

# 高血圧に関する シングルセル解析

竹内史比古、梁一強、加藤規弘

国立国際医療研究センター

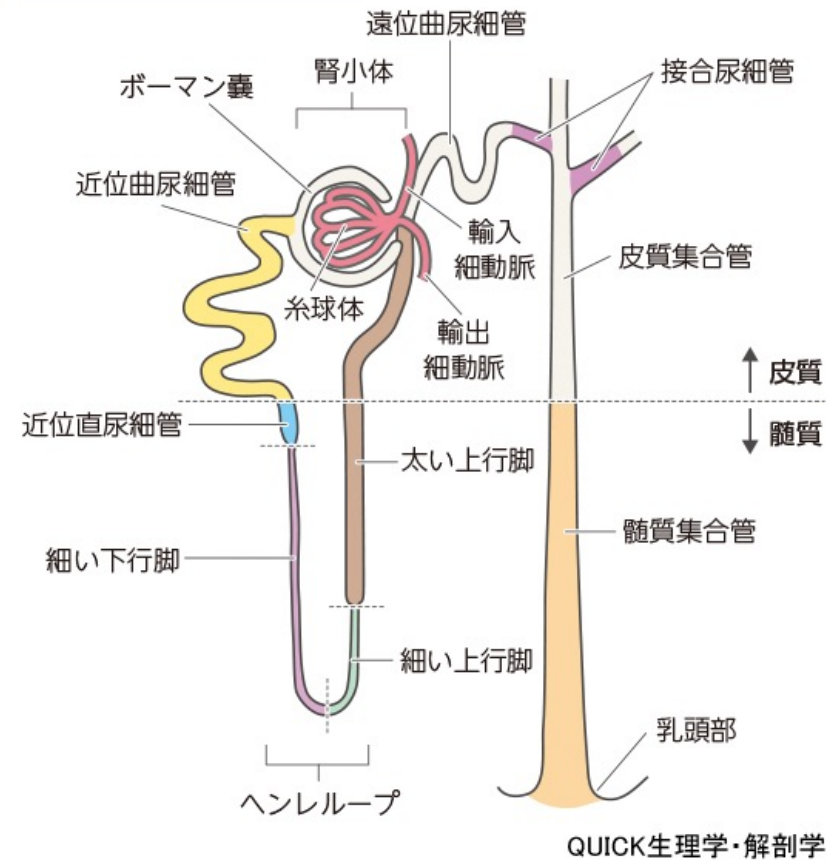
2023年9月16日

第45回日本高血圧学会総会

<https://www.fumihiko.takeuchi.name>

# 腎臓でのシングルセル解析・空間トランスクリプトーム解析の意義

- 腎臓は多様な細胞種からなっている
  - ➔ シングルセル解析により、細胞をほぐし、個々での遺伝子発現を測定
- 腎臓は組織構造が複雑
  - ➔ 空間トランスクリプトーム解析により、組織内の位置ごとに遺伝子発現を測定



## Part 1. シングルセル解析

- 自験例

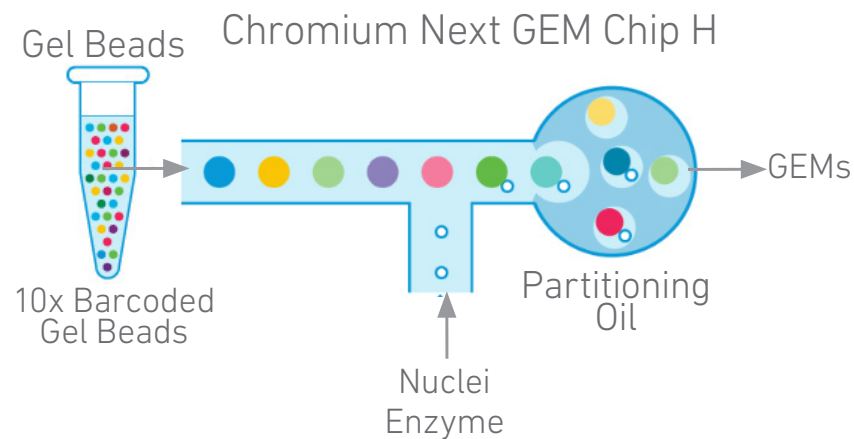
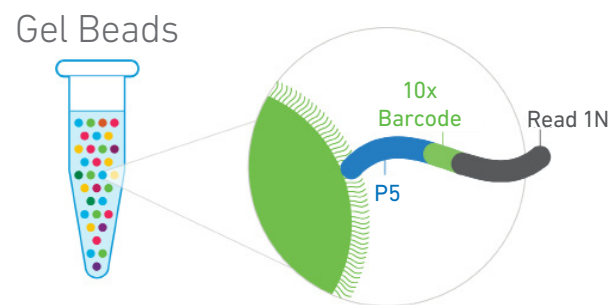
## Part 2. 空間トランスクリプトーム解析

- 自験例

## Part 3. 食塩負荷による腎障害モデル

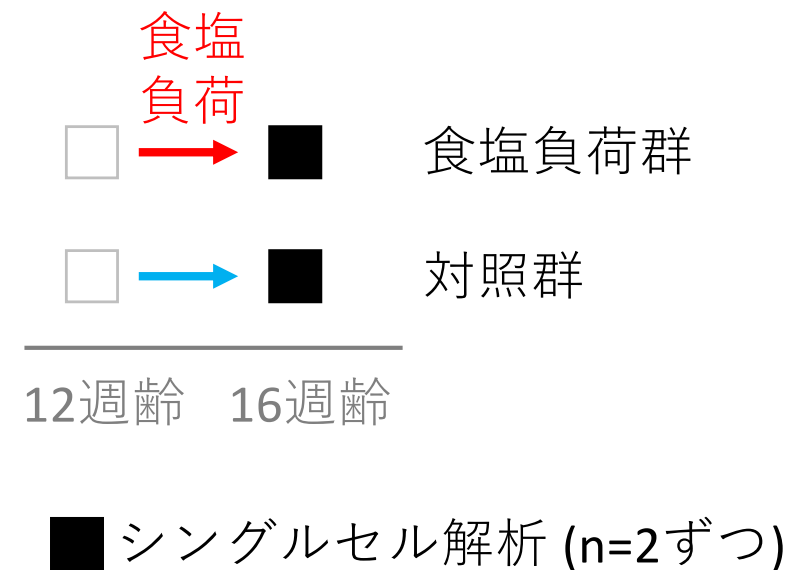
# Single-cellおよびsingle-nucleus解析

- 細胞あるいは核を個々にアッセイする
  - 例、油の中の水滴
  - 本研究では、各検体 ~4000 核
- キット化されているアッセイ
  - RNA-seq
  - ATAC-seq



# [方法] 食塩負荷による腎障害モデル

- 雄の自然発症高血圧ラット (SHR/Izm)
- 食塩負荷
  - 飲水中に1% NaCl
  - 12週齢から4週間
- 腎臓のシングルセル解析
  - Chromium [10x Genomics] で single-nucleus RNA-seq & ATAC-seq
- 細胞種のアノテーション
  - mRNA発現 & クロマチンの開きの類似度
    - 20クラスターに分解
  - マーカー遺伝子の発現
    - 14細胞種を同定



# シングルセル解析における細胞種のアノテーション

- シングルセル解析により、似たもの同士が集まった細胞集団が得られる。
- その集団の細胞種を割り当てる（アノテーション）方法は？
  1. 細胞種特有のタンパク質が分かっている場合  
→ その遺伝子が発現しているか？
  2. 組織内での位置情報を利用する
    - マイクロダイセクション
    - 空間トランスクリプトーム  
→ 特定位置での遺伝子発現と合致するか？

# 腎臓の細胞種マーカー遺伝子

<p><b>Vasculature</b></p> <p><b>Endothelium:</b> <i>Nrp1, Cdh5, Eln</i></p> <p><b>Glomerular endothelium:</b> <i>Plat, Emcn, Tsapn7, Mapt, Kdr, Smad6, Ehd3, Lpl, Flt1, Fbln2, Mgp, Trpv4, Bmx</i></p> <p><b>Capillaries:</b> <i>Kdr, Smad6, Ehd3, Lpl, Flt1</i></p> <p><b>Arterioles and arteries:</b> <i>Fbln2, Mgp, Trpv4, Bmx, Sox17, Cxcl12, Gja5</i></p> <p><b>Vas afferens:</b> <i>Edn1, Fbln5, Cldn5, Efnb2</i></p> <p><b>Vas efferens:</b> <i>Klf4, Cryab, Gas6, Podxl</i></p> <p><b>Peritubular capillaries:</b> <i>Plvap</i></p> <p><b>Veins and venules:</b> <i>Plvap, Bgn, Cd9, Nr2f2</i></p> <p><b>Ascending vasa recta:</b> <i>Fxyd2, Fxyd6, Igfbp7</i></p> <p><b>Descending vasa recta:</b> <i>Slc14a1, Aqp1, S100a4</i></p>		<p><b>Mesangium/smooth muscle cells (SMCs)/juxtaglomerular cells (JGs)</b></p> <p><b>Mesangial cells:</b> <i>Serpine2, Fhl2, Klf4, Cryab, Gas6, Podxl, Des, Prkca, Art3, Nt5e, Pdgrfb</i></p> <p><b>Pericytes:</b> <i>Vim, Tagln, Myh11, Pdgrfb</i></p> <p><b>SMCs:</b> <i>Tagln, Myh11, Acta2, Gata3, Rergl, Map3k7cl</i></p> <p><b>JGs:</b> <i>Ren1, Akr1b7, Rgs5</i></p>		<p><b>Podocytes</b></p> <p><b>Adult podocytes:</b> <i>Nphs1, Nphs2, Synpo, Cdkn1c, Wt1</i></p> <p><b>Podocyte progenitors:</b> <i>Wt1, Foxc2, Wt1, Maib, Efnb2, Foxl1</i></p>	
<p><b>Proximal tubule (PT)</b></p> <p><b>Pan-PT:</b> <i>Slc34a1, Lrp2, Hxyd2, Hrsp12, Acsm1, Acsm2, Cpt1a, Acox3, Slc26a6, Slc9a3, Glud1, Pck1, Aqp8, Hnf4a, Ppara</i></p> <p><b>Proximal convoluted tubule:</b> <i>Slc5a2, Slc5a12, Adra1a, Slc6a19, Slc7a8, Slc7a9</i></p> <p><b>Proximal straight tubule:</b> <i>Atp11a, Slc13a3, Slc16a9, Slc27a2, Slc7a13, Slc22a6 (S2 segment), Slc1a1</i></p> <p><b>PT progenitors:</b> <i>Notch2, Lgr4</i></p> <p><b>Injured PT:</b> <i>Havcr1, Krt20, Hspa1a, Vcam1, Dcdc2a, Sema5a</i></p>		<p><b>Loop of Henle (LOH)/macula densa (MD)</b></p> <p><b>Descending thin limb of LOH:</b> <i>Fst, Aqp1, Slc14a2, Bst1, Epha7, Cryab, Tshz2, Cald1, Bst1, Lypd2</i></p> <p><b>Ascending thin limb of LOH:</b> <i>Epha7, Mx2, Clcnka</i></p> <p><b>Thick ascending limb of LOH:</b> <i>Slc12a1, Umod, Tmem207, Foxq1, Cldn10, Ptger3, Kcnj1, Enox1, Thsd4, M2, Slc5a3</i></p> <p><b>MD:</b> <i>Enox1, Thsd4, Nos1, Avpr1a</i></p>			
<p><b>Distal convoluted tubule (DCT)/connecting tubule (CNT)</b></p> <p><b>DCT1:</b> <i>Pvalb, Slc12a3, Trpm7, Wnk1, Wnk4, Stk39, Calb1, Slc8a1, Egf, Trpm6, Cnmm2, Atp1a1, Atp1a2, Atp1a3, Atp1a4, Fxyd2</i></p> <p><b>DCT2:</b> <i>Slc12a3, Trpm7, Wnk1, Wnk4, Klhl3, Stk39, Calb1, Slc8a1, Egf, Trpm6, Cnmm2, Atp1a1, Atp1a2, Atp1a3, Atp1a4, Klk1, Trpv5, Trpm6, S100g, Atp2b1, Atp2b4, Scnn1b, Scnn1g, Kcne1, Fxyd2</i></p> <p><b>CNT:</b> <i>Calb1, Slc8a1, Egf, Klk1, Trpv5, Trpm6, S100g, Atp2b1, Scnn1b, Scnn1g, Kcne1</i></p>		<p><b>Collecting duct (CD)</b></p> <p><b>CD-principal cells:</b> <i>Scnn1b, Scnn1g, Aqp2, Avpr2, Hsd11b2, Rhbq, Elf5, Fxyd4, Aqp3, Apela, Kcne1, Npnt, Kcnj10</i></p> <p><b>Pan-CD-intercalated cells:</b> <i>Tcfcp2l1, Foxi, Atp6v1g3, Atp6v0d2, Insr, Atp6v1b1</i></p> <p><b>CD-intercalated cells (type A):</b> <i>Atp4a, Slc4a1, Aqp6, Kit, Adgrf5, Mme</i></p> <p><b>CD-intercalated cells (type B):</b> <i>Slc26a4, Hmx2, Spink8</i></p> <p><b>CD-transitional cells:</b> <i>Aqp2, Hsd11b2, Rhbq, Atp6v1g3, Atp6v0d2, Insr, Atp6v1b1, Atp6v1b1, Pam1, Sec23b</i></p>			
<p><b>Immune cells</b></p> <p><b>Macrophages:</b> <i>C1qa, C1qb, Itgam, Apoe, C1qc, Cd74, Ctss, Fcer1g, Aif1, Ms4a7</i></p> <p><b>Neutrophils:</b> <i>S100a8, S100a9, Lyz2, Plac8, Ifitm3, Cebspb, Tyrobp, Lst1, Fcer1g, Hp</i></p> <p><b>Basophils:</b> <i>Ifitm1, Hdc, Mempt8, Fcer1a, Csrp3, Ms4a2, Cyp11a1, Cd200r3, Il6, Il4</i></p> <p><b>Dendritic cells 11b*:</b> <i>Ca74, Cd209a, Wfdc17, Mgl2, Ccl6, Ccl9, Ctss, Aloxsap, Ifitm3, Tyrobp</i></p> <p><b>Dendritic cells 11b*:</b> <i>Ifi8, Naaa, Plbd1, Cbfa2t3, Basp1, Rnase6, Wdfy3, Sept3, Ppm1m, Rab7b</i></p> <p><b>Plasmacytoid dendritic cells:</b> <i>Ly6d, Siglech, Cox6a2, Rnase6, Sell, Ccr9, Runx2, Cd209d, Bcl11a, Lair1</i></p> <p><b>B cells:</b> <i>Cd79a, Cd79b, Ms4a1, Ly6d, Ebf1, Cd22, Cd19, Fcmm, Siglecg, Fcrl1</i></p> <p><b>T cells:</b> <i>Cxcr6, Cd247, Nkg7</i></p> <p><b>CD4 T cells:</b> <i>Lef1, Ms4a4b, Il7r, Ccr7, Klf2, Tcf7, Dapl1, Satb1, Cd3d</i></p> <p><b>CD8 effector T cells:</b> <i>Ccl5, Nkg7, Cd8b1, Ms4a4b, Cd8a, Cd3d, Hcst, Cd3g, Lck</i></p> <p><b>T regulatory cells:</b> <i>Tnfrsf4, Ccap, Ilzf2, Izumo1r, Ifi27l2a, S100a4, Rgs1, Cd3g, Ltb, Tnfrsf18</i></p> <p><b>NK T cells:</b> <i>Ly6c2, Cxcr6, Gimap3, Tmsb10, Cd3g, Gimap4, Ctsw, Nkg7, Hcst, Ltb</i></p> <p><b>NK cells:</b> <i>Gzma, Nkg7, Cd7, Ccl5, Xcl1, Klrd1, Klrk1, Ncr1, Klre1, Il2rb</i></p>					

## Balzer, Rohacs, Susztak (2022) Annual Review of Physiology

<https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-052521-121841>

Part 1. シングルセル解析

- 自験例

Part 2. 空間トランスクリプトーム解析

- 自験例

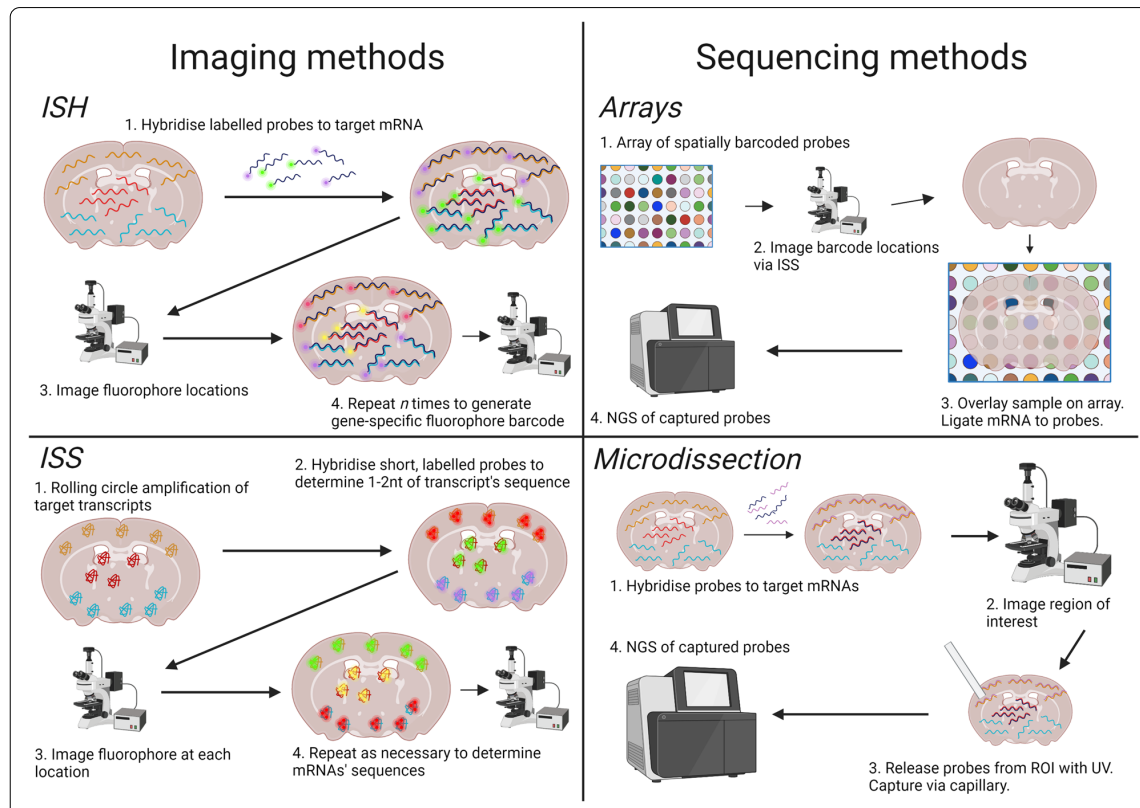
Part 3. 食塩負荷による腎障害モデル



# 空間トランスクリプトーム解析

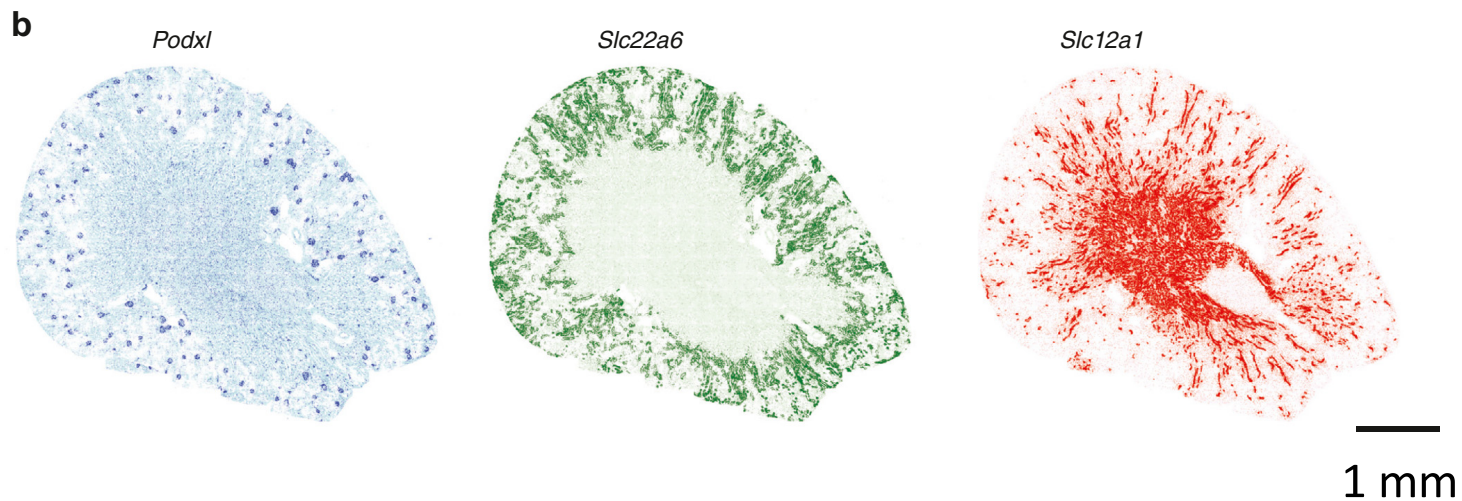
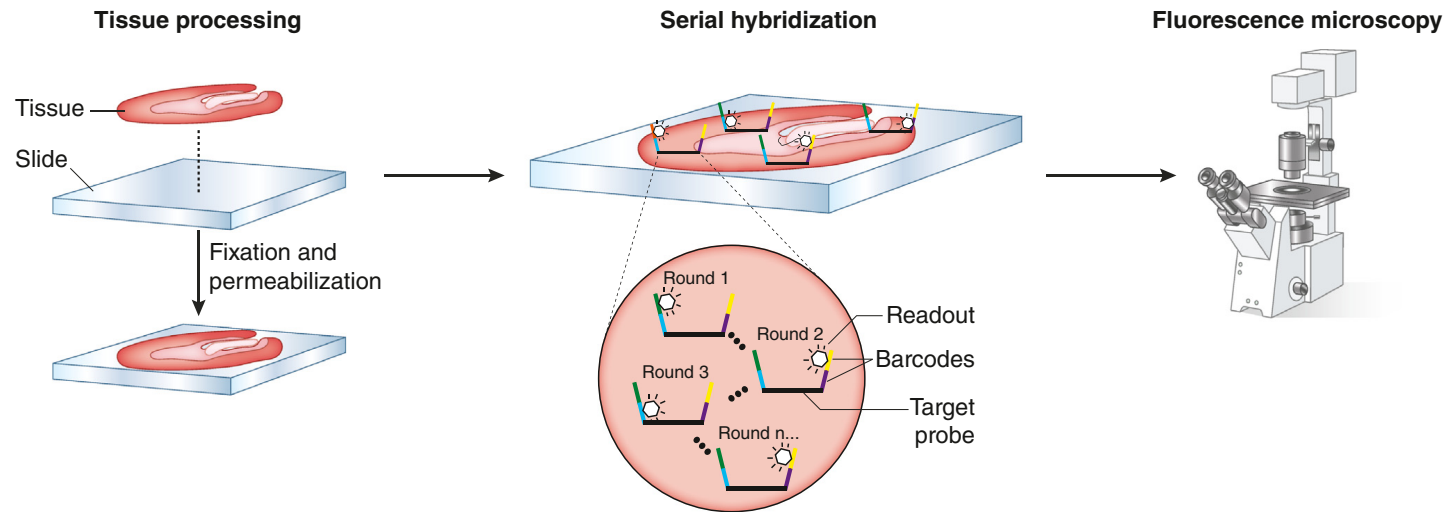
- 顕微鏡で測定
  - 位置が正確
  - 遺伝子数が限られる
    - ~1000
    - ヒト・マウスのみ
- スポットをNGS
  - 位置解像度に制限
    - 100  $\mu\text{m}$  Visium
    - ~25  $\mu\text{m}$  Stereo-seq
  - 遺伝子数限度無し
- いずれにせよ細胞ごとには分けられない
- シングルセル解析と補完的

in situ hybridization  
のmultiplex



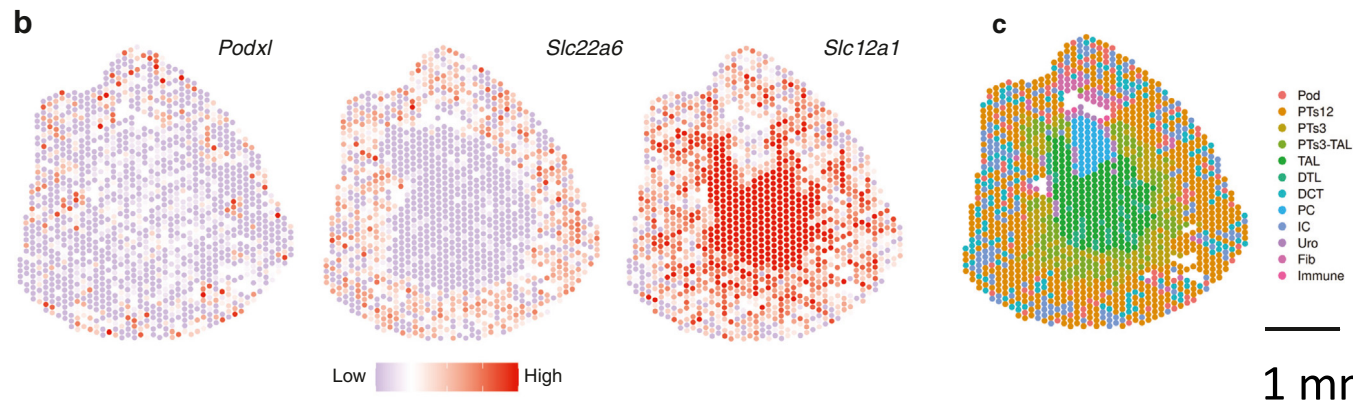
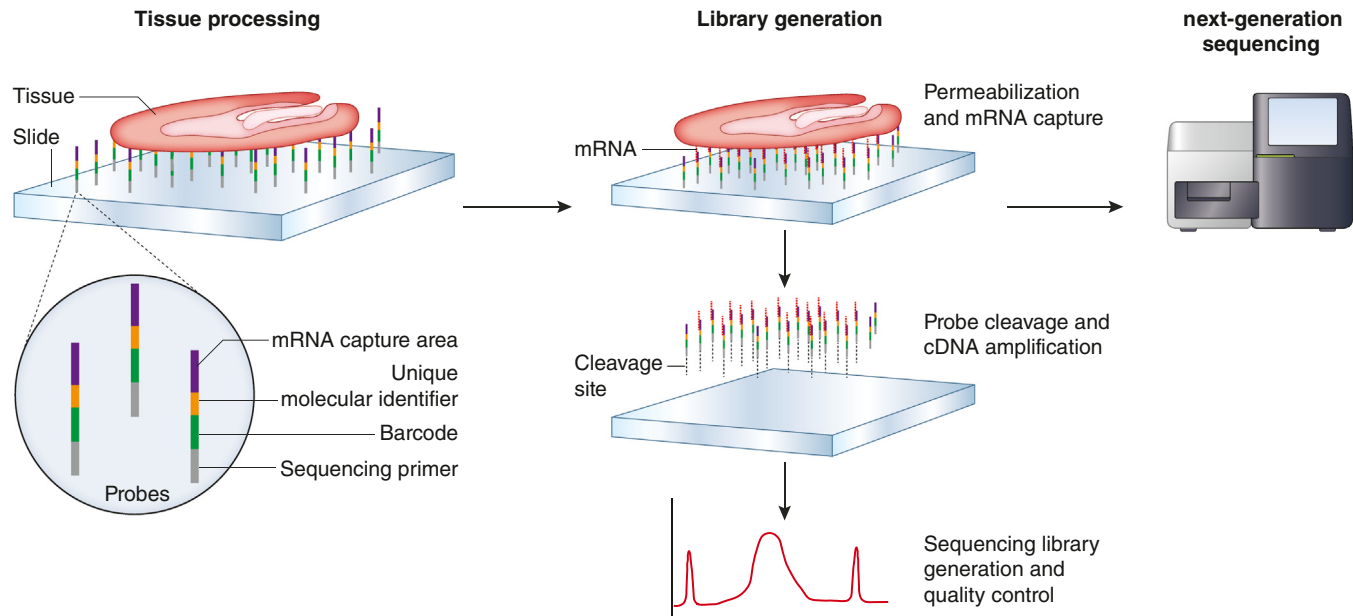
<https://doi.org/10.1186/s13073-022-01075-1>

# 空間トランスクリプトーム解析： 顕微鏡で測定



# 空間トランスクリプトーム解析： スポットをNGS

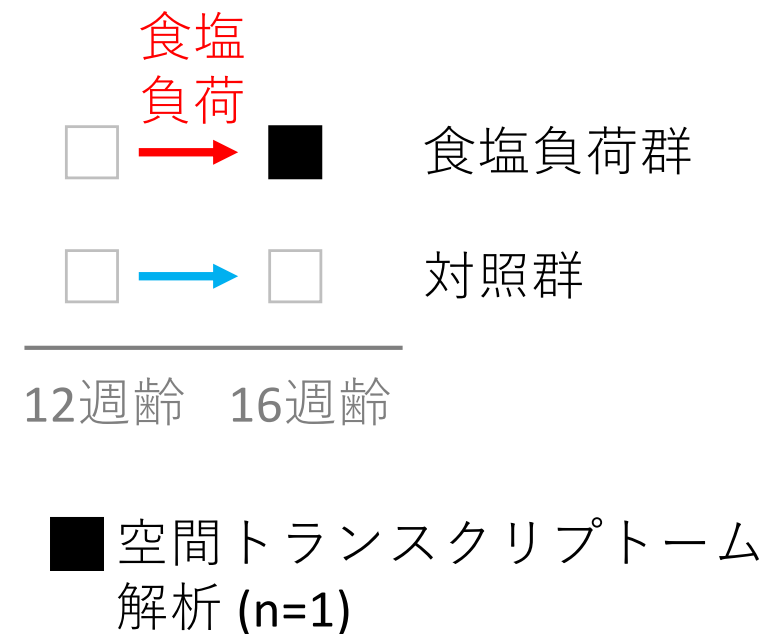
スポットが配置  
されたチップ



100 $\mu$ m解  
像度で粗  
く分かる

# [方法] 食塩負荷による腎障害モデル

- 雄の自然発症高血圧ラット (SHR/Izm)
- 食塩負荷
  - 飲水中に1% NaCl
  - 12週齢から4週間
- 腎臓の空間トランスクリプトーム解析
  - 凍結切片を1cm x 1cmのStereo-seqチップに乗せる
  - 0.5 $\mu$ m毎のスポットでRNA-seq
  - 50 x 50スポットをプール (実効解像度25 $\mu$ m)
- DestVIプログラムでシングルセル解析と統合



## Part 1. シングルセル解析

- 自験例

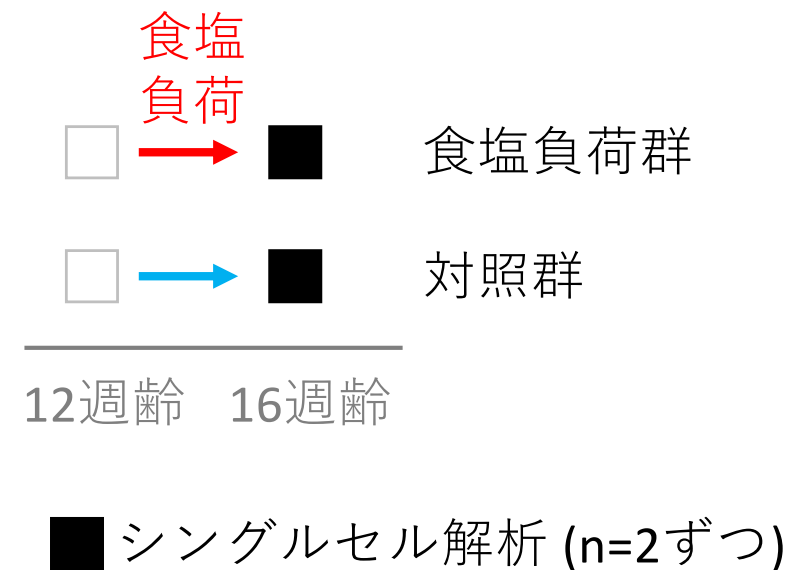
## Part 2. 空間トランスクリプトーム解析

- 自験例

## Part 3. 食塩負荷による腎障害モデル

# [方法] 食塩負荷による腎障害モデル

- 雄の自然発症高血圧ラット (SHR/Izm)
- 食塩負荷
  - 飲水中に1% NaCl
  - 12週齢から4週間
- 腎臓のシングルセル解析
- 細胞種のアノテーション
- 遺伝子発現比較
  - 各細胞種について、食塩負荷群由来の核と対照群由来の核を比較
  - mRNA発現、クロマチンの開きに基づく遺伝子発現



# まとめ

- シングルセル解析により、細胞をほぐし、個々の遺伝子発現を測定できた。
- 空間トランスクリプトーム解析により、組織内の位置ごとに遺伝子発現を測定できた。
- これらを組み合わせることにより、腎臓のような複雑な臓器についても、病理的な遺伝子変動を細胞種ごとに詳しく調べることができた。
  - 食塩負荷による腎障害モデルにおいては、糸球体に加えて、近位尿細管、Henleループ太い上行脚、集合管主細胞において、線維化遺伝子が発現上昇していた。