

2021年度 日本骨髄腫学会奨励賞 研究成果報告書

氏名	青木 一成
所属施設名	京都大学医生物学研究所
研究課題名	CXCL12-CXCR4 軸による骨髄腫細胞制御に必須の細胞内分子の網羅的探索
研究期間	2021年4月1日 ~2022年3月31日
研究成果報告	<p>1) 論文をもって研究成果報告とする場合には以下にチェックの上、論文を添えて提出してください。</p> <p><input type="checkbox"/> 研究結果の主な内容が含まれ、本助成を受けている事が明記された論文があるため、研究成果報告を論文に代え提出いたします。</p> <p>2) 論文がない場合には以下に報告内容を記載してください。</p> <p>急性白血病や多発性骨髄腫などの血液がん細胞は主として骨髄で増殖している。これらの血液がんモデルマウスにおいて、骨髄微小環境特異的に <i>Cxcl12</i> をノックアウトすると、骨髄中のがん細胞数が著明に減少し、マウスの生存は有意に延長する。また、血液がん細胞特異的に CXCL12 の受容体をコードする <i>CXCR4</i> をノックアウトすると、同様の表現型を示す。これらの事実は、急性白血病や多発性骨髄腫などの血液がん細胞の生体内での増殖には、CXCL12-CXCR4 軸が必須であることを示す。しかしながら、がん細胞の CXCL12 応答性がどのように制御されているかはよくわかっていない。申請者は、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR) スクリーニングにより、クロマチンリモデリング複合体 canonical Brahma-related gene 1/brhma-associated factor (cBAF) と転写因子 RUNX1 が白血病細胞の CXCR4 発現に必要で、cBAF あるいは RUNX1 の抑制は白血病細胞の CXCL12 応答性を低下させることを発見した (Aoki et al., <i>Blood</i> 2024)。一方、多発性骨髄腫細胞の CXCR4 の発現には、cBAF も RUNX1 も必要なかった。本研究の目的は、多発性骨髄腫細胞における <i>CXCR4</i> 発現制御因子を網羅的に明らかにすることである。</p> <p>CRISPR-Cas9 システムを用いてゲノムワイドノックアウト MM.1S ライブラリーを作製し (Koike-Yusa et</p>

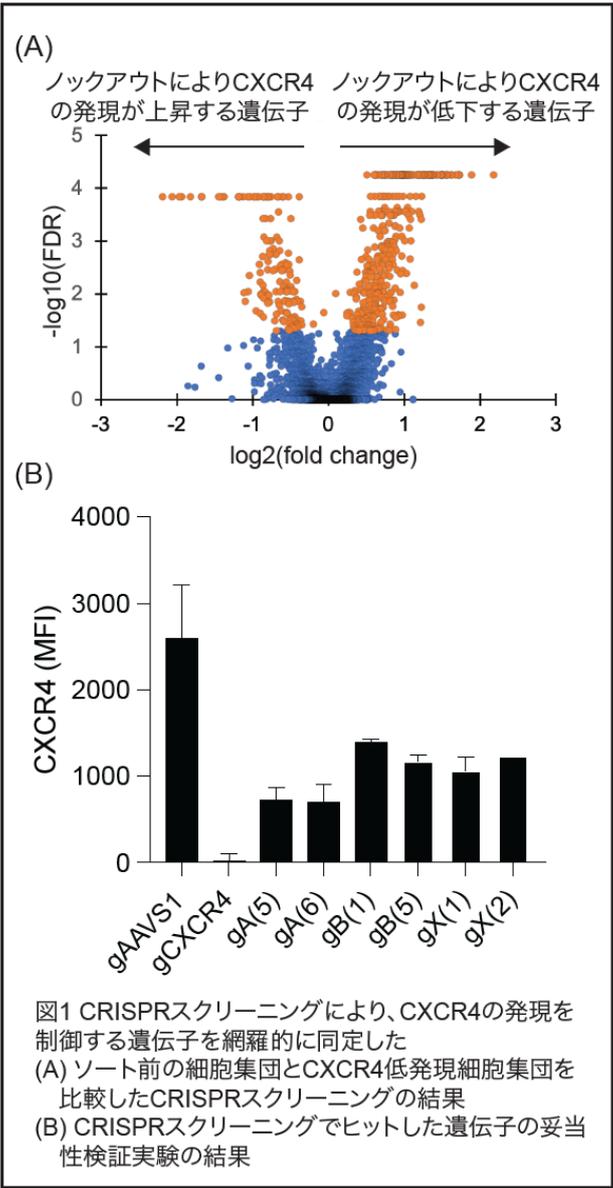


図1 CRISPRスクリーニングにより、CXCR4の発現を制御する遺伝子を網羅的に同定した (A) ソート前の細胞集団とCXCR4低発現細胞集団を比較したCRISPRスクリーニングの結果 (B) CRISPRスクリーニングでヒットした遺伝子の妥当性検証実験の結果

※提出時のファイル形式は A4 サイズ PDF データとすること

al., *Nat Biotechnol.* 2014; Ong et al., *Sci Rep.* 2017)、トランスダクションから 8 日後に、セルソーターを用いて CXCR4 の発現が低下している分画を分取した。次世代シーケンサーを用いてソート前の細胞集団と CXCR4 低発現細胞集団の guide RNA (gRNA) の頻度を比較することで、ノックアウトにより CXCR4 の発現が低下する遺伝子の同定を目指した (図 1A)。ノックアウトすることで CXCR4 低発現集団に有意に濃縮する遺伝子として 396 遺伝子がヒットした。その中には *CXCR4* が含まれており、本スクリーニングの堅牢性を確認することができた。ヒット遺伝子の中には、cBAF 構成要素をコードする遺伝子や RUNX ファミリーの転写因子をコードする遺伝子は含まれていなかった。ヒット遺伝子の中から、これまで CXCR4 との関連性の報告がない転写因子をコードする遺伝子 2 つ (A, B) と cBAF とは別のクロマチンリモデリング複合体構成要素をコードする遺伝子 1 つ (X) に注目することにした。各遺伝子あたり 2 つの gRNA を用いて A, B, X を個別にノックアウトし、CXCR4 の発現が低下することを確認した (図 1B)。

以上の実験結果は、多発性骨髄腫細胞では白血病細胞とは全く異なる転写因子およびクロマチンリモデリング複合体によって CXCR4 の発現制御が行われていることを示す。今後、A, B, X の Chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) によってこれらのタンパク質のゲノム上での局在を明らかにしたり、遺伝子 X ノックアウト細胞を用いた Assay for transposase-accessible chromatin (ATAC-seq) によって遺伝子 X がクロマチンアクセシビリティを制御している領域を明らかにしたりすることで、多発性骨髄腫細胞における CXCR4 発現制御メカニズムを解析する。

本研究を通して、血液がん細胞における系列特異的な CXCL12 応答性制御機構を明らかにすることで、がん細胞と骨髄微小環境との相互作用を標的にする新規治療薬の開発に繋がる可能性がある。また、本研究計画は、血液細胞が目的臓器に遊走する分子機構の一端を明らかにするもので、学術的有益性が高い。