120 造血器腫瘍における骨髄微小環境再構築の制御因子探索

神戸医療産業都市推進機構 先端医療研究センター 血液・腫瘍研究部　林　康貴

【目的】骨髄異形成症候群（MDS）などの造血器腫瘍において、骨髄ニッチの変化は腫瘍特有の病態の維持に重要な役割を果たしている。我々はこれまでの研究においてMSCマーカーの一つであるLeptin receptor遺伝子高発現（Lepr-high）亜集団が造血不全等の病態に鍵となる役割を果たすことを明らかにした。しかしMSCの異常が造血不全を引き起こす機序についての理解は不十分である。そこで、本研究ではMDSモデルマウス由来MSCの単一細胞マルチオーム解析によりニッチ機能の制御機構を解明することで、MDSにおけるMSC制御と病態をつなぐ経路を同定することを目的とする。

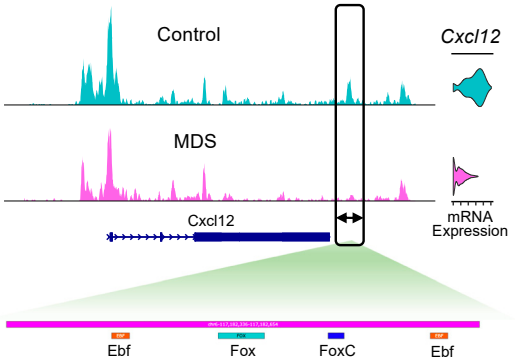
【方法】本研究では、同種骨髄移植により作製したMDSモデルマウスを用い、同マウスの骨髄からフローサイトメーターを用いて採取した $Cd45^{-}Ter119^{-}Cd31^{-}Cd140a^{+}Cd51^{+}$間葉系幹細胞（MSC）の解析を行う。まず単一細胞マルチオーム解析技術により、遺伝子発現とクロマチン状態を同時に評価する。これにより各MSC亜集団の遺伝子発現変動と相関するクロマチン状態の変化を明らかにする。また腫瘍によりアクセシビリティが変化するクロマチン領域の制御因子を、モチーフ解析等から推定し、同領域とその制御因子がニッチ機能に与える影響を *in vitro* 実験にて検証する。

【結果】まずRNAとATACデータを用いてクラスタリングを行い、これまでの研究同様にMSCの骨芽細胞系列への分化抑制が再現されることを確認した。またLepr-high MSC亜集団においては、サンプル間で特に顕著なクロマチン変動が観察された。そこで同亜集団においてコントロールとMDSの間でGene Set Enrichment Analysis（GSEA）を行ったところ、骨芽細胞系列への分化経路やケモカイン産生制御経路がMDSにおいて低下しており、分化抑制に伴うニッチ因子の産生低下により造血支持機能が抑制されることが示唆された。次にLepr-high MSC亜集団において造血支持能が低下するような遺伝子発現変動が起こる機序を調べるため、MDSにおける現低下と相関するクロマチン領域を探索し、さらに有意にアクセシビリティが低下するDNA領域に着目してモチーフ解析を行った。これらの領域には、ニッチ因子発現が特に高いMSC亜集団であるCxcl12-Abundant Reticular（CAR）細胞維持に不可欠とされるEbf1/3やFoxC1といった転写因子モチーフが濃縮されており（Omatsu et al. Nature 2014, Seike et al. Genes Dev 2018）、また特に顕著なクロマチン変動を認めたCxcl12下流のDNA領域には、FoxC1とEbf1/3モチーフが見られた。加えてこれらの転写因子遺伝子発現は、MDSにおいて顕著に低下していた。そこでMSCにおいてEbf1/3やFoxC1遺伝子をノックアウトしたところ、FoxC1ノックアウト時にCxcl12下流の同領域のクロマチンアクセシビリティ低下を認めた。さらにCRISPR-Cas9システムを利用して同DNA領域を削除したMSCを作製し、Cxcl12遺伝子発現を検討したところ、コントロールに比べて発現が低下傾向にあり、FoxC1による同領域を介した発現調節機構の存在が示唆された。

【発表】

1）　2024年11月　第47回日本分子生物学会年会、ポスター発表

2）　2024年10月　第19回生命医科学研究所ネットワーク国際シンポジウム、ポスター発表



LepR-high MSC亜集団におけるCxcl12下流のアクセシビリティとモチーフ