

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06739

研究課題名(和文)一次造血とその循環を担う内皮ネットワーク形成機構の解明

研究課題名(英文)Origins and regulatory mechanisms of the embryonic and extraembryonic endothelial network in mice

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、一次造血とその循環を担う心血管系内皮細胞のネットワーク形成過程の可視化と分子制御メカニズムの解明を目的として行った。報告者は、全胚培養系を確立して複合変異マウスの全胚免疫染色を行い、レーザー共焦点顕微鏡及びライトシート顕微鏡を用いてこれらの蛍光3D画像を取得・解析した。その結果、胚発生の最初期に出現するSOX17陽性の内皮前駆細胞群は、mesodermal wing のみに分布して心内膜と背側大動脈に寄与するが、胚体外組織での一次造血には寄与しないことを明らかとなった。これらの成果を第45回日本分子生物学会年会(2022年)と第56回日本発生生物学会年会(2023年)で報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一次造血系と心血管系は、最初期に胚体内外で同時進行する器官形成過程であるが、それらを連関する内皮ネットワーク形成についての発生学的・解剖学的な知見は少なかった。本研究では、マウス全胚培養系・免疫染色系・3Dイメージング及び解析系を構築・駆使して、発生最初期に卵黄嚢での一次造血と、胚体での心血管形成に寄与する内皮前駆細胞群は分布・由来が異なり、後者は胚体 mesodermal wing で派生してSOX17陽性である事を明らかにした。報告者は本研究結果が、造血・心血管系内皮ネットワーク形成制御機構を解析するための重要な知的・技術的基盤となると考えている。

研究成果の概要(英文)：In the mouse development, primary hematopoiesis and cardiovascular formation proceed in conjunction with each other by connecting the vascular endothelial network, facilitating the circulation of blood cells from the yolk sac throughout the embryonic body. However, the details of this process are not well understood. In this study, I analyzed the process using whole mount immunohistochemistry and 3D imaging of genetically modified mice with laser confocal microscopy and light sheet microscopy. The results showed that SOX17-positive endothelial precursor cells appeared only in the mesodermal wings during the early phase of the embryo and contributed to the endocardium and the dorsal aorta, but not to primary hematopoiesis. These findings were presented at the 45th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan (2022) and the 56th Annual Meeting of the Japanese Society for Developmental Biologists (2023).

研究分野：発生学

キーワード：一次造血 心臓発生 内皮ネットワーク Sox17 マウス 3Dイメージング ライトシート顕微鏡 画像解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

心臓及び全身の血管系の最内層を構成する心内膜及び血管内皮は、血管径や配向する器官それぞれに特化した極めて多様な形態を有する。その機能障害も多様であり、病理病態が未解明の疾患も多い。研究代表者らは独自の先行研究において、心内膜に寄与する前駆細胞群での SRY 型転写因子 SOX17 の発現が、心臓形成に必須であることを明らかにした (Saba *et al.*, 2019)。中胚葉性の SOX17 陽性細胞は予定心臓領域外でも確認され (Engert *et al.*, 2009, 2013)、卵黄囊血島での一次造血、背側大動脈の内皮および成人型の二次造血を担う造血性内皮細胞に寄与する。Sox17 の欠損は、卵黄囊及び胚体での血管リモデリングの不全を生じさせる (Saba *et al.*, 2019; Lee *et al.*, 2014)。また、マウス初期胚の網羅的シングルセル遺伝子発現解析データからは、個々の細胞の解剖学的位置情報は含まないものの、中胚葉性 SOX17 陽性細胞群に発現プロファイルの多様性が存在することも判明した (Saba *et al.*, 2019; Chan *et al.*, 2018)。これらの結果は、SOX17 陽性内皮系前駆細胞群が同時期の異なる細胞外環境下で出現し、既に多様性を有していることを示している。しかし、初期胚におけるそれらの時空間的分布の詳細・多様性の分子生物学的特性とその制御機構・それらが胚体内外を繋ぐ血管網とその中を流れる血球細胞のネットワークへと統合されていく分化過程の動態は、多くが不明である。

## 2. 研究の目的

本研究は、マウス初期胚体の内外で同時多発的に出現する SOX17 陽性内皮前駆細胞群に着目し、1)マウス胚蛍光イメージングによりそれらの時空間分布様式と細胞外環境の多様性を明らかにすること、2)マウス胚 3D シングルセル発現プロファイリングによりそれらの遺伝子発現様式を明らかにすること、3)それらの多様性の制御機構をリポーターアッセイ及び ATAC-Seq により明らかにすること、4)細胞系譜解析により内皮ネットワーク形成機構を可視化することで、一次造血とその循環を担う心臓血管系内皮細胞ネットワーク形成過程の基盤を解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究は、以下の4つの実験項目を設定して進行した。

### 1)マウス胚蛍光イメージングによる Sox17 陽性内皮前駆細胞群の時空間座標アトラス作成。

中胚葉性 SOX17 陽性細胞群のマウス初期胚体内外での時空間分布様式を明らかにするため、*Mesp1*<sup>Cre</sup>、*Sox17*<sup>mCherry</sup>、*Rosa26*<sup>eYFP</sup> の遺伝子改変アレルを持つマウスを用いて全胚 3D 蛍光イメージングを行う。

### 2)マウス胚 3D シングルセル発現プロファイリングによる内皮前駆細胞群分化多様性を担う内外要因の同定。

既存のマウス初期胚からのシングルセルシーケンスデータ (Chan *et al.*, 2019; 他) を利用し、中胚葉性 SOX17 陽性細胞群に多様性を付与しうる候補遺伝子群を *in silico* で抽出する。これらについてマウス切片上で 3D シングルセルシーケンスを行い、同一切片上で数十個の遺伝子の発現様式をシングルセルレベルで取得する。

### 3)内皮前駆細胞群の分化多様性制御機構の解明。

実験項目 1, 2)の結果を基に、内皮前駆細胞群に分化多様性を与える遺伝子群の発現制御機構を、*in silico* での転写制御領域の解析、トランスジェニックマウスを用いた転写制御領域のレポーター解析、マウス胚のシングルセル ATAC-Seq 解析を行い多層的に解明する。

#### 4)内皮前駆細胞系譜のネットワーク形成過程の解明。

*Sox17<sup>CreErt2</sup>* と *Rosa26<sup>eYFP</sup>* アレルを持つ変異マウスを用いて時期特異的な SOX17 発現細胞系譜の追跡を行う。

### 4. 研究成果

上記の実験項目に従い、以下の結果を得た。

#### 1)マウス胚蛍光イメージングによる SOX17 陽性内皮前駆細胞群の時空間座標アトラス作成。

*Mesp1<sup>Cre/+</sup>/Sox17<sup>mCherry/+</sup>/Rosa26<sup>eYFP/+</sup>* マウス胎生(E)6.5-8.5 日胚を用いて全胚蛍光免疫染色を行い、中胚葉性 SOX17 陽性細胞群の出現をレーザー共焦点顕微鏡による 3D 画像を取得、解析した。その結果、最初期の SOX17 陽性内皮前駆細胞群は E7.75 胚体の前方中胚葉 mesodermal wing のみに出現する事が明らかとなった (図 1)。

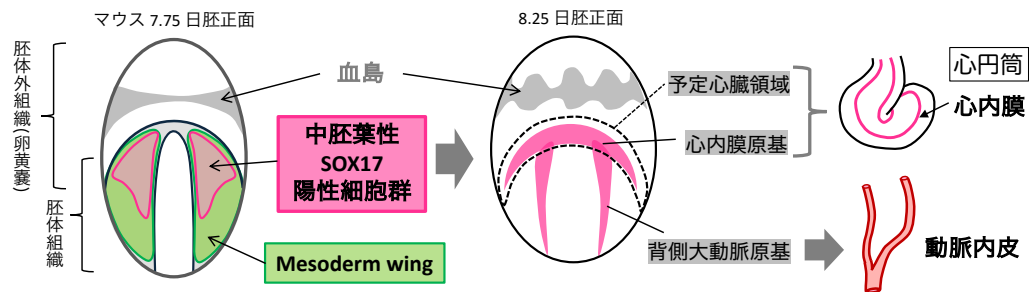


図1. マウス初期胚発生における中胚葉性 SOX17 陽性細胞群の分布と寄与部位。

#### 2)マウス胚 3D シングルセル発現プロファイリングによる内皮前駆細胞群分化多様性を担う内外要因の同定、及び 3) 内皮前駆細胞群の分化多様性制御機構の解明。

既存のシングルセルシーケンスデータ(Mouse Gastrulation Data, MGD; Pijuan-Sala *et al.*, 2019)を用い、E7.0-8.5 胚での胚体内外で出現する Sox17 陽性・陰性内皮前駆細胞群の発現様式を *in silico* で解析し、それらの多様性を分類した (図 2)。

当初、発生過程でのそれらの分布及び発現制御機構を項目 2)3D シングルセルシーケン

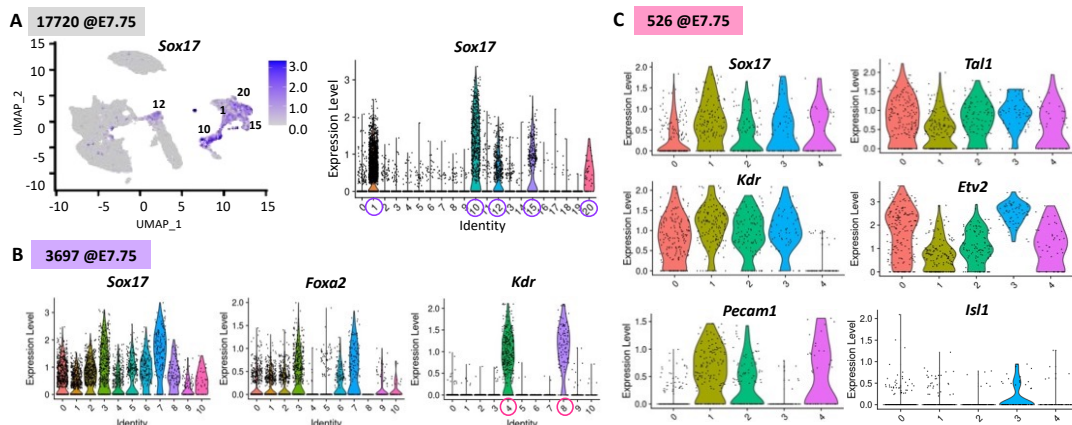


図2. 胎生 7.75 日胚 MGD からの Sox17 陽性内皮・心内膜前駆細胞群の抽出。

A) MGD (Mouse Gastrulation Data, Pijuan-Sala *et al.*, 2019) と Seurat package を用い、E7.75 日胚 17720 細胞を PCA 解析により 21 群に分類した。Sox17 陽性細胞群の分布を UMAP で示している(左)。バイオリンプロット(右)から、#1, 10, 12, 15, 20 (3697 細胞)を Sox17 陽性細胞とした。B) 3697 細胞のサブクラスターリング。11 群から Kdr 陽性の #4, 8 (526 細胞)を血管内皮・心内膜前駆細胞群とした。C) 526 細胞は内皮細胞及び心臓前駆細胞のマーカー遺伝子群の発現多様性から 5 群に分けられる。

スと 3)ATAC-Seq により解析・検証する予定であった。しかし項目 1)で得られた結果から、それぞれの内皮前駆細胞集団を時期及び部位特異的に標識して追跡することが可能であると考え、シーケンス解析を中断し、細胞系譜解析に重点を置いた 4)の実験計画を進行することとした。

#### 4)内皮前駆細胞系譜のネットワーク形成過程の解明。

マウス初期胚全胚培養系を構築し、*Sox17*<sup>CreErt2/+</sup>/*Rosa26*<sup>eYFP/+</sup> マウス胚培養下でのタモキシフェン投与による *Sox17* 発現細胞系譜解析を、ライトシート顕微鏡を用いた 3D イメージングにより行った。その結果、E7.75 に出現する中胚葉性 *Sox17* 陽性細胞群は、心内膜・背側大動脈形成のみに寄与し、卵黄囊での一次造血には寄与しないことが明らかとなった(図 1)。胚体内外の異なる部位で派生した内皮前駆細胞の出現時期とその寄与部位を更に詳細に解析するための、新たな遺伝子改変マウス *Mesp1*<sup>CreErt2</sup> を作成中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Rie Saba, Shinichiro Sakaki, Satoshi Inoue, Hideya Yamazaki, Kei Yamada, Kenta Yashiro
2. 発表標題 Spatio-temporal distribution of the mesodermal SOX17-expressing cells in the early phase of the mouse development
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Rie Saba, Shinichiro Sakaki, Satoshi Inoue, Hideya Yamazaki, Kei Yamada, Kenta Yashiro
2. 発表標題 SOX17-expressing cells in the mesodermal wing contribute to the endocardium and vascular endothelium in the mouse development
3. 学会等名 第56回日本発生生物学会年会
4. 発表年 2023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)		
研究協力者	山崎 秀哉  (Yamazaki Hideya)		

6. 研究組織（つづき）

	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	山田 恵  (Yamada Kei)		

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ドイツ	Helmholtz Zentrum Munchen			