

【要約】

High-throughput single-RNA molecule imaging analysis reveals spatial
information of heterogeneous cardiomyocytes expressing *Myh7* RNA
in heart failure

(心筋細胞の胎児型遺伝子発現のばらつきと心不全進展の関連性の検討)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：小林欣夫教授)

佐藤 真洋

【目的】

心不全は死亡原因の主要な疾患の一つで、日本では 30 万人弱の患者がいてと推定される。心移植や補助人工心臓など新たな治療が提供されているが、最近 10 年間で患者数は増加傾向であり有効な治療法はまだ存在していない。心不全の進展過程において心臓収縮能が低下する原因は心臓収縮に重要である心筋細胞の機能低下と考えられている。

心筋細胞の機能低下は、主にミオフィラメント、カルシウムハンドリングの異常である。ミオフィラメントは Myosin heavy chain 6 (MYH6), Myosin heavy chain 7 (MYH7) の 2 つの isoform がある。ATPase 活性の低い胎児型ミオシン (MYH7) は胎児期に多く、成人期になると MYH7 は低下し、ATPase 活性の高い MYH6 が増加する。心不全進展過程において MYH7 が活性化することが知られている。これまで、この心不全に伴う胎児型遺伝子の再活性化は、心臓組織全体に一様に現れるものと考えられていた。近年、老化に伴い個々の心筋細胞の遺伝子発現にばらつきが生じ、これが老化の進展に関与することが報告された。

心不全進展過程においては心不全関連遺伝子発現のばらつきに関する報告はこれまでなく、組織内の局在を示した報告もない。本研究は心不全のストレス応答により発現する Myh7 遺伝子を指標に、心臓組織内での発現のばらつき、心臓組織切片内の局在を 1 細胞レベルで可視化、定量化することを目的とした。

【方法】

野生型 C57BL/6 マウスに横行大動脈縮窄術 (Transverse Aortic Constriction: TAC) を施行し圧負荷を加えることにより心肥大・心不全モデルマウスを作成した。偽手術マウス (Sham マウス)、心肥大マウス (Left ventricular hypertrophy マウス: LVH マウス)、心不全マウス (Heart failure マウス: HF マウス) からそれぞれ心臓を摘出し、ランゲンドルフ還流装置を用いて心筋細胞の単離を行った。心筋細胞 1 細胞から、Smart-seq2 法を用いて cDNA 合成を行い single cell qPCR で Myh7 RNA の発現を検討した。

single cell qPCR の結果を再検証するため心臓組織切片を作成し MYH7 免疫染色を行った。さらに 1 分子 Myh7 RNA FISH (single molecule RNA *in situ* hybridization; smFISH) を行い、ハイスループット自動画像解析装置を組み合わせた心筋細胞 1 細胞レベル心臓組織定量解析を行った。

【結果】

single cell qPCR では、sham マウスと比較し LVH マウス、HF マウスでは Myh7 発現心筋細胞は増加していた。また HF マウス心筋細胞において、Myh7 発現が低値の心筋細胞も存在し発現にばらつきが存在していた。同細胞が心臓内でばらつきをもって発現していることを異なる手法で検討するため MYH7 免疫染色を行った。HF マウスでは心臓組織切片内に占める MYH7 陽性心臓組織内の心筋細胞は、0.1%程度であった。HF マウスの single cell qPCR では、80%程度が Myh7 発現心筋細胞と考えられたため、single cell qPCR の結果と免疫染色の結果に解離が存在していた。

そこで免疫染色と比較し、高感度である Myh7 smFISH を行った。心筋細胞 1 細胞レベルで定量するため、ハイスループット自動画像解析装置を組み合わせバイアスなく、単位面積あたりの Myh7 RNA 分子を測定した。各マウスから 1000 細胞程度の心筋細胞を解析し、Myh7 発現心筋細胞を評価した。

sham マウスと比較し、LVH マウス、HF マウスは単位面積当たりの Myh7 分子数は増加し、sham マウス、LVH マウスと比較し HF マウスでは Myh7 発現において個々の心筋細胞にばらつきがあった。

また、Myh7 発現心筋細胞の空間的情報を検討するため、心筋壁を内膜、中膜、外膜の 3 層に分類した。sham マウス、HF マウスでは 3 層間で Myh7 発現心筋細胞の分布に違いはなかったが、LVH マウスでは内膜、外膜に比べ中膜において Myh7 高発現心筋細胞を認め空間的なばらつきも存在する事を認めた。

【考察】

心不全のストレス応答により発現する Myh7 遺伝子を指標に 1 細胞レベルで解析を行った。single cell qPCR, smFISH と異なる 2 つの手法で、Myh7 発現心筋細胞の検討したところ、心不全進展過程で増加し、ばらつきがあることを確認した。

さらに発現のばらつきは、個々の心筋細胞においてだけでなく、心筋の層にも存在し空間的なばらつきがあることも確認した。

以上よりストレス応答は個々の心筋細胞において一様ではなく、ばらつきがあることが示唆された。

心筋は 3 層構造であることが知られており、中膜には心臓収縮拡張に重要な役割を担う輪状筋が存在している。

LVH マウスで中膜に Myh7 発現心筋細胞を多く認めたのは、心肥大から心不全に切り替わる過程で心収縮に寄与する中層が左室内腔の圧にあがなうように収縮したためと考えられた。その結果ストレスが強くなり、Myh7 発現心筋

細胞が高発現であったと考えられる。

【結論】

心筋細胞 1 細胞レベル、Myh7RNA1 分子レベルで心不全進展過程における遺伝子発現を評価した。心筋細胞 single cell qPCR とハイスループットな心臓組織切片定量解析により、心不全進展過程において Myh7 遺伝子が増加し、ばらつきをもって個々の心筋細胞に発現していることが示された。

さらに空間的解析により、心筋の層においても Myh7 発現心筋細胞はばらつきが存在していることが示唆された。