

研究助成 2019 – 生活習慣病領域 –

研究成果報告書（最終） <概要>

所 属	東京大学医学部附属病院 循環器内科
氏 名	候 聡志
研 究 テーマ	一細胞解析と in vivo CRISPR/Cas9 システムの融合による心不全リプログラミング因子スクリーニング

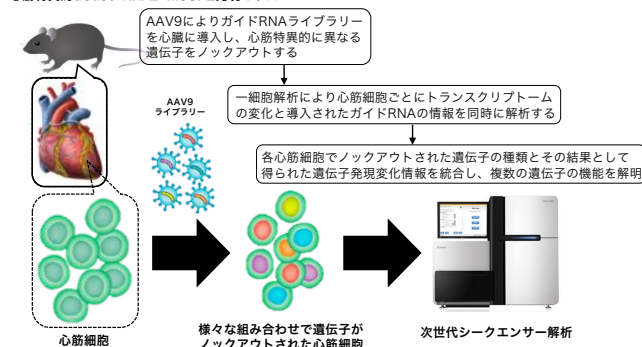
- 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。
- 概要の構成は自由とするが、研究目的、研究手法、研究成果などを、1 ページにまとめること。
(図表、写真などの貼付を含む)

scRNA-seq 解析は心不全基礎研究領域でも近年急速に普及しつつあるが、得られた膨大なデータを如何に処理し、有用な情報を抽出(新規心不全治療ターゲットの探索)するのかは未解決の課題である。申請者らは本研究助成を受けてこの課題の解決のため、①in vivo Perturb-seq 実験系の確立と②scRNA-seq データの解析による心不全治療ターゲットの絞り込みに取り組んだ。

①in vivo Perturb-seq 実験系の確立

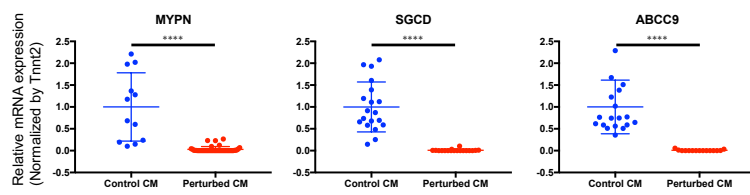
dCas9-KRAB-MeCP2 という gRNA 依存性に対象遺伝子をサイレンシングする分子を心筋細胞特異的に発現するマウスを作成することに成功した。このマウスに対して様々な遺伝子を標的とする gRNA 搭載 AAV9 ベクターライブラリーを設計・投与した後、その心筋細胞を scRNA-seq 解析(Perturb-seq)することにより、異なる遺伝子の発現が抑制された個々の心筋における表現系を確認する予定である。

心筋特異的 dCas9-KRAB-MeCP2 発現マウス



AAV9 ベクター感染心筋を効率よく選択して scRNA-seq を行うため、申請者らは生後 4 日目の新生児マウスに AAV9 を感染させ、14 日目に(新生児心臓用に改良したランゲンドルフ灌流法を用いて)マウス心筋を単離し、かつ FACS により AAV9 感染心筋(GFP+)のうち、形態が杆状に保たれている良質なもののみを Sort 単離できる系を確立した。qPCR を用いた予備的検証実験では、

AAV9 感染によって gRNA が細胞内に導入された心筋(Perturbed CM)では対象遺伝子の発現量が元々の平均の 5%未満まで抑制されていることが分かり、dCas9-KRAB-MeCP2 による



対象遺伝子のサイレンシングが十分機能していることが確認された。

②scRNA-seq データの解析による心不全治療ターゲットの絞り込み

in vivo Perturb-seq では一度に調べられる遺伝子の種類は 30-50 種類程度に限られるため、scRNA-seq のデータを解析して事前にある程度解析対象の絞り込みを行う必要があり、そのための効果的な解析方法の開発にも取り組んだ。まず重み付け遺伝子共発現ネットワーク解析(WGCNA)の手法を用いることで、心筋細胞における心保護的転写因子 X を同定することに成功した。マウスを用いた実験では、TAC 手術後 8 週経過した晚期心不全状態のマウスで TF-X を過剰発現させても、心室壁の代償性肥大が再度見られ、左室径や収縮能の改善を認めており、心不全の新規治療ターゲットと考えられる。また、WGCNA を応用してリガンド-受容体解析や Pathway 解析を行うことで、心筋細胞と他の非心筋細胞集団の細胞間コミュニケーションを解析することができ、その結果、線維芽細胞の活性を調整し、心筋にも影響を与うる新規分子として Htra3 を同定した。Htra3 KO マウスでは線維芽細胞の TGF β シグナル過剰活性化が生じ、周囲の心筋細胞にも影響して老化形質や DNA 傷害をもたらす。逆に過剰発現実験の結果、Htra3 は心保護作用を示した。

研究助成 2019 – 生活習慣病領域 –

研究成果報告書（最終）＜発表実績/予定一覧＞

所	属	東京大学医学部附属病院 循環器内科
氏	名	候 聡志

1. 論文発表実績	
● 研究助成報告として広報資料に掲載される点を留意すること。 ● 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。 ● 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<u>下線</u>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	Komai K, Ito M, Nomura S, Shichino S, Katoh M, Yamada S, <u>Ko T</u> , Iizuka-Koga M, Nakatsukasa H, Yoshimura A. Single-Cell Analysis Revealed the Role of CD8+ Effector T Cells in Preventing Cardioprotective Macrophage Differentiation in the Early Phase of Heart Failure. Front Immunol. 2021; 12: 763647.
2	Hasegawa S, Inoue T, Nakamura Y, Fukaya D, Uni R, Wu CH, Fujii R, Peerapanyasut W, Taguchi A, Kohro T, Yamada S, Katagiri M, <u>Ko T</u> , Nomura S, Nakanishi Ozeki A, Susaki EA, Ueda HR, Akimitsu N, Wada Y, Komuro I, Nangaku M, Inagi R. Activation of Sympathetic Signaling in Macrophages Blocks Systemic Inflammation
3	Ishizuka M, Harada M, Nomura S, <u>Ko T</u> , Ikeda Y, Guo J, Bujo S, Yanagisawa-Murakami H, Satoh M, Yamada S, Kumagai H, Motozawa Y, Hara H, Fujiwara T, Sato T, Takeda N, Takeda N, Otsu K, Morita H, Toko H, Komuro I. CXCR7 ameliorates myocardial infarction as a β -arrestin-biased receptor. Sci Rep. 11(1):3426.
4	Toko H, Morita H, Katakura M, Hashimoto M, <u>Ko T</u> , Bujo S, Adachi Y, Ueda K, Murakami H, Ishizuka M, Guo J, Zhao C, Fujiwara T, Hara H, Takeda N, Takimoto E, Shido O, Harada M, Komuro I. Omega-3 fatty acid prevents the development of heart failure by changing fatty acid composition in the heart. Sci Rep. 10(1):
5	Yamaguchi T, Sumida TS, Nomura S, Satoh M, Higo T, Ito M, <u>Ko T</u> , Fujita K, Sweet ME, Sanbe A, Yoshimi K, Manabe I, Sasaoka T, Taylor MRG, Toko H, Takimoto E, Naito AT, Komuro I. Cardiac dopamine D1 receptor triggers ventricular arrhythmia in chronic heart failure. Nat Commun. 11(1): 4364. 2020(査読あり)
6	<u>Ko T</u> , Higashitani M, Uemura Y, Utsunomiya M, Yamaguchi T, Matsui A, Ozaki S, Tobita K, Kodama T, Morita H, Komuro I. Clinical Outcome and Diverse Risk Factors for Different Therapeutic Target Locations of Peripheral Artery Disease. J Atheroscler Thromb. 27(8): 769-779. 2020(査読あり)
7	<u>候 聡志</u> , 山田 臣太郎, 野村 征太郎. シングルセル解析に基づく循環器病態研究. 循環器専門医. 2021 年 8 月号. in press(査読なし)
8	候 聡志. 心不全に対する precision medicine の展望. 内科. 128(1). in press(査読なし)
9	候 聡志. DNA 損傷評価に基づく拡張型心筋症患者の精密医療. Heart View. 24(10), 994-1000. 2020(査読なし)

2. 学会発表実績		
● 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。 ● 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	2021 年 12 月	第 38 回国際心臓研究会（ISHR）日本部会総会 Young Investigator's Award 最優秀賞. T. Ko , M. Ito, B. Zhang, S. Nomura, I. Komuro. 「Single-cell multiomic analysis of knock-in mouse and iPSC cardiomyocytes identifies mechanism of maturation abnormality in heart by LMNA Q353R mutation」
2	2021 年 11 月	AHA2021 Melvin L. Marcus Early Career Investigator Award. T. Ko , S. Nomura, S. Yamada, K. Fujita, M. Hatano, H. Morita, I. Komuro. 「Cardiac fibroblasts are critically involved in the development of heart failure by inducing cardiomyocyte senescence.」
3	2021 年 10 月	第 25 回日本心不全学会 Young Investigator Award 優秀賞. S. Yamada, T. Ko , M. Ito, S. Nomura, I. Komuro. Integrative single-cell multi-omics analysis reveals a potential molecular mechanism of LMNA associated dilated cardiomyopathy.
4	2021 年 4 月	第 7 回 日本心筋症研究会. 山田 臣太郎, 候 聡志 , 伊藤 正道, 初瀬 慧, 野村 征太郎, 小室一成. 「一細胞および空間的 RNA-seq 解析による心不全の分子病理学的機序の解明」
5	2021 年 3 月	第 85 回日本循環器学会 Young Investigator Award (Basic Research, 優秀賞). 候 聡志 , 野村 征太郎, 山田 臣太郎, 藤田 寛奈, 森田 啓行, 小室 一成. 「Mechanical Stress on Cardiac Fibroblasts Triggers Phenotypic Conversion in Cardiomyocytes Leading to Heart Failure」
6	2021 年 3 月	第 85 回日本循環器学会 シンポジウム. 候 聡志 . 「Single-Cell Analysis to Explore the Molecular Pathology of Heart Failure」
7	2021 年 3 月	第 85 回日本循環器学会 一般演題(心筋症). 関 侑華, 野村 征太郎, 山田 臣太郎, 候 聡志 , 伊藤 正道, 小室 一成. 「Single Cell RNA Sequencing Reveals Potential Molecular Mechanisms of Lamin A/C Gene Mutation Leading to Dilated Cardiomyopathy」
8	2021 年 3 月	第 24 回 日本心血管内分泌代謝学会学術総会 若手研究奨励賞. 山田 臣太郎, 候 聡志 , 初瀬 慧, 野村 征太郎, 小室 一成. 「Integrative Analysis of Spatial Transcriptomics and Single Cell RNA-seq Reveals the Spatiotemporal Mechanism of Cardiomyocyte Adaptation after Myocardial Infarction」
9	2020 年 12 月	第 43 回日本分子生物学会. 初瀬 慧, 候 聡志 , 山田 臣太郎, 藤田 寛奈, 加藤 愛巳, 野村 征太郎, 小室 一成. 「Spatiotemporal transcriptomic analysis of myocardial infarction」
10	2019 年 12 月	第 23 回日本心血管内分泌代謝学会学術総会 若手研究奨励賞. 候 聡志 , 野村 征太郎, 藤田 寛奈, 東口 治弘, 油谷 浩幸, 小室 一成. 「シングルセル RNA-seq/細胞間相互作用解析による不全心筋誘導を制御する非心筋細胞の機能解明」
11	2019 年 10 月	第 23 回日本心不全学会 Young Investigator Award(最優秀賞). 候 聡志 , 野村 征太郎, 波多野 将, 小室 一成. 「Quantification of DNA Damage in Heart Tissue as A Novel Prediction Tool for Therapeutic Prognosis」

3. 投稿、発表予定

	投稿/発表時期	雑誌名、学会名等
1	2022 年 2 月投稿 予定	S. Yamada*, T. Ko *(equally co-first), M. Ito, T. Sassa, S. Nomura, H. Okuma, M. Sato, T. Imasaki, S. Kikkawa, B. Zhang, T. Yamada, K. Fujita, M. Katoh, M. Kubota, S. Hatsuse, M. Katagiri, N. Takeda, H. Morita, S. Takada, M. Toyoda, M. Uchiyama, M. Ikeuchi, K. Toyooka, A. Umezawa, R. Nitta, H. Aburatani, I. Komuro. Aberrant interaction between TEAD1 and Lamin A/C impairs cardiomyocyte maturation in LMNA-related cardiomyopathy. 投稿準備中
2	2021 年 6 月投稿	S. Yamada*, T. Ko *(equally co-first), S. Hatsuse, S. Nomura, B. Zhang, T. Yamada, S. Inoue, M. Kubota, K. Sawami, T. Yamada, T. Sassa, M. Katagiri, K. Fujita, M. Katoh, M. Ito, M. Harada, H. Toko, M. Takeda, H. Morita, H. Aburatani, I. Komuro. Spatiotemporal single-cell analysis reveals critical roles of mechano-sensing genes at the border zone in left ventricular remodelling after myocardial infarction. Nature Cardiovasc Res にて Revise 中
3	2021 年 5 月投稿	T. Ko , S. Nomura, K. Fujita, S. Yamada, 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, M. Ono, M. Ikeuchi, H. Morita, H. Aburatani, I. Komuro. Cardiac fibroblasts are critically involved in the development of heart failure by inducing cardiomyocyte senescence. Nature Communications にて Revise 中
4	2021 年 5 月投稿	T. Yamada, S. Nomura, M. Katoh, S. Hatsuse, K. Fujita, M. Ito, T. Fujita, M. Tsuji, E. Amiya, T. Ko , S. Yamada, M. Katagiri, T. Sassa, O. Kinoshita, K. Nawata, T. Tobita, M. Satoh, K. Tatsuno, S. Fukuda, T. Kashimura, T. Minamino, M. Ono, M. Hatano, H. Aburatani, I. Komuro. LMNA Mutations and Right Heart Failure in Cardiomyopathy Patients with Left Ventricular Assist Device. European Journal of Heart Failure にて Revise 中