

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：12602

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15414

研究課題名（和文）脱細胞化骨を用いた、新しい人工ヒト骨髄およびヒト骨髄異形成症候群モデルの作成

研究課題名（英文）Establishment of human bone-marrow microenvironment model using Decellularized bone

研究代表者

大西 威一郎 (Ichiroh, Onishi)

東京医科歯科大学・東京医科歯科大学病院・助教

研究者番号：70750214

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：脱細胞化骨を用いてマウス体内での人工ヒト骨髄組織の構築モデルの作製を目的とした。ヒト骨髄間葉細胞株にCRISPR activation libraryや CRISPR Knock Out libraryによりランダムかつ網羅的な遺伝子変異を導入し、骨と共培養したところ、骨内浸潤因子としてSHC4 upregulation, SRRM4 ノックアウト (KO) を同定した。SHC4 upregulation とSRRM4 KO細胞株の機能について、増殖能に有意な差はなかったが、いずれも遊走能の亢進、足場非依存的増殖が確認できた。これにより、脱細胞化骨への侵入に有利に働いたと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、CRISPR Activation libraryとKnock Out libraryを導入することでUE7T-9の脱細胞化骨への新規侵入因子として、SHC4遺伝子の過剰発現、SRRM4 KOを同定した。脱細胞化骨に進展する因子を同定したことで、今後新たなin vivoヒト骨髄モデル、疾患モデルの構築を十分に遂行可能と考えており、ヒト造血微小環境の解析、造血メカニズム、間質細胞の遺伝子異常による白血病発症メカニズムなどの解析が、飛躍的に進むものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：We successfully transplant human bone marrow mesenchymal stem cell-line, to decellularized bone using CRISPR library. We identified SRRM4 knock out and SHC4 upregulation as bone protrusion factor.

SHC4 overexpression and SRRM4 knock out improved cell migration, and invasion to decellularized bone. Establishment of complete SRRM4 knock out cell line was difficult, but half knock out cell line protrudes into bone trabeculae.

研究分野：実験病理学

キーワード：脱細胞化骨 骨髄間葉系幹細胞株 CRISPR library

※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と目的

造血幹細胞は、骨髄微小環境内で骨髄間葉幹細胞との相互作用により、分化と増殖が維持されている。急性白血病や骨髄異形成症候群の一部では、骨髄微小環境内での造血幹細胞と、遺伝子異常を有する骨髄間葉幹細胞の相互作用が、造血細胞の腫瘍化を誘導している可能性が示唆されている<sup>1)</sup>。また、*DICER1* などの遺伝子変異と骨髄異形成症候群との関連も報告されている<sup>2)</sup>。骨髄異形成症候群は、病態が多岐にわたり、しばしば急性骨髄性白血病に移行する。高齢者で発症することが多く、高齢化に伴い、患者数の増加が想定される。

骨髄微小環境の詳細な解析のためには、実験動物体内で検証可能なヒト骨髄微小環境を反映した *in vivo* モデルが必要であるが、今現在有効なモデルは構築されていない。

一方で、本学生体材料研究所では、ブタ肋骨に高い静水圧をかけることにより、脱細胞化骨が開発された。脱細胞化骨をラットの皮下に移植すると免疫反応は生じず、脱細胞化骨内に造血組織が構築された<sup>3)</sup>。そこで、脱細胞化骨にヒト骨髄間葉系細胞株を移植前に生着させ、マウス皮下に移植することで、マウス体内での人工ヒト骨髄組織の構築、新しいヒト白血病発症骨髄モデルの作製が可能ではないかと考えた。本研究では、脱細胞化骨へのヒト骨髄間葉系細胞株の導入実験及び同定した遺伝子変異を導入した細胞の機能評価を目的とした。

## 2. 研究方法と結果

### ① CRISPR activation library および knock out library の導入と責任遺伝子の同定

本研究では、ヒト骨髄由来細胞 UE7T-9 を用いた。

単純に、脱細胞化骨と細胞株を共培養するのみでは骨内への進展が確認できなかったため、CRISPR activation library (SAM library) および knock out library (GeCKO v2 library) を導入した。既報告<sup>4)</sup>と同様に、Lipofection にて HEK293T 細胞より Lentivirus vector を作製し、Infection により UE7T-9 細胞に各 CRISPR library を導入した。抗生剤による selection 後に、脱細胞化骨と3週間共培養した。3週間後、10%中性緩衝ホルマリンで1日固定し、EDTA 溶液 (Pharma) で1日脱灰した。パラフィン包埋切片を作製し、未染標本上で骨の表面部分をマクロダイセクション後、DNA を抽出し、gRNA 部分を PCR により増幅し、PCR 産物を Zero Blunt TOPO ベクターに導入し、大腸菌に導入した。形成されたそれぞれのコロニーについて、mini-prep を行い、DNA 配列解析 (サンガー法) にて gRNA に対応する遺伝子変異を同定した。実験の流れを図1に示す。

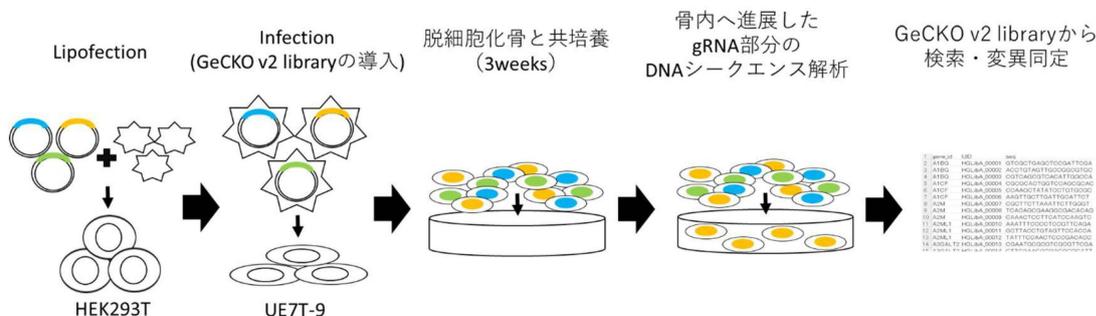


図1 遺伝子変異同定までの実験の流れ

両 library をそれぞれ導入した UE7T-9 と、脱細胞化骨を共培養したところ、骨内への浸潤が確認できた。SAM library より *SHC4* の過剰発現を、GeCKO v2 library より *SRRM4* の knock out(KO) を同定した。

## ② *SHC4* 過剰発現細胞株および *SRRM4* KO 細胞株の作製と蛋白発現の確認

### ・遺伝子改変細胞株の作製

*SHC4* 過剰発現細胞株は、CMV プロモーターを有する lentivirus vector を用いて、また、*SRRM4* KO 細胞株は、CRISPR v2 vector を用いて作製した。それぞれ、抗生剤による selection を行った。

*SHC4* 過剰発現細胞株(UE7T-9-SHC4)は、Western blot により過剰発現を確認した。*SRRM4* KO 細胞株(UE7T-9 *SRRM4* KO)は、Western blot ではバンドの欠失が確認されなかったが、フローサイトメトリーでは、*SRRM4* の発現が半分程度の減弱が確認された(図 2-B)。

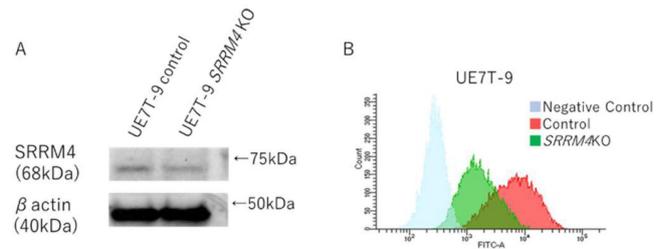


図 2 UE7T-9 *SRRM4* KO 蛋白発現の比較

(A) WB 結果 (B) フローサイトメトリー結果

### ③ 脱細胞化骨との共培養・浸潤距離の測定

UE7T-9-SHC4, UE7T-9 *SRRM4* KO をそれぞれ脱細胞化骨と 4 週間共培養を行い、骨内に進展した細胞 100 個の脱細胞化骨表面からの浸潤距離を測定した。

両者ともに骨内への進展が認められた(図 3)。また、表面からの浸潤距離を測定したところ、コントロールに比べて、*SRRM4* KO の方が有意に。浸潤距離は control と比較して優位に深く浸潤していた ( $p < 0.01$ ) (図 4)

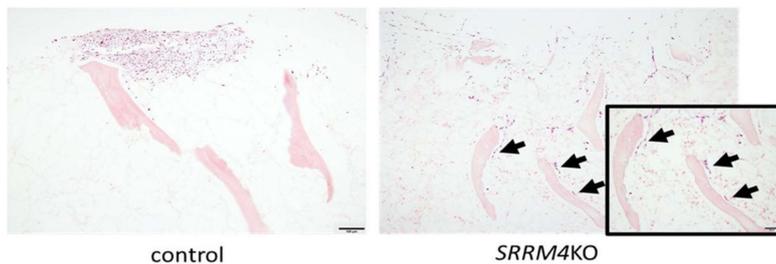


図 3 UE7T-9 *SRRM4* KO と脱細胞化骨との共培養

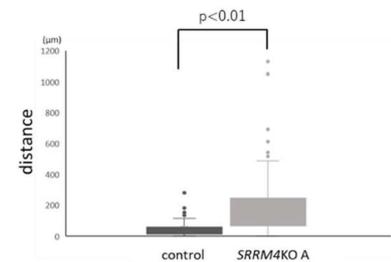


図 4 浸潤距離の測定結果

### ④ KO 細胞株の機能評価

両細胞について、MTS assay にて細胞増殖能、Scratch assay にて遊走能、Soft agar assay にて足場非依存的増殖能の評価を行った。

#### ・ MTS assay

両細胞について、24 時間、48 時間、72 時間いずれにおいても、コントロールと両細胞に有意な差は認められなかった(図 5-A)。

#### ・ Scratch assay

カルチャーインサートを外して 15 時間後に固定、染色を行った(図 5-B)。コントロールと比較して、両者では cell free area が有意に減少していた ( $p < 0.05$ ) (図 5-C)。

#### ・ Soft agar assay

UE7T-9-*SRRM4*KO を Soft agar にて 17 日間培養した後、固定、染色 (図 6-A) し、コロニー数及びその面積を測定した。コロニー数、面積いずれでも有意な増加がみられた ( $p < 0.01$ ) (図 6-B, C)。よって、*SRRM4* KO により、足場非依存的な増加が認められた。

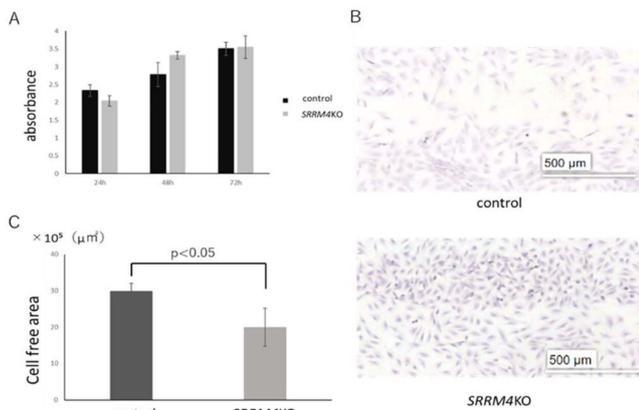


図 5 UE7T-9 *SRRM4* KO における機能評価  
(A) MTS assay 結果 (B) Scratch assay 染色結果  
(C) Scratch assay cell free area 測定結果

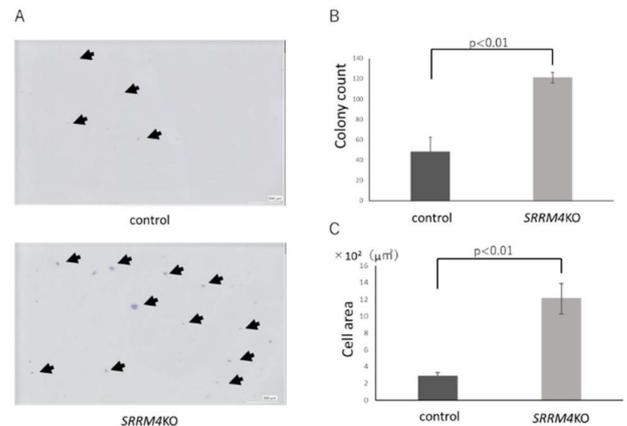


図 6 UE7T-9 *SRRM4* KO における Soft agar assay 結果  
(A) 染色結果 (B) コロニー数測定結果 (C) 面積測定結果

### ⑤ RNA sequence による網羅的発現解析

両細胞について、RNA sequence を行い、網羅的な遺伝子発現解析を行った。結果を図 7 に示す。*SHC4* 過剰発現および *SRRM4* KO により、cell migration や chemotaxis に関連する遺伝子発現傾向が認められ、このことが脱細胞化骨への進展に有利に作用した可能性が考えられる。

### 3 まとめ

本研究では、CRISPR Activation library と Knock Out library を導入することで UE7T-9 の脱細胞化骨への新規侵入因子として、*SHC4* 遺伝子の過剰発現、*SRRM4* KO を同定した。

この *SHC4* および *SRRM4* は中枢神経系に発現しており、*SHC4* は神経細胞の成長増殖因子として、*SRRM4* は神経細胞の分化に特異的なスプライシング因子として知られている<sup>5)</sup>。*SRRM4* においては、肺小細胞癌の治療薬として *SRRM4* を標的としたアンチセンス核酸医薬が開発された報告<sup>6)</sup>があり、また、*SRRM4* がサイレンシングされることで増殖に有利に働いているのではないかと示唆されている<sup>7)</sup>。しかし、骨髄や造血との関連は報告されていない。

本研究では、*SRRM4*KO 細胞株においては、WB およびフローサイトメトリーで蛋白発現の比較を行ったが、*SRRM4* の完全な欠損は確認できず、*SRRM4* の発現が半分程度にとどまる KO 細胞株での解析となった。この原因として、UE7T-9 における *SRRM4* の発現が低いことが考えられる。UE7T-9 での発現がわずかであるため、KO すること自体が難しく、WB でのバンドの差異の判別が

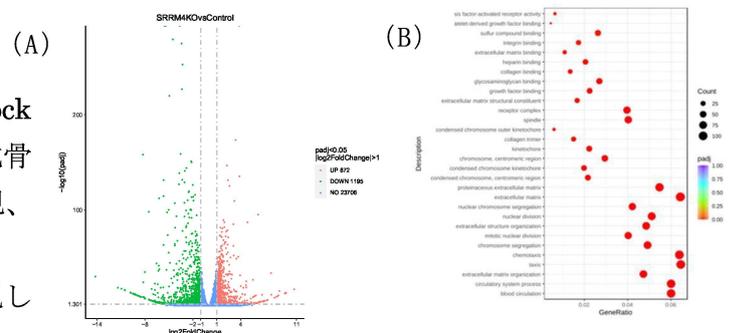


図 7 RNA sequence 結果(UE7T-9 *SRRM4* KO 細胞)  
(A) Volcano plot (B) Enrichment analysis

できなかったと考えられる。また、UE7T-9においては、*SRRM4*の欠損が致死的に作用した可能性がある。一方、フローサイトメトリーでは*SRRM4*の発現減弱が確認でき、脱細胞化骨と共培養すると、骨梁に沿った浸潤がみられた。浸潤距離の測定ではコントロールに比べ有意に深い結果となった。

UE7T-9-SHC4, UE7T-9 *SRRM4* KOともに、Controlと比較して、細胞増殖に有意な差が見られない一方で、遊走能の亢進を認め、RNA sequenceではそれらを裏付ける結果となった。*SHC4*および*SRRM4*は異なる機能遺伝子ではありながら、一方は過剰発現により、もう一方はKOにより、同様の機能を誘導できたことは、CRISPR libraryによる機能的 screeningが有効に作用したことを示すものである。遊走能の亢進と、足場非依存的な増殖が可能となり、脱細胞化骨への深い浸潤に有利に働いたと考えられる。

UE7T-9-SHC4, UE7T-9 *SRRM4* KOともに、脱細胞化骨へ生着させ、その脱細胞化骨を、免疫不全ヌードマウスの皮下に移植する研究も施行したが、脱細胞化骨内へのマウス細胞、組織の生着には、3ヶ月以上の長期間飼育を必要とすること、移植部位の感染管理などに、課題を残しており、当初目標としていた、新たなヒト骨髄モデルの作製、*DICER1*などの遺伝子異常を導入した骨髄間葉細胞による骨髄異形成症候群モデルの構築については、実験、解析が及ばなかった。しかしながら、脱細胞化骨に進展する因子を同定したことで、今後新たなヒト骨髄モデル、疾患モデルの構築は、十分に遂行可能と考えている。これにより、ヒト造血微小環境の解析、造血メカニズム、間質細胞の遺伝子異常による白血病発症メカニズムなどの解析が、飛躍的に進むものとする。

本報告では、主に*SRRM4* KOについて、図の掲載、まとめを行ったが、*SHC4* 過剰発現については、刊行された論文（文献8）を参照ください。

#### 4 参考文献

- 1) Kitagawa M, Kurata M, Onishi I, et al. Bone marrow niches in myeloid neoplasms. *Pathol Int.* 2020; 70: 63-71.
- 2) Raaijmakers MH, Mukherjee S, Guo S, et al. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature.* 2010; 464 (7290) : 852-857.
- 3) Hashimoto Y, Funamoto S, Kimura T, et al. The effect of decellularized bone/bone marrow produced by high-hydrostatic pressurization on the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Biomaterials.* 2011; 32: 7060-7067.
- 4) Sugita K, Onishi I, Nakayama R, et al. Indirect CRISPR screening with photoconversion revealed key factors of drug resistance with cell-cell interactions. *bioRxiv.* 2022; 500173.
- 5) Ohnishi T, Shirane, M, Nakayama K. *SRRM4*-dependent neuron-specific alternative splicing of protrudin transcripts regulates neurite outgrowth. *Sci Rep* 7. 2017; 41130.
- 6) Shimojo M, Kasahara Y, Inoue M, et al. A gapmer antisense oligonucleotide targeting *SRRM4* is a novel therapeutic medicine for lung cancer. *Sci Rep.* 2019; 9 (1) : 7618.
- 7) Head SA, Hernandez-Alias X, Yang JS, et al. Silencing of *SRRM4* suppresses microexon inclusion and promotes tumor growth across cancers. *PLoS Biol.* 2021; 19 (2) :e3001138.
- 8) Koyanagi A, Onishi I, Muraoka K, Kurata M. et al. Identification of the Factor That Leads Human Mesenchymal Stem Cell Lines into Decellularized Bone. *Bioengineering.* 2022; 9(10):490.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Koyanagi Anri, Onishi Ichiroh, Muraoka Karin, Sato Ikue, Sato Shingo, Kimura Tsuyoshi, Kishida Akio, Yamamoto Kouhei, Kitagawa Masanobu, Kurata Morito	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of the Factor That Leads Human Mesenchymal Stem Cell Lines into Decellularized Bone	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 490～490
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/bioengineering9100490	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 —

1. 著者名 Tatsumi Akiya, Hirakochi Haruka, Inoue Satomi, Tanaka Yosuke, Furuno Hidehiro, Ikeda Masumi, Ishibashi Sachiko, Taguchi Towako, Yamamoto Kouhei, Onishi Ichiroh, Sachs Zohar, Largaespada David A., Kitagawa Masanobu, Kurata Morito	4. 巻 11
2. 論文標題 Identification of NRAS Downstream Genes with CRISPR Activation Screening	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biology	6. 最初と最後の頁 1551～1551
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/biology11111551	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 —

1. 著者名 Tanaka Yosuke, Kambayashi Hidetaka, Yamamoto Akiko, Onishi Ichiroh, Sugita Keisuke, Matsumura Miwa, Ishibashi Sachiko, Ikeda Masumi, Yamamoto Kouhei, Kitagawa Masanobu, Kurata Morito	4. 巻 23
2. 論文標題 Efficient Identification of the MYC Regulator with the Use of the CRISPR Library and Context-Matched Database Screenings	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 7723～7723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms23147723	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 —

1. 著者名 Onishi Ichiroh, Yamamoto Kouhei, Kinowaki Yuko, Kitagawa Masanobu, Kurata Morito	4. 巻 22
2. 論文標題 To Discover the Efficient and Novel Drug Targets in Human Cancers Using CRISPR/Cas Screening and Databases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 12322～12322
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms222212322	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 —

1. 著者名 Kurata Morito, Onishi Ichiro, Takahara Tomoko, Yamazaki Yukari, Ishibashi Sachiko, Goitsuka Ryo, Kitamura Daisuke, Takita Junko, Hayashi Yasuhide, Largaespada David A, Kitagawa Masanobu, Nakamura Takuro	4. 巻 112
2. 論文標題 C/EBP $\beta$ induces B-cell acute lymphoblastic leukemia and cooperates with mutations <i>BLNK</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 4920~4930
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15164	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Sugita Keisuke, Onishi Ichiroh, Nakayama Ran, Ishibashi Sachiko, Ikeda Masumi, Inoue Miori, Narita Rina, Oshima Shiori, Shimizu Kaho, Saito Shinichiro, Sato Shingo, Moriarity Branden S., Yamamoto Kouhei, Largaespada David A., Kitagawa Masanobu, Kurata Morito	4. 巻 6
2. 論文標題 Indirect CRISPR screening with photoconversion revealed key factors of drug resistance with cell-cell interactions	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 582
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-023-04941-9	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 -

[学会発表] 計6件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Ichiroh Onishi, Morito Kurata, Kouhei Yamamoto, Masanobu Kitagawa
2. 発表標題 Establishment of human bone-marrow microenvironment model using Decellularized bone
3. 学会等名 第81回 日本癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小柳 杏莉, 大西 威一郎, 倉田 盛人, 村岡 香琳, 木村 剛, 岸田 晶夫, 北川 昌伸
2. 発表標題 CRISPR activation libraryより同定された脱細胞化骨への間葉系幹細胞の進展因子SHC4の解析
3. 学会等名 第111回 病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中 陽典, 倉田 盛人, 上林 秀孝, 山本 亜希子, 山本 浩平, 大西 威一郎, 北川 昌伸
2. 発表標題 CRISPR activation libraryを用いたMYCの発現調節因子の探求
3. 学会等名 第111回 病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 杉田 佳祐, 倉田 盛人, 中山 蘭, 大西 威一郎, 山本 浩平, 北川 昌伸
2. 発表標題 CRISPR KO libraryを用いた細胞相互作用における薬剤耐性機序の解明
3. 学会等名 第81回 日本癌学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大西 威一郎, 倉田 盛人, 山本 浩平, 北川 昌伸
2. 発表標題 骨髄の病理:基礎から病理診断まで 骨髄の病理診断
3. 学会等名 第110回 日本病理学会総会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大西 威一郎, 倉田 盛人, 村岡 香琳, 小柳 杏莉, 木村 剛, 岸田 晶夫, 山本 浩平, 北川 昌伸
2. 発表標題 脱細胞化骨を用いた、ヒト骨髄微小環境構築の試み
3. 学会等名 第80回 日本癌学会総会
4. 発表年 2021年

[図書] 計2件

1. 著者名 大西威一郎	4. 発行年 2024年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 516
3. 書名 病理と臨床 2024年臨時増刊号 (42巻) 病理形態学キーワード2024	

1. 著者名 大西威一郎	4. 発行年 2023年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 364
3. 書名 病理診断クイックリファレンス2023	

[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
連携研究者	木村 剛  (Kimura Tsuyoshi)  (10393216)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・准教授   (12602)	
連携研究者	岸田 晶夫  (Kishida Akio)  (60224929)	東京医科歯科大学・生体材料工学研究所・教授   (12602)	

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
---------	---------