

令和 2 年 5 月 27 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08490

研究課題名(和文) 心臓形成における心内膜細胞の系譜と機能の解明

研究課題名(英文) The cell lineage and role of the endocardium during the mouse heart tube formation

研究代表者

佐波 理恵 (Saba, Rie)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80378893

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、心臓形成過程での心内膜細胞系列の系譜と細胞特性の分子基盤を解明することを目的として行われた。報告者らは、シングルセル発現解析により、マウス胚予定心臓領域において心臓前駆細胞群の一部がSox17遺伝子を発現し、これらが心内膜に寄与する細胞集団であることを発見した。さらに中胚葉特異的にSox17を欠損するマウスの心臓形成において、心筋層肥厚過程に重篤な異常が生じることを明らかにした。本研究で得られた成果は、不明な点が多い心内膜細胞系列の分化過程と心臓形成におけるその機能解明に新たな切り口をもたらした。以上の研究結果を2019年に Scientific Reports誌に発表した

研究成果の学術的意義や社会的意義

心内膜は、発生過程で心筋と同時に出現し、心筋細胞の分化増殖を制御する必須な役割を果たしながら心臓形成に細胞ソースとして寄与するが、その分化過程や機能の分子メカニズムについては不明な点が多かった。本研究で報告者は、マウス胚予定心臓領域で心内膜前駆細胞群が転写因子 SOX17 を発現することを発見した。また心内膜前駆細胞群におけるその欠損が、心室心筋層肥厚過程において細胞分化および増殖低下による肉柱形成不全をもたらすことを明らかにした。報告者は、心内膜派生過程と心筋層肥厚過程を制御する分子メカニズムの一端を明らかにした本研究成果が、重症心疾患治療のための新規細胞治療法開発の一助となると考えている。

研究成果の概要(英文)：The endocardium is the endothelial component of the vertebrate heart and plays a key role in heart development. Our single cell cDNA expression profiling of cardiac progenitor cells (CPCs) shows that Nkx2-5+ CPCs expressing Sox17 specifically differentiate into the endocardium in mouse embryos. The expression of Sox17 is highly correlated to the endothelial markers, such as Dll4 and Pecam1, but not to the cardiomyocyte or smooth cell markers. Although Sox17 is not essential or sufficient for endocardium fate, it can bias the fate of CPCs toward the endocardium. On the other hand, it is required for heart development. Deletion of Sox17 in the mesoderm markedly impaired heart development with regard to cell proliferation and behavior in both of the endocardium and myocardium. Our results provide insight into differentiation of the endocardium and its role in heart development. Above results were published in 2019 (Saba et al., Scientific Reports (2019) 9:11953).

研究分野：心臓発生

キーワード：心臓発生 心内膜 心筋 シングルセル解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の心臓を構成する多様な細胞群は、そのほとんどが初期胚発生過程で心臓予定領域に生じる中胚葉性の心臓前駆細胞群 (cardiac progenitor cells; CPC) に由来する。しかし CPC の細胞学的特性や各心臓細胞系列への分化制御メカニズムに関する知識基盤は、新規細胞治療法開発目的で多能性幹細胞から特定の心臓細胞系列の誘導法を確立するには未だ脆弱である。この状況を打開するため先行研究において申請者らは、マウス胚予定心臓領域から CPC を単離して単一細胞遺伝子発現プロファイリングを行い、既存のマーカー遺伝子 *Nkx2-5* を発現する CPC の 20-30%が SRY 型転写因子をコードする *Sox17* を発現し、それらが心内膜前駆細胞群であることを発見した。しかし予定心臓領域で CPC が *Sox17* を発現して以降の形態形成過程での心内膜細胞系列の時空間的な分布、分化過程での細胞学的特性は不明であった。

2. 研究の目的

本研究は、*Sox17* の発現を基盤とする細胞系譜の時空間分布データ及びその遺伝子発現プロファイルの取得と、分化過程を再現する多能性幹細胞を用いた *in vitro* の実験解析系構築により、心臓発生過程での心内膜の細胞特性とその分子実態を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

1) マウス胚発生過程における心内膜前駆細胞の系譜追跡

遺伝子改変マウスを用いて予定心臓領域の心内膜前駆細胞の系譜を追跡して胚発生過程での心内膜細胞系列の時空間的分布を明らかにする。

2) 心内膜分化過程での細胞特性の解明

項目 1) から得られた細胞系譜の時空間的分布情報を元に、形成過程のマウス心円筒から心内膜細胞を採取して単一細胞遺伝子発現プロファイリングを行うことにより、CPC からの分化過程にある心内膜の細胞特性を解明する。

3) 心内膜細胞による心円筒形成制御機構の解明

項目 2) で得られた遺伝子発現プロファイルから、遺伝子オントロジーと発現様式解析により心円筒の形態形成に作用し得る心内膜特異的遺伝子群を選別し、それらの機能を検証する。

4) マウス ES 細胞からの心内膜細胞分化誘導系の構築

項目 3) で検証した心内膜特異的遺伝子群が心円筒形成過程で担う機能の分子実態を精査するため、マウス ES 細胞を用いて多能性幹細胞から CPC を経て心内膜細胞への分化経路を再現する *in vitro* の分化誘導系を開発する。

4. 研究成果

1) マウス胚発生過程における心内膜前駆細胞の系譜追跡

マウス初期胚において転写因子 SOX17 を発現する CPC が、予定心臓領域に一過的に出現することを、免疫組織学染色により明らかにした。さらにそれらの *Sox17* を発現する CPC が心内膜に寄与することを、遺伝子改変マウスを用いて示した (図 1)。

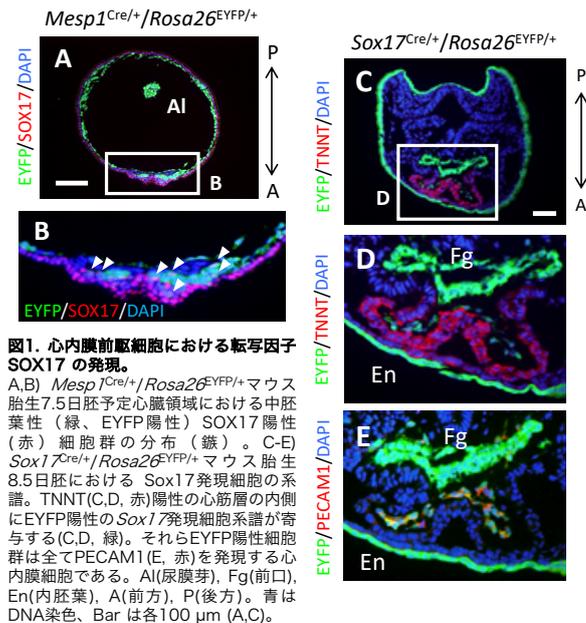


図1. 心内膜前駆細胞における転写因子 SOX17 の発現。
A, B) *Mesp1^{Cre/+}/Rosa26^{EYFP/+}* マウス胎生 7.5 日胚予定心臓領域における中胚葉性 (緑、EYFP 陽性) SOX17 陽性 (赤) 細胞群の分布 (矢)。C-E) *Sox17^{Cre/+}/Rosa26^{EYFP/+}* マウス胎生 8.5 日胚における *Sox17* 発現細胞の系譜。TNNT (C, D, 赤) 陽性の心筋層の内側に EYFP 陽性の *Sox17* 発現細胞系譜が寄与する (C, D, 緑)。それら EYFP 陽性細胞群は全て PECAM1 (E, 赤) を発現する心内膜細胞である。AI (尿管芽), Fg (前口), En (内胚葉), A (前方), P (後方)。青は DNA 染色。Bar は各 100 μm (A, C)。

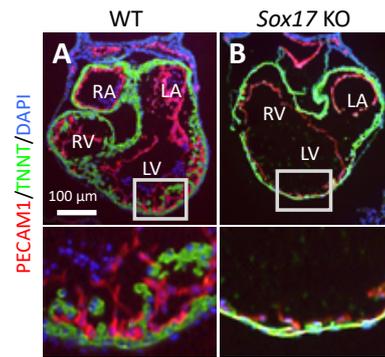


図2. 中胚葉性 *Sox17* 欠損マウスにおける心臓形成異常。
A, B) 野生型 (WT) 及び *Sox17* KO (*Mesp1^{Cre/+}/Sox17^{lox/lox}*) マウス胎生 9.75 日胚の心臓横断面蛍光免疫染色像。緑 (心筋), 赤 (心内膜), 青 (DNA)。WT 心室では心内膜層によって覆われた空間で心筋細胞が内部へ増殖する肉中形成が顕著に認められるが、*Sox17* KO では両組織間の相互作用が顕著に阻害されている。LA (左心房), LV (左心室), RA (右心房), RV (右心室)。

2) 心内膜分化過程での細胞特性の解明

中胚葉細胞系列で *Sox17* を欠損するマウス胚の心臓形成において、心室心筋層の肥厚を促す肉柱形成の不全による重篤な異常が生じることを、複合変異マウスを用いて明らかにした (図 2)。さらにこの遺伝子欠損マウスの胎生 8.5 日胚心円筒から採取した心内膜細胞及び心筋細胞を用いてのシングルセルマイクロアレイ解析により、心円筒形成直後の両細胞系列におい

て顕著な遺伝子発現プロファイルの異常が生じていることが確認された(図3)。

3) 心内膜細胞による心円筒形成制御機構の解明

項目 2) で得られた *Sox17* 欠損マウス初期胚の心内膜・心筋細胞の遺伝子発現プロファイルにおいて、特に DNA 複製・細胞増殖と細胞分化に関連する遺伝子群の発現変動が顕著に検出された(図3)。組織学的手法による同遺伝子欠損マウス心臓形成過程の解析からは、胎生 9.0 日以降心内膜で、9.5 日以降は心筋でも細胞増殖の有意な低下が認められた(図4)。また、胎生 9.5 日の同遺伝子欠損マウス心内膜では、心内膜の分化を促進し、さらに心筋の増殖を促進する NOTCH シグナル伝達経路の関連遺伝子である *Notch1* と *Nrg1* の発現レベルが顕著に低下していた。このことが、心内膜・心筋間の相互作用を著しく阻害して両細胞系列の増殖低下による肉柱形成不全をもたらしたと考えられる(図5)。

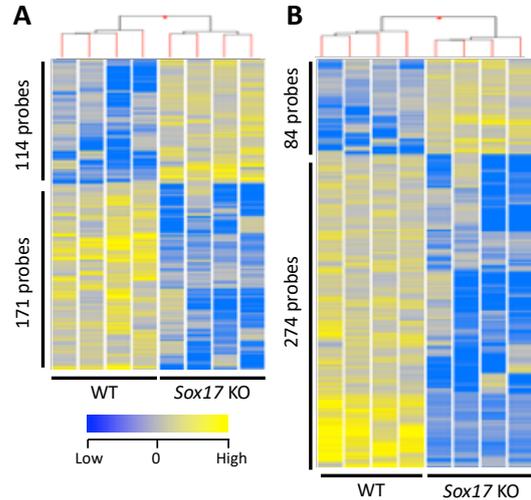


図3. 中胚葉性 *Sox17* 欠損マウス心円筒における遺伝子発現異常。A,B) 野生型(WT)及び *Sox17* KO (*Mesp1^{Cre/+}/Sox17^{flx/flx}*) マウス胎生8.5日胚の心内膜(A)及び心筋(B)細胞を用いたシングルセルマイクロアレイ解析で5倍の差別的発現を示したプローブ群のヒートマップ。心円筒形成直後の心内膜・心筋両細胞系列で既に心内膜前駆細胞での *Sox17* 欠損による遺伝子発現プロファイル異常が生じている。

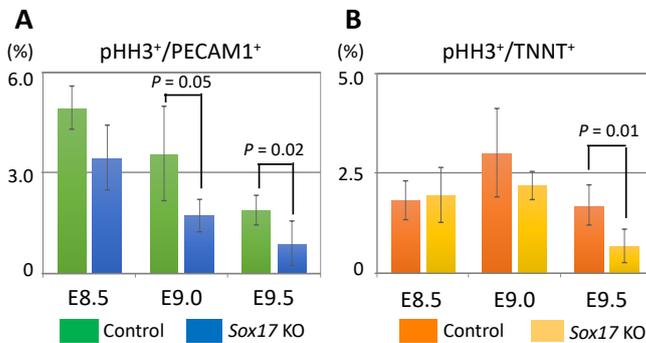


図4. 中胚葉性 *Sox17* 欠損マウス心臓形成過程における細胞増殖異常。A,B) 野生型(WT)及び *Sox17* KO (*Mesp1^{Cre/+}/Sox17^{flx/flx}*) マウス胎生8.5-9.5日胚の心内膜(A)及び心筋(B)におけるリン酸化ヒストンH3を発現する有糸分裂期の細胞の割合。心内膜においては9.0日胚以降、心筋においては9.5日胚以降に有糸分裂期の細胞数が有意に低下する。

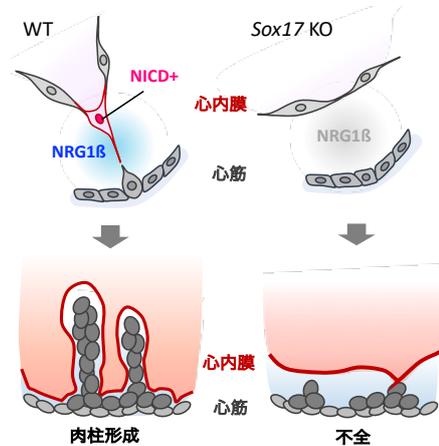


図5. *Sox17* 欠損による心室肉柱形成不全モデル。野生型(WT, 左側)及び *Sox17* KO (右側) マウス胚心室における肉柱形成過程模式図。WT心内膜ではNOTCHシグナル伝達経路の活性化 (NOTCH 細胞内ドメイン: NICDの核移行)により下流遺伝子 *Nrg1* が発現して NRG1β が分泌され、心筋との細胞間相互作用と増殖を活性化し、肉柱形成を促進する。 *Sox17* KO 胚では心内膜による NRG1β の分泌が不十分であるため心筋との相互作用が阻害され、肉柱形成が不全となる。

4) マウス ES 細胞からの心内膜細胞分化誘導系の構築

マウス ES 細胞を用いて多能性幹細胞から CPC を経て心内膜細胞への分化経路を再現する *in vitro* の分化誘導系開発を行う過程で、心内膜を含めた内皮前駆細胞群のサブタイプ特異的な分化誘導が困難であるという問題が生じている。これを解決するため、既存のシングルセルシーケンスデータと複合変異マウスを用いた心内膜細胞系譜解析結果を統合し、同時期に出現する *Sox17* 陽性の内皮前駆細胞群の多様性とそれらの分化過程についてのより詳細な情報を取得中である。

1-3)に関して、上記研究結果を2019年に *Scientific Reports* 誌に発表した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saba R, Kitajima K, Rainbow L, Engert S, Uemura M, Ishida H, Kokkinopoulos I, Shintani Y, Miyagawa S, Kanai Y, Azuma-Kanai M, Koopman P, Meno C, Kenny J, Lickert H, Saga Y, Suzuki K, Sawa Y, Yashiro K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Endocardium differentiation through Sox17 expression in endocardium precursor cells regulates heart development in mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 11953
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1038/s41598-019-48321-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐波理恵
2. 発表標題 心疾患治療を目指した心臓前駆細胞群分化制御機構の解明
3. 学会等名 第8回細胞再生医療研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八代健太
2. 発表標題 SoxF class transcription factor Sox17 identifies endocardium progenitor cells and regulates the heart development in mice.
3. 学会等名 日本循環器学会（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kenta Yashiro
2. 発表標題 Nobel finding of embryonic cardiac progenitor cells via single cell expression profiling
3. 学会等名 生命科学系学会合同年次大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Saba R, Kitajima K, Rainbow L, Engert S, Uemura M, Ishida H, Kokkinopoulos I, Shintani Y, Miyagawa S, Kanai Y, Azuma-Kanai M, Koopman P, Meno C, Kenny J, Lickert H, Saga Y, Suzuki K, Sawa Y, Yashiro K.
2. 発表標題 Sox17 expression in endocardium precursor cells regulates heart development in mice.
3. 学会等名 Weinstein Conference 2019, Poster#49(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐波理恵, 北島桂子, 新谷泰範, 金井克晃, 金井正美, 目野主税, 相賀裕美子, 鈴木憲, 宮川繁, 澤芳樹, 山崎秀哉, 山田恵, 八代健太
2. 発表標題 Sox17 expression in the endocardium precursor cells regulates the mouse heart development.
3. 学会等名 日本分子生物学会第42回年会, ワークショップ及びポスター発表 (2PW-07, 3P-0327)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐波理恵, 八代健太
2. 発表標題 心内膜前駆細胞における Sox17 の発現と心臓形成における役割
3. 学会等名 第18回日本心臓血管発生研究会, 口頭発表
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	八代 健太 (Yashiro Kenta)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	相賀 裕美子 (Saga Yumiko)		
研究協力者	山口 新平 (Yamaguchi Shimpei)		
研究協力者	橋本 昌和 (Hashimoto Masakazu)		
研究協力者	山崎 秀哉 (Yamazaki Hideya)		
研究協力者	山田 恵 (Yamada Kei)		
研究協力者	宮川 繁 (Miyagawa Shigeru)		
研究協力者	澤 芳樹 (Sawa Yoshiki)		