慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	ダイレクトリプログラミングを利用した心臓刺激伝導系誘導因子の探索
Sub Title	Mining for transcriptional regulators of the cardiac conduction system based on cardiac reprogramming
Author	橋本, 寿之(Hashimoto, Hisayuki)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2020
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2019.)
JaLC DOI	
Abstract	心疾患における致死的な不整脈の起源は心房筋や心室筋等の作業心筋のみならず、心臓刺激伝導系の特殊心筋細胞のような希少な細胞集団にも存在する事が判明している。しかし心臓発生における刺激伝導系形成の分子メカニズムに関しては依然として不明な点が多く、特殊心筋細胞が心疾患の病態にどのように寄与するかは十分に解析できていないという問題点が挙げられる。 近年、心臓発生に重要な転写因子を強制発現させることによりマウス及びヒト線維芽細胞を心筋様細胞にリプログラミングできることが報告された。我々はマルチオミクス解析によりマウスのリプログラミングと心臓発生の間にはエピジェネティックなプロセスにおいて多くの共通点があることを世界で初めて報告した。この知見に基づき、今度は逆にリプログラミングの研究成果を参考にして、心臓発生に寄与する新たな転写制御機構を解明することができるのではないかと考えた。本研究では我々が過去に同定したリプログラミング誘導因子の中から特殊心筋細胞を誘導する因子を探索し、その因子を用いて多能性幹細胞から特殊心筋細胞を誘導する方法を樹立することを目的とする。 我々はまずマウス線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて心筋リプログラミング因子であるAkt1、Gata4、Hand2、Mef2c、Tbx5を強制発現した。そしてさらに申請者がすでに報告したリプログラミング効率を増幅する約30個の転写因子をレトロウイルスベクターで一つずつ加え、その中から特殊心筋細胞のマーカーであるCntn2とScn5aの発現を顕著に上昇させる因子Xを同定した。現在は因子Xの発現量が多能性幹細胞の心筋分化に及ぼす影響を解析するために、薬剤により因子Xを誘導的に過剰発現できる多能性幹細胞を作成している。今後はこの多能性幹細胞を用いて心筋細胞に至るまでの分化段階毎に因子Xの発現を誘導し、特殊心筋細胞のマーカーが最も上昇する条件を確認する予定である。以上の実験により、因子Xを用いてPSC から特殊心筋細胞を誘導する方法を確立する。 Pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes are composed of diverse cell types and the heterogeneity of the population remains a hurdle to dissect cell-type specific phenotypes. For example, fatal arrhythmias often originate from the cardiac conduction system (CCS). Nonetheless, we currently lack methods to efficiently induce specific subtypes of cardiomyocytes including the CCS and hence are unable to perform mechanistic studies individually in CCS cardiomyocytes. We have worked on studying the molecular mechanisms by which fibroblasts are directly reprogrammed into induced cardiomyocyte-like cells (iCMs) by cardiogenic transcription factors and established novel strategies to enhance the reprogramming efficiency. We also employed a genome-wide approach to study the enhancer dynamics during cardiac reprogramming, which revealed a common epigenetic signature between cardiac reprogramming and heart development. Based on our findings, we surmised that direct reprogramming could be a useful tool to decipher new transcriptional networks during heart development. In this study, we aim to establish a novel method to induce CCS cells from pluripotent stem cells based on findings from direct reprogramming. First, we screened for transcription factors that can activate the transcriptional network of CCS cells during direct cardiac reprogramming. Particularly, we reprogrammed mouse fibroblasts into iCMs by reprogramming factors Akt1, Gata4, Hand2, Mef2c and Tbx5, and individually added around 20 inducers of cardiac reprogramming. Among these inducers, we identified factor X which significantly upregulates CCS marker genes such as Cntn2 and Scn5a in iCMs. Currently, we are establishing a drug-inducible system to induce the expression of factor X in pluripotent stem cells at different stages and define the optimal condition to induce CCS cells. Our study will open a new avenue for the field of cardiac reprogramming, which contributes as a new tool for studying transcriptional networks of cardiogenesis.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2019000007-20190305

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

2019 年度　学事振興資金（個人研究）研究成果実績報告書

2020 年 3 月 12 日

研究代表者	所属	医学部臨床教室	職名	助教（有期・医学部）	補助額	500 （特B）千円
	氏名	橋本 寿之	氏名（英語）	Hisayuki Hashimoto		

研究課題（日本語）

ダイレクトリプログラミングを利用した心臓刺激伝導系誘導因子の探索

研究課題（英訳）

Mining for transcriptional regulators of the cardiac conduction system based on cardiac reprogramming

１．研究成果実績の概要

心疾患における致死的な不整脈の起源は心房筋や心室筋等の作業心筋のみならず、心臓刺激伝導系の特殊心筋細胞のような希少な細胞集団にも存在する事が判明している。しかし心臓発生における刺激伝導系形成の分子メカニズムに関しては依然として不明な点が多く、特殊心筋細胞が心疾患の病態にどのように寄与するかは十分に解析できていないという問題点が挙げられる。

近年、心臓発生に重要な転写因子を強制発現させることによりマウス及びヒト線維芽細胞を心筋様細胞にリプログラミングできることが報告された。我々はマルチオミクス解析によりマウスのリプログラミングと心臓発生の間にはエピジェネティックなプロセスにおいて多くの共通点があることを世界で初めて報告した。この知見に基づき、今度は逆にリプログラミングの研究成果を参考にして、心臓発生に寄与する新たな転写制御機構を解明することができるのではないかと考えた。本研究では我々が過去に同定したリプログラミング誘導因子の中から特殊心筋細胞を誘導する因子を探索し、その因子を用いて多能性幹細胞から特殊心筋細胞を誘導する方法を樹立することを目的とする。

我々はまずマウス線維芽細胞にレトロウイルスベクターを用いて心筋リプログラミング因子である Akt1、Gata4、Hand2、Mef2c、Tbx5 を強制発現した。そしてさらに申請者がすでに報告したリプログラミング効率を増幅する約 30 個の転写因子をレトロウイルスベクターで一つずつ加え、その中から特殊心筋細胞のマーカーである Cntn2 と Scn5a の発現を顕著に上昇させる因子 X を同定した。現在は因子 X の発現量が多能性幹細胞の心筋分化に及ぼす影響を解析するために、薬剤により因子 X を誘導的に過剰発現できる多能性幹細胞を作成している。今後はこの多能性幹細胞を用いて心筋細胞に至るまでの分化段階毎に因子 X の発現を誘導し、特殊心筋細胞のマーカーが最も上昇する条件を確認する予定である。以上の実験により、因子 X を用いて PSC から特殊心筋細胞を誘導する方法を確立する。

２．研究成果実績の概要（英訳）

Pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes are composed of diverse cell types and the heterogeneity of the population remains a hurdle to dissect cell-type specific phenotypes. For example, fatal arrhythmias often originate from the cardiac conduction system (CCS). Nonetheless, we currently lack methods to efficiently induce specific subtypes of cardiomyocytes including the CCS and hence are unable to perform mechanistic studies individually in CCS cardiomyocytes.

We have worked on studying the molecular mechanisms by which fibroblasts are directly reprogrammed into induced cardiomyocyte-like cells (iCMs) by cardiogenic transcription factors and established novel strategies to enhance the reprogramming efficiency. We also employed a genome-wide approach to study the enhancer dynamics during cardiac reprogramming, which revealed a common epigenetic signature between cardiac reprogramming and heart development. Based on our findings, we surmised that direct reprogramming could be a useful tool to decipher new transcriptional networks during heart development.

In this study, we aim to establish a novel method to induce CCS cells from pluripotent stem cells based on findings from direct reprogramming. First, we screened for transcription factors that can activate the transcriptional network of CCS cells during direct cardiac reprogramming. Particularly, we reprogrammed mouse fibroblasts into iCMs by reprogramming factors Akt1, Gata4, Hand2, Mef2c and Tbx5, and individually added around 20 inducers of cardiac reprogramming. Among these inducers, we identified factor X which significantly upregulates CCS marker genes such as Cntn2 and Scn5a in iCMs. Currently, we are establishing a drug-inducible system to induce the expression of factor X in pluripotent stem cells at different stages and define the optimal condition to induce CCS cells. Our study will open a new avenue for the field of cardiac reprogramming, which contributes as a new tool for studying transcriptional networks of cardiogenesis.

３．本研究課題に関する発表

発表者氏名（著者・講演者）	発表課題名（著書名・演題）	発表学術誌名（著書発行所・講演学会）	学術誌発行年月（著書発行年月・講演年月）