

実験講座



シングルセル解析による 心不全の病態解明と臨床応用

野村 征太郎

Key words : シングルセル解析, 病態解明, 臨床応用

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になると心臓に極端な圧負荷が加わり、これに対して心臓は代償的に肥大して血液ポンプとしての機能を維持しようとする。しかし、慢性的に圧負荷が心臓に加わると、心臓のポンプ機能は低下して心不全を呈するようになる。この過程において、心筋細胞は様々なシグナル経路を活性化させることが知られているが、それらがいかに心臓の肥大・不全にかかわっているか明らかでない。また、その心臓の肥大・不全という過程のなかで、心筋細胞は形態的に変化すると考えられているが、細胞の形態的な変化が分子レベルの変化とどのようにリンクしているか、更にはそれがどのように機能的な変化(心臓の肥大から不全への移行)とリンクしているか、についての詳細なメカニズムは明らかでない。

細胞はその核内での遺伝子制御により生まれる産物であり、細胞の形態的・機能的特徴はその細胞の転写により制御されていると考えられる¹⁾。心臓への圧負荷により誘導される転写活性化を抑制することで、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ことが知られており²⁾、転写は心臓の分子・形態のリモデリングを引き起こすと考えられる。これまで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³⁾、負荷による脱分

化や細胞周期リエントリーの可能性⁴⁾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形態的リモデリングを制御し、心肥大から心不全といった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えはいまだない。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、細胞レベルで心筋細胞の特徴を詳細に理解する必要がある。また、モデル動物とヒトとの相違について理解することで、心不全における疾患層別化に寄与する分子病態を特定することも可能となる。

最近筆者らは、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により、心筋細胞の形態・分子・機能の連関⁵⁾、マウス・ヒトの遺伝子プログラムの相違⁵⁾、更には心不全の病態層別化を可能にするバイオマーカー⁶⁾を明らかにした。本稿はそれらを紹介すると共に、シングルセル研究の将来展望について概説する。

I. 心筋シングルセル解析による 心不全病態の徹底解明

1. 圧負荷心不全モデルマウスの心筋シングルセル RNA-seq データ取得

横行大動脈を縮窄することによって心臓に圧負荷を加えると、心肥大(術後1-2週)、心不全(術

Single-cell analysis for pathogenesis understanding and clinical application in heart failure

Nomura Seitaro : 東京大学医学部附属病院循環器内科 (〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1)

0370-9531/04/¥500/ 論文/JCOPY

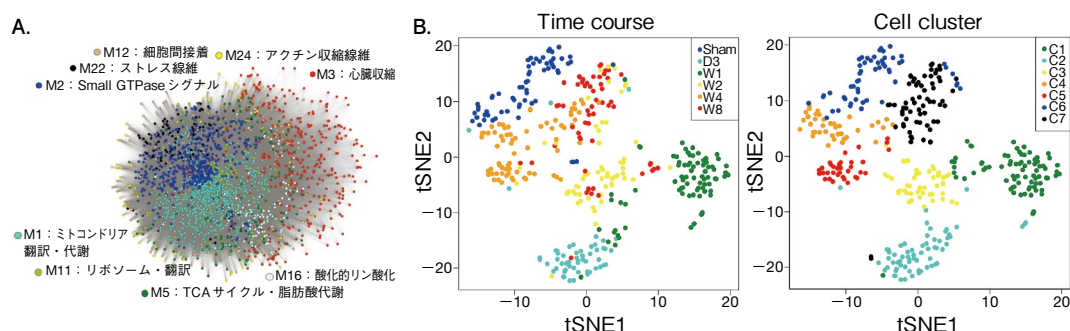


図 1 圧負荷心不全モデルマウスの心筋 1 細胞 RNA-seq 解析 (文献 5 より改変して引用)

A. 重み付け遺伝子共発現ネットワーク解析および Random Forests 解析により同定された心筋遺伝子共発現ネットワーク。点は遺伝子を示しており、点と点の間の距離は相関の強さを示している (距離が近いほど遺伝子間の相関係数が高い)。同じモジュールに所属する遺伝子は同じ色がつけられている。モジュールの名称は、モジュールに所属する遺伝子群の Gene ontology 解析により最も特徴的な GO term から名づけた。

B. 次元圧縮アルゴリズム tSNE 解析により細胞関係性を二次元空間上に可視化。点は細胞を表しており、距離が近い細胞は似たトランスクリプトームを持っている。左は心筋細胞を単離したタイムポイントで、右はクラスタリング解析で分類された細胞クラスターで色づけしている。

後 4-8 週)を誘導することができる。筆者らは、この圧負荷心不全モデルマウスを用いて、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、シングルセル RNA-seq 解析を単離心筋に適用する基盤技術を構築した。近年、微小流体装置 (Fluidigm 社 C1 など)・ドロップレット作製装置 (10x Genomics 社 Chromium など)・マイクロウェル (BD 社 Rhapsody など)などの市販機器を用いてシングルセル cDNA ライブラリを作製することが容易になってきているが、心筋細胞は長径 150 μm 程度、短径 50 μm 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。そこで筆者らはマニュアルピックアップと Smart-seq2 法⁷⁾による cDNA ライブラリ作製技術を統合した心筋シングルセル RNA-seq 解析技術を構築した。

筆者ら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よっ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 (N=396) をマニュアルピックアップによって回収して、個々の心筋細胞のトランスクリプトームを Smart-seq2 法により取得した。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)⁸⁾によっ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、機械学習アルゴリズム Random Forests⁹⁾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 (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 tSNE¹⁰⁾を用いて二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)。偽手術後の心筋の多くは C6 に含まれる一方で、圧負荷 4・8 週後の心筋の多くは C7 に含まれ、C7 は不全心筋細胞に特徴的なクラスターと考えられた。

2. 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。そこで筆者らは、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、細胞サイズを測定したのち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のタンパク質合成 (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いだした

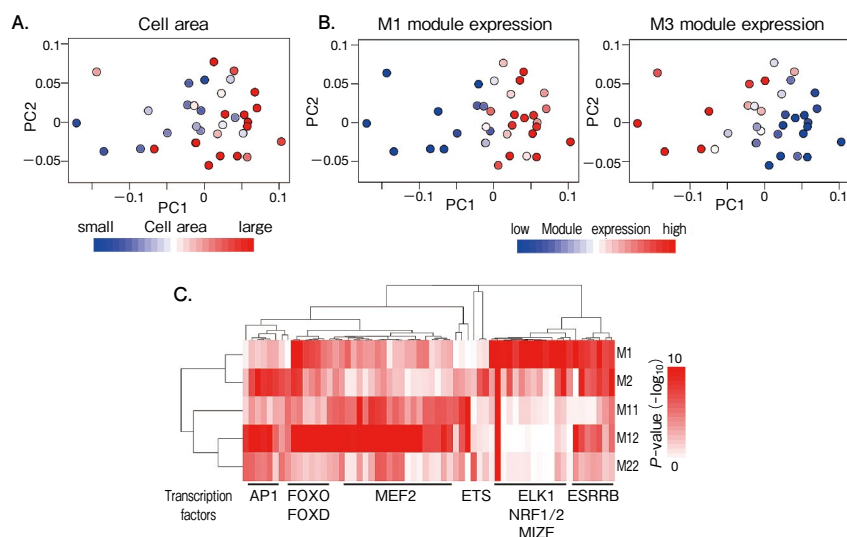


図 2 心筋細胞肥大と関連する転写ネットワークの同定 (文献 5 より改変して引用)

A. 圧負荷 1 週後のマウス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の主成分分析。点は細胞を示しており、細胞面積の程度で色づけされている。

B. 主成分分析の図をモジュール発現の程度で可視化。A. で示す細胞面積と M1 (ミトコンドリア翻訳・代謝遺伝子) 発現が相関するのに対して、M3 (心臓収縮遺伝子) 発現は逆相関である。

C. 圧負荷 1 週後のマウスの心筋細胞の H3K27ac ChIP-seq 解析から同定した各モジュールの制御領域に濃縮する転写因子モチーフの階層的クラスタリング解析。圧負荷により発現上昇するモジュールの制御転写因子のみ掲載。ELK1 および NRF1/2 の認識配列は M1 遺伝子の制御領域の特異的に濃縮している。

(図 2A, B)。また、圧負荷 1 週後の肥大型の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前述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、extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2) によりリン酸化される ETS domain-containing protein Elk-1, ミトコンドリア生合成を制御する nuclear respiratory factor 1/2 (NRF1/2) の認識配列が濃縮していることがわかった (図 2C)。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。

3. 胎児型遺伝子の再活性化は心臓中間層において早期に誘導される

心臓に圧負荷が加わると、心筋細胞において胎児型遺伝子が再活性化することが知られている¹⁾。しかしながら、心臓に存在するどの心筋が遺伝子発現胎児化を生じているか (空間的な不均一性) について明らかでない。そこで、筆者らは 1 分子 RNA *in situ* hybridization により胎児型ミ

オシン (*Myh7*) 遺伝子の mRNA を 1 分子レベルで捉えて、空間情報を保ったまま、1 つの心筋細胞に含まれる *Myh7* 遺伝子の発現量を解析した¹¹⁾ (図 3A)。すると、圧負荷後早期 (1 週間) に *Myh7* 遺伝子を発現する細胞は心臓の内層や外層と比較して、中間層に多いことがわかった (図 3B)。また、心筋細胞のサイズと *Myh7* 遺伝子の発現量をシングルセルレベルで比較したところ、*Myh7* 遺伝子発現心筋細胞のサイズは小さく、心筋肥大を起こしていないことがわかった。実際にシングルセル RNA-seq 解析により、*Myh7* 遺伝子の発現量は前項で示したミトコンドリア翻訳・代謝遺伝子と逆相関にあることを確認した。すなわち、筆者らは遺伝子発現胎児化と心筋肥大は関係しないことを明らかにした。

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)

続いて Monocle¹²⁾ を用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 4A),

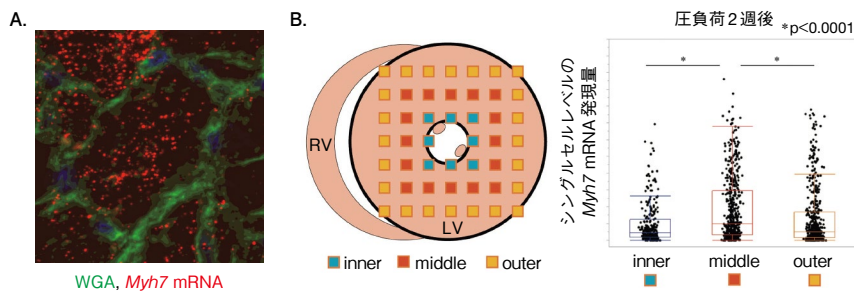


図 3 心臓における空間的な遺伝子発現の不均一性 (文献 11 より改変して引用)

A. 1 分子 RNA *in situ* hybridization による空間情報を保持した状態でのシングルセル遺伝子発現解析。WGA は細胞膜を意味しており、この緑で囲まれた領域が 1 つの心筋細胞。1 分子の *Myh7* (胎児型ミオシン) mRNA が 1 つの赤いドットで示されている。WGA で囲まれた 1 つの心筋細胞の中の赤いドットを定量することで、シングルセルレベルの遺伝子発現解析が可能になる。

B. 圧負荷 2 週後の心筋細胞におけるシングルセルレベルの *Myh7* mRNA 発現量の比較。内層・中間層・外層と分けて比較すると、中間層において有意に多くの *Myh7* 発現心筋細胞が存在していることがわかる。

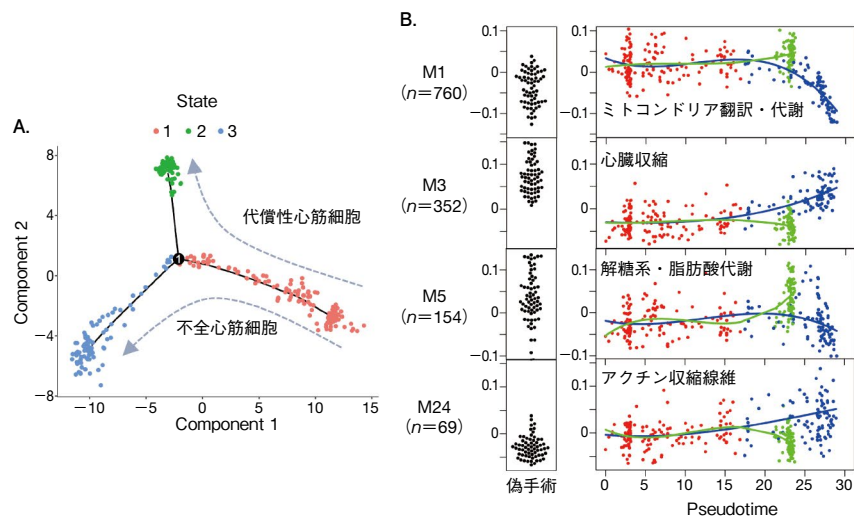


図 4 心筋リモデリングにおける系譜追跡解析 (文献 5 より改変して引用)

A. 圧負荷後の心筋細胞のトランスクリプトームデータを用いた系譜追跡解析。心筋細胞が 3 つの状態 (State) に分かれており、State 1 (肥大心筋細胞) から State 2 (代償性心筋細胞) と State 3 (不全心筋細胞) への分岐がある。

B. 肥大心筋細胞 (赤) から代償性心筋細胞 (緑) と不全心筋細胞 (青) にかけて系譜追跡タイムコース (Pseudotime) に沿ったモジュール発現ダイナミクス。偽手術後 (黒) の発現レベルも左に示している。代償性心筋細胞と不全心筋細胞で発現が大きく異なる 4 つのモジュールの結果を示した。各モジュールに割り当てられた遺伝子数も示している。

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 4B)。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かかわらず、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。

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かかわる遺伝子群・シグナル経路を同定するために、分岐のタイミング (肥大期後半) に属する心筋細胞に特異的にみられる遺伝子ネットワークを抽出したところ、DNA 損傷・p53 シグナルに関連する遺伝子ネットワークが同定された (図 5A)。

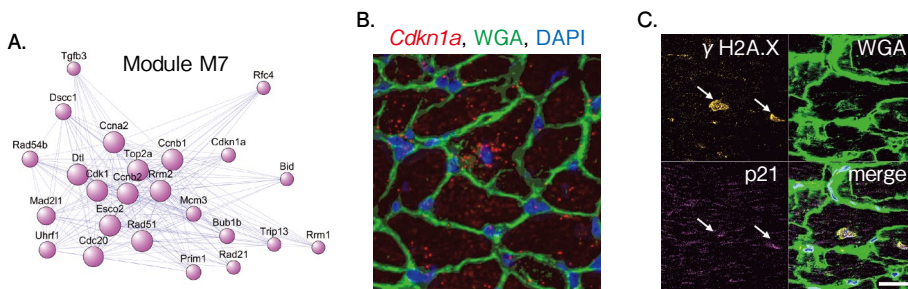


図 5 肥大心筋における不全心筋細胞誘導シグナルの同定 (文献 5 より改変して引用)

- A. 圧負荷後期に時期特異的に活性化する遺伝子ネットワーク。p53 シグナルに関連する遺伝子が濃縮している。
 B. 1 分子 mRNA *in situ* hybridization 解析による *Cdkn1a* (p21) 強発現細胞の確認。
 C. 免疫染色による γ -H2A.X と p21 の共発現心筋細胞の確認。p21 陽性心筋細胞のはほぼすべてが γ -H2A.X 陽性である。

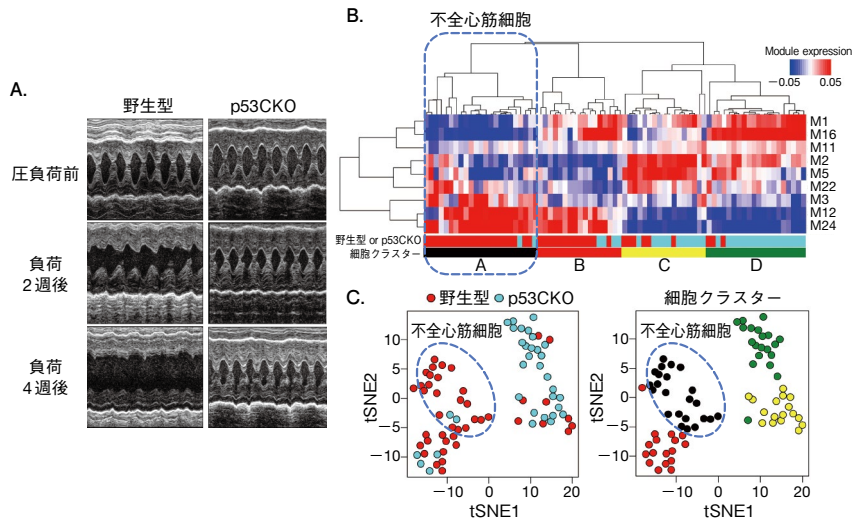


図 6 心筋特異的 p53 ノックアウトマウスの解析 (文献 5 より改変して引用)

- A. 野生型マウスと心筋特異的 p53KO (p53CKO) マウスの心臓超音波による心機能解析。
 B. 圧負荷 2 週後の野生型・p53CKO マウスから単離した心筋シングルセル RNA-seq の階層的クラスタリング解析。野生型 (赤) と比較して p53CKO (ターコイズ) の心筋細胞は不全心筋細胞 (クラスター A) の割合が極めて少ない。
 C. B. の心筋シングルセル RNA-seq の tSNE 解析。左はマウスの種類で、右は細胞クラスターで色づけしている。

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 5B)。また、免疫染色により p21 陽性細胞は γ -H2A.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)。

6. 心筋特異的 p53 ノックアウトマウスの解析

そこで筆者らは、心筋細胞特異的 p53 ノックアウトマウス (p53CKO マウス) を作製して圧負

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 6A)。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 p53CKO・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、p53CKO マウスの心筋細胞は肥大心筋細胞の状態からはほぼ代償性心筋細胞のみへ移行していた (図 6B)。また、圧負荷 2 週後において、野生型マウスの心筋細胞では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

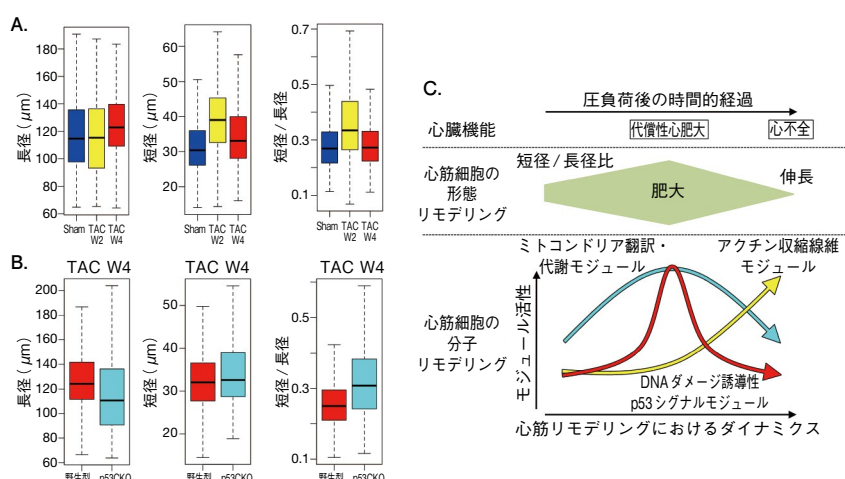


図 7 圧負荷後の心筋リモデリングにおける形態・機能・分子レベルの関係性 (文献 5 より改変して引用)

A. 心筋細胞の形態的特徴 [sham (偽手術) 1,243 細胞, TAC W2 (圧負荷 2 週後) 1,366 細胞, TAC W4 (圧負荷 4 週後) 717 細胞, それぞれ 3 匹のマウスから採取]. 圧負荷によりまず短径が増大するが, その後長径が増大する。
B. 野生型と p53CKO マウスの圧負荷 4 週後における心筋細胞の形態的特徴 (野生型 1,761 細胞, p53CKO 1,538 細胞, それぞれ 3 匹のマウスから採取). p53CKO マウスの心筋細胞では長径が短く肥大の形質を保っている。
C. 心筋リモデリングにおける形態・機能・分子のダイナミクスの関係性。

子・収縮線維遺伝子群の発現上昇といった不全心筋の特徴的な変化がみられる一方で, p53CKO マウスの心筋細胞ではみられなかった (図 6C)。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, p53CKO マウスに圧負荷手術を施したのち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み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。

これまでをまとめると, 心筋細胞は圧負荷に応じて, 分子・形態・機能, それぞれのレベルが連動してリモデリングを起こしている (図 7)。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, 肥全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する DNA ダメージ・p53 シグナルは, 肥全心筋細胞から不全心筋細胞へと分子・形態・機能において変化するうえで必要である。

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病態解析に応用した。筆者らは, 拡張型心筋症 (dilated cardiomyopathy; DCM) 患者が左室補助人工心臓 (left ventricular assist device; LVAD) の植込み術を受ける際に得られる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。WGCNA⁸⁾により 17 の遺伝子モジュールを抽出し, Random Forests⁹⁾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 8A)。健常者の心筋細胞は 1 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。

更に, 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た 5 つのモジュールのうち, M1 (翻訳・細胞間接着・タンパク質分解・細胞周期・DNA ダメージ応答遺伝子群) 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

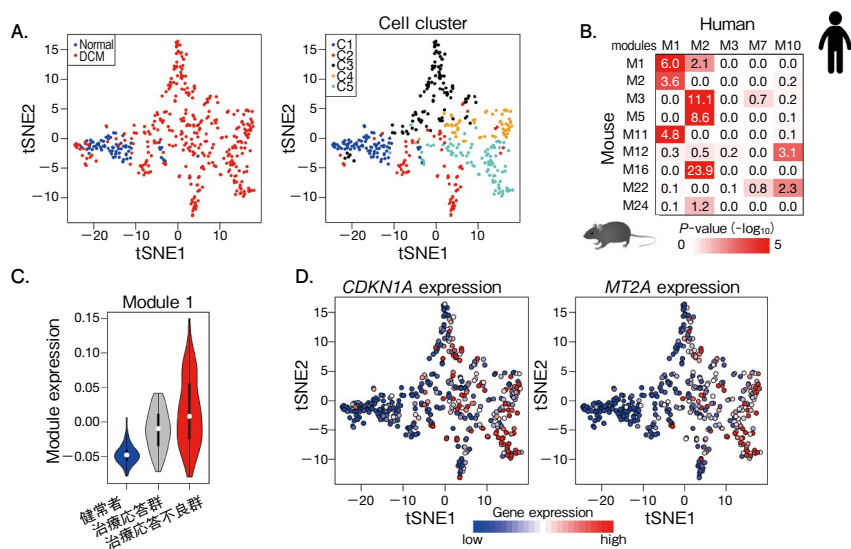


図 8 シングルセル解析による心不全患者の分子病態解析 (文献 5 より改変して引用)

- A. ヒト健常者と DCM 患者の心筋 1 細胞 RNA-seq の tSNE 解析。DCM 患者の心筋細胞は転写不均一性が高い。左は健常者と DCM で、右はクラスターで色づけされている。
- B. ヒトとマウスの遺伝子モジュールのオーバーラップ。重複の程度をヒートマップで示している。
- C. Module 1 (M1) 高発現細胞は、治療応答不良群の患者の心筋細胞においてのみみられる。
- D. tSNE マップ上に *CDKN1A* 遺伝子と *MT2A* 遺伝子 (Metallothionein ファミリー) の発現レベルを掲載。

かった (図 8B)。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、心機能の改善を起こす可能性があることを見いだした (図 8C)。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 DNA 損傷応答遺伝子 *CDKN1A* (p21) は酸化ストレス応答により発現上昇する Metallothionein ファミリーの遺伝子と相関が高く (図 8D)、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・DNA 損傷応答と関係することが示唆された。

8. DNA 損傷応答による心不全患者の予後予測法の開発

心不全は、様々な原因により心臓の機能が悪くなり、息切れやむくみが生じ、がんと並んで世界中の人の命を脅かす病気である。心不全におい

て、病状の経過や治療に対する応答性 (治療による効果) は非常に多様であり、治療薬に応答して心臓の機能が回復する患者がいる一方で、あらゆる治療を尽くしても心機能が回復せずに早い段階で心臓移植をしなければ命を救うことができない患者もいる。治療に対する応答性や予後 (病状の経過) を治療前に評価できれば、患者一人ひとりに合った適切な治療を施すことが可能になる (個別化医療・精密医療) と考えられるが、現段階ではまだ簡便かつ正確に治療応答性を予測することが難しいため、すべての患者に画一的な治療を施すしかない。

そこで筆者らは、心筋 DNA 損傷により心不全患者の予後を予測できると仮説を立てた。東京大学病院に 2009 年から 2017 年まで DCM により心不全として入院して心筋生検を受けた 82 例の患者のうち、生検時に既に治療介入がなされていた 24 例を除いた 58 例を対象として、心臓組織の DNA 損傷応答を免疫染色により評価し、治療応答性や予後との関係性を解析した⁶⁾。DNA に切断が生じると、poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) という分子がリクルートされて同部位の

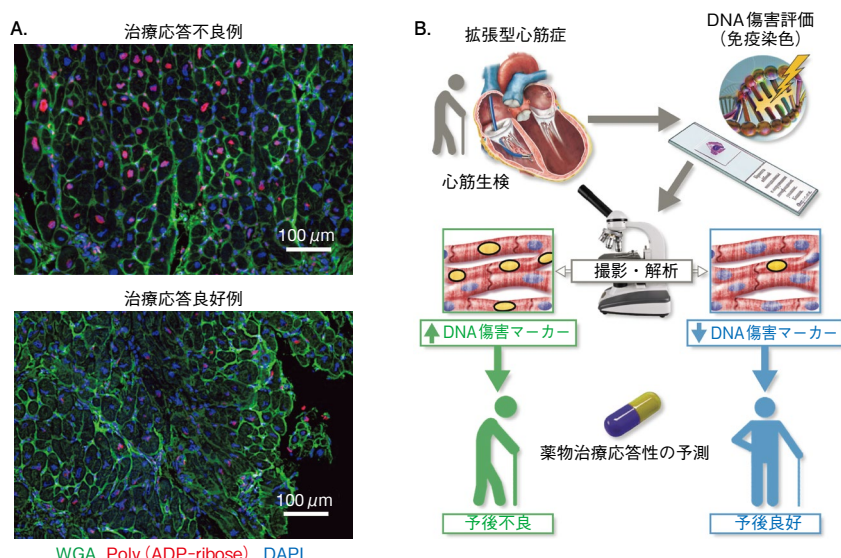


図 9 心筋 DNA 損傷応答による心不全患者の予後・治療応答予測 (文献 6 より改変して引用)

A. Poly (ADP-ribose) 免疫染色による DNA 損傷応答評価。DAPI と重なる Poly (ADP-ribose) が DNA 損傷応答細胞核。
B. 心筋 DNA 損傷応答による心不全患者の予後・治療応答予測法の概要。

DNA・修復酵素などに poly (ADP-ribose) という化学修飾を入れる。また、同部位のヒストンは γ -H2A.X というリン酸化ヒストンに置き換えられる。筆者らは、本免疫染色において poly (ADP-ribose) と γ -H2A.X に対する抗体を用いて DNA 損傷応答を評価した。すると、治療に対して効果がみられない DCM 心不全患者では、治療前に行った生検検体における心筋 DNA 損傷の程度が有意に強いことが明らかとなった (図 9A)。更に解析を進めることで、poly (ADP-ribose) 陽性の DNA 損傷核の存在確率が 5.7% 以上の患者を DNA 損傷強陽性症例、5.7% 未満の患者を弱陽性症例と分類することで、高い精度 (77.8% の感度・88.7% の特異度) で、前者を治療応答不良・後者を治療応答良好と予測することが可能であることを明らかにした⁶⁾ (図 9B)。

これらの結果により、筆者らは、心不全患者の“治療応答性の事前予測”を可能にするという待望されてきた手法を確立した。本手法は、臨床現場において日常的に診断目的で採取する心臓生検組織の検体を有効利用するため患者への追加侵襲が存在しないという非常に大きな利点を有しており、近年叫ばれている個別化医療・精密医療を心不全臨床において実践するうえでの基盤的技術と

なると考えられる。

II. 心臓シングルセル解析の将来展望

ここまで、筆者らの心臓シングルセル解析研究の実際と応用について紹介してきた。ここからは心臓疾患の解析に限らず、特に臓器シングルセル解析の今後の将来展望について記す。

1. 空間情報を保持した網羅的な遺伝子発現解析

臓器において種々の細胞が綿密な空間的構造を構築して恒常性を保っている。このような空間的関係性を理解することは、病理理解に欠かせない。筆者らは、標的遺伝子を決めて空間的な発現解析⁶⁾を行ったが、近年、発現する全遺伝子を対象とした空間的遺伝子発現解析を可能にする技術が 2 つ開発された。1 つは組織切片上で全遺伝子の mRNA を標的としたプローブを連続的に当てていく seqFISH¹³⁾ という手法であり、もう 1 つは Drop-seq¹⁴⁾ において用いたオリゴつきビーズを 10 μ m 間隔で敷き詰めたスライドの上に組織切片を乗せて、mRNA をキャプチャーする Slide-seq¹⁵⁾ という手法である。今後、これらの手法を用いた空間的シングルセルトランスクリプトーム解析が一般化すると考えられる。

2. エピゲノムなど他階層のオミックスとのシングルセルレベルでの統合

脳のシングルセル全ゲノム解析により、前頭前皮質や海馬において老化に伴って蓄積するゲノム変異のパターンと神経変性疾患で生じるゲノム変異のパターンが異なることが明らかになり、疾患発症・老化におけるゲノム変異の意義が明らかになりつつある¹⁶⁾。また近年、シングルセルから複数階層のオミックス情報を同時に取得する解析が構築された。例えば、ゲノムとトランスクリプトームを同時に取得する手法として、G & T-seq¹⁷⁾、SIDR¹⁸⁾など、トランスクリプトームとエピゲノムを同時に取得する手法として、scNMT-seq¹⁹⁾、sci-CAR²⁰⁾などが開発されている。また最近では、Drop-seq を統合することでハイスループットにゲノム・トランスクリプトームを解析できる技術も報告されている²¹⁾。オミックス同時解析により、単一のシングルセルオミックス解析で同定された制御状態が他オミックスとどのように関連するか(どの genotype がどのトランスクリプトームと関係するかなど)を詳細に解析でき、細胞の分子制御構造の詳細な理解につながる。

3. ライブラリスケールの perturbation とシングルセル RNA-seq の統合解析

CRISPR/Cas9 システムによるライブラリスケールの遺伝子改変システムとシングルセル RNA-seq を統合して、改変遺伝子と表現型(トランスクリプトーム)を連結する Perturb-seq²²⁾・CRISP-seq^{22, 23)}・CROP-seq^{24, 25)}といった手法が開発され、遺伝子改変の影響を網羅的に解析できるようになった。更にこの手法では、複数の遺伝子改変の影響を単一個体で解析できるため、遺伝子改変の効果や関係性を詳細に解析できる利点がある。今後、これらの手法は個体における遺伝子機能解析において強力なツールとなると考えられる。

4. シングルセル解析の臨床応用

シングルセル解析は少量検体でも解析可能であるため、臨床検体との相性が良い。がんなどの組織検体において、シングルセルレベルでゲノム変異とトランスクリプトーム変化を統合解析する研究が進んでおり²⁶⁻²⁸⁾、患者ごとにがんの細胞進化過程を詳細に明らかにしている。筆者らも心不全

患者の少量の心臓組織検体を用いて、治療応答性と関係する心筋遺伝子プログラムを同定している⁵⁾。また、臨床検体は容易に単一細胞に単離できないことが多く、保存可能な凍結組織から単離した細胞核を用いた single-nucleus RNA-seq 技術も確立されており^{29, 30)}、これにより single-cell RNA-seq と同様に細胞種分類・分子病態解析を行うことができる。

5. DNA 系譜追跡との統合解析

Monocle¹²⁾や Velocity³¹⁾などを用いて、シングルセルトランスクリプトームから細胞系譜・細胞進化を予測することは可能であるが、真に細胞がどのように変化したかを理解するには細胞の DNA 系譜を追跡することが重要である。このような手法として、LoxP 配列を連結した PolyLox システム³²⁾や CRISPR/Cas9 による random barcoding を用いた系譜追跡法³³⁾が発展してきた。最近、ゼブラフィッシュの発生において CRISPR/Cas9 による random barcoding とトランスクリプトーム同時解析の報告があり³⁴⁾、細胞のクローン追跡と細胞表現型(トランスクリプトーム)を同時に抽出できるようになり、組織再生における上皮間葉転換の分子機構が詳細に明らかとなった。

6. 日進月歩のコンピューター解析技術

シングルセル解析において、実験間のバッチ効果を取り除き生命現象の本質を浮き彫りにするアルゴリズムが開発されている³⁵⁻³⁸⁾。また、低発現の遺伝子に対して発現量をリカバーする MAGIC³⁹⁾や SAVER⁴⁰⁾などのアルゴリズムが開発され、発現量の低い転写因子の標的予測などを効率的に行えるようになった。このようなシングルセル解析を系統的に行うプラットフォームとして、Seurat³⁶⁾や Scanpy⁴¹⁾などが開発されている。更に、トランスクリプトームの次元削減手法として定番となってきた tSNE よりも更に精度の高い細胞分類が可能となる UMAP というアルゴリズムが開発された⁴²⁾。最近、10x Genomics 社の Chromium システムを用いたシングルセルエピゲノム(ATAC-seq)、シングルセルコピー数多型解析(CNV 解析)が可能となり、これらの解析技術が非常に身近になってきている。

おわりに

本稿では、心不全における心筋リモデリング過程をシングルセル解析で理解して臨床応用することを目指した筆者らの研究を詳しく紹介すると共に、今後のシングルセル研究の方向性について概説した。筆者らの研究は、心肥大から心不全において形態的・機能的特徴を内包する心筋遺伝子プログラムを明らかにしただけでなく、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ており、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。シングルセル解析は非常に多様な応用可能性を秘めた魅力的な研究手法であるが、検体準備・細胞単離（細胞核単離）・cDNA ライブラリ作製・データ解析という多方面にわたる十分なスキルが必要であり、疾患生物学・生命科学とデータサイエンスの融合が極めて重要である。常に最先端の技術に視野を広げ、基礎・臨床の緊密な連携を構築することが、本質的な分子病態解明、治療法開発、精密医療の実現に重要と考える。

●文 献

- Komuro I, Yazaki Y : *Annu Rev Physiol.* **55** : 55-75, 1993
- Anand P, Brown JD, Lin CY et al : *Cell.* **154** : 569-582, 2013
- Bahar R, Hartmann CH, Rodriguez KA et al : *Nature.* **441** : 1011-1014, 2006
- See K, Tan WLW, Lim EH et al : *Nat Commun.* **8** : 225, 2017
- Nomura S, Satoh M, Fujita T et al : *Nat Commun.* **9** : 4435, 2018
- Ko T, Fujita K, Nomura S et al : *JACC Basic Transl Sci.* **4** : 670-680, 2019
- Picelli S, Faridani OR, Björklund AK et al : *Nat Protoc.* **9** : 171-181, 2014
- Langfelder P, Horvath S : *BMC Bioinformatics.* **9** : 559, 2008
- Breiman L : *Machine Learning.* **45** : 5-32, 2001
- Van der Maaten L, Hinton G : *J Mach Learn Res.* **9** : 2579-2605, 2008
- Satoh M, Nomura S, Harada M et al : *J Mol Cell Cardiol.* **128** : 77-89, 2019
- Qiu X, Mao Q, Tang Y et al : *Nat Methods.* **14** : 979-982, 2017
- Eng CL, Lawson M, Zhu Q et al : *Nature.* **568** : 235-239, 2019
- Macosko EZ, Basu A, Satija R et al : *Cell.* **161** : 1202-1214, 2015
- Rodrigues SG, Stickels RR, Goeva A et al : *Science.* **363** : 1463-1467, 2019
- Lodato MA, Rodin RE, Bohrsen CL et al : *Science.* **359** : 555-559, 2018
- Macaulay IC, Teng MJ, Haerty W et al : *Nat Protoc.* **11** : 2081-2103, 2016
- Han KY, Kim KT, Joung JG et al : *Genome Res.* **28** : 75-87, 2018
- Clark SJ, Argelaguet R, Kapourani CA et al : *Nat Commun.* **9** : 781, 2018
- Cao J, Cusanovich DA, Ramani V et al : *Science.* **361** : 1380-1385, 2018
- Nam AS, Kim KT, Chaligne R et al : *Nature.* **571** : 355-360, 2019
- Dixit A, Parnas O, Li B et al : *Cell.* **167** : 1853-1866, 2016
- Jaitin DA, Weiner A, Yofe I et al : *Cell.* **167** : 1883-1896, 2016
- Giladi A, Paul F, Herzog Y et al : *Nat Cell Biol.* **20** : 836-846, 2018
- Datlinger P, Rendeiro AF, Schmidl C et al : *Nat Methods.* **14** : 297-301, 2017
- Neftel C, Laffy J, Filbin MG et al : *Cell.* **178** : 835-849, 2019
- Hovestadt V, Smith KS, Bihannic L et al : *Nature.* **572** : 74-79, 2019
- Schirmer L, Velmeshev D, Holmqvist S et al : *Nature.* **573** : 75-82, 2019
- Lake BB, Ai R, Kaeser GE et al : *Science.* **352** : 1586-1590, 2016
- Mathys H, Davila-Velderrain J, Peng Z et al : *Nature.* **570** : 332-337, 2019
- La Manno G, Soldatov R, Zeisel A et al : *Nature.* **560** : 494-498, 2018
- Pei W, Feyerabend TB, Rössler J et al : *Nature.* **548** : 456-460, 2017
- McKenna A, Findlay GM, Gagnon JA et al : *Science.* **353** : aaf7907, 2016
- Alemayehu A, Florescu M, Baron CS et al : *Nature.* **556** : 108-112, 2018
- Haghverdi L, Lun ATL, Morgan MD, Marioni JC : *Nat Biotechnol.* **36** : 421-427, 2018
- Butler A, Hoffman P, Smibert P et al : *Nat Biotechnol.* **36** : 411-420, 2018
- Welch JD, Kozareva V, Ferreira A et al : *Cell.* **177** : 1873-1887, 2019
- Barkas N, Petukhov V, Nikolaeva D et al : *Nat Methods.* **16** : 695-698, 2019
- van Dijk D, Sharma R, Nainys J et al : *Cell.* **174** : 716-729, 2018
- Huang M, Wang J, Torre E et al : *Nat Methods.* **15** : 539-542, 2018
- Wolf FA, Angerer P, Theis FJ : *Genome Biol.* **19** : 15, 2018
- McInnes L, Healy J : UMAP : Uniform Manifold Approximation and Projection for Dimension Reduction. arXiv : 1802.03426v1, 2018