



TITLE:

Expression dynamics of HAND1/2 in in vitro human cardiomyocyte differentiation(Abstract_要旨)

AUTHOR(S):

Okubo, Chikako

CITATION:

Okubo, Chikako. Expression dynamics of HAND1/2 in in vitro human cardiomyocyte differentiation. 京都大学, 2021, 博士(医学)

ISSUE DATE:

2021-09-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k23471>

RIGHT:

京都大学	博士（医学）	氏名	大久保 周子
論文題目	Expression dynamics of HAND1/2 in <i>in vitro</i> human cardiomyocyte differentiation (試験管内でのヒト心筋細胞の分化誘導における HAND1/2 の発現解析)		
(論文内容の要旨)			
<p>Hand1 と Hand2 は中胚葉から左心室右心室に至るまで重要な役割を果たしていることが示唆されているが、ヒトの心形成における HAND1 と HAND2 の発現動態や機能はほとんど調べられていない。</p> <p>そこで、ヒト iPS 細胞にゲノム編集を行い、HAND1^{mCherry}HAND2^{EGFP} レポーター細胞株を作成した。ヒト iPS 細胞の心臓分化に伴う発現動態を分化 1 日目から 20 日目までフローサイトメーターで観察したところ、mCherry は 3 日目から検出され、5 日目には mCherry 陽性および mCherry 陰性の集団が観察された。その後、EGFP の発現が始まり、20 日目の心筋細胞中には、4 つの集団 (mCherry 陰性 EGFP 陰性、mCherry 陰性 EGFP 陽性、mCherry 陽性 EGFP 陰性、mCherry 陽性 EGFP 陽性) が観察された。</p> <p>まず、5 日目の mCherry 陽性及び陰性集団を分取したところ、mCherry 陽性細胞は、心筋細胞分化において重要な遺伝子の発現レベルが mCherry 陰性細胞よりも高く、心筋前駆細胞マーカーの発現も mCherry の発現と相関していた。さらに、細胞標識システムを構築し、5 日目の mCherry 陽性及び陰性細胞を追跡したところ、20 日目において mCherry 陰性細胞は培養皿中で維持されていなかった。以上のことから、初期段階での HAND1 の発現は、心筋前駆細胞の目印となることがわかった。</p> <p>次に、分化誘導に必要なサイトカインの濃度を変化させ HAND1 と HAND2 の発現を調べた。分化初期における HAND1 は、BMP シグナル、Activin シグナルによってそれぞれ正と負に制御されていた。分化誘導後期には、BMP シグナルの阻害剤を投与することにより mCherry の発現量が下がったことから、後期においても BMP シグナルによる HAND1 の発現制御が明らかにされた。一方、HAND2 はヒトの心房では特に高い発現率を示している。レチノイン酸(RA) を用いて心房筋を誘導したところ、RA は mCherry の発現を抑制し、EGFP の発現を促すことが示された。</p> <p>20 日目の 4 つの心室筋細胞集団の特徴を明らかにするために、RNA-seq を行った。その結果、mCherry 陽性心筋細胞において細胞周期が活性化している可能性が示唆され、EdU を用いて細胞増殖率を調べたところ、mCherry 陽性心筋細胞は mCherry 陰性心筋細胞に比べて EdU 陽性比率が有意に高かった。次に、上流解析を行い LEF1 遺伝子が上流因子として予測された。LEF1 を発現抑制すると、EdU 陽性比率が有意に低下したが、HAND1 や HAND2 の発現抑制実験では低下しなかった。興味深いことに、HAND1 および HAND2 の発現抑制実験では、LEF1 の発現が有意に増加し、逆に LEF1 の発現抑制では HAND1 および HAND2 の発現が有意に増加した。このことから心筋細胞の増殖では LEF1 を中心とした HAND1、HAND2 を含む遺伝子制御ネットワークが示唆された。最後に、増殖性心筋細胞マーカーを探索し、mCherry 陽性心筋細胞で高い発現を示した CD105 を同定した。20 日目に心筋細胞中の CD105 陽性及び陰性の集団を選別したところ、CD105 陽性心筋細胞の EdU 陽性比率と HAND1 の発現レベルは、CD105 陰性心筋細胞よりも高かった。</p> <p>本研究において、試験管内でのヒトの心筋細胞の分化誘導過程での HAND1 及び HAND2 の発現パターンおよび増殖メカニズムに迫ることができ、今後ヒトの心臓の発生過程の研究に貢献することが期待される。</p>			

(論文審査の結果の要旨)

Hand1 と Hand2 は中胚葉から心臓の発生に重要な転写因子であるが、ヒトの心形成における発現動態や機能はほとんど調べられていない。そこで、ヒト iPS 細胞にゲノム編集を行い、HAND1^{mCherry}HAND2^{EGFP} ダブルレポーター細胞株を作製し、さらに MYH6 プロモーター制御下で心筋細胞特異的に iRFP670 を発現するトリプルレポーター細胞株、および標的の細胞を追跡する為に HAND1/2 のダブルレポーターに加え tagBFP を恒常的に発現するトリプルレポーター細胞株を作製した。

本研究では、心筋細胞分化初期では、HAND1 の発現は心筋細胞前駆細胞の目印となることを明らかにし、HAND1 の発現の制御は BMP4 と Activin A にそれぞれ正と負に制御されていることを示した。心筋細胞分化後期では、HAND1 陽性 HAND2 陽性、HAND1 陽性 HAND2 陰性、HAND1 陰性 HAND2 陽性、HAND1 陰性 HAND2 陰性の 4 つの細胞集団がそれぞれ存在し、HAND1 陽性細胞は細胞増殖能が高いことが示された。また、これらの細胞増殖は LEF1 によって大きく制御されていることが分かった。さらに、CD105 が増殖能の高い心筋細胞のマーカーとなることを示した。

以上の研究は、ヒト iPS 細胞を用いた心筋細胞の分化誘導メカニズムと、ヒトの心臓の発生メカニズムの解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、令和 3 年 8 月 11 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降