

令和 6 年 6 月 27 日現在

機関番号：84503

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16258

研究課題名(和文) 間葉系幹細胞の分化異常が引き起こす造血不全の病態解析

研究課題名(英文) Pathological analysis of hematopoietic failure caused by differentiation abnormalities in mesenchymal stem/stromal cells

研究代表者

林 康貴 (Hayashi, Yasutaka)

公益財団法人神戸医療産業都市推進機構・その他部局等・研究員

研究者番号：10854664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：骨髄異形成症候群(MDS)において、間葉系幹細胞(MSC)の改変は病態維持に重要な役割を果たすことが知られる。本研究ではMDSモデルマウス由来MSCの単一細胞解析により、病態の中心となる亜集団の探索と病態制御機序の解明を目指した。scRNA-seq解析からLeptin受容体遺伝子高発現亜集団において顕著なニッチ因子の発現低下や分化抑制を認め、それにより骨芽細胞系列にコミットした亜集団が著減することが明らかになった。またMDSモデルの同亜集団ではニッチ因子遺伝子において分化関連転写因子のモチーフを持つエンハンサー領域の活性が低下し、分化を制御する転写因子を介した造血抑制が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、骨髄異形成症候群(MDS)では骨髄間葉系幹細胞(MSC)の骨芽細胞系列への分化障害を介して造血不全を惹起することを明らかにした。またLeptin受容体遺伝子高発現MSC亜集団はMDSの病態に鍵となる役割を果たし、同亜集団においてニッチ因子の新規エンハンサー領域が疾患による分化抑制に伴い顕著に変動することを見出した。これらの知見はMDSにおけるMSC機能異常を司るマスターレギュレーターを明らかにし、改変MSCを対象とする治療応用につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：In Myelodysplastic syndrome (MDS), MDS cells remodel bone marrow mesenchymal stem/stromal cells (MSC) to construct a favorable environment for themselves. In this study, we explored subpopulations that played a crucial role in the pathogenesis of MDS through single-cell analysis of MSCs. Our single-cell RNA-seq data showed remarkable downregulation of niche factors in the Leptin receptor high subpopulation (LepR-high MSCs). We also found suppressed osteoblastic differentiation in LepR-high MSCs derived from MDS, which led to a reduction of osteoblastic subpopulation in MDS. Furthermore, we identified a decreased activity in the enhancer region of the niche factor gene in LepR-high MSCs from MDS. We confirmed the presence of motif sequences for transcription factors that regulate osteoblastic differentiation in this region. These findings suggest that hematopoietic failure in MDS occurs via transcription factors that regulate osteoblastic differentiation.

研究分野：骨髄微小環境

キーワード：骨髄微小環境 間葉系幹細胞 骨髄異形成症候群

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の造血において、概ね全ての成熟血球細胞は造血幹細胞 (Hematopoietic Stem Cell, HSC) から産生され、骨髄中のニッチと呼ばれる特別な微小環境のサポートを得て維持・制御されている。一方で、腫瘍化した HSC は周囲のニッチを自身の生存に有利となるように再構築し、腫瘍細胞の生存・増殖だけでなく治療抵抗性に寄与することが知られている。そのため、腫瘍細胞そのものを標的とした細胞障害性を有する治療法とは独立して、改変されたニッチの正常化は有望な治療戦略として注目を集めている。

骨髄間葉系幹細胞 (Mesenchymal Stem/Stromal cell, MSC) は HSC ニッチを構成する代表的な細胞集団の一つであり、SCF や CXCL12 などのニッチ因子を産生することで HSC をサポートしている。また骨芽細胞や軟骨細胞、脂肪細胞等に分化し、骨髄中のニッチを構成する多系統の細胞を供給することから、HSC ニッチ形成に不可欠な細胞群といえる (Shiozawa et al. *Leukemia* 2008, Morrison and Scadden *Nature* 2014, Bianco. *Blood* 2011)。MSC はマーカー蛋白や表面抗原、各系統への分化傾向などにより特徴づけられる複数の亜集団から構成される不均一な細胞集団であり、造血器腫瘍のニッチとして様々な役割を有し、それぞれ異なる特徴を有することが知られている。例えば、骨髄増殖性疾患 (Myeloproliferative neoplasms, MPN) と急性骨髄性白血病 (Acute Myeloid Leukemia, AML) では MSC の絶対数がそれぞれ減少及び増加に転じ、各々の疾患の維持に寄与する可能性が示唆された (Arranz et al. *Nature* 2014, Hanoun et al. *Cell Stem Cell* 2014)。さらに、MSC が白血病幹細胞の代謝リプログラミングを介して病態進展に貢献することが報告されるなど (Forte et al. *Cell Metab* 2020)、MSC の質的・量的制御機構を同定し介入することは、今後の造血器腫瘍研究の新たな潮流になると予想される。

高齢者に多い骨髄異形成症候群 (Myelodysplastic syndrome, MDS) は、遺伝子変異をもつ HSC に起因する悪性疾患であり、無効造血による血球減少をきたし、高率に AML に形質転換することが知られている。白血病と異なり増殖が遅くアポトーシスの亢進を特徴とする MDS 細胞が骨髄内で生存・増殖するためには骨髄微小環境、特に MSC の支持が必須である。MDS 患者では HSC の遺伝子変異に加えて MSC の機能変化が認められ (Medyouf et al. *Cell Stem Cell* 2014, Horiguchi et al. *Haematologica* 2016)、また MSC 側の機能異常を誘導するのみで MDS 様の病態を惹起することが報告されている (Rupeć et al. *Immunity* 2005, Raaijmakers et al. *Nature* 2010)。これらの知見から、MDS 細胞だけでなく、機能的な障害を受けた MSC を治療標的とする機運が高まっている。

2. 研究の目的

申請者等はこれまでに MDS 細胞が MSC の骨芽細胞分化を障害し、間接的に造血不全を惹起することを見出した。これは分化異常を表現型として MSC が造血支持細胞として不可欠な役割を果たしていることを示している。しかし、不均一な細胞集団であり多系統への分化能を有する MSC において、単一細胞レベルでの病態理解は十分に進んでいない。本研究では、急速な進歩を遂げる単一細胞オミックス解析を取り入れることで、MSC のうちどの細胞集団が、どのようにニッチ機能を変化させ、正常 HSC が負に制御されるのかを解き明かすことを目的とする。

3. 研究の方法

本研究では MDS モデルマウスを用い、同マウスの骨髄から採取した MSC の単一細胞 RNA シークエンス解析を行う。これにより疾患における MSC 分化障害時の亜集団構成変化を明らかにし、病態の中心となる細胞集団を同定する。次に病態の中心となる細胞集団を中心に各亜集団の特性を検討することで、MSC の分化障害がニッチ機能の異常を引き起こす機序を明らかにする。

4. 研究成果

申請者等のこれまでの解析から、MDS では骨形成の低下による顕著な骨量の減少が確認された。そこで骨形成低下の原因として MSC から骨芽細胞系列への分化プログラムを評価するため、単一細胞レベルでの RNA シークエンスを実施した。Cd45⁻Ter119⁻Cd31⁻Cd140a⁺Cd51⁺にて FACS ソートした MSC は、マーカー遺伝子の発現や分化系列とその段階によって骨芽細胞系列や線維芽細胞等の亜集団に分類され、MDS マウスでは骨芽細胞系列亜集団が著しく減少していた。またマーカー遺伝子の一つである Leptin receptor 高発現を特徴とする亜集団 (LepR-high MSC) の顕著な差異を認めた (図 1)。

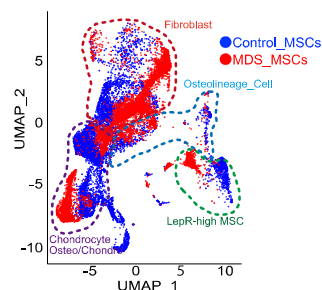


図1. 正常またはMDS由来MSCsのクラスタリング

MDS マウス由来の LepR-high MSC では骨格系幹細胞マーカーとして知られる Grem1 の発現が低下しており、骨格系幹細胞としての機能を損なうことにより骨芽細胞系列亜集団の減少が引き起こされていると考えられた。その一方で MSC の数や多分化能自体は維持されており、MDS 環境下で分化障害は起こるものの、MSC としての能力は保たれていると考えられた。

LepR-high MSC はニッチ因子を豊富に発現する細胞集団であり、造血サポートに特に重要な役割を果たすと考えられる。MDS モデルマウスでは、骨芽細胞系列への分化抑制に伴って SCF や CXCL12 等のニッチ因子の発現低下を認めた。当該亜集団構築には MSC の分化関連転写因子の寄与が指摘されているが、それらの転写因子によるニッチ因子への関与については十分に解析されていない。そこで LepR-high MSC におけるニッチ因子の制御機構を探索するため、単一細胞 ATAC シークエンス解析を実施した。興味深いことに、MDS モデルマウス由来 LepR-high MSC では顕著なクロマチン状態の変化が見られた。造血支持において最も重要なニッチ因子の一つである Cxcl12 において特に影響が顕著であり、同遺伝子下流のエンハンサーと考えられる領域の活性低下が確認された(図2)。

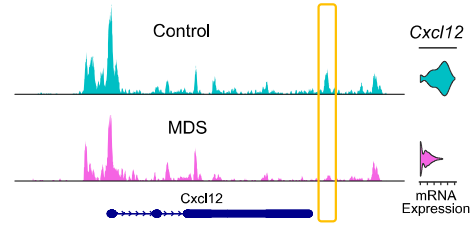


図2. LepR-high MSC亜集団におけるクロマチンアクセシビリティ

同領域には MSC の骨芽細胞系列への分化制御を司る転写因子のモチーフ配列が見出された。これらの知見から、LepR-high MSC 亜集団は MDS の病態に鍵となる役割を果たしており、同亜集団において骨芽細胞系列への分化制御に関する転写因子によるニッチ因子発現制御の異常が造血抑制を引き起こすことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hayashi Yasutaka, Nishimura Koutarou, Tanaka Atsushi, Inoue Daichi	4. 巻 117
2. 論文標題 Extracellular vesicle-mediated remodeling of the bone marrow microenvironment in myeloid malignancies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Hematology	6. 最初と最後の頁 821-829
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12185-023-03587-x	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 Hayashi Y et al.	4. 巻 39
2. 論文標題 MDS cells impair osteolineage differentiation of MSCs via extracellular vesicles to suppress normal hematopoiesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 110805 ~ 110805
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110805	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 該当する

1. 著者名 Hayashi et al.	4. 巻 39
2. 論文標題 MDS cells impair osteolineage differentiation of MSCs via extracellular vesicles to suppress normal hematopoiesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cell reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.celrep.2022.110805	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3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 林 康貴
2. 発表標題 造血器腫瘍における骨髄微小環境制御機構の解析
3. 学会等名 第28回造血器腫瘍研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 林 康貴
2. 発表標題 MDS cells impair osteolineage differentiation of MSCs via EVs to suppress normal hematopoiesis
3. 学会等名 第84回日本血液学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 林 康貴
2. 発表標題 Impaired Osteoblastic Differentiation of MSCs Suppresses Normal Hematopoiesis in MDS
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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