

Title	ヒトiPS細胞を用いた左右心室特異的心筋および心内膜細胞分化誘導法の開発
Sub Title	Development of protocol for generating iPS cell-derived heart field specific cardiac progenitor cells and endocardial cells
Author	古道, 一樹(Kodo, Kazuki)
Publisher	慶應義塾大学
Publication year	2019
Jtitle	学事振興資金研究成果実績報告書 (2018.)
JaLC DOI	
Abstract	心臓領域特異的レポーター遺伝子をCRISPR/Cas9およびPiggybac systemを用いてゲノム編集したヒトiPS細胞を樹立した。全心臓前駆細胞の標識には、NKX2.5遺伝子の内因性エンハンサー・プロモーターを、一次心臓領域由来心臓前駆細胞の標識には、TBX5遺伝子の内因性エンハンサー・プロモーターを用いた。樹立したiPS細胞株は、発生過程でNKX2.5を発現した一次心臓領域由来心臓前駆細胞および二次心臓領域由来心臓前駆細胞はすべてRFPで、TBX5を発現した一次心臓領域由来心臓前駆細胞はGFPで蛍光標識される。実際、NKX2.5およびTBX5遺伝子の発現パターンに従って、心筋分化誘導開始6日目よりRFPおよびGFP蛍光の発現が認められ、誘導開始10日目に、GFPおよびRFPシグナルの有無に応じてFACSを用いて4分画に選別可能であった。さらに培養を継続し、心筋分化誘導を進めたのち、mRNA発現パターンを確認したところ、RFP陽性細胞群(NKX2.5陽性心臓前駆細胞)は心筋マーカーであるトロポニンTの発現量が高く、またGFP陽性群はGFP陰性群に比してTBX5遺伝子発現量が高値であった。これらの結果は、想定される各心臓領域特異的心臓前駆細胞の遺伝子発現パターンに合致し、このシステムの有用性を示唆する結果であった。一方で、このシステムで分けられる分画の中で、二次心臓領域由来心臓前駆細胞を示すNKX2.5陽性TBX5陰性分画は、その全細胞に対する割合が非常に少数であり、二次心臓領域由来心臓前駆細胞および心筋細胞を用いた実験系を組むことは困難が予想された。その問題を解決するために、NKX2.5に加えて、二次心臓領域由来心臓前駆細胞に特異的に発現するISL1を分子マーカーとして利用する方法を再検討し、ISL1の一過性の発現をもとに、永続的に細胞を蛍光標識するために、新たにCre-loxPシステムを使用する方針とした。 We generated the iPS cell line carrying the transgene which expresses fluorescent proteins under the control of promoters of heart field-specific cardiac transcription factors. We used NKX2.5 promoter for the first and second heart field promoter and TBX5 promoter for the first heart field-specific promoter. During the cardiac differentiation, the reporter iPS cells-derived first field cardiac progenitor cells express GFP and RFP, and second heart field cardiac progenitor cells express RFP. The reporter iPS cell-derived cardiac progenitor cells could express the fluorescent proteins at day 6 after starting cardiac differentiation and we could obtain each progenitor cells by FACS at day 10. RFP positive cardiac progenitor cells could express cardiac troponin T and GFP positive cardiac progenitor cells showed higher TBX5 expression compared to GFP negative cells. These results suggest the usefulness of the reporter system. However, we could not obtain the enough amount of second heart field progenitor cells due to the negative selection. To obtain the higher amount of second heart field cardiac progenitor cells, we decided to use ISL1 promoter as the second heart field-specific promoter. ISL1 temporally expresses in the second heart field progenitor cells so we are planning to use Cre-loxP system to label the ISL1 positive cells permanently.
Notes	
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=2018000005-20180010

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.

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	古道 一樹	氏名 (英語)	Kazuki Kodo		
研究課題 (日本語)						
ヒト iPS 細胞を用いた左右心室特異的心筋および心内膜細胞分化誘導法の開発						
研究課題 (英訳)						
Development of protocol for generating iPS cell-derived heart field specific cardiac progenitor cells and endocardiac cells						
1. 研究成果実績の概要						
心臓領域特異的レポーター遺伝子を CRISPR/Cas9 および Piggybac system を用いてゲノム編集したヒト iPS 細胞を樹立した。全心臓前駆細胞の標識には、NKX2.5 遺伝子の内因性エンハンサー・プロモーターを、一次心臓領域由来心臓前駆細胞の標識には、TBX5 遺伝子の内因性エンハンサー・プロモーターを用いた。樹立した iPS 細胞株は、発生過程で NKX2.5 を発現した一次心臓領域由来心臓前駆細胞および二次心臓領域由来心臓前駆細胞はすべて RFP で、TBX5 を発現した一次心臓領域由来心臓前駆細胞は GFP で蛍光標識される。実際、NKX2.5 および TBX5 遺伝子の発現パターンに従って、心筋分化誘導開始 6 日目より RFP および GFP 蛍光の発現が認められ、誘導開始 10 日目に、GFP および RFP シグナルの有無に応じて FACS を用いて 4 分画に選別可能であった。さらに培養を継続し、心筋分化誘導を進めたのち、mRNA 発現パターンを確認したところ、RFP 陽性細胞群(NKX2.5 陽性心臓前駆細胞)は心筋マーカであるトロポニン T の発現量が高く、また GFP 陽性群は GFP 陰性群に比して TBX5 遺伝子発現量が高値であった。これらの結果は、想定される各心臓領域特異的心臓前駆細胞の遺伝子発現パターンに合致し、このシステムの有用性を示唆する結果であった。一方で、このシステムで分けられる分画の中で、二次心臓領域由来心臓前駆細胞を示す NKX2.5 陽性 TBX5 陰性分画は、その全細胞に対する割合が非常に少数であり、二次心臓領域由来心臓前駆細胞および心筋細胞を用いた実験系を組むことは困難が予想された。その問題を解決するために、NKX2.5 に加えて、二次心臓領域由来心臓前駆細胞に特異的に発現する ISL1 を分子マーカとして利用する方法を再検討し、ISL1 の一過性の発現をもとに、永続的に細胞を蛍光標識するために、新たに Cre-loxP システムを使用する方針とした。						
2. 研究成果実績の概要 (英訳)						
We generated the iPS cell line carrying the transgene which expresses fluorescent proteins under the control of promoters of heart field-specific cardiac transcription factors. We used NKX2.5 promoter for the first and second heart field promoter and TBX5 promoter for the first heart field-specific promoter. During the cardiac differentiation, the reporter iPS cells-derived first field cardiac progenitor cells express GFP and RFP, and second heart field cardiac progenitor cells express RFP. The reporter iPS cell-derived cardiac progenitor cells could express the fluorescent proteins at day 6 after starting cardiac differentiation and we could obtain each progenitor cells by FACS at day 10. RFP positive cardiac progenitor cells could express cardiac troponin T and GFP positive cardiac progenitor cells showed higher TBX5 expression compared to GFP negative cells. These results suggest the usefulness of the reporter system. However, we could not obtain the enough amount of second heart field progenitor cells due to the negative selection. To obtain the higher amount of second heart field cardiac progenitor cells, we decided to use ISL1 promoter as the second heart field-specific promoter. ISL1 temporally expresses in the second heart field progenitor cells so we are planning to use Cre-loxP system to label the ISL1 positive cells permanently.						
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)			