

シングルセルマルチオミクス及び細胞形態評価の統合解析に基づく 難治性肥大型心筋症病態解明

肥大型心筋症 (Hypertrophic cardiomyopathy: HCM) は心筋肥大と拡張障害を特徴とする遺伝性心筋症であり、その中でも拡張相肥大型心筋症 (dHCM) および閉塞性肥大型心筋症 (HOCM) は予後不良で治療抵抗性を示す。本研究では、シングルセルマルチオミクス解析を活用することで、これら難治性 HCM の病態機序解明と新規治療標的および予後層別化法の確立を目的とした。家族性 dHCM および HOCM 患者から同定された *MYBPC3* および *MYH7* 変異を再現したノックインマウスをそれぞれ作製し、生理学的・組織学的解析ならびに Plate-based single-cell RNA-seq を実施した。dHCM モデルでは、拡張相移行期において心筋肥大関連遺伝子の活性化と同時に、p53 を中心とした DNA 損傷応答およびアポトーシス関連遺伝子群の顕著な活性化を認め、転写因子 TF-M がその制御因子として同定された。TF-M の抑制は拡張相への移行を抑制し、治療標的としての有用性が示唆された。また、dHCM モデルマウスを用いることで、マバカムテン投与により長期的な心機能低下の抑制効果も確認された。HOCM モデルでは、特異的心筋細胞クラスターを同定し、Myc および TGF- β シグナル活性化を特徴とする肥大・代謝亢進プログラムが明らかとなった。

さらに本研究では、ヒト心筋検体を用いた解析を通じて、DNA 損傷応答の程度が心不全治療反応性および長期予後を予測する独立したバイオマーカーであることを明らかにした。心筋生検標本における DNA 損傷マーカーの定量評価は、HCM も含め、基礎疾患を問わず心不全全般において有用であり、従来のゲノム変異情報とは独立した予後予測能を有していた。加えて、細胞核形態情報と DNA 損傷指標を統合した機械学習アルゴリズムを開発し、自動的かつ高精度な予後層別化を可能とした。また、HCM 患者の全エクソーム解析から、既知の HCM 関連遺伝子変異に加えて非 HCM 関連心筋症遺伝子変異を併存する症例では予後が不良であることを示した。さらに、既存の Mayo HCM Genotype Predictor Score に心電図情報を統合することで、遺伝子変異保有予測精度を向上させた。

以上、本研究では難治性 HCM における病態進展機序の理解を深めるとともに、遺伝子治療・薬物治療および予後予測への新たな基盤を提供する成果を得ることに成功した。

※ 候 聡志 ※ Bo Zhang ※ 蛭間 貴司 ※※ 神馬 崇宏 ※ 戴 哲皓 ※※ 辻 敦美

緒 言

肥大型心筋症 (HCM) は原発性に心室壁の肥大を来たすことで心室が十分に拡張できない状態を伴う難病であり、その有病率は実際のところ約 500 人に

1人とされており、人種差も強くないとされている。肥大型心筋症は心肥大が生じる部位や経過によっていくつかの病型に分類され、全体的な予後は5年/10年生存率が91%/81%と悪くはないが、その中で拡張相肥大型心筋症 (dHCM) と閉塞性肥大型心筋症 (HOCM) は現時点ではまだ予後が悪く、治療に難渋する病型である。

※東京大学医学部附属病院 循環器内科

※※東京科学大学病院 総合教育研修センター

目的

本研究では拡張相肥大型心筋症及び閉塞性肥大型心筋症の患者家系のゲノム解析で同定した新規ゲノム変異情報を反映した疾患モデルノックインマウス (*Mybpc3* S593Pfs*3 及び *Myh6* Y583H) を作成して解析した他、ゲノム及び患者検体解析を通じて HCM 患者の予後層別化法を確立することを目指した。

方法

<病態解明に関する実験>

HCM 症例に対する全エクソームシーケンシス解析によりゲノム変異を同定し、予後を含めた臨床情報と合わせて解析を行った。その中で特に家族性 dHCM 及び HOCM の症例については CRISPR/Cas9 ゲノム編集によりノックインマウスを作成した。作成したノックインマウスを用いて経時的に心エコーを用いて心機能の評価した他、組織学的解析、シングルセル解析を行い、病態解明を進めた。判明した治療標的に対して *MyoAAV2A* を用いて遺伝子治療や投薬実験による介入を行った。

<予後予測に関する実験>

HCM 症例を含む収縮力が低下した心不全 (HFrEF) 症例の治療導入前に採取された心筋生検検体のパラフィン包埋ブロックを用いて組織標本を作成し、DNA 損傷に関連するマーカータンパク (PAR, γ H2A.X) の蛍光免疫染色評価を行った。Keyence X800 にて蛍光免疫染色画像を撮影し、付随する Analyzer software を用いて染色率の自動計測・定量評価を行った。こうして得られた患者ごとの心筋生検検体中の DNA 損傷マーカー陽性率を臨床情報と統合解析することで、DNA 損傷マーカー染色の予後予測能を評価した。

結果

< dHCM について >

家族性の拡張相肥大型心筋症 (dHCM) 家系のゲノム解析で判明した *MYBPC3* S593Pfs*3 変異を CRISPR/Cas9 ゲノム編集によりマウスで再現し、樹立した *Mybpc3*^{S593Pfs*3/WT} マウスを用いて一連の生理学的・組織学的解析を行った。その結果、*Mybpc3*^{S593Pfs*3/WT} マウスはモデルとなったヒト dHCM 症例と経過が酷似しており、当初は通常 HCM と同様、均一な心室壁肥厚を伴う左室肥大を示すが、経時的に壁の菲薄化及び左室拡大を認めることが分かった。また、組織学的にもヒト dHCM 症例同様、錯綜配列や心筋細胞肥大が確認された。

次に *Mybpc3*^{S593Pfs*3/WT} マウスを肥大型 (7 週齢)・拡張相移行期 (11 週齢)・拡張相不全期 (18 週齢) の 3 段階で心筋細胞単離し、心筋細胞用に新たに確立した Plate-based single-cell RNA-seq (scRNA-seq) を実施した。通常心筋細胞はサイズが大きいため (FACS チューブや流路を通らないことから) scRNA-seq を実施しようと思うと一つ一つ手でピックアップするしかないが、今回確立したやり方では一度に大量の scRNA-seq が可能となり、一核 RNA-seq と違って細胞の解析であるため、読み取れる遺伝子数も多く、後に述べる転写因子予測が可能となった。解析の結果、特に拡張相移行期の心筋細胞の変化が (通常的心不全モデルや他の心筋症モデルと違って) 一番特徴的であり、この時期では細胞肥大関連の遺伝子発現が活性化している一方で、p53 関連や DNA 損傷関連、アポトーシス関連といった心筋細胞にとって有害と考えられる遺伝子群も活性化していることが分かった (図 1)。

特に p53 の活性化は我々の過去の研究から心筋細胞

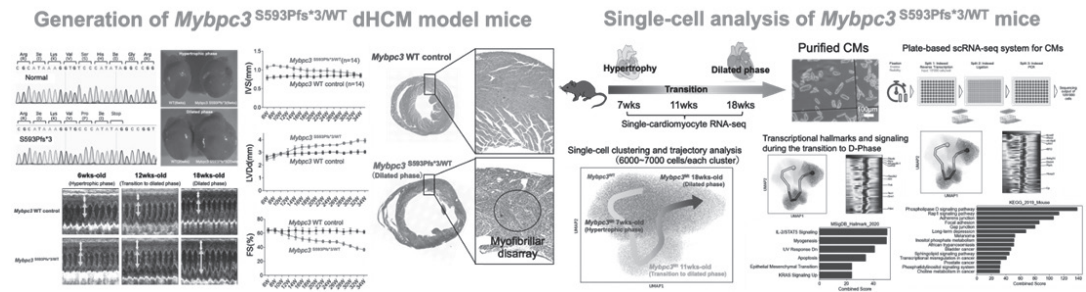


図 1

にとって有害であることが分かっており、こうした遺伝子群の活性化が長期的には心筋細胞の脱落や不全化につながるものと予想された。転写因子予測 (SCENIC) ではこうした遺伝子群を制御する共通の転写因子 *TF-M* が同定され、そのノックダウンベクター (shTF-M を心筋細胞に感染効率が低い MyoAAV2A に搭載) を作成することに成功した。MyoAAV2A-sh*TF-M* を投与した *Mybpc3*^{S593Pfs*3/WT} マウスはコントロールと比較して拡張相への移行が抑制され、逆に *TF-M* を過剰発現させると今度は早期より心機能が低下することが分かった。現在 *TF-M* 過剰発現心筋細胞の RNA-seq を行っており、この新規治療標的候補の詳細な機能について一層詳しく調べていく予定である。

加えて拡張相移行期において細胞肥大関連の遺伝子発現が活性化していることに着目して、細胞肥大を抑えることができれば将来的な心機能低下を抑制できるのではと考えた。現在 HOCM について適応を有しているマバカムテンを *Mybpc3*^{S593Pfs*3/WT} マウスに投与したところ、一過性の心機能低下は見られるものの、長期的に見ればその後の拡張相移行を抑えられることが分かった。

最後に HCM 患者の予後予測についてもいくつか重要な知見を得た。ヒト患者の心筋細胞を用いたシングルセル解析では重症例ほど DNA 損傷応答遺伝子の発現が高いことが分かったので、その点に着目して各種肥大型心筋症も含めた収縮力が低下した心不全全般の治療予後予測の研究を行った。心筋生検組織検体を用いた DNA 損傷マーカーの染色定量評価を行ったところ、治療反応性や疾患予後を予測する上で有用であり、かつ従来の予後予測因子であるゲノム変異情報とは独立した予後予測因子であることが分かった^{1,2)}。また、九州工業大学の生命化学情報工学研究系濱野先生と共同研究を行い、深層学習を含む最新の医療画像解析アルゴリズムを活用することで、機械学習による自動判別アルゴリズムの開発に成功した³⁾。

HCM はガイドラインにも掲載されているようにゲノム変異の確認が予後を推定する上で大事である。HCM 症例の全エクソームシーケンシスによるゲノム解析を通して、これまで既知の HCM 関連遺伝子変異以外の心筋症関連遺伝子変異が併存している症例では、単に HCM 関連遺伝子変異しかない症例に比べて、予後が悪いことを明らかにした⁴⁾。さらにこれまで臨

床情報とエコー指標を基に HCM のゲノム変異の保有を予測するスコアとして The Mayo HCM Genotype Predictor Score (Mayo score) が確立されていたが、そこにさらに ECG 情報を加えて改良することで (Mayo-ECG score を作成)、より精度の高いゲノム変異保有予測ができることを示した⁵⁾。

< HOCM について >

家族性 HOCM 家系のゲノム解析で判明した *MYH7* Y582H 変異を CRISPR/Cas9 ゲノム編集によりマウスで再現し、樹立した *Myh6*^{Y583H/WT} マウス (ヒト MYH7 にマウスにおける相同タンパクは *Myh6*) を用いて一連の生理学的・組織学的解析を行った。*Myh6*^{Y583H/WT} マウスはヒト HOCM 患者同様、心基部を中心とした不均一な壁肥厚を示した他、心室圧容積関係 (PV loop) 測定を行ったところ、HCM の疾患マウスモデルとしては初めて大動脈-左室内圧格差や左室の拡張障害を証明することに成功した。*Myh6*^{Y583H/WT} マウスの心筋細胞についても今回新たに確立した Plate-based scRNA-seq を実施した。野生型マウス及び *Myh6*^{Y583H/WT} マウスの心筋細胞の scRNA-seq をクラスタリング解析した結果、*Myh6*^{Y583H/WT} マウスでのみ見られる心筋細胞クラスターを同定することができた。この HOCM 心筋特異的クラスターの遺伝子ネットワーク解析・発現変動遺伝子解析を行ったところ、細胞の肥大や増殖に関連する *Myc*, *TGF-β* といったシグナル伝達経路が特徴的に上昇していることが分かり、同時に心筋細胞内の酸化的リン酸化やタンパク合成といった代謝の活性化を示唆する遺伝子発現変化も認められた (図 2)。

今回の解析からはこうした *Myc* や *TGF-β* シグナルの抑制が HOCM における左室流出路狭窄を来す肥大の治療に有効であることが示唆されるが、何れのシグナルについてもあまりに全身性に重要なので治療介入がしづらいという欠点がある。そのため、dHCM モデルマウス同様、さらに HOCM 心筋クラスターにおける転写因子予測により、より特異性の高いターゲットを絞って遺伝子治療に持ち込む必要がある。

今後はさらに組織を用いた空間的遺伝子発現解析を行い、シングルセル解析で同定された HOCM 特異的心筋細胞クラスターの所在 (恐らく肥大の強い心基部側に集積していると予想される) を明らかにすると共

Generation and analysis of *Myh6*^{Y583H/WT} HOCM model mice

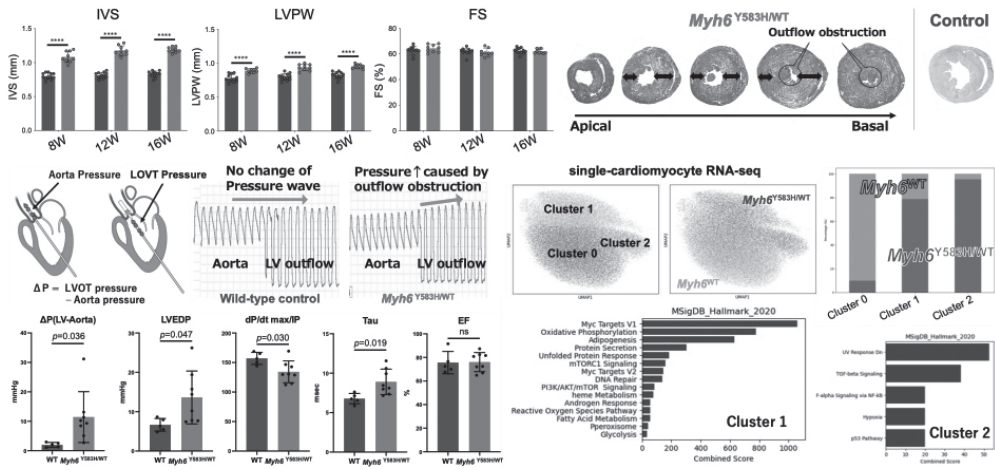


図 2

に、空間的遺伝子発現解析の方が scRNA-seq よりも遺伝子数を多く検出できるため、両者のデータの統合解析でより正確に転写因子予測を行っていく予定である。

また *Myh6*^{Y583H/WT} dHCM モデルマウス同様、本研究により樹立した *Myh6*^{Y583H/WT} マウスは貴重な HOCM のモデルマウスであるため、現在同時に進めているゲノム編集治療のよい実験モデルとして活用していく予定である。具体的には本変異は優性阻害的に働くことに着目し、変異アリル特異的に切断・不活化するゲノム編集を導入することでマウス表現系の改善を期待している。

結論・将来展望

本研究を通して HCM 中の難治病型である dHCM 及び HOCM に関する疾患モデルマウスを樹立して病態解明を行った他、心筋生検検体を含む様々な臨床データを活用して予後予測研究も進めることができた。

dHCM については一連の解析の結果、TF-M が新規治療標的と判明したため、今後これの詳細な分子機序を明らかにしていく予定である。また、マバカムテンを用いた非閉塞性 HCM (Non-HOCM) 症例に対する臨床試験は今まで有効性を示す結果は残していないものの、本研究により樹立したモデルマウスの経時的に心機能が悪化していくという特徴を用いて、人間では

長期の観察期間が必要のためフォローしきれない長期的な心保護効果を実証することに成功した。こちらの知見については、今後のヒトへの応用のためにも早期に論文化していきたい。

HOCM については空間遺伝子発現解析を行うことで、シングルセル解析で同定した HOCM 特異的心筋細胞クラスターの空間位置情報投影を行い、もし予想通り左室流出路付近の閉塞部であれば、dHCM の解析の時にも用いた転写因子予測 (SCENIC) ないしは部位別のエピゲノム解析 (H3K27ac, H3K4me3) 情報も加えた SCENIC+ で解析を行い、閉塞部の心筋肥大を制御している転写因子を同定する。これにより、HOCM においても dHCM における TF-M 同様、遺伝子治療の検証が可能になると考えられる。

HCM の薬物治療応答性及び予後予測については本研究を通して心筋生検検体を用いた DNA 損傷程度評価の多施設研究を行ってその有用性を報告したが、後向き臨床試験であったため、今後は前向き臨床試験を行いたい。また、心筋生検自体は本法と比べて欧米諸国では近年あまり行われな傾向があり、より簡便に予後予測を実現するため、現在多施設共同で末梢血を用いた DNA 損傷応答関連 miR の定量評価の予後予測性を検証している最中である。

最後になりましたが、本研究助成のご支援のおかげで多くの貴重な研究知見を得ることができましたことをこの場をお借りして深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) Dai Z, **Ko T (co-first author)**, et al. Myocardial DNA Damage Predicts Heart Failure Outcome in Various Underlying Diseases. *JACC Heart Fail.* 12(4): 648-661 (2024).
- 2) Dai Z, **Ko T**, et al. Myocardial DNA Damage Is Responsible for the Relationship Between Genotype and Reverse Remodeling in Patients With Dilated Cardiomyopathy. *Circ Heart Fail.* 17(11): e011879 (2024).
- 3) Hayashi H, **Ko T**, et al. TRAITER: transformer-guided diagnosis and prognosis of heart failure using cell nuclear morphology and DNA damage marker. *Bioinformatics.* 40(11): btae610 (2024).
- 4) Hiruma T, Inoue S, Dai Z, Nomura S, Kubo T, Sugiura K, Suzuki A, Kashimura T, Matsushima S, **Ko T**, et al. Association of Multiple non-HCM related Genetic Variants with Outcomes in Patients with Hypertrophic Cardiomyopathy. *JACC Heart Fail.* 12(12): 2041-2052 (2024).
- 5) T. Hiruma, S. Inoue, S. Nomura, T. Kubo, K. Sugiura, Z. Dai, **T. Ko**, et al. Integrating electrocardiogram into the Mayo score enhances genotype prediction in hypertrophic cardiomyopathy. *J Am Heart Assoc. in press* (2025)

ELUCIDATION OF PATHOGENESIS OF INTRACTABLE HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY BY SINGLE-CELL MULTIOMICS ANALYSIS

※ ※ ※ ※ ※ ※※
Toshiyuki KO, Bo ZHANG, Takashi HIRUMA, Takahiro JIMBA, Zhehao DAI, Atsumi TSUJI

※ Department of Cardiovascular Medicine, Graduate School of Medicine, The University of Tokyo
※※ Department of professional development, Institute of Science Tokyo School of Medicine

Hypertrophic cardiomyopathy (HCM) is a common inherited cardiac disease characterized by myocardial hypertrophy and diastolic dysfunction. Among its subtypes, dilated-phase HCM (dHCM) and hypertrophic obstructive cardiomyopathy (HOCM) are associated with poor prognosis and limited therapeutic options. This study aimed not only to elucidate disease mechanisms using patient-derived animal models but also to establish translational biomarkers and prognostic stratification strategies through integrated single-cell multi-omics and cellular phenotyping.

Using knock-in mouse models carrying patient-derived *MYBPC3* and *MYH7* mutations, we identified a critical transitional phase in dHCM marked by simultaneous activation of hypertrophic programs and maladaptive pathways, including p53-mediated DNA damage response and apoptosis. Transcription factor analysis identified TF-M as a central regulator of these processes and a potential therapeutic target. In the HOCM model, we identified a disease-specific cardiomyocyte cluster characterized by enhanced Myc and TGF- β signaling and metabolic activation.

Beyond animal models, analysis of human myocardial biopsy samples revealed that the extent of DNA damage response serves as an independent predictor of treatment response and long-term outcomes across various forms of heart failure, including HCM. Quantitative assessment of DNA damage markers provided prognostic information independent of underlying genetic variants. Furthermore, we developed a machine learning-based algorithm integrating nuclear morphology and DNA damage features, enabling automated and accurate prognostic classification.

Comprehensive whole-exome sequencing of HCM patients demonstrated that the coexistence of non-HCM-related cardiomyopathy gene variants is associated with worse clinical outcomes. In addition, incorporation of electrocardiographic parameters into the Mayo HCM Genotype Predictor Score significantly improved the prediction of pathogenic genotype carriage.

Collectively, this study advances the understanding of HCM pathophysiology and provides a robust framework for targeted therapy, biomarker-driven prognostic stratification, and precision medicine in cardiomyopathy.