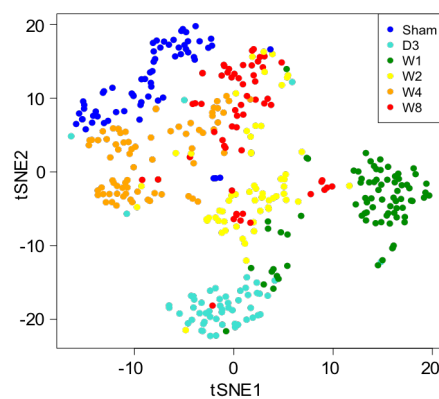


図1. 心不全における1細胞トランスクリプトーム解析 (Shamは偽手術、他は圧負荷手術後の期間)

(2) 空間的な遺伝子発現の不均一性

このダイナミクスを詳細に解析すると、圧負荷直後から心臓収縮に関わる遺伝子を含むモジュールの活性が低下し、その後心不全になるに伴ってその活性が回復することを見出した。また興味深いことに、1分子 RNA FISHを用いて特徴的な遺伝子の発現を空間的に計測したところ、心臓内の心筋細胞の位置によ

Atp2a2, DAPI, WGA

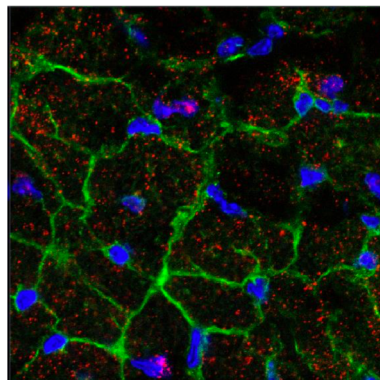


図2. 1分子 RNA FISHによる空間的な遺伝子発現解析

って遺伝子発現パターンは異なることを見出した。これは心臓内の位置によって心筋細胞のストレスのかかり方に差がある可能性を示している。

(3) 形態的な不均一性

また圧負荷後の心筋細胞の形態的变化と遺伝子発現の関係性を1細胞レベルで解析したところ、肥大の程度が大きい(面積の大きい)細胞において、ミトコンドリアのリボソーム・代謝の活性が強いことがわかった。これは圧負荷後にミトコンドリアを増やして代償しようという機構を見ているものと考えられる。さらにエピゲノム解析を統合することにより、ミトコンドリアのリボソーム・代謝に関わる遺伝子の発現の制御エレメントに心肥大に関わるシグナルの下流転写因子の認識配列が濃縮しており、肥大シグナルとミトコンドリア生合成の綿密な関係性を示唆しているものと考えられた。

(4) 心不全誘導細胞の出現

さらに1細胞トランスクリプトーム解析によって同定された不全心筋細胞が心肥大の時期から少数ではあるが出現することを見出したため、その時期に少数の細胞のみで活性化するネットワークを抽出し、このネットワークを制御する転写因子を同定した。このような希少な細胞が出現することは免疫染色でも明瞭に確認することができた。そこでその制御因子を心筋細胞特異的にノックアウトしたマウスを作成し、そのマウスに圧負荷を加え、通常野生型マウスでは心不全が誘導される時期の心筋細胞を抽出して1細胞トランスクリプトーム解析を行ったところ、不全心筋細胞が出現しないことがわかった。また心エコー検査によって、このマウスは心肥大を生じるが、心不全を生じないことがわかった。以上の解析により、肥大心筋細胞から不全心筋細胞への心筋リモデリングを制御するシグナルを明らかにすることに成功した。

(5) 考察

本研究により、圧負荷によって誘導される心筋リモデリングの時間的・空間的な挙動を明らかにした。圧負荷によって誘導されるミトコンドリアのリボソーム・代謝に関わる遺伝子群は、負荷に対して細胞がより多くのエネルギーを必要とするためにミトコンドリアを増やして対応している現象をみたものと考えられる。本研究により、我々はその制御シグナルおよび転写因子を同定することに成功した。今後ミトコンドリアの増殖が細胞内代謝のリモデリングをどのように誘導するかを明らかにする必要がある。また心肥大から心不全をつなぐシグナルの活性化様式も深く解析していく。

また本研究は、1細胞レベルで疾患モデルを構築する新たな手法を開発したものである。本研究の解析手法はあらゆる疾患モデルに応

用可能であるだけでなく、疾患発症患者の組織検体も同様に解析できる。今後患者ごとの疾患の分子病態を解析する新たな技術へと発展が期待される。

本研究により、我々は心筋細胞のリモデリングの過程を詳細に明らかにした。本研究の臨床的な意義は、心筋リモデリングの制御過程を詳細に明らかにし、その誘導シグナル・誘導因子を同定したことである。これらのシグナルや因子を制御する薬剤を作成することにより、現在存在しない心不全の本質的な治療薬へと発展することが期待される。

<引用文献>

① Picelli S, Faridani OR, Björklund AK, Winberg G, Sagasser S, Sandberg R. Full-length RNA-seq from single cells using Smart-seq2. *Nature Protocols*. 2014 Jan;9(1):171-81.

② Wang FJ, Flanagan J, Su N, Wang LC, Bui S, Nielson A, Wu X, Vo HT, Ma XJ, Luo Y. RNAscope: a novel in situ RNA analysis platform for formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Journal of Molecular Diagnostics*. 2012 Jan;14(1):22-9.

③ Langfelder, P. & Horvath, S. WGCNA: an R package for weighted correlation network analysis. *BMC Bioinformatics*. 2008 Dec 29;9:559.

④ Van der Maaten, L. & Hinton, G. Visualizing data using t-SNE. *Journal of Machine Learning Research*. 2008; 9, 2570-2605

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計7件)

① Higo T, Naito AT, Sumida T, Shibamoto M, Okada K, Nomura S, Nakagawa A, Yamaguchi T, Sakai T, Hashimoto A, Kuramoto Y, Ito M, Hikoso S, Akazawa H, Lee JK, Shiojima I, McKinnon PJ, Sakata Y, Komuro I. DNA single-strand break-induced DNA damage response causes heart failure. *Nature Communications*. 2017 Apr 24;8:15104 (査読有).

doi: 10.1038/ncomms15104.

② Nakamura S, Koyama T, Izawa N, Nomura S, Fujita T, Omata Y, Minami T, Matsumoto M, Nakamura M, Fujita-Jimbo E, Momoi T, Miyamoto T, Aburatani H, Tanaka S. Negative feedback loop of bone resorption by NFATc1-dependent induction of Cadml. *PLoS One*. 2017 Apr 17;12(4):e0175632 (査読有).

doi: 10.1371/journal.pone.0175632.

③ Kamo T, Akazawa H, Suda W, Saga-Kamo A, Shimizu Y, Yagi H, Liu Q, Nomura S, Naito AT, Takeda N, Harada M, Toko H, Kumagai H, Ikeda Y, Takimoto E, Suzuki JI, Honda K, Morita H, Hattori M, Komuro I.

Dysbiosis and compositional alterations with aging in the gut microbiota of patients with heart failure. *PLoS One*. 2017 Mar 22;12(3):e0174099 (査読有).

doi: 10.1371/journal.pone.0174099.

④ Kushida N, Nomura S, Mimura I, Fujita T, Yamamoto S, Nangaku M, Aburatani H. Hypoxia-Inducible Factor-1 α Activates the Transforming Growth Factor- β /SMAD3 Pathway in Kidney Tubular Epithelial Cells. *American Journal of Nephrology*. 2016;44(4):276-285 (査読有).

⑤ duVerle DA, Yotsukura S, Nomura S, Aburatani H, Tsuda K. CellTree: an R/bioconductor package to infer the hierarchical structure of cell populations from single-cell RNA-seq data. *BMC Bioinformatics*. 2016 Sep 13;17(1):363 (査読有).

doi: 10.1186/s12859-016-1175-6.

⑥ Nakagawa A, Naito AT, Sumida T, Nomura S, Shibamoto M, Higo T, Okada K, Sakai T, Hashimoto A, Kuramoto Y, Oka T, Lee JK, Harada M, Ueda K, Shiojima I, Limbourg FP, Adams RH, Noda T, Sakata Y, Akazawa H, Komuro I. Activation of endothelial β -catenin signaling induces heart failure. *Scientific Reports*. 2016 May 5;6:25009 (査読有).

doi: 10.1038/srep25009.

⑦ Okada K, Naito AT, Higo T, Nakagawa A, Shibamoto M, Sakai T, Hashimoto A, Kuramoto Y, Sumida T, Nomura S, Ito M, Yamaguchi T, Oka T, Akazawa H, Lee JK, Morimoto S, Sakata Y, Shiojima I, Komuro I. Wnt/ β -Catenin Signaling Contributes to Skeletal Myopathy in Heart Failure via Direct Interaction With Forkhead Box O. *Circulation Heart Failure*. 2015 Jul;8(4):799-808 (査読有).

doi: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.114.001958.

[学会発表] (計 3 件)

① 野村征太郎、Genetics of Cardiomyopathy、第 81 回 日本循環器学会学術集会、2017 年 3 月 19 日、ホテル金沢 (石川県金沢市)

② 野村征太郎、佐藤真洋、候聡志、藤田隆教、油谷浩幸、小室一成、システム生物学的アプローチによる心不全 1 細胞モデリング、第 20 回日本心不全学会学術集会、2016 年 10 月 7 日 ~ 2016 年 10 月 9 日、ロイトン札幌 (北海道札幌市)

③ 野村征太郎、飛田尚重、藤田隆教、油谷浩幸、小室一成、心筋症のハイスループットな遺伝子解析技術の構築とその応用、2016 年 10 月 7 日 ~ 2016 年 10 月 9 日、ロイトン札幌 (北海道札幌市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ

https://cardiovasc.m.u-tokyo.ac.jp/study/system_cardiology/about

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野村征太郎 (NOMURA, Seitaro)

東京大学・医学部附属病院・特任助教

研究者番号 : 10722118