

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	2021
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2020. )
JaLC DOI	
Abstract	<p>本研究ではリプログラミングを初期スクリーニングに利用し、我々が同定した心筋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た。そしてこの因子を用いて、今度は多能性幹細胞から特殊心筋細胞を効率的に分化誘導する方法を樹立し、in vivo解析では困難である個体発生における刺激伝導系形成の新たな転写制御機構を解明することを目的として研究を行った。</p> <p>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FOXL1という転写因子を同定した。次に心筋リプログラミング因子にFOXL1を加えた心筋様細胞のトランスクリプトーム解析を行ったところ、GO解析で心室刺激伝導系に関連する遺伝子が全体的に強く誘導されていることが確認できた。また、ChIP-seq解析でもFOXL1は心室刺激伝導系遺伝子群の近傍に結合し、エンハンサーを活性化することが判明した。以上より、我々はマルチオミクス解析を用いてFOXL1が心筋リプログラミング中に心室刺激伝導系に関連した転写ネットワークを活性化することを明らかにした。</p> <p>FOXL1は主に消化管に発現しているが、心臓にも発現している。しかし心臓における機能は未解析の興味深い転写因子である。そのため、今後はFOXL1が心筋分化に及ぼす影響を解析するためには、Tet-On発現誘導システムを用いて分化段階毎にFOXL1の発現を誘導し、免疫染色法とqPCR法等を用いてCntn2やScn5a等の心室刺激伝導系マーカーの発現を誘導するか確認する予定である。</p> <p>We have worked on studying the molecular mechanisms by which fibroblasts are directly reprogrammed to cardiomyocytes 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 and cellular differentiation. In this study, we aim to establish a novel method to induce cardiac conduction system (CCS) cells from pluripotent stem cells based on findings from direct reprogramming.</p> <p>First, we chose 30 transcription factors from our previous study which activate the cardiac transcriptional network, to screen for factors which can activate the transcriptional network of CCS cells during direct cardiac reprogramming. We found that FOXL1 significantly activates the expression of CCS markers Cntn2 and Scn5a. Whole transcriptome sequencing and gene ontology analysis also demonstrated a global activation of the CCS transcriptional network.</p> <p>Next, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP)-seq of FOXL1 during reprogramming. Interestingly, this epigenetic analysis also showed that FOXL1 activates enhancers which are in the vicinity of CCS related genes.</p> <p>FOXL1 is enriched in the GI tract but also expressed in the heart. However, its function in the cardiovascular system has not been reported. Hence, we will induce the expression of FOXL1 in pluripotent stem cells at different stages and define the optimal condition to induce CCS cells. Establishing a method to induce cardiomyocytes in the CCS will expand the potential of pluripotent stem cells in regenerative medicine. Our study will uncover the molecular mechanisms of arrhythmic heart disease by particularly focusing on the CCS, and will give rise to valuable resources for drug screening and clinical application.</p>
Notes	
Genre	Research Paper
URL	<a href="https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2020000008-20200272">https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2020000008-20200272</a>

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.

研究代表者	所属	医学部中央診療施設等	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

本研究ではリプログラミングを初期スクリーニングに利用し、我々が同定した心筋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査した。そしてこの因子を用いて、今度は多能性幹細胞から特殊心筋細胞を効率的に分化誘導する方法を樹立し、in vivo 解析では困難である個体発生における刺激伝導系形成の新たな転写制御機構を解明することを目的として研究を行った。

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づつ加え、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 FOXL1 という転写因子を同定した。次に心筋リプログラミング因子に FOXL1 を加えた心筋様細胞のトランスクriptome 解析を行ったところ、GO 解析で心室刺激伝導系に関連する遺伝子が全体的に強く誘導されていることが確認できた。また、ChIP-seq 解析でも FOXL1 は心室刺激伝導系遺伝子群の近傍に結合し、エンハンサーを活性化することが判明した。以上より、我々はマルチオミクス解析を用いて FOXL1 が心筋リプログラミング中に心室刺激伝導系に関連した転写ネットワークを活性化することを明らかにした。

FOXL1 は主に消化管に発現しているが、心臓にも発現している。しかし心臓における機能は未解析の興味深い転写因子である。そのため、今後は FOXL1 が心筋分化に及ぼす影響を解析するために、Tet-On 発現誘導システムを用いて分化段階毎に FOXL1 の発現を誘導し、免疫染色法と qPCR 法等を用いて Cntn2 や Scn5a 等の心室刺激伝導系マーカーの発現を誘導するか確認する予定である。

## 2. 研究成果実績の概要 (英訳)

We have worked on studying the molecular mechanisms by which fibroblasts are directly reprogrammed to cardiomyocytes 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 and cellular differentiation. In this study, we aim to establish a novel method to induce cardiac conduction system (CCS) cells from pluripotent stem cells based on findings from direct reprogramming.

First, we chose 30 transcription factors from our previous study which activate the cardiac transcriptional network, to screen for factors which can activate the transcriptional network of CCS cells during direct cardiac reprogramming. We found that FOXL1 significantly activates the expression of CCS markers Cntn2 and Scn5a. Whole transcriptome sequencing and gene ontology analysis also demonstrated a global activation of the CCS transcriptional network.

Next, we performed chromatin immunoprecipitation (ChIP)-seq of FOXL1 during reprogramming. Interestingly, this epigenetic analysis also showed that FOXL1 activates enhancers which are in the vicinity of CCS related genes.

FOXL1 is enriched in the GI tract but also expressed in the heart. However, its function in the cardiovascular system has not been reported. Hence, we will induce the expression of FOXL1 in pluripotent stem cells at different stages and define the optimal condition to induce CCS cells.

Establishing a method to induce cardiomyocytes in the CCS will expand the potential of pluripotent stem cells in regenerative medicine. Our study will uncover the molecular mechanisms of arrhythmic heart disease by particularly focusing on the CCS, and will give rise to valuable resources for drug screening and clinical application.

## 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)