

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570250

研究課題名(和文) マウス胎生中期の造血発生における Sox17 ファミリータンパク質の役割

研究課題名(英文) Role of Sox17 family proteins in hematopoiesis at midgestation of mouse embryos

研究代表者

信久 幾夫 (NOBUHISA, Ikuo)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号：40332879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000 円、(間接経費) 1,260,000 円

研究成果の概要(和文)：マウスの発生過程で最初に造血幹細胞を認める胎生10.5日胚の大動脈-生殖原基-中腎領域において、造血幹細胞の発生に関わる血管内皮細胞に隣接する血液細胞塊の細胞に、転写因子Sox17および同じファミリータンパク質Sox7とSox18転写因子の発現を認めた。そこで、Sox17を血液細胞塊の細胞に強制発現すると、長期造血再建能をもつ造血幹細胞を含む血液細胞塊を *in vitro* で多数得ることが出来た。さらに、Sox17強制発現細胞よりSox17の発現を消失させると血液細胞への分化誘導が起きた。これらより、Sox17ファミリータンパク質はAGM領域における血液細胞塊の維持に必要であることを示した。

研究成果の概要(英文)：During mouse development, definitive hematopoiesis is first detected in the aorta-gonad-mesonephros (AGM) region at around embryonic day 10.5 (E10.5), which exhibits intra-aortic cell clusters (IACCs). These clusters are known to contain hematopoietic stem cells (HSCs). It is unclear how the cells in such clusters maintain their HSC phenotype. We found that a transcription factor, Sox17, and other SoxF-group (SoxF) proteins, Sox7 and Sox18, were expressed in E10.5 IACCs. Overexpression of any of these SoxF proteins in IACCs led to consistent formation of cell clusters *in vitro* during several passages of cocultures with stromal cells. Sox17-transduced cells retained a long-term bone marrow reconstitution activity *in vivo*. Shutdown of exogenously introduced Sox17 gene expression resulted in immediate hematopoietic differentiation. These results indicate that SoxF proteins, especially Sox17, contribute to the maintenance of cell clusters containing HSCs in the midgestation AGM region.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・発生生物学

キーワード：Sox17 AGM hematopoiesis

## 1. 研究開始当初の背景

(1) マウスにおける造血発生において、放射線照射を施して造血組織を破綻させたマウスへの移植により長期に渡って再建能を持つ「造血幹細胞」は、胎生 11 日に大動脈-生殖原基-中腎 (AGM) 領域で最初に認められる。この AGM 領域では、血液細胞と血管内皮細胞の共通の幹細胞から血液発生が起きることが、造血幹細胞と考えられている血管内皮細胞に隣接する細胞塊が血管内皮細胞にのみ取り込まれる色素の取り込みを認めること、あるいは、この細胞塊が血管内皮細胞のマーカー (VE-Cad) および血液細胞のマーカー (CD45) を発現していることなどから示されていた。

(2) 今回注目する内胚葉マーカータンパク質である Sox17 は High mobility group (HMG)-box と呼ばれる DNA 結合ドメインを有する転写因子であり、遺伝子欠損マウスは著しい成長遅延のため胎生 9 日までに致死となる。最近、Sox17 をコンディショナルに遺伝子欠損させるマウスを用いた研究より、出生直前および新生仔期においては造血幹細胞の細胞周期が停止期にとどまらず造血幹細胞数が減少し致死となるが、一方で、成体においては Sox17 の欠損を誘導しても造血幹細胞数および造血能について影響を受けないことが報告された (Kim et al., *Cell*, 130: 470-483, 2007)。しかしながら、AGM 領域における造血に関する研究および Sox17 の分子基盤についての解析はなされていなかった。

(3) 準備研究として、胎生中期の AGM 領域における Sox17 の発現を解析すると、血管内皮細胞および血管内皮細胞に隣接する細胞塊、とりわけ血管内皮細胞に接する細胞において発現を認めた。そこで、申請者が見出した AGM 領域で認める未分化血液細胞である CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>high</sup> 細胞にレトロウイルスを用いて Sox17 を強制発現すると、ストローマ細胞との共培養で CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>high</sup> 細胞が好中球および顆粒球へと分化する培養条件下においても、未分化な血球細胞が細胞塊状に増殖するという結果を得た。また、Sox17 を標的とした short hairpin (sh) RNA を CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>+</sup> 細胞に導入すると維持される未分化血球細胞の量が低下した。以上の準備研究から、Sox17 の発現量と細胞の未分化性に相関があることを示し、Sox17 が AGM 領域の造血にも関わることが強く示唆される。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、内胚葉のマーカー蛋白質で転写因子として知られている Sox17 が、中胚葉である長期造血再建能を持つ造血幹細胞

を生み出す AGM 領域において血管内皮細胞と血液細胞の共通の起源細胞より造血幹細胞への運命付けにどのような関わりを持つかを解析することにある。

## 3. 研究の方法

(1) 妊娠 10 日目のマウスより胎仔を得て、AGM 領域を顕微鏡下で回収した。酵素消化、抗体反応後、フローサイトメトリーを用いて、未分化血液細胞である CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>high</sup> 細胞を単離し、レトロウイルスを用いて Sox17 およびそのファミリー分子あるいは shRNA を GFP と共に導入、ストローマ細胞である OP9 細胞と共に、Stem cell factor (SCF)、Interleukin-3 (IL-3)、Oncostatin M (OSM) の増殖因子の存在下で培養を行った。4 日培養後、遺伝子導入が起きた GFP 陽性細胞に注目し、形態を観察、またフローサイトメトリーを用いて回収後、再びストローマ細胞との共培養または半固形培地で培養を行い、in vitro における造血能を判定した。

(2) Sox17 導入により生じた細胞塊内に長期造血再建能を示す造血幹細胞が存在するかについての評価は、定法に従い、Ly5.2 抗原を発現するマウスより得た未分化細胞を用いて Sox17 導入細胞塊を作製し、致死量放射線照射を施した Ly5.1 抗原を発現するマウスの骨髄内に移植を行った。Sox17 を導入した細胞を、移植後 4、8、12 週の末梢血を解析し移植の成立を確認した後に、移植後 3 ヶ月後のレシビエントの体内に於いて、各分化マーカーを発現する細胞の中で移植時に GFP 陽性細胞がどの程度存在するかをフローサイトメトリーで評価した。また、Sox17 導入細胞を移植したマウスより骨髄を回収し、さらに致死量放射線照射を施したマウスに対して、二次移植を行った。

## 4. 研究成果

(1) マウス胎生中期の AGM 領域で認める未分化血液細胞である CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>high</sup> 細胞に Sox17 を強制発現することより得られた細胞塊について、単一細胞の分離による細胞塊の形成などの解析から、単一細胞より細胞塊を形成することを認めた。また、Sox17 導入の細胞塊は、in vitro において少なくとも 8 回継代しても、細胞塊形成能および未分化性が保たれた。

(2) Sox17 導入により得られた細胞塊について抗体染色を行うと、血管内皮細胞のマーカー (CD31) および c-Kit が細胞塊の一部の細胞で強く発現していた。さらに、造血幹細胞の指標である Side population (SP) 細胞について解析すると、Sox17 発現細胞塊では SP を認め、さらに継代を重ねても SP が維持された。

(3) Sox17 導入により得られる細胞塊形成に

必要な液性因子を検討すると、Thrombopoietinの重要性を示した。

(4) Sox17と同じファミリーに属するSox7とSox18について胎生期のAGM領域における発現の検討を行うと、胎生10.5日胚AGM領域において、大動脈の血管内皮細胞と隣接する血液細胞の細胞塊に発現を認めた。そこで、Sox7とSox18をAGM領域の未分化血球細胞に強制発現すると、やはり未分化性の高い細胞塊を生じた。加えて、異なるファミリー分子Sox9とSryを強制発現しても細胞塊は得られなかった。以上の結果より、SoxFファミリーの強制発現のみで未分化性の高い細胞塊が形成された。

(5) Sox17の強制発現の有無による2つの細胞集団の発現プロファイルについてマイクロアレイを用いて解析を行った。

(6) あらかじめloxP配列で挟んだSox17遺伝子をGFP遺伝子と共にAGM領域の未分化血球細胞に強制発現することにより得られた未分化性を高く保持した血液細胞塊において、Cre遺伝子をmCherry遺伝子と共に導入を行った。GFP遺伝子およびmCherry遺伝子共陽性の細胞すなわち、Sox17の遺伝子発現を停止した細胞について解析を行うと、Sox17強制発現で認めた未分化性の維持が認められなくなり分化が進行することが明らかとなった。以上の結果よりSox17の発現量と血液細胞の未分化性に相関があることが示唆された。

(7) 今までAGM領域の未分化血球細胞にSox17遺伝子を強制発現した細胞がin vitroにおいて造血能が高く保持することを示した。そこで、致死量の放射線照射を施したマウスの骨髄内にSox17遺伝子強制発現細胞を移植して、長期造血再建能について検討を行った。その結果、Sox17遺伝子を導入しない細胞で同様な移植を行ったときに認めない長期造血再建能を、Sox17強制発現細胞においては認めることが出来た。さらに移植する細胞数依存的に、骨髄内における移植した細胞の割合が高くなることを明らかとした。以上の結果よりSox17強制発現細胞が長期造血再建能を保持することを示した。

(8) Sox17強制発現細胞より得たSox17免疫沈降物より増幅したPCR産物について、遺伝子のプロモーター領域を集めたチップに対するマイクロアレイ解析を行い、Sox17が作用する遺伝子の同定を行った。

(9) Sox17強制発現細胞を移植したマウスの骨髄細胞を用いて、致死量放射線照射を施したマウスに二次移植を行った。その結果、二

次移植を行ったマウスは移植後40日以内に死亡し、コントロール群に比べて脾臓の重量が2.2倍増加していた。さらに、common myeloid progenitor(CMP)が、二次移植マウスの骨髄内において増殖していることを示した。このことより、Sox17を長期にわたり発現すると細胞に対して悪影響を及ぼすことが考えられる。

(10) Sox17と同じファミリーに属するSox18欠損マウスのAGM領域により得られた未分化血液細胞に対して、Sox17および同じファミリー分子であるSox7を標的としたshort hairpin (sh) RNAを導入すると、in vitroにおいて造血能の低下を見出した。このことは、Sox17およびSox7の発現が、通常のAGM領域での血液発生においても必要であることを示す。

(11) 胎生中期のAGM領域より得た血管内皮細胞を、フローサイトメトリーにより分収し、Sox17を強制発現すると、コントロールで認める血液細胞の産生が著しく阻害され、血管内皮細胞様の細胞を多数認めた。この結果より、Sox17が血管内皮細胞に対して発現量が多い時は血管内皮細胞の増殖が起き、Sox17の発現量が低下すると血液細胞が分化することが明らかとなった。血管内皮細胞より分化した血液細胞について、Sox17の発現量を維持すると未分化性が維持されることから、AGM造血においてSox17の発現量と血液細胞および血管内皮細胞の運命決定に対する関係性が強く示唆される。

(12) 以上の結果に基づき、今後は血液細胞塊および造血幹細胞を産生・維持する分子機構についてSox17およびSox17により発現が誘導される候補遺伝子に注目して解析を行う。また、Sox17導入によりin vitroにおいて造血幹細胞を維持・増幅出来るか、および長期造血再建能を認めない未分化血液細胞にSox17を導入することより長期造血再建能を獲得できるか検討する予定である。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計4件)

Nobuhisa I, Osawa M, Uemura M, Kishikawa Y, Anani M, Harada K, Takaki H, Saito K, Kanai-Azuma M, Kanai Y, Iwama A, Taga T. Sox17-mediated maintenance of fetal intra-aortic hematopoietic cell clusters. *Mol. Cell. Biol.* 査読有, in press  
Uemura M, Ozawa A, Nagata T, Kurasawa K, Tsunekawa N, Nobuhisa I, Taga T,

Hara K, Kudo A, Kawakami H, Saijoh Y, Kurohmaru M, Kanai-Azuma M, and Kanai Y. Sox17 haploinsufficiency results in perinatal biliary atresia and hepatitis in C57BL/6 background mice. **Development**. 査読有, 140(3), 2013, 639-48. doi: 10.1242/dev.086702.

**Nobuhisa I**, Yamasaki S, Ramadan A and Taga T. CD45<sup>low</sup>c-Kit<sup>high</sup> cells have hematopoietic properties in the mouse aorta-gonad-mesonephros region. **Exp. Cell Res**. 査読有, 318(6), 2012, 705-715, doi:

10.1016/j.yexcr.2012.01.017.

Yamasaki S, **Nobuhisa I**, Ramadan A. and Taga T. Identification of a yolk sac cell population with hematopoietic activity in view of CD45/c-Kit expression. **Develop. Growth Differ**. 査読有, 53(7), 2011, 870-877. doi: 10.1111/j.1440-169X.2011.01293.x.

[学会発表](計11件)

**信久幾夫**、大澤光次郎、原田果歩、Maha Anani、齋藤清香、高木春奈、岩間厚志、田賀哲也。Analysis of recipients transplanted with the bone marrow cells of Sox17-transduced cells-transplanted mice. 第42回日本免疫学会学術集会 2013年12月11-13日 千葉

**信久幾夫**、大澤光次郎、上村麻実、原田果歩、Maha Anani、齋藤清香、高木春奈、金井正美、金井克晃、岩間厚志、田賀哲也。Introduction of Sox17 in the aorta-gonad-mesonephros-derived hematopoietic cells leads to increased common myeloid progenitors in transplanted mice. 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月3-6日 神戸

原田果歩、**信久幾夫**、Maha Anani、齋藤清香、田賀哲也。Thrombopoietin contributes to formation and maintenance of hematopoietic progenitor cell-containing cell clusters in the aorta-gonad-mesonephros region. 第36回日本分子生物学会年会 2013年12月3-6日 神戸

**信久幾夫**。Maintenance of immature phenotype of the hematopoietic cell clusters in the aorta-gonad-mesonephros region by Sox17. The 8th International Symposium of the Institute Network.

2013年6月27-28日 京都

**信久幾夫**、大澤光次郎、上村麻実、岸川陽子、Maha Anani、原田果歩、高木春奈、金井正美、金井克晃、岩間厚志、田賀哲也。Sox17 protein-mediated maintenance of cells with stem cell phenotype in the hematopoietic cell clusters in the fetal AGM region. 第11回幹細胞シンポジウム 2013年5月17-18日 東京

**信久幾夫**、大澤光次郎、上村麻実、岸川陽子、Maha Anani、原田果歩、高木春奈、金井正美、金井克晃、岩間厚志、田賀哲也。Hematopoietic cell clusters present in the aorta-gonad-mesonephros region exhibited long-term repopulating ability by Sox17-expression. 第35回日本分子生物学会年会 2012年12月11-14日 神戸

**信久幾夫**、大澤光次郎、原田果歩、高木春奈、岩間厚志、田賀哲也。Hematopoietic cell clusters from the aorta-gonad-mesonephros region exhibited long-term repopulating ability by overexpression of Sox17. 第41回日本免疫学会学術集会 2012年12月5-7日 神戸

**信久幾夫**、大澤光次郎、上村麻実、岸川陽子、Maha Anani、原田果歩、高木春奈、宮東明彦、金井正美、金井克晃、岩間厚志、田賀哲也。SOX-F FAMILY PROTEINS HAVE ROLES IN THE MAINTAINANCE OF IMMATURE PHENOTYPE OF THE HEMATOPOIETIC CELL CLUSTERS IN THE AORTA-GONAD-MESONEPHROS REGION OF MOUSE EMBRYOS. The 10<sup>th</sup> Annual Meeting of International Society for Stem Cell Research. 2012年6月13-16日 横浜

**信久幾夫**、岸川陽子、上村麻実、Maha Anani、金井正美、金井克晃、田賀哲也。Maintenance of immature phenotype of the hematopoietic cell clusters in the aorta-gonad-mesonephros region by SoxF family proteins. 第34回日本分子生物学会年会 2011年12月13-16日 横浜

**信久幾夫**、岸川陽子、Maha Anani、田賀哲也。SoxF family proteins have roles in maintenance of immature phenotype of hematopoietic progenitors in the aorta-gonad-mesonephros region. 第40回日本免疫学会学術集会 2011年11月27-29日 千葉

**信久幾夫**、岸川陽子、上村麻実、Maha Anani、Gomaa Ahmed、金井正美、金井克

晃、田賀哲也. Role of SoxF family proteins in the maintenance of immature phenotype of hematopoietic progenitors in the aorta-gonad-mesonephros region. 第9回幹細胞シンポジウム 2011年5月13-14日 東京

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.tmd.ac.jp/mri/scr/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

信久 幾夫 (NOBUHISA, Ikuo)

東京医科歯科大学・難治疾患研究所・准教授

研究者番号: 40332879