シングルセル解析に基づく循環器病態研究

東京大学医学部附属病院循環器内科

こう
候

とし ゆき
聡 志

やま だ しん た ろ う
山田臣太郎

の む ら せ い た ろ う
野村征太郎

はじめに

生物を構成する多種多様の臓器/組織が示す表現型の多様性は、それを構成する一つひとつの細胞レベルでの遺伝子発現の不均一性に基づいており、その背景には複雑な時空間的遺伝子発現制御がある。従来の細胞集団（バルク）を分析するアプローチでは、個々の細胞に特有の遺伝子発現プロファイルは細胞集団の平均像の中に埋もれてしまっていた。しかしシングルセル RNA-seq (scRNA-seq) の解析手法が続々と開発されたことで、トランスクリプトームをシングルセルの分解能で比較してその特徴を解析し、細胞機能をより深く理解することが可能になった。加えて、近年の解析技術の加速度的進歩により、シングルセル解析はトランスクリプトームのみならず、copy number variations (CNV) の解析に代表されるような DNA, Assay for Transposase-Accessible Chromatin with high-throughput sequencing (ATAC-seq) に代表されるようなエピゲノム、さらにはタンパクのレベルにまで及んでいる。また、当初は断片的なシングルセル解析が主流であったが、近年は空間的情報を加味した解析プラットフォームが登場するようになり、さらには CRISPR/Cas9 技術や Base editor 技術と融合させた機能解析の効率化など、さまざまな進化を見せている¹⁾。本稿では筆者らの研究グループが

取り組んでいる循環器領域のシングルセル解析を一部紹介しつつ、近年のシングルセルに関連した話題を紹介していきたい。

心不全病態解明のためのシングルセル解析

圧負荷心不全モデルとして知らせている TAC (transverse aortic constriction) 手術をマウスに行うと、マウスの心臓は代償性心肥大を経た後、徐々に心拡大・心収縮力低下をきたして心不全に至る。近年のシングルセル解析の普及には10X 社 Chromium に代表されるような微小流路・ドロップレット作成装置、あるいは Takara Bio 社 ICELL8 や BD 社 Rhapsody に代表されるようなマイクロウェル式装置の商用化が大きく貢献しているが、筆者らが当初心臓組織でシングルセル解析を始めた頃はまだ簡便に利用できる設備はなかった。血管内皮細胞や線維芽細胞、マクロファージといった非心筋細胞は FACS を用いて容易に単離することができるが、心筋細胞は直径が大きいと、筆者らはランゲンドルフ灌流法によって単離した心筋細胞を一つひとつマニュアルピックアップして選び取り、Smart-seq2 法 (poly A を有する mRNA を捉えて全長 cDNA ライブラリーを作成する方法) によりシングルセル RNA-seq (scRNA-seq) 解析を行った²⁾。

[Key words] 心不全, シングルセル解析, 精密医療

図1 心筋細胞シングルセル RNA-seq 解析

Sham 手術（偽手術）および TAC 手術後の合計 6 つのタイムポイントにおいて計 396 個の心筋細胞シングルセル RNA-seq 解析を施行

scRNA-seq の解析の利点は多岐にわたるが、何といてもトランスクリプトームに基づいて細胞集団を分類・評価できる点にある。従来細胞集団の分類は限られた細胞表面抗原を用いて行われることが多かったが、scRNA-seq では一つひとつの遺伝子発現情報を全て加味して分類（クラスタリング解析）を行うため、まれな細胞集団を同定できたり、従来均質と思われていた細胞集団が実は Heterogeneous なものと発見できたりする。筆者らの解析でも、圧負荷前の健常心の心筋細胞は均一な遺伝子発現プロファイルを有していたのに対して、長期圧負荷後の心不全期の心臓内の心筋細胞は異なるパターンの遺伝子発現プロファイルを有する Heterogeneous な状態であることが判明した（図 1）²⁾。

また、重み付け遺伝子共発現ネットワーク解析 (Weighted Gene Co-expression Network Analysis) という手法により、全遺伝子から協調的に発現する遺伝子をグループ化することで心筋細胞において普遍的に働く 9 つの“遺伝子モジュール”を同定し、それらの発現パターンによって心筋細胞を 7 つの種類に分類した。Monocle³⁾ という細胞系譜追跡解析を行うことにより、圧負荷後の自然経過の中で、肥大化した心筋細胞はその後ミトコンドリア翻訳・代謝関連遺伝子の発現レベルが高く保たれている代償型心筋、そして脂肪酸代謝

関連やアクチン結合分子の遺伝子発現レベルが低く、線維化関連遺伝子や DNA 損傷応答関連遺伝子の発現レベルが高い不全型心筋の 2 種類の細胞種に分岐することがわかった。心不全期の心臓では特に後者の不全型心筋が多く、さらにエピゲノム解析により遺伝子モジュールの上流転写因子を予測した結果、心筋の肥大化や不全化に関わるシグナルや転写因子が明らかとなった（図 2）²⁾。

続いて、拡張型心筋症 (DCM) 患者が左室補助人工心臓 (LVAD) 植込術を受ける際に切除される心組織や非心臓死剖検患者の心組織を用いて同様に scRNA-seq 解析を行ったところ、健常者由来の心筋細胞は比較的均一な遺伝子発現を示していたのに対して、DCM 患者由来の心筋細胞は遺伝子発現パターンの不均一性が高いことが分かった²⁾。マウス心の scRNA-seq 解析で得られた遺伝子モジュールとヒト心の scRNA-seq で得られた遺伝子モジュールは大幅にオーバーラップしていたが、興味深いことに LVAD 植込後に心機能改善が得られた予後良好な DCM 患者 (Responder) はそうではない予後不良 DCM 患者 (Non-responder) と比較して、DNA 損傷応答遺伝子群の発現が低いことが判明した（図 3）²⁾。この知見を臨床応用すべく、心不全患者の治療前の心筋生検検体を用いて DNA 傷害の定量評価をすることで、予後予測できないかをさらに検証した。具体

図2 遺伝子共発現ネットワーク解析及び細胞系譜追跡解析

遺伝子共発現ネットワーク解析により、心不全形成過程の各段階における重要な遺伝子モジュールを同定した。また、TAC 後長期の心臓においては代償型心筋と不全型心筋が混在することが明らかとなった。

的には、東京大学医学部附属病院循環器内科にて治療開始前の段階で心筋生検を受けた DCM 患者 58 症例を対象として、治療開始前に採取された心筋生検組織の病理標本を用いて、DNA 傷害マーカーである poly ADP-ribose や γ H2A.X の免疫染色評価を行った。その結果、感度・特異度ともに 8 割程度の高い精度で薬物治療導入後の治療反応性を予後予測できることが明らかとなり、精密医療の実現に寄与することが分かった (図 3)⁴⁾。このように、シングルセル解析で得られた基礎研究の知見は患者の臨床像と連結した分子病態の理解に有用であり、それをもとに多様な診断・治療への応用可能性を秘めている。

シングルセル解析の多方面への応用と展開

scRNA-seq で得られた膨大なデータを如何に処理するか、その解析手法の進歩はまさに日進月歩であり、筆者らの取り組みとも絡めてその一部を紹介していきたい。

筆者らも先の心筋細胞 scRNA-seq 解析の際

に利用した Monocle^{3,5)} に代表されるような、scRNA-seq のデータを基に細胞系譜の変遷を予測する解析はかなり普及しており、これによりトランスクリプトームに応じて別々に分類された細胞集団間の関係性を推測することが可能となった。同様の scRNA-seq データから細胞動態の変化を推測する方法として Velocity⁶⁾ など開発されている。また、直接 DNA の一部を改変させてバーコードとして利用することで真の意味で細胞系譜を追跡する方法として、LoxP 配列の組み換えを利用した Polylox システム⁷⁾ や CRISPR/Cas9 を利用した Random barcoding システム⁸⁾ などが知られており、正確な細胞のクローン追跡が可能となっている。さらに、細胞に組み込んだ様々なバーコードを *in situ* hybridization によって染め分けることで細胞系譜と遺伝子発現を空間情報と連結して解析するプラットフォーム⁹⁾ も開発されている。

Ramilowski らは 2015 年に初めて細胞間相互作用をするリガンド-受容体分子のネットワークデータベースの作成¹⁰⁾を試みたが、scRNA-seq で得られた膨大な遺伝子発現プロファイル情報の

図3 心筋細胞シングルセル解析のヒト心不全への臨床応用

ヒト心臓検体のシングルセル解析により不全型心筋でDNA 損傷応答遺伝子の発現が高いことが分かり、治療導入前の心筋生検組織でDNA 傷害マーカーを染色すると治療反応性の予後に応じて染色率が異なることが分かった。PAR: poly ADP-ribose

中から、こうしたリガンド-受容体分子として機能する細胞間相互作用分子のデータのみを抽出して細胞間相互作用を解析することで、各細胞群間の相互作用を可視化し、組織や病態における変化を定量評価することができる。現在こうした細胞間相互作用の解析のためのアルゴリズムは一般公表されており、例えば CellPhoneDB¹¹⁾などが公開されている。筆者らも心筋細胞及び種々の非心筋細胞の scRNA-seq データを利用して細胞間相互作用の可視化に取り組んでおり、その解析を通して心臓の恒常性維持に重要な細胞間のシグナル伝達の解明に取り組んでいる (図4)。

シングルセル解析の欠点の1つとしては、細胞を単離する過程でその細胞が元いた位置情報が失われる点が挙げられる。筆者らは過去に1分子RNA *in situ* hybridization (ISH) の手法により胎児型ミオシン (*Myh7*) の mRNA 量を個々の心筋細胞ごとに定量評価し、その空間的分布の偏り

を報告した¹²⁾。現在こうした1分子RNA ISHの手法は一度に最大12種類の異なる mRNA を検出するもの (RNA scope HiPlex^{®13)}) が商用化されているが、それも結局は標的遺伝子を決めて空間的な発現を解析する手法であるため、空間的遺伝子発現プロファイルの全体像を捉えることは困難である。近年では seqFISH¹⁴⁾ や Slide-seq¹⁵⁾ といった、1つの組織標本切片上で網羅的に mRNA プロファイルを調べていく方法 (Spatial transcriptome 解析) が考案されており、特に10X Genomics 社からは FFPE 標本や新鮮凍結標本を使って Spatial transcriptome 解析ができる Visium という解析キットが商用的に入手可能である。筆者らもマウス心筋梗塞モデルの凍結心臓標本を用いて Visium で Spatial transcriptome 解析を行った。現時点で販売されている Visium は直径55μmのマイクロスポット上で組織標本の mRNA をキャプチャーして逆転写する仕組みと

図4 各細胞群間の相互作用の可視化

心臓を構成する各細胞種特異的なリガンドおよび受容体遺伝子の発現プロファイルを表示した後、対応するリガンド-受容体ペアを線で結ぶことにより、細胞群間コミュニケーションを可視化した。

なっており、組織標本の厚みは多くの場合 $10\mu\text{m}$ が推奨されている。そのため、スポットの大きさにしろ、あるいは組織の縦方向の細胞の重なりにし、シングルセルレベルの解析ではないのだが、それでも組織標本を“数細胞レベル”の細かい解像度で空間的遺伝子発現プロファイルの解析を可能としている。心筋梗塞モデルで解析してみると、scRNA-seqの解析と同様に、各スポット上の遺伝子発現パターンをクラスタリング解析でき、各スポットはいくつかのクラスターに分類された。その各スポットクラスターの組織上における分布を確認すると、梗塞巣、梗塞辺縁領域、遠隔領域領域という組織学的特徴に対応しており、従来は主に見た目で曖昧に規定されていたこうした各領域を遺伝子発現プロファイルによって規定できることがわかった(図5)。また、各スポット上には1つ~数個の異なる細胞が載っていると思われるが、scRNA-seqのデータと統合解析させることによって、どの細胞種がどの程度の割合で各スポットクラスターに含まれるのかを推測することは可能である。

シングルセル解析技術を応用した 遺伝子機能解析の効率化

増え続けるシングルセル解析のデータはわれわれの分子細胞生物学や疾患病態に対する理解を大きく深めてきたが、今後一層理解を深めるためには観察的な研究のみならず、新しい仮説を効率的に検証するシステムを確立することが急務である。前述の細胞系普追跡のように、シングルセル解析技術はさまざまな細胞工学技術と組み合わせることが可能であり、近年は効率的な仮説検証のためのプラットフォーム開発に関する報告が相次いでいる。表1^{16~24)}にまとめたように、あらかじめ細胞を改変してCRISPR KOやCRISPR interference (CRISPRi)、CRISPR activation (CRISPRa)といったシステムを内在化させ、そこにバーコード付きのsgRNAを導入(=Perturbation)してから、scRNA-seqやscATAC-seq、さらにはCITE-seq(表面タンパクの発現解析)などのシングルセル解析を行うことで、個々の対象遺伝子を操作した結果の表現系を確認するという流れが主流である。さらにBase editorを用いてランダムにゲノム変異を導入し、それをシングル

図5 心筋梗塞モデルの Spatial transcriptome 解析

各スポット領域の遺伝子発現プロファイルを基にクラスタリング解析を行い、元々の組織学的情報（HE 染色）と対応させて表示した。

表1 シングルセル解析と CRISPR/Cas9 技術を融合した遺伝子機能スクリーニングの代表例

名称 (文献)	Perturbation 機序	分別 (検知) 方法	Perturbation 数	解析細胞数	解析対象
Perturb-seq ¹⁶⁾	CRISPRi	sgRNA barcode	67 sgRNAs (24 genes)	~30,000	RNA
CRISP-seq ¹⁷⁾	CRISPR KO	sgRNA barcode	57 sgRNAs (22 genes)	6,144	RNA
Mosaic-seq ¹⁸⁾	CRISPRi	sgRNA barcode	241 sgRNAs (71 enhancers)	12,444	RNA
CROP-seq ¹⁹⁾	CRISPR KO	sgRNA barcode	48 sgRNAs (20 genes)	N/A	RNA
Perturb-ATAC-seq ²⁰⁾	CRISPRi	sgRNA direct capture/barcode	~190 sgRNAs (63 genes)	~4,300	クロマチン
ECCITE-seq ²¹⁾	CRISPR KO	sgRNA direct capture	N/A	N/A	RNA, 表面タンパク
Convert-seq ²²⁾	cDNA	cDNA sequence	20 genes (transcription factors)	466	RNA
Perturb-CITE-seq ²³⁾	CRISPR KO	sgRNA barcode	~750 sgRNAs (~250 genes)	~218,000	表面タンパク
TAP-seq ²⁴⁾	CRISPRi	sgRNA barcode	1,790 enhancers	231,667	RNA

セル解析で評価する報告もなされている^{25,26)}。また、近年では1つの細胞からゲノム・エピゲノム・トランスクリプトーム・プロテオームのうち、複数のオミックス情報を同時に取得してその間の関係性を明らかにするシングルセルマルチオミックス解析が盛んになってきており、今後もさまざまな細胞工学的技術との組み合わせによって効率的な遺伝子機能スクリーニングがなされていくと思われる。

おわりに

本稿では筆者らのシングルセル解析を用いた循環器研究の取り組みについて簡単に紹介しながら、近年話題のシングルセル解析技術について触れてきた。シングルセル解析はわれわれの分子細胞生物学に対する理解を劇的に深めるだけでなく、さまざまな臨床応用性も秘めた魅力的な技術であるが、検体の準備から細胞の単離、ライブラリー調整、そしてデータ解析に至るまで、多方面にわたるスキルが求められる。技術的進歩は日々

日進月歩で進んでいくため、筆者らも絶えず最先端の情報にキャッチアップし、新しい技術をいち早く自分らの循環器研究に応用していきたいと努めている。一方で研究はまずニーズがあり、そのためにどのような技術開発が必要かを考えていかないと目的を見失ってしまうので、完全に技術Drivenになってもいけないと痛感している。今後もうまくバランスを取りつつ、シングルセル解析を用いて循環器診療の進歩に貢献できるような本質的な研究を進めて参りたい。

著者の COI (conflicts of interest) 開示： 本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) Yamada S, Nomura S: Review of Single-Cell RNA Sequencing in the Heart. *Int J Mol Sci* 2020; **21**: 8345
- 2) Nomura S, Satoh M, Fujita T et al: Cardiomyocyte gene programs encoding morphological and functional signatures in cardiac hypertrophy and failure. *Nat Commun* 2018; **9**: 4435
- 3) Qiu X, Mao Q, Tang Y et al: Reversed graph embedding resolves complex single-cell trajectories. *Nat Methods*. 2017; **14**: 979-982
- 4) Ko T, Fujita K, Nomura S et al: Quantification of DNA damage in heart tissue as a novel prediction tool for therapeutic prognosis of patients with dilated cardiomyopathy. *JACC Basic Transl Sci*. 2019; **4**: 670-680
- 5) Cao J, Spielmann M, Qiu X et al: The single-cell transcriptional landscape of mammalian organogenesis. *Nature* 2019; **566**: 496-502
- 6) La Manno G, Soldatov R, Zeisel A et al: RNA velocity of single cells. *Nature* 2018; **560**: 494-498
- 7) Pei W, Shang F, Wang X et al: Resolving Fates and Single-Cell Transcriptomes of Hematopoietic Stem Cell Clones by PolyloxExpress Barcoding. *Cell Stem Cell* 2020; **27**: 383-395
- 8) Chan MM, Smith ZD, Grosswendt S et al: Molecular recording of mammalian embryogenesis. *Nature* 2019; **570**: 77-82
- 9) Chow KK, Budde MW, Granados AA et al: Imaging cell lineage with a synthetic digital recording system. *Science* 2021; **372**: eabb3099
- 10) Ramilowski JA, Goldberg T, Harshbarger J et al: A draft network of ligand-receptor-mediated multicellular signalling in human. *Nat Commun* 2015; **6**: 7866
- 11) Efremova M, Vento-Tormo M, Teichmann SA et al: CellPhoneDB: inferring cell-cell communication from combined expression of multi-subunit ligand-receptor complexes. *Nat Protoc* 2020; **15**: 1484-1506
- 12) Satoh M, Nomura S, Harada M et al: High-throughput single-molecule RNA imaging analysis reveals heterogeneous responses of cardiomyocytes to hemodynamic overload. *J Mol Cell Cardiol* 2019; **128**: 77-89
- 13) Hashikawa Y, Hashikawa K, Rossi MA et al: Transcriptional and Spatial Resolution of Cell Types in the Mammalian Habenula. *Neuron* 2020; **106**: 743-758. e5
- 14) Eng CL, Lawson M, Zhu Q et al: Transcriptome-scale super-resolved imaging in tissues by RNA seq-FISH. *Nature* 2019; **568**: 235-239
- 15) Rodriques SG, Stickels RR, Goeva A et al: Slide-seq: A scalable technology for measuring genome-wide expression at high spatial resolution. *Science* 2019; **363**: 1463-1467
- 16) Dixit A, Parnas O, Li B et al: Perturb-seq: dissecting molecular circuits with scalable single-cell RNA profiling of pooled genetic screens. *Cell* 2016; **167**: 1853-1866. e17
- 17) Jaitin DA, Weiner A, Yofe I et al: Dissecting immune circuits by linking CRISPR-pooled screens with single-cell RNA-seq. *Cell* 2016; **167**: 1883-1896. e15
- 18) Xie S, Duan J, Li B et al: Multiplexed engineering and analysis of combinatorial enhancer activity in single cells. *Mol Cell* 2017; **66**: 285-299. e5
- 19) Datlinger P, Rendeiro AF, Schmidl C et al: Pooled CRISPR screening with single-cell transcriptome readout. *Nat Methods* 2017; **14**: 297-301
- 20) Rubin AJ, Parker KR, Satpathy AT et al: Coupled single-cell CRISPR screening and epigenomic profiling reveals causal gene regulatory networks. *Cell* 2019; **176**: 361-376. e17
- 21) Mimitou EP, Cheng A, Montalbano A et al: Multiplexed detection of proteins, transcriptomes, clonotypes and CRISPR perturbations in single cells. *Nat Methods* 2019; **16**: 409-412
- 22) Luginbuhl J, Kouno T, Nakano R et al: Decoding Neuronal Diversification by Multiplexed Single-cell RNA-Seq. *Stem Cell Reports* 2021; **16**: 810-824
- 23) Frangieh CJ, Melms JC, Thakore PI et al: Multimodal pooled Perturb-CITE-seq screens in patient models define mechanisms of cancer immune evasion. *Nat Genet* 2021; **53**: 332-341

- 24) Schraivogel D, Gschwind AR, Milbank JH et al: Targeted Perturb-seq enables genome-scale genetic screens in single cells. Nat Methods 2020; **17**: 629-635
- 25) Hanna RE, Hegde M, Fagre CR et al: Massively parallel assessment of human variants with base editor screens. Cell 2021; **184**: 1064-1080. e20
- 26) Cuella-Martin R, Hayward SB, Fan X et al: Functional interrogation of DNA damage response variants with base editing screens. Cell 2021; **184**: 1081-1097. e19

*

*

*