

氏 名 坂口 あかね

学位(専攻分野) 博士(理学)

学位記番号 総研大甲第 1955 号

学位授与の日付 平成29年9月28日

学位授与の要件 生命科学研究科 遺伝学専攻
学位規則第6条第1項該当

学位論文題目 A lineage study for cardiac conduction system in mice

論文審査委員 主 査 教授 城石 俊彦
教授 岩里 琢治
教授 澤 斉
教授 平田 たつみ
特任准教授 八代 健太 大阪大学

Summary (Abstract) of doctoral thesis contents

The heart is an essential organ for blood circulation to whole body via keeping heart beats with constant rhythm. The rhythm is produced by electric stimulation generated autonomously in the cardiac conduction system (CCS). The defects of CCS induce severe cardiac disease called cardiac arrhythmia. Popular therapies for the disease are the implantation of pacemakers and catheter ablation, but the quality of life of the patients is limited with these methods. For this reason, establishing a new therapy by transplantation of CCS cells is expected. However, the method is not established yet because the origin and developmental process of CCS cells have not been understood well.

The CCS is composed of special cardiomyocytes called pacemaker cells and Purkinje cells. Pacemaker cells in the sinoatrial node (SAN) and the atrioventricular node (AVN) can produce electric stimulation and the stimulation is expanded to all cardiac chambers via Purkinje cells. Although CCS cells are a kind of cardiomyocyte, its developmental process is different from the myocardium based on the previous lineage tracing study using *Mesp1*-Cre. Even though *Mesp1* lineage contributes to almost all cardiac components derived from the cardiac crescent, the CCS was not derived from the *Mesp1* lineage. On the other hand, cell tracking analyses by dye labeling using mouse and chick embryos implied that progenitor cells of CCS are localized in the caudal-lateral parts of the cardiac crescent. Based on these studies, I hypothesized that CCS progenitor cells can be identified by specific marker genes which are expressed on the cardiac crescent.

As a candidate gene possibly marking early CCS progenitor cells, I focused on the *Secreted-frizzled related protein 5* (*Sfrp5*) gene. *Sfrp5*-venusYFP (vYFP) knock-in (KI) mice revealed that the expression of vYFP was observed in the cardiac crescent stage and gradually restricted to the CCS in the four-chambered heart stage. It suggests that *Sfrp5* is continuously expressed in CCS lineages during development. In order to trace the lineage of *Sfrp5*, I generated Cre and CreERT2 KI mice in the *Sfrp5* locus. The lineage tracing analysis using *Sfrp5*-Cre mouse revealed that the descendants differentiated into many cardiac components including the CCS in all the chambers except for myocardium in the right ventricle. Furthermore, the lineage tracing analysis using *Sfrp5*-CreERT2 mouse indicated that the *Sfrp5* expressing cells at embryonic day (E) 7.5 contributed to the CCS. This result indicated that *Sfrp5* could mark CCS lineages much earlier than *Hcn4*, which is known as a CCS lineage marker gene and can mark CCS lineages only after E9.5. However, *Sfrp5* is not a specific marker for CCS progenitor cells. Therefore, next I focused on the difference of the contribution between *Mesp1* and *Sfrp5* lineages. In order to trace the cell lineage simultaneously in a single embryo, I established *Mesp1*-Cre/*Sfrp5*-Dre

(別紙様式 2)

(Separate Form 2)

and *Mesp1-Dre/Sfrp5-CreERT2* mice. Double lineage tracing analyses using *Mesp1-Cre/Sfrp5-Dre* mice showed that major parts of SAN head and Purkinje cells were derived from the cells once expressed *Sfrp5* but not *Mesp1* (*Mesp1*-negative/*Sfrp5*-positive cells), and the analyses using *Mesp1-Dre/Sfrp5-CreERT2* mice confirmed that the *Mesp1*-negative/*Sfrp5*-expressing cells at E7.5 contributed to the SAN. To observe these cells at E7.5, I crossed *Mesp1-Cre* mouse with CAG-floxed-CAT-mCherry/*Sfrp5*^{v/v} mice, and found that *Mesp1*-negative/*Sfrp5*-expressing cells were frequently observed on the posterior side of the cardiac crescent, implying that the area is the candidate that includes CCS specific progenitor cells. To further restrict the CCS progenitors, I conducted lineage tracing analyses focusing on the *T-Cre* lineage that marks more posterior mesodermal cells than the *Mesp1-Cre* lineage. The lineage contribution was observed in the SAN and Purkinje cells, but not in the AVN. Furthermore, double lineage tracing analyses of *Mesp1-Dre* and *T-Cre* showed that a few *Mesp1*-negative/*T*-positive cells observed on the posterior cardiac crescent are strong candidates for SAN progenitors.

In conclusion, based on the lineage tracing analyses using different combinations of three markers, I found that SAN and Purkinje cells but not AVN were derived from a common origin. I expect that isolating the progenitor cells of each CCS components using these three markers should enable us to identify differentially expressed genes and help us to understand the developmental process of each CCS components. In addition, I showed that almost all differentiated cells except for the CCS lost the expression of *Sfrp5*, implying that SFRP5 has an important role for CCS cell development. Further analyses focusing on the function of SFRP5 would help in elucidating the molecular mechanism of CCS development.

Summary of the results of the doctoral thesis screening

心臓の刺激伝導系 (CCS) は、特殊な心筋細胞から構成されるネットワークであり、洞房結節 (SAN) と房室結節 (AVN) からプルキンエ細胞へと電気刺激が供給され、そのネットワークを通じて電気刺激が心臓全体へと広がることで心筋が収縮する。CCS の発生過程は他の心筋とは異なることが知られているが、初期前駆細胞の特異的マーカーが未同定なため、その発生系譜の詳細は不明であった。そこで、坂口さんは、CCS の初期前駆細胞のマーカー遺伝子を同定し、その起原と細胞系譜を明らかにすることを目的に研究を行った。

坂口さんは、心臓形成に働く Wnt シグナル伝達系の阻害因子である *Sfrp5* に着目した。まず、*Sfrp5*-venusYFP ノックインマウスや *Sfrp5*-CreERT2 マウスの発生胚を用いた詳細な細胞系譜追跡を行い、受精後 7.5 日胚 (E7.5) にみられる三日月状の心原基で *Sfrp5* を発現している細胞は、右心室以外の心臓の構造に寄与し、*Sfrp5* の発現を継続したままの細胞が心臓発生と共に CCS へと限局してゆき、心筋を含む CCS 以外の細胞では *Sfrp5* の発現が分化とともに消失することを見いだした。この実験から、*Sfrp5* 単独では CCS 特異的な前駆細胞のマーカーとはならないことが明らかとなった。そこで、E7.5 の *Sfrp5* 発現細胞に含まれる CCS 初期前駆細胞を同定するため、CCS へとは分化しないことが強く示唆されてきた心筋細胞系譜のマーカー遺伝子である *Mesp1* の発現履歴をもつ細胞特異的に蛍光タンパク質を発現する新たなマウスを作製し、二重系譜追跡を行った。その結果、E16.5 において SAN の中央部にある SAN head 部位の多くの細胞が、*Mesp1* 発現の履歴を持たない *Sfrp5* 陽性細胞由来であること、また、E7.5 における *Mesp1* 発現履歴陰性かつ *Sfrp5* 発現陽性細胞が三日月状心原基の尾部側(後方)に多く存在することを発見した。従って、これらの三日月状心原基の尾部側に存在する細胞が SAN の head 部位と一部のプルキンエ細胞の起源である可能性が示唆された。さらに、E6.5 の初期中胚葉から胚の尾部側に発現している *T* 遺伝子に着目して、詳細な二重系譜追跡を行ったところ、三日月状心原基上では *T* 発現細胞由来かつ *Sfrp5* 発現陽性細胞が、*Mesp1* 発現細胞由来の *Sfrp* 発現陽性細胞よりもさらに尾部側に集中して観察され、それらの *T* 陽性細胞が AVN を除く CCS へと寄与することが明らかとなった。以上の結果から、三日月状心原基の尾部側の一部に、AVN 以外の CCS へと分化する初期前駆細胞が存在することが示された。

本研究では、*Mesp1*, *T*, *Sfrp5* の三種類の遺伝子の組み合わせが、CCS のうち SAN とプルキンエ細胞への細胞系譜の特異的マーカーとなり得ることを示し、巧妙な二重細胞系譜追跡により三日月状心原基の尾部側のごく一部に存在する、*Mesp1* 発現履歴陰性で *T* 発現履歴陽性かつ *Sfrp5* 発現陽性細胞が AVN を除く CCS の初期前駆細胞である可能性を明らかにした。この成果は、全く不明のままであった SAN の起原を明らかにし、かつ原条内の解剖学的位置関係と将来の心臓内における CCS の分布の関係の新しいモデルを提示することで、今後、CCS 発生過程の全貌を解明するための重要な基盤を与えるものである。

(別紙様式 3)

(Separate Form 3)

以上から、本審査委員会は、本研究は総研大の学位を授与する水準に十分に達していると判断した。