

第 6 回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –

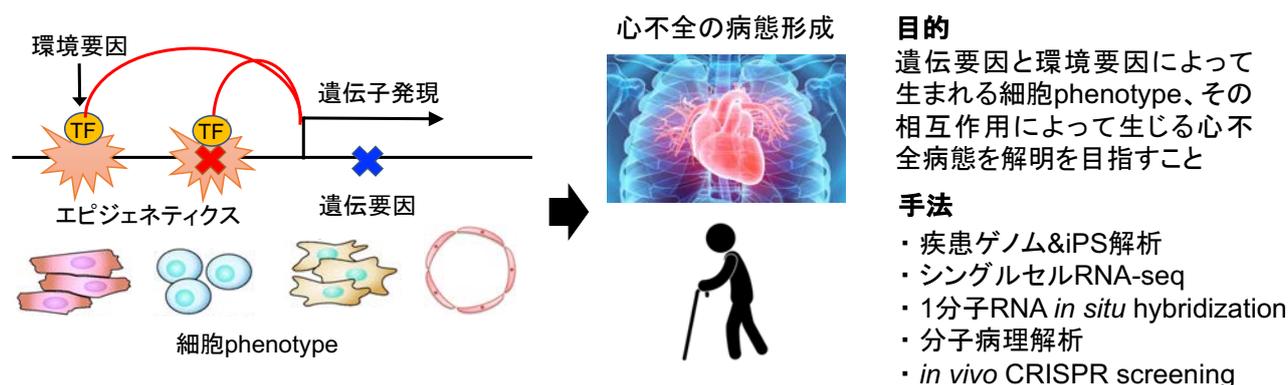
研究成果報告書（追加助成） <概要>

所属	東京大学大学院医学系研究科 循環器内科
氏名	野村 征太郎
研究テーマ	時空間的 1 細胞トランスクリプトーム解析から切り込む心不全の病態解明

概要の構成は自由ですが、研究助成報告として広報資料に掲載されます点をご留意ください。研究目的、研究手法、研究成果などを 1 ページにまとめてください。（図表、写真などの貼付を含む）

心不全の病態は、遺伝要因と環境要因の組み合わせにより形成される（下図）。すなわち、（1）遺伝要因の患者からの詳細な抽出、（2）遺伝要因による心不全発症メカニズムの解明、（3）環境要因による心不全発症メカニズムの解明、（4）心不全関連細胞の時空間的挙動の解明、（5）同定された分子メカニズムによる心不全層別化法の開発、を通して心不全病態を基礎から臨床まで貫いて理解することが可能となる。

そこで本研究では、遺伝要因と環境要因によって生まれる細胞 phenotype、およびその相互作用によって生じる心不全病態の形成メカニズムの解明を目指して、疾患ゲノム&iPS 解析、シングルセル RNA-seq、1 分子 RNA in situ hybridization、分子病理解析、*in vivo* CRISPR screening を組み合わせて、上記の課題の解決に向けて取り組み、以下のような成果を挙げた。



- （1）重症な心不全の遺伝要因を *LMNA* 遺伝子変異と特定した（Nomura et al. *Sci Rep* 2018）。
- （2）*LMNA* 変異は核形態異常・DNA 損傷を伴い、心筋成熟化不良を誘導する（in preparation）。
- （3）圧負荷により心筋は肥大状態を経て代償・不全型に分岐するが、不全型心筋の誘導には DNA 損傷・p53 シグナルの活性化が必須である（Nomura et al. *Nat Commun* 2018）。
- （4）心筋胎児化は空間的不均一性があり・肥大とは異なる形質である（Nomura et al. *JMCC* 2019）
- （5）線維芽細胞からの TGF- β シグナルは心筋 DNA 損傷の蓄積を促進する（in preparation）。
- （6）心筋 DNA 損傷の程度は、心不全患者の臨床的予後・治療応答性を規定しており、治療前の組織でこれらを高精度に予測可能である（Nomura et al. *JACC Basic Transl Sci* 2019; 特許出願済）。

これらの成果により、心不全の病態の本質である心筋 DNA 損傷を特定するに至ったが、（1）心筋 DNA 損傷はいかに誘導されるか？（2）DNA 損傷はいかに不全心筋を誘導するか？（3）不全心筋はいかに心不全病態を形成するか？（4）心筋 DNA 損傷は有効な治療標的となり得るか？という大きな問題を解くことが次なる挑戦である。これに向けて、我々は、*in vivo* CRISPR スクリーニング系による網羅的な遺伝子機能解析システム・心筋特異的老化/不全化誘導システム・DNA 損傷に関連したエピゲノム解析システムを構築したので、DNA 損傷の誘導要因の特定・DNA 損傷部位の局所で生じている詳細な分子機序の解明を目指している。これを同定・制御することにより、心不全の分子病態をコントロールすること、これが本研究の将来展望である。

第 6 回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 – 研究成果報告書（追加助成） <詳細>

所属	東京大学大学院医学系研究科 循環器内科
氏名	野村 征太郎
研究テーマ	時空間的 1 細胞トランスクリプトーム解析から切り込む心不全の病態解明

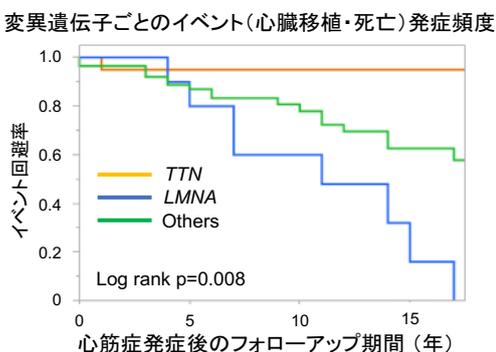
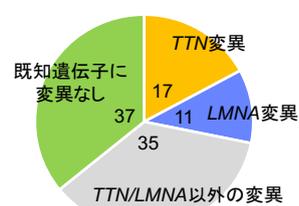
目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

心不全を含めたあらゆる疾患は、臓器・細胞・分子・遺伝子、各レベルの要素が有機的に繋がった個体システムの破綻により生じる。遺伝的要因と環境要因の組み合わせが疾患発症に直結するため、その要因に着目して循環器システム構造の全貌を解明することが、心不全の分子病態の解明、精密医療の展開に欠かせない。

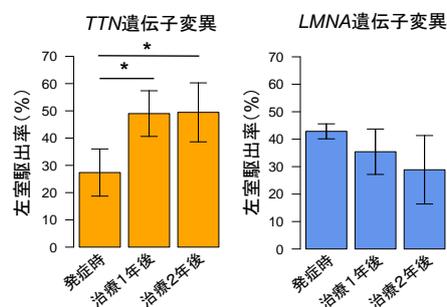
(1) 心筋症・心不全におけるゲノム構造基盤の解明 (Nomura et al. *Sci Rep.* 2018)

拡張型心筋症は重症心不全の主要な要因であり、わが国の心臓移植原因疾患の一位となっている。我々は、拡張型心筋症の 100 以上の原因遺伝子の変異を包括的に解析する手法を確立して本邦の 500 名以上の心筋症患者に適用し、拡張型心筋症において *TTN* 遺伝子の短縮型変異と *LMNA* 遺伝子の変異が大半を占めること、*TTN* 短縮型変異患者は心機能が回復して予後が良い一方で、*LMNA* 変異患者は心機能の回復は難しく予後が極めて悪いことを明らかにした。これにより *LMNA* 変異の同定は、心筋症診療において推奨クラス I という位置付けとなった (2019 年 3 月改訂の心筋症診療ガイドライン)。

本邦における拡張型心筋症の遺伝子変異パターン(%)



変異のタイプによる治療応答性の違い

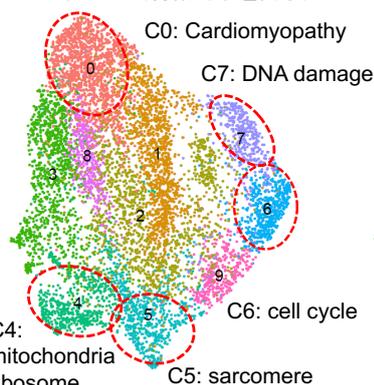


(2) LMNA 変異による心筋症・心不全発症メカニズムの解明 (in preparation)

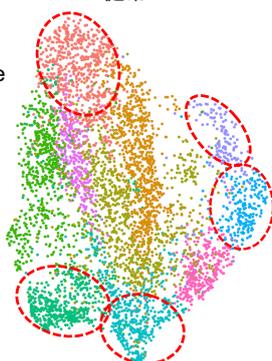
予後不良遺伝的要因である *LMNA* 変異 (p.Q353R) を CRISPR/Cas9 によりマウスに導入し、拡張型心筋症・心不全の発症を確認した。また *LMNA* 変異心筋症患者から樹立した iPS 細胞を心筋細胞に分化させてシングルセル RNA-seq 解析を行い、細胞周期活性化・DNA 損傷応答・心筋成熟化不良が *LMNA* 変異の特徴であることを見出した。免疫染色・クライオ電顕で DNA 損傷蓄積・サルコメア形成不良を確認した。

シングルセルRNA-seq解析 LMNA変異では心筋成熟化クラスター(C4/5)が減少しDNA損傷クラスターが増加(C6/7)

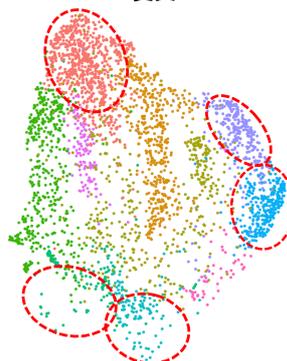
クラスター(特徴的な遺伝子)



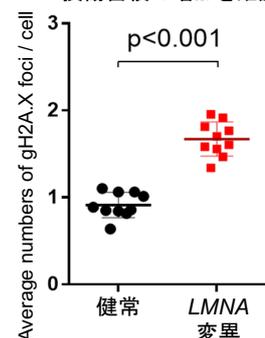
健常



LMNA変異



gH2A.X免疫染色 DNA損傷蓄積の増加を確認

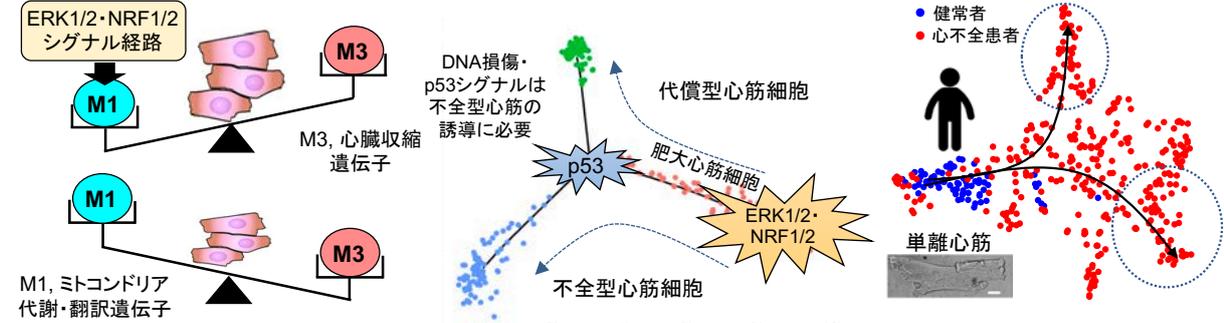


目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

(3) 心不全における心筋リモデリングの分子挙動 (Nomura et al. *Nat Commun.* 2018)

我々は、心筋シングルセル RNA-seq 解析を世界で初めて成功させて圧負荷心不全モデル・心不全患者の心筋組織検体に適用し、圧負荷による ERK1/2・NRF1/2 シグナル活性化がミトコンドリア生合成・細胞肥大を誘導すること、持続的な圧負荷により代償型と不全型の 2 つの心筋細胞に分岐すること、不全型心筋への形質転換には DNA 損傷応答により誘導される p53 シグナルの活性化が重要であることを解明した。

- ① 心筋の肥大に関する経路・遺伝子を同定 ② 肥大心筋は代償型・不全型に分岐 ③ 臨床検体でも代償型・不全型心筋を分離

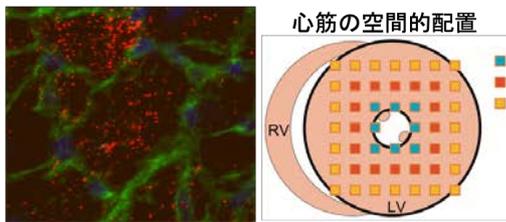


(4) 心臓ストレス応答の空間的不均一性の同定 (Nomura et al. *J Mol Cell Cardiol.* 2019)

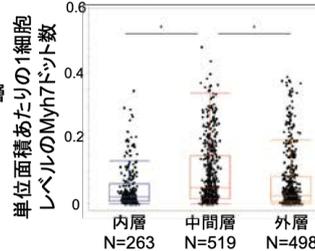
応募者は、1 分子 RNA *in situ* hybridization を世界で初めて心臓に応用してシングルセル RNA-seq と統合解析し、胎児型遺伝子発現を生じる心筋細胞は形態的に小さく、ミトコンドリア代謝が抑制されており、心臓の中間層で特異的に認められることを解明した。これは中間層を占める輪状筋の特異性によるものと考えられ、心臓ストレス応答の空間的不均一性を世界に先駆けて提唱した。

1分子RNA *in situ* hybridization (1分子RNAを1ドットで同定)

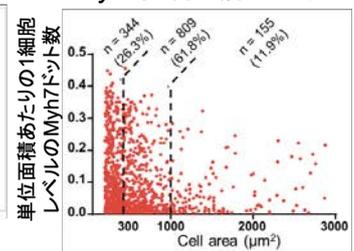
Myh7(胎児型ミオシン)mRNA, WGA(細胞膜)



特に中間層でMyh7発現心筋が出現

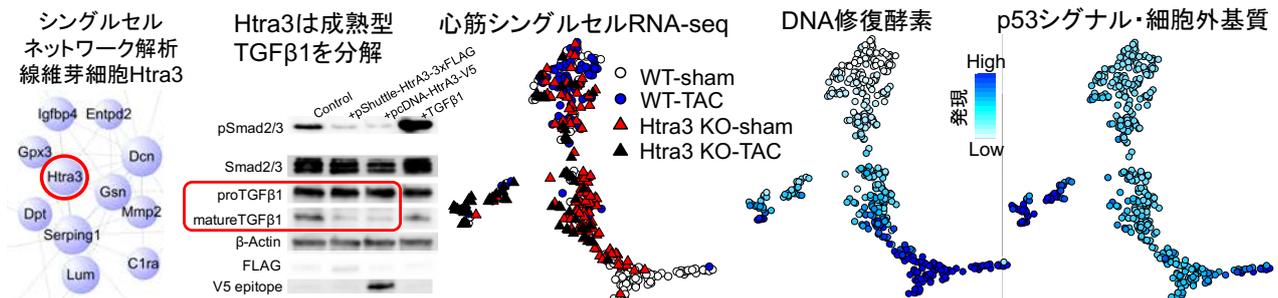


Myh7発現心筋は小さい



(5) 線維芽細胞からの TGF-βシグナルは心筋 DNA 損傷の蓄積を促進する (in preparation)

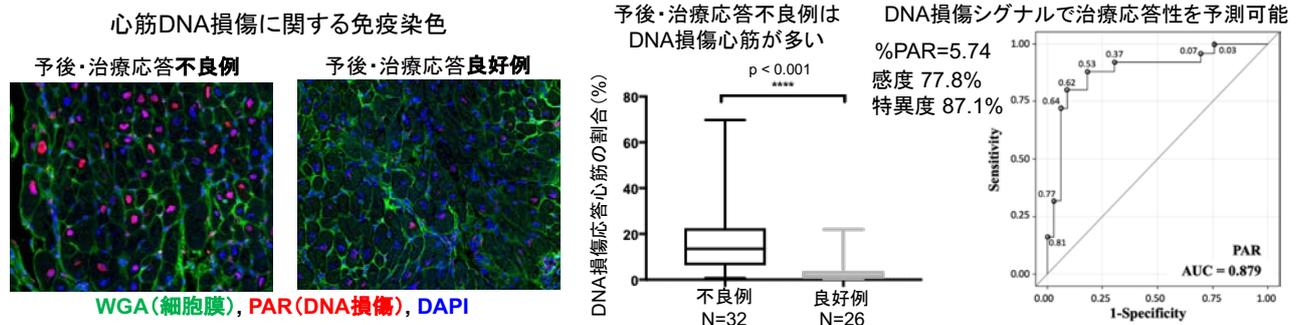
非心筋シングルセル RNA-seq 解析を行い、心筋細胞と相互作用する頻度の高い細胞として心臓線維芽細胞を同定した。ネットワーク解析により機能未知のプロテアーゼ遺伝子 Htra3 を同定し、その分子が成熟型 TGF-β1 を分解することを見出した。Htra3KO マウスの心臓は圧負荷前から肥大し、圧負荷によって速やかに心不全を呈した。シングルセル RNA-seq により、Htra3KO による TGF-βシグナルが DNA 修復酵素の発現低下を誘導し、圧負荷により心筋に p53 シグナル活性化・線維芽細胞化を誘導することを明らかにした。



目的/研究方法/結果/考察/今後の課題など(3 ページ以内)

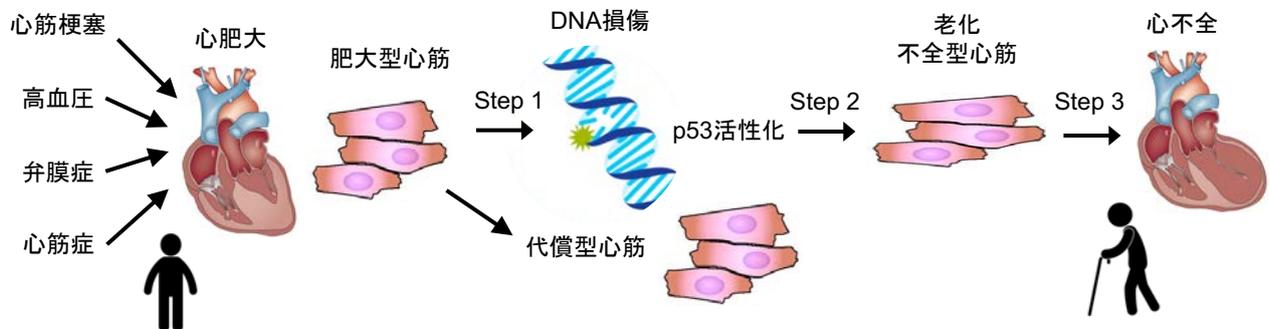
(6) 心筋 DNA 損傷による心不全の予後・治療応答予測 (Nomura et al. JACC BTS 2019)

これまでの研究により、心筋におけるDNA損傷が心不全の不可逆性を規定している可能性が高いと考えられたため、DNA 損傷マーカーとして poly ADP-ribose (PAR) およびγ-H2A.X を用いて 58 例の心不全患者の心臓組織 (治療前) を免疫染色し、臨床経過と統合解析を行った。その結果、薬物応答不良群で優位に DNA 損傷陽性率が高く、PAR 陽性率 5.74%を閾値として PAR 陽性群と陰性群を分割すると、感度 77.8%・特異度 87.1%で患者の薬物応答性を予測できることを明らかにした (特許出願済み)。



(7) 心筋 DNA 損傷研究の将来展望

上記の研究により、遺伝的要因と環境的要因はいずれも最終的に心筋細胞に DNA 損傷を誘導して不全心筋化を誘導することが解明された。しかしながら、(1) 心筋 DNA 損傷はいかに誘導されるか？ (2) DNA 損傷はいかに不全心筋を誘導するか？ (3) 不全心筋はいかに心不全病態を形成するか？ (4) 心筋 DNA 損傷は有効な治療標的となり得るか？という大きな問題を解くことが次なる挑戦である。



これに向けて、我々は、*in vivo* CRISPR スクリーニング系による網羅的な遺伝子機能解析システム・心筋特異的老化/不全化誘導システム・DNA 損傷に関連したエピゲノム解析システムを構築したので、DNA 損傷の誘導要因の特定・DNA 損傷部位の局所で生じている詳細な分子機序の解明を目指している。これを同定・制御することにより、心不全の分子病態をコントロールすること、これが本研究の将来展望である。これは、循環器疾患において重要な課題である心不全の本質的な分子機序の解明だけでなく、DNA 損傷により発症する神経変性疾患、加齢により生じる臓器傷害など、多くの疾患の機序の解明にも寄与することが期待される。

第 6 回万有医学奨励賞 – 生活習慣病領域 –

研究成果報告書（追加助成）＜発表実績/予定一覧＞

所属	東京大学医学系研究科 循環器内科
氏名	野村 征太郎

1. 論文発表実績	
<ul style="list-style-type: none"> 掲載年次順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 論文 PDF 添付ありとなしに分けてリストを作成のこと。 著者名、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年（西暦）、査読の有無について記入する。なお、著者名は省略せず、全てを記入し、自分の名前に下線を引く。 国内外雑誌を問わない。 印刷中は in press と記入、学会のアブストラクトおよび投稿中の論文は含めない。 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 	
① <論文 PDF 添付あり>	
1	Ko T*, Fujita K*, <u>Nomura S*</u> , 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. Quantification of DNA Damage in Heart Tissue as a Novel Prediction Tool for Therapeutic Prognosis of Patients With Dilated Cardiomyopathy. <i>JACC Basic Transl Sci.</i> 4: 670-680, 2019 *co-first authors
2	Izawa N*, Kurotaki D*, <u>Nomura S*</u> , Fujita T, Omata Y, Yasui T, Hirose J, Matsumoto T, Saito T, Kadono Y, Okada H, Miyamoto T, Tamura T, Aburatani H, Tanaka S. Cooperation of PU.1 with IRF8 and NFATc1 defines chromatin landscapes during RANKL-induced osteoclastogenesis. <i>J Bone Miner Res.</i> 2019. doi: 10.1002/jbmr.3689. *co-first authors
3	Ito M, Hara H, Takeda N, Naito AT, <u>Nomura S</u> , Kondo M, Hata Y, Uchiyama M, Morita H, Komuro I. Characterization of a small molecule that promotes cell cycle activation of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. <i>J Mol Cell Cardiol.</i> 128: 90-95, 2019
4	Satoh M*, <u>Nomura S*</u> , 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. <i>J Mol Cell Cardiol.</i> 128: 77-89, 2019 *co-first authors
5	<u>Nomura S</u> . Genetic and non-genetic determinants of clinical phenotypes in cardiomyopathy. <i>J Cardiol.</i> 2018. pii: S0914-5087(18)30294-6.
6	Hara H, Takeda N, Kondo M, Kubota M, Saito T, Maruyama J, Fujiwara T, Maemura S, Ito M, Naito AT, Harada M, Toko H, <u>Nomura S</u> , Kumagai H, Ikeda Y, Ueno H, Takimoto E, Akazawa H, Morita H, Aburatani H, Hata Y, Uchiyama M, Komuro I. Discovery of a Small Molecule to Increase Cardiomyocytes and Protect the Heart After Ischemic Injury. <i>JACC Basic Transl Sci.</i> 3: 639-653, 2018
7	<u>Nomura S</u> , Satoh M, Fujita T, Higo T, Sumida T, Ko T, Yamaguchi T, Tobita T, Naito AT, 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. <i>Nat Commun.</i> 9: 4435, 2018
8	Sakai T, Naito AT, Kuramoto Y, Ito M, Okada K, Higo T, Nakagawa A, Shibamoto M, Yamaguchi T, Sumida T, <u>Nomura S</u> , Umezawa A, Miyagawa S, Sawa Y, Morita H, Lee JK, Shiojima I, Sakata Y, Komuro I. Phenotypic Screening Using Patient-Derived Induced Pluripotent Stem Cells Identified Pyr3 as a Candidate Compound for the Treatment of Infantile Hypertrophic Cardiomyopathy. <i>Int Heart J.</i> 59: 1096-1105, 2018
9	Ito M, <u>Nomura S</u> . Cardiomyopathy with LMNA Mutation. <i>Int Heart J.</i> 59: 462-464, 2018

10	Fujiwara T, Takeda N, Hara H, Morita H, Kishihara J, Inuzuka R, Yagi H, Maemura S, Toko H, Harada M, Ikeda Y, Kumagai H, <u>Nomura S</u> , Takimoto E, Akazawa H, Ako J, Komuro I. Distinct variants affecting differential splicing of TGFBR1 exon 5 cause either Loeys-Dietz syndrome or multiple self-healing squamous epithelioma. <i>Eur J Hum Genet.</i> 26: 1151-1158, 2018
11	Tobita T*, <u>Nomura S*</u> , 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, Nakanishi 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. <i>Sci Rep.</i> 8: 1998, 2018 *co-first authors
② <論文 PDF 添付なし>	
1	
2	
3	

2. 学会発表実績		
<ul style="list-style-type: none"> ・ 発表年順（新しいものから）に記入すること。ただし、本研究助成金交付後のものに限る。 ・ 発表学会名、発表者名、演題を記入する。 ・ アブストラクト、プログラム等の PDF を添付すること。 ・ 国内外を問わない。 ・ 欄が足りない場合は、増やして記入すること。 		
	発表時期	発表学会名、発表者名、演題
1	2019年12月	日本心血管内分泌代謝学会、野村征太郎、「シングルセルシステム循環器学による循環器疾患システム構造の全貌解明（永井良三賞受賞講演）」 「心臓疾患における細胞・分子挙動の網羅的理解」
2	2019年12月	日本分子生物学会、野村征太郎、「Systems biology for the integrative understanding of cardiac system」
3	2019年11月	コールドスプリングハーバー研究所ミーティング（ニューヨーク、米国）Single cell analysis、野村征太郎、「Integrative single-cell analysis to dissect heart failure biology」
4	2019年10月	Cell Symposia Transcriptional regulation in Evolution, Development and Disease（シカゴ、米国）、野村征太郎、「Multi-omics dissection of heart failure for cardiovascular precision medicine」
5	2019年10月	日本心不全学会、野村征太郎、「マルチオミクス連関による心筋症における精密医療の実現」、「Multi-omics dissection of heart failure for cardiovascular precision medicine」、「ゲノム分子病理解析による心筋症における精密医療の実現」
6	2019年9月	日本循環器学会基礎研究フォーラム、野村征太郎、「Heart Cell Atlas for understanding the pathophysiology of the Heart and for the development of precision cardiovascular medicine」
7	2019年9月	ヨーロッパ心臓病学会（ESC）（パリ、フランス）、野村征太郎、「Genetic architecture of cardiomyopathy」
8	2019年5月	Gordon Research Conference（香港）Epigenetic Regulation of Cardiovascular Disease、野村征太郎、「Multi-omics dissection of heart failure for the development of cardiovascular precision medicine」
9	2019年5月	Annual Meeting of Taiwan Society of Cardiology（台湾）、野村征太郎、「Multi-omics dissection of heart failure for precision cardiovascular medicine」
10	2019年3月	日本循環器学会、野村征太郎、「Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure」、「マルチオミクス連関による心筋症・心不全における精密医療の実現」、「Systems Cardiology for Multi-omics Dissection of Cardiomyopathy」

11	2019年2月	Cell Symposia (シンガポール) Single cells Technology to Biology、野村征太郎、「Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure」
12	2018年11月	アメリカ心臓協会 (AHA、シカゴ、アメリカ) Melvin L. Marcus Young Investigator Award、野村征太郎、「Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure」
13	2018年11月	Annual Meeting of International Society for Mechanical Circulatory Support、野村征太郎、「Genetic basis of cardiomyopathy and the genotypes involved in prognosis and left ventricular reverse remodeling」
14	2018年10月	日本心不全学会、野村征太郎、「ゲノム解析による心筋症における精密医療の実現に向けて」、「マルチオミクス連関による心不全分子病態の層別化」、「臨床と基礎をつなぐ循環器研究の今後のあり方」
15	2018年8月	ヨーロッパ心臓病学会 (ESC) (ミュンヘン、ドイツ)、野村征太郎、「Comprehensive targeted sequencing of cardiomyopathy and its relation to phenotype」

3. 投稿、発表予定 (投稿中の論文も含める)

	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2020年1月投稿予定	Nature Ko T*, Nomura S*, Fujita K, Toko H, Morita H, Aburatani H, Komuro I. 「Single-cell analysis identifies cardiac fibroblast Htra3 as a regulator of cardiomyocyte fibrotic and failing conversion」
2	2020年1月投稿予定	Journal of the American College of Cardiology Shintani-Domoto Y, Ode K, Nagashima Y, Kinoshita O, Nomura S, Fujita K, Ogawa M, Abe H, Komuro I, Ono M, Ueda HR, Ushiku T, Fukayama M. 「Tissue level predictors for recovery from left ventricular assist device support. Proteomic analysis of myocardial tissue」
3		