

令和元年5月14日現在

機関番号：12501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2017～2018

課題番号：17H06566

研究課題名（和文）ゲノム解析と1細胞解析を統合した心筋症precision medicineの確立

研究課題名（英文）Establishment of precision medicine for cardiomyopathy using genome analysis and single cell analysis

研究代表者

佐藤 真洋（Sato, Masahiro）

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10802564

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により、TTN遺伝子変異を有す拡張型心筋症患者は補助人工心臓など治療に反応し心収縮能が改善、一方、LMNA遺伝子変異を有す拡張型心筋症患者は補助人工心臓など積極的な治療を行うも収縮能は改善せず予後不良集団であることを見出した。左室補助人工心臓、心移植心筋症患者の心臓切片を用いて、1細胞RNA-seq、RNA FISHを施行したところ不全型心筋細胞の割合の多い心不全患者は治療抵抗性を有することが示唆された。心筋症患者の心臓組織全体を1細胞レベルで詳細に検証することを目標に解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在心筋症の治療法は心不全や致死性不整脈などの臨床症状のみに依存する形で画一的に選択されている。しかし、本研究により治療反応性の予測可能な遺伝子変異を同定することに成功し、さらに1細胞解析をヒトサンプルに応用することにも成功した。予後を含めた詳細な臨床情報、心筋症ゲノム解析、single cell RNA sequencing, 心筋生検を用いた1分子RNA FISHなどの1細胞解析を統合し心筋症予後予測確立へむけて解析を進めている。

研究成果の概要（英文）：In this study, we performed targeted sequencing on dilated cardiomyopathy and hypertrophic cardiomyopathy in Japan. Dilated cardiomyopathy patients harboring TTN truncating variants had better prognosis than those with LMNA variants. Most patients with TTN truncating variants achieved left ventricular reverse remodeling, unlike most patients with LMNA variants. We performed single cardiomyocyte RNA sequencing and single molecule fluorescence in situ hybridization and elucidated heart failure patients with a high proportion of failing cardiomyocytes have treatment resistance. To achieve the mechanism about the whole heart tissue of cardiomyopathy patients, we are integrating the genome analysis and single cell analysis.

研究分野：循環器内科

キーワード：循環器内科学 精密医療

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

心筋症は原因不明の難治疾患であり、心不全死や致死的不整脈による突然死を引き起こす。画期的な薬物治療が存在しないため重症例では心移植や補助人工心臓のほか治療手段がない。また致死的不整脈による突然死の予防を目的に植え込み型除細動器が必要となる。現在、これらの治療法は心不全や致死性不整脈などの臨床症状のみに依存する形で画一的に選択されているが、一方で心筋症症例の予後は多様であることが知られており、その多様性を既定する因子は不明なままである。これは従来の研究手法では1細胞レベルで詳細に解析する手法が存在しなかったためである。昨今1細胞解析の手法が発展し、細胞レベルで詳細に解析することが可能になった。同疾患に応用し多様性を規定する主要シグナルを同定し疾患メカニズム解明、治療へ結びつけることを考えた。

2. 研究の目的

本研究は心筋症ゲノム解析、心筋細胞1細胞解析に、予後を含めた詳細な臨床情報を統合し、予後の多様性を規定する心筋細胞内分子カスケードを同定する。これにより新たな心筋症予後予測軸の開発とリスク層別化を確立し、心筋症治療における precision medicine の開発を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

1. 心筋症患者の詳細な臨床情報とゲノム解析、1細胞解析の統合

申請者は心筋症患者の詳細な臨床情報(内服状況、臨床症状、心臓超音波検査・心臓MRI・核医学検査などの画像検査など)、既知遺伝子スクリーニングをすでに完了した。このデータに加え心筋症患者の診断時に行う心筋生検サンプルの心筋細胞を使用した1細胞解析を行う。具体的には生検サンプルから心筋細胞を抽出、1細胞心筋細胞から cDNA ライブラリを作成し全遺伝子発現情報、共発現ネットワーク解析を行う。同解析より心筋細胞機能低下に寄与する分子カスケードは、心筋生検サンプルを用いた1分子 RNA FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) による1細胞レベル RNA 定量解析で再検証する。高感度 RNA FISH システムとハイスループット自動画像解析装置を組み合わせ、1細胞 RNA-seq の定量性を再検証できることは心肥大・心不全モデルマウスで検証済みでありヒト心筋生検サンプルでも十分可能である。心筋細胞1細胞 RNA-seq と1分子 RNA FISH による1細胞レベル RNA 定量解析により心筋症の病態を1細胞レベルまで詳細に検証する。

2. 心筋症患者の心筋生検サンプルを用いた RNA FISH の定量化による心筋症予後予測軸の開発
心筋症の心筋生検サンプルは心筋症診断の一助にはなるが癌の病理診断と異なり予後予測は不可能と考えられた。これは心筋症病理診断が定性評価であり予後予測因子と関連させたスコアリング評価が不十分であったためである。そこで我々は1細胞解析の手法である心筋生検サンプルを RNA FISH で定量化し、予後予測軸の一つへ確立する。

まず、生検時の心筋生検サンプルから心筋細胞のみを抽出し1細胞 RNA-seq による全遺伝子発現と共発現ネットワーク解析により心機能低下や突然死に関与する分子カスケードを同定する。同定した分子カスケードに関連する因子内に、心筋症診断時と比較し移植時に増加する因子が存在するか解析し予後予測因子として有用なマーカーを探索する。同因子を用いて心筋生検サンプルの RNA FISH の定量化を行う。

3. 1細胞解析とゲノム解析を統合した心筋症の病態解明と precision medicine の開発

心筋細胞1細胞レベルで遺伝子発現、分子カスケードを詳細に検証した報告は今までにない。申請者は次世代シーケンサーから得られたビックデータとゲノム解析、心筋症患者の臨床情報を組み合わせ、新しい疾患分類体系を構築する。心筋症の病態を基礎に、患者のリスク層別化を精密に行う。各疾患サブグループの治療反応性評価は臨床情報に加え、血液や心筋生検サンプルを用いた1細胞解析も並行して行う。

具体的には、診断時と心臓移植や補助人工心臓挿入時の心筋片を用いた1細胞解析結果を比較し、心機能低下に関与される因子を同定する。

4. 研究成果

1. 心筋症患者の詳細な臨床情報とゲノム解析、1細胞解析の統合

拡張型心筋症、肥大型心筋症患者の詳細な臨床情報を集積したうえで既知遺伝子の網羅的スクリーニングを施行した。TTN 遺伝子変異を有す拡張型心筋症患者は補助人工心臓など治療に反応し心収縮能が改善、一方、LMNA 遺伝子変異を有す拡張型心筋症患者は補助人工心臓など積極的な治療を行うも収縮能は改善せず予後不良集団であることを見出した。日本人患者集団で初めてこれらの遺伝子変異が予後予測因子となることを見出すことに成功した。

さらに移植、補助人工心臓患者の心臓片より心筋細胞を単離し、1細胞トランスクリプトーム解析を行うことに成功しており、心筋1細胞解析患者登録数は100名を目標に予定通り進めている。

2. 心筋症患者の心筋生検サンプルを用いた RNA FISH の定量化による心筋症予後予測軸の開発

心不全モデルマウスより心筋細胞を単離し心筋細胞 1 細胞 RNA-seq を施行、系譜追跡解析により、慢性的な圧負荷により肥大型心筋細胞は、代償型と不全型という 2 種類の心筋細胞へ分岐し、不全型心筋細胞へ個性転換する際、p53 活性化が寄与することを見出した。左室補助人工心臓、心移植心筋症患者の心臓切片を用いて、1 細胞 RNA-seq、RNA FISH を施行したところ不全型心筋細胞の割合の多い心不全患者は治療抵抗性を有することが示唆された。ヒト心筋切片を用いた RNA FISH 解析においても成功し心筋生検サンプルの収集を行っている。

3. 1 細胞解析とゲノム解析を統合した心筋症の病態解明と precision medicine の開発
左室補助人工心臓等の治療に応答し心機能が改善する心筋症患者、健常者は特徴的な遺伝子発現パターンを呈する不全型心筋細胞を有していないことを見出しており、治療応答性の予測因子のマーカーとなることを見出した。さらに心臓組織は心筋細胞だけでなく、線維芽細胞・血管内皮細胞・炎症細胞等の非心筋細胞も存在し、個々の細胞が協調し心臓の恒常性を保持している。そこで非心筋細胞 1 細胞解析、心臓組織 1 核解析も行い、心臓組織全体を細胞レベルで詳細に解析し心筋症予後予測に応用することに取り組んでいる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件) 全て査読あり

1. **Satoh M**, Nomura S, Harada M, Yamaguchi T, Ko T, Sumida T, Toko H, Naito AT, Takeda N, Tobita T, Fujita T, Ito M, Fujita K, Ishizuka M, Kariya T, Akazawa H, Kobayashi Y, Morita H, Takimoto E, Aburatani H, Komuro I “High-throughput single-molecule RNA imaging analysis reveals heterogeneous responses of cardiomyocytes to hemodynamic overload.” *J Mol Cell Cardiol.* 128:77-89 (2019)
2. Nomura S*, **Satoh M***, Fujita T, Higo T, Sumida T, Ko T, Yamaguchi T, Tobita T, Naito A, 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* 9:4435 (2018) (*co-first authors)
3. Tobita T, Nomura S, Fujita T, Morita H, Asano Y, Onoue K, Ito M, Imai Y, Suzuki A, Ko T, **Satoh M**, Fujita K, Naito A, Furutani Y, Toko H, Harada M, Amiya E, Hatano M, Takimoto E, Shiga T, Nakatani T, Sakata Y, Ono M, Saito Y, Takashima S, Hagiwara N, Aburatani H, Komuro I “Genetic basis of cardiomyopathy and the genotypes involved in prognosis and left ventricular reverse remodeling” *Sci Rep.* 8:1998 (2018)

[学会発表] (計 9 件)

1. **Satoh M**, Nomura S, Fujita T, Ko T, Tobita T, Ito M, Fujita K, Aburatani H, Kobayashi Y, Komuro I “High-throughput Single molecule RNA-Imaging Analysis Reveals Spatial Heterogeneity of Cardiomyocytes In Stress Response.” The 90th American Heart Association (AHA) Scientific Sessions in Anaheim, 2017, Nov 11-15, California (United States)
2. **Satoh M**, Miyauchi H, Sakao S, Iimori T, Sawada K, Kuwabara Y, Tatsumi K, Kobayashi Y “SPECT-Guided Myocardial Perfusion and Metabolic Fatty Acid Planar Imaging Reflects the Severity of the Pulmonary Hypertension in Patients with Chronic Thromboembolic Pulmonary Hypertension.” The 90th American Heart Association (AHA) Scientific Sessions in Anaheim, California, 2017, Nov 11-15, California (United States)
3. **Satoh M**, Nomura S, Fujita T, Ko T, Tobita T, Fujita K, Ito M, Kobayashi Y, Aburatani H, Komuro I “High-throughput single-RNA molecule imaging analysis reveals spatial heterogeneity in heart failure” 2018 年 1 月 6 日 第 1 回日本循環器学会基礎研究フォーラム (東京都、品川)
4. **Satoh M**, Nomura S, Fujita T, Ko T, Tobita T, Fujita K, Ito M, Kobayashi Y, Aburatani H, Komuro I “High-throughput single molecule RNA imaging analysis reveals spatial heterogeneity in heart failure” Keystone Symposia Conference on Heart Failure: Crossing the Translational Divide, 2018 Jan 14-18, Keystone (United States)
5. **Satoh M**, Nomura S, Ko T, Tobita T, Ito M, Fujita K, Kobayashi Y, Komuro I “High-throughput Single molecule RNA-Imaging Analysis Reveals Spatial Heterogeneity of Cardiomyocytes In Stress Response.” 2018 年 3 月 25 日、第 82 回日本循環器学会, (大阪府、大阪市)
6. **Satoh M**, Nomura S, Fujita T, Ko T, Tobita T, Fujita K, Ito M, Ieki H, Yamada S, Zhang B, Tian X, Kobayashi Y, Aburatani H, Komuro I “Single cell analysis of cardiomyocyte reveals spatial and temporal heterogeneity in heart failure” 2018 年 9 月 22 日 第 2 回日本循環器学会基礎研究フォーラム (奈良県、奈良市)
7. **Satoh M**, Nomura S, Fujita T, Ko T, Tobita T, Ito M, Fujita K, Aburatani H, Kobayashi Y, Komuro I “High-throughput single-molecule RNA imaging analysis reveals spatial heterogeneity in heart failure” The 32nd European Society of Cardiology (ESC) Congress, 2018, Aug 25-29, Munich, (Germany)
8. **Satoh M**, Miyauchi H, Mori N, Iimori T, Sawada K, Kuwabara Y, Hirano K, Kobayashi Y. “Marked Decreased Myocardial Washout Rate of 123I-BMIPP is a Crucial Index in Diagnosing Triglyceride Deposit Cardio16-18 myovasculopathy.” The 91st American Heart Association (AHA)

Scientific Sessions, 2018, Nov 10-12, Chicago (United States)

9. **Satoh M**, Nomura S, Fujita T, Ko T, Tobita T, Ito M, Fujita K, Aburatani H, Kobayashi Y, Komuro I
“Single cell analysis of cardiomyocyte reveals spatial and temporal heterogeneity in heart failure”
第 22 回日本心不全学会 2018 年 10 月 11 日(東京都、新宿)

〔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〕

ホームページ等

・日本人における拡張型心筋症・肥大型心筋症のゲノム解析

<https://www.genome.rcast.u-tokyo.ac.jp/3807>

・Keystone Symposia Heart Failure 見聞記

<https://www.genome.rcast.u-tokyo.ac.jp/3798>

・シングルセル解析と機械学習により心不全発症のメカニズムを解明

<https://www.genome.rcast.u-tokyo.ac.jp/3939>

・シングルセル解析と 1 分子 RNA FISH により心不全進展過程の空間情報を解明

<https://www.genome.rcast.u-tokyo.ac.jp/3995>

・シングルセル解析と機械学習により心不全において心筋細胞が 肥大化・不全化するメカニズムを解明

<https://www.rcast.u-tokyo.ac.jp/ja/news/release/181030.html>

・シングルセル解析と機械学習により心不全において心筋細胞が肥大化・不全化するメカニズムを解明

http://www.h.u-tokyo.ac.jp/press/press_archives/20181030.html

・シングルセル解析と AI により心不全発症のメカニズムを解明

<http://www.j-circ.or.jp/topics/pr20181031.pdf>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

該当なし

(2) 研究協力者

該当なし

※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、研究者個人に帰属されます。