

36. がんの悪性を制御するカルシウムシグナルの役割解明

合山 進

東京大学 大学院新領域創成科学研究科 メディカル情報生命 先進分子腫瘍学分野

Key words : カルシウムシグナル, 骨髄系腫瘍, *Atp2a2*, CRISPR/Cas9, 腫瘍抑制因子

緒言

最近のゲノム編集技術の発達、特に CRISPR/Cas9 法の普及により、がん細胞を用いた CRISPR library スクリーニングが盛んに行われるようになり、がん細胞の増殖を制御する分子についての情報が飛躍的に増大した [1]。しかし、これらのスクリーニングの多くは *in vitro* の培養系を用いたものか、もしくは最初に *in vitro* 培養系で候補分子を絞った上で *in vivo* 実験を行ったものであり、生体内特異的にがん細胞の増殖を制御する分子に関する情報は、現在でもまだ不足している。そこで我々は、CRISPR/Cas9 library sgRNA を導入したマウス骨髄系腫瘍細胞をレシピエントマウスに直接移植する 3 つの実験を行い、生体内で骨髄系腫瘍の増殖を制御する分子の探索を行った。その結果、実験 1～3 全てで増加した sgRNA が標的とする遺伝子として、*Trp53* と *Atp2a2* の 2 つを同定した (図 1)。有名ながん抑制因子である *Trp53* の検出は想定内であったが、*Atp2a2* は一般的に腫瘍抑制因子として認識されておらず、意外な結果であった。さらに興味深いことに、*in vitro* における *Atp2a2* 欠失誘導の効果を [depmap portal 1 \(https://depmap.org/portal/\)](https://depmap.org/portal/) で調べたところ、*in vivo* スクリーニングの結果とは逆に、*Atp2a2* 欠失誘導はほぼ全てのがん細胞で強い増殖抑制効果を示していた。この結果は、*Atp2a2* の役割が生体内と試験管内で異なっていることを示している。

Atp2a2 は Ca^{2+} の小胞体への取り込みを担う *Serca* をコードする遺伝子で、細胞内カルシウム量の調節に寄与している [2]。本研究では、*Atp2a2* 欠失骨髄系腫瘍細胞が、*in vitro* の培養系では増殖が低下するにも関わらず生体内で増殖優位性を獲得するのは何故か、細胞内カルシウムシグナルの変化、遺伝子発現の変化、そしてメタボリズムの変化に注目し、多角的に解析した。その結果、*Atp2a2* 欠失によるカルシウムシグナルの変化が、骨髄系腫瘍細胞の生体内特異的な悪性を促進していることが明らかになった。

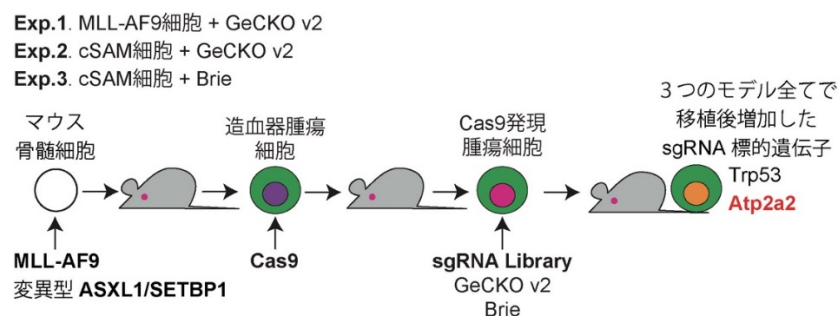


図 1. *in vivo* CRISPR/Cas9 library スクリーニング

MLL-AF9 もしくは変異型 SETBP1/ASXL1 を導入して作製したマウス骨髄系腫瘍細胞に、Cas9 および sgRNA library (GeCKO v2, Brie) を導入し、移植前後の sgRNA 数を比較した。3 つのスクリーニング全てで移植後に増加した sgRNA が標的とする遺伝子として、*Trp53* と *Atp2a2* が同定された。

方法

1. ウイルスによる遺伝子導入

レンチウイルスは、HEK293T細胞にレンチウイルスコンストラクトと共に、pMD2.G (env) (Addgene、#12259) と psPAX2 (gag-pol) (Addgene、#12260) をリン酸カルシウム法によってトランスフェクションして作製した。

2. マウス骨髄系腫瘍モデル

C57B/6J マウスの骨髄細胞から c-kit 陽性細胞を取り出し、MLL-AF9 を導入した。この細胞をレシピエントマウスに連続移植し、MLL-AF9 細胞を樹立した。この細胞にレンチウイルス感染により Cas9 (Addgene、#52962) を導入し、Cas9 発現 MLL-AF9 細胞を樹立した [3]。また、同様に、変異型 ASXL1 と変異型 SETBP1 を導入することにより cSAM (combined expression of SETBP1 and ASXL1 Mutations) 細胞を作製し、同様の方法で Cas9 発現 cSAM 細胞を作製した [3]。本研究の動物実験は、東京大学の動物実験指針に沿って行った。

3. 細胞培養

HEK293T細胞はDMEM/10% FBSと1%ペニシリン-ストレプトマイシンを加えて培養した。MLL-AF9細胞は、Methocult3234 (STEMCELL Technologies) に 10 ng/ml mouse SCF、10 ng/ml mouse IL-3、10 ng/ml mouse IL-6、10 ng/ml mouse GM-CSF (R&D Systems) を添加し培養した。cSAM細胞は、RPMI-1640に10% FBSと1%ペニシリン-ストレプトマイシン、1 ng/ml mouse IL-3 を添加して培養した。

4. 遺伝子欠失実験

CRISPick (<https://portals.broadinstitute.org/gppx/crispick/public>) で Atp2a2 標的 single guide RNA (sgRNA) の配列を決定し、pLKO5.sgRNA.EFS.tRFP657 (Plasmid #57824) または lentiGuide-Puro (Plasmid #52963) にクローニングした。sgRNA は、レンチウイルス感染により細胞に導入した。

5. フローサイトメトリー

蛍光色素標識抗体で染色 (1 時間、4°C) した細胞は、PBS で洗い、PBS (2% FBS) で再懸濁した。その後、BD FACSVerser (BD Bioscience) または BD FACSCanto II (BD Bioscience) で解析した。

6. ウェスタンブロット

タンパクは、2×Laemmli sample buffer (Bio-Rad) と 2-メルカプトエタノールを用いて hot lysis により抽出した。180 V、30 mA で SDS-PAGE を行い、メンブレンに転写した (15 V、250 mA、60 分)。転写後のメンブレンは、5% スキムミルク溶液でブロッキングし、anti-Atp2a2 抗体 (sc-376235、Santa Cruz) をあてた。

7. 細胞内カルシウム測定

2 mM CaCl₂ 含 Balanced salt solution (BSS : 115 mM NaCl、5.4 mM KCl、1 mM MgCl₂、10 mM glucose、and 20 mM HEPES-NaOH (pH7.4)、0.025%BSA) を用いて培地から細胞を回収し、2 μM Fura-red を 30 分間ロードした (37°C、遮光)。30 分後、細胞質内 Ca²⁺測定用サンプルは Ca²⁺ (+) BSS で洗い、BD FACSAriaIII (BV650、PerCPCy-5.5) で測定した。また、小胞体内 Ca²⁺測定用サンプルは Ca²⁺ (-) BSS で洗い、AriaIII (BV650、PerCPCy-5.5) で測定中に 2 μM Calcimycin を添加し、細胞小器官から細胞質へ流入した Ca²⁺を測定した。

8. RNA シークエンス解析

In vivo : Cas9 発現 MLL-AF9 細胞に tRFP657 共発現 Non targeting および Atp2a2 標的 sgRNA を導入し、レシピエントマウスに移植した (3×10⁵ cells/匹)。10 日後に白血病を発症したマウスから骨髄細胞を回収し tRFP657 陽性細胞をソートした。回収した細胞から RNeasy (Qiagen) を用いて Total RNA を抽出した。RNA ライブラリーは、1,000 ng の total RNA を用いて SureSelect Strand-Specific RNA Preparation Kit (Agilent) を用いてメーカーのプロトコルに従って調製し、Illumina HiSeq2500 System で 2×100 nucleotide paired-end reads で配列決定した。得られたリードは、cutadapt (1.8.1) と fastx-toolkit (0.0.13) を用いて、Illumina アダプター配列を除去し、低品質塩基をトリミングして処理した。リードの品質は FastQC で評価した。

9. Quantitative PCR

細胞を回収し、FastGene™ RNA Basic Kit (日本ジェネティクス株式会社) を用いて RNA を抽出した。逆転写により cDNA を合成し、SYBR™ Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific) を用いて qPCR を行った。

10. WST-8

96 well プレートに MLL-AF9 細胞 : 1×10^4 cells/100 μ l、cSAM 細胞 : 0.3×10^4 cells/100 μ l で播き、薬剤やサイトカインを段階希釈して加えた。48 時間培養後、Cell counting kit (Dojindo) を 10 μ l 加えて懸濁し、5 時間後に蛍光マイクロプレートリーダー FLUOStar OPTIMA (BMG Labtech) を用いて OD450 を測定した。

11. メタボローム解析

凍結した細胞と 2-morpholinoethanesulfonic acid を氷冷したメタノール 500 μ l に懸濁し、等量のクロロホルムと 0.4 倍量の超純水 LC/MS グレード (和光) を加えた。その後、懸濁液を 15,000 g、4°C で 15 分間遠心分離した。遠心分離後、水相を限外ろ過チューブ Ultra-free MC-PLHCC (Human Metabolome Technologies) を用いて限外ろ過し、濾液を真空濃縮器 SpeedVac (Thermo) で濃縮した。濃縮濾液を 25 μ l の超純水に溶解し、IC-MS 分析に使用した。ICS-5000+ に接続したオービトラップ型 MS (Q-Exactive focus) を用いて陰イオン代謝物の測定を行った。分離は Thermo Scientific Dionex IonPac AS11-HC、4 μ m 粒子径カラムを使用して行った。IC 流量は 0.25 ml/min で、ポストカラムに 0.18 ml/min の MeOH のメーキャップフローを補充した。IC 分離のための水酸化カリウム勾配条件は、1 mM から 100 mM (0~40 分)、100 mM (40~50 分)、1 mM (50.1~60 分) で、カラム温度は 30°C に設定した。Q Exactive focus 質量分析計は、すべての検出において ESI ネガティブモードで動作させた。

結 果

1. 骨髄系腫瘍における *Atp2a2* 欠失は、生体内特異的な増殖促進効果を示す

MLL-AF9 白血病細胞において *Atp2a2* の欠失を誘導し、スクリーニング結果の確認実験を行った。tRFP657 を共発現する vector に Non-targeting および *Atp2a2* 標的 sgRNA を挿入し、Cas9 発現 MLL-AF9 細胞に導入して、コントロールおよび *Atp2a2* 欠失 MLL-AF9 細胞を作製した。これらの細胞をサイトカイン入り半固形培地で培養すると共にレシピエントマウスに移植した。その結果、*in vitro* 培養系では *Atp2a2* 欠失細胞の増殖が低下するのに対し、移植したマウスの骨髄内では増殖が促進されることが判明した。さらに、同様の実験を MDS/AML モデルである cSAM 細胞を用いて行った。MLL-AF9 細胞と同様に、*Atp2a2* 欠失 cSAM 細胞は、*in vitro* では細胞増殖が低下するのに対し、マウス骨髄内での増殖は逆に促進された (図 2)。さらに、白血病を発症したマウスから回収したコントロールおよび *Atp2a2* 欠失 MLL-AF9 細胞を再びレシピエントマウスに移植し、2 次移植後に発症したマウス骨髄細胞を回収してウェスタンブロッティングを行った。これにより、*Atp2a2*-sgRNA 導入細胞において、2 次移植後にも *Atp2a2* が欠失していることを確認した。以上の実験により、*Atp2a2* の欠失が生体内特異的に骨髄系腫瘍の増悪に寄与していることが明らかとなった。

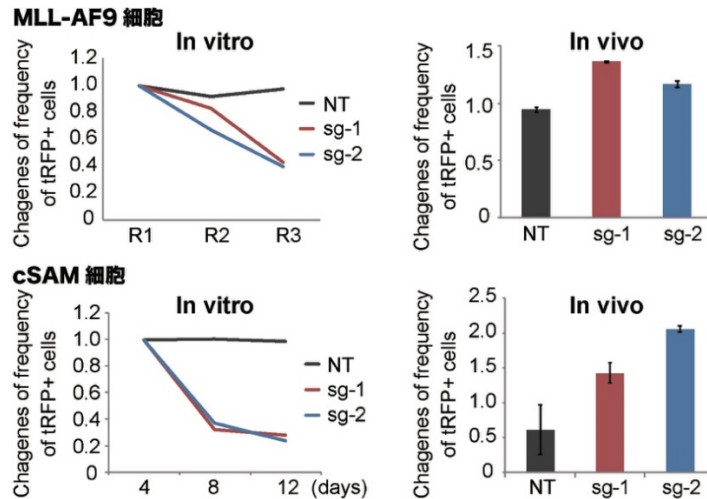


図2. *Atp2a2* 欠失は、*in vivo* 特異的に骨髄系腫瘍細胞の増殖を促進する。

Non-targeting (NT) コントロール及び *Atp2a2* 標的 sgRNA (sg-1, sg-2) を MLL-AF9, cSAM 細胞に導入し、一部を *in vitro* で培養し、残りをマウスに移植した。*Atp2a2* 欠失細胞は、*in vitro* 培養系では増殖が低下したが、*in vivo* では逆に増殖優位性を獲得した。

2. *Atp2a2* 欠失骨髄系腫瘍は、生体内特異的に治療抵抗性を示す

次に、*Atp2a2* 欠失による薬剤抵抗性への影響を検討した。コントロール及び *Atp2a2* 欠失 MLL-AF9 細胞を用いて白血病治療薬 Ara-C に対する感受性を *in vitro* 及び *in vivo* で検証した。*in vitro* 培養系では、コントロール細胞と *Atp2a2* 欠失細胞間に Ara-C 感受性の差は認められなかった。一方、MLL-AF9 細胞を移植したマウスに Ara-C を投与 (50 mg/kg、腹腔内投与、移植 3 日後から 5 日間連続投与) する実験では、Ara-C 投与後に *Atp2a2* 欠失 MLL-AF9 細胞の有意な増加が認められた。さらに、p53 活性化薬 DS-5272 [4] を用いて同様の実験を行った。その結果、Ara-C と同様、*in vitro* では *Atp2a2* 欠失による薬剤感受性の変化がみられなかったのに対し、*in vivo* (DS-5272 100 mg/kg、経口投与、移植翌日から 2 日に 1 回) では *Atp2a2* 欠失による薬剤抵抗性の亢進が確認された。これらの結果より、*Atp2a2* 欠失 MLL-AF9 細胞は機序の異なる 2 つの薬剤に対して生体内特異的に薬剤抵抗性を示すことが明らかとなった。

3. *Atp2a2* 欠失によるカルシウムシグナルの変化

ATP2A2 は、細胞質から小胞体への Ca^{2+} の取り込みを担う SERCA をコードする遺伝子である。そこで、MLL-AF9 細胞を用いて、*Atp2a2* 欠失によるカルシウムシグナルの変化を観察した。その結果、*Atp2a2* 欠失細胞ではコントロール細胞に比べて小胞体に貯蔵されている Ca^{2+} 量が低く、逆に細胞質内の Ca^{2+} 濃度は高いことが判明した。一方、ミトコンドリアにおける Ca^{2+} 濃度は低下していた。さらに、細胞外から細胞質へのカルシウムの取り込みを見るために、 Ca^{2+} 非存在下での Fura-red を用いた細胞質内 Ca^{2+} 濃度測定中に 2 mM CaCl_2 を加えた。その結果、*Atp2a2* 欠失細胞はコントロール細胞よりも強く Ca^{2+} に反応し、より多くの Ca^{2+} を細胞質に取り込んだ。この細胞外から細胞質への Ca^{2+} の取り込みの増加は、ストア作動性 Ca^{2+} 流入 (Store operated Ca^{2+} entry : SOCE) の活性化によるものであると考えられた。次いで、*in vivo* の細胞でも *Atp2a2* 欠失によるカルシウムシグナルの変化を調べた。tRFP657 共発現コントロールおよび *Atp2a2* 欠失 MLL-AF9 細胞をレシピエントマウスに移植し、白血病を発症したマウスの骨髄細胞を回収した。それぞれのマウスから回収した骨髄細胞について *in vitro* の細胞と同様に Fura-red を用いて細胞質内 Ca^{2+} 濃度、小胞体内 Ca^{2+} 濃度および SOCE 活性を測定した。その結果、*in vivo* の細胞でも *in vitro* の細胞と同様に、*Atp2a2* 欠失により MLL-AF9 細胞の細胞質内 Ca^{2+} 濃度は増加し、小胞体内 Ca^{2+} 濃度は低下すること、および SOCE が活性化することが確認できた (図 3)。

最後に、*Atp2a2* 欠失細胞における SOCE の役割を明らかにするため、SOCE 制御因子である *Stim1/2* をノック

クアウトした MLL-AF9 細胞を作製した。この *Stim1/Stim2* ノックアウト MLL-AF9 細胞において *Atp2a2* の欠失を誘導したところ、*in vitro* のみならずマウス生体内でも白血病細胞の増殖が低下した。これらの実験により、*Atp2a2* 骨髄系腫瘍細胞では小胞体内の Ca^{2+} 枯渇に対応して SOCE が活性化し、この SOCE 依存的に生体内で増殖していることが明らかとなった。

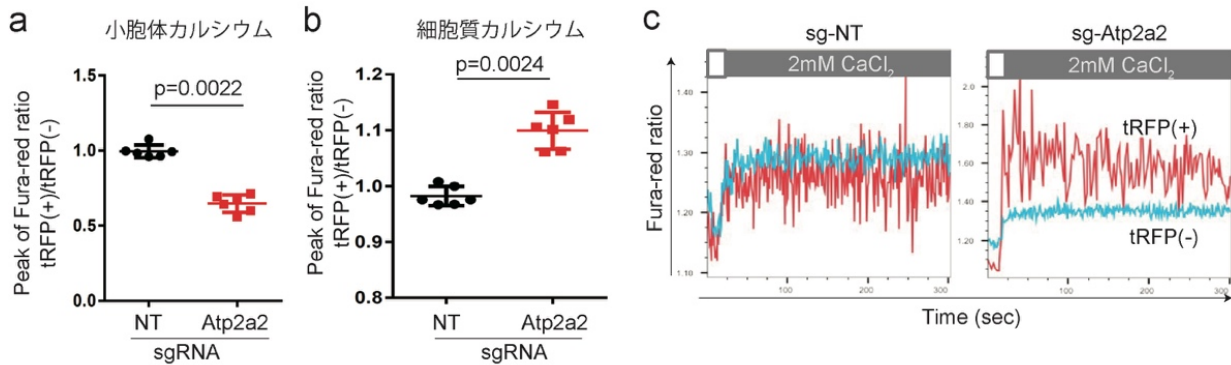


図 3. 骨髄系腫瘍における *Atp2a2* 欠失による Ca^{2+} シグナル変化

MLL-AF9 細胞において *Atp2a2* 欠失を誘導し、 Ca^{2+} シグナルの変化を解析した。*Atp2a2* 欠失細胞では、(a) 小胞体内の calcium が減少し、一方、(b) 細胞質の calcium が上昇した。また、(c) store-operated Ca^{2+} entry (SOCE) は亢進していた。unpaired t test。

4. *Atp2a2* 欠失骨髄系腫瘍細胞では、免疫原性が低下している。

Atp2a2 欠失による生体内での遺伝子発現変化を調べるために、コントロール及び *Atp2a2* 欠失細胞を用いて RNA シークエンス解析を行った。その結果、*Atp2a2* 欠失細胞では、自然免疫応答や抗原のプロセッシング、MHC class1 による抗原提示に関与する遺伝子群の発現が低下していることが判明した。また、FACS 解析により、細胞表面の MHC class1 発現が低下していることも確認した。さらに、コントロール及び *Atp2a2* 欠失細胞を用いて、メタボローム解析を行った。その結果、*Atp2a2* 欠失 MLL-AF9 細胞ではプリン代謝産物が顕著に増加していた。また、生体内特異的にペントースリン酸経路代謝産物の増加が認められた。

次に、MHC class I の発現低下が、*Atp2a2* 欠失細胞の生体内特異的な増殖優位性獲得に関与しているのかを検証するために、免疫不全マウスを用いた実験を行った。コントロールおよび *Atp2a2* 欠失 MLL-AF9 細胞を、免疫正常 C57BL/6 マウス、T/B リンパ球を欠損した *Rag2* ノックアウトマウスや NOG マウス内では低下することが判明した (図 4)。これらの実験により、*Atp2a2* 欠失白血病細胞における免疫原性の低下が、生体内特異的な細胞増殖に貢献していることが明らかとなった。

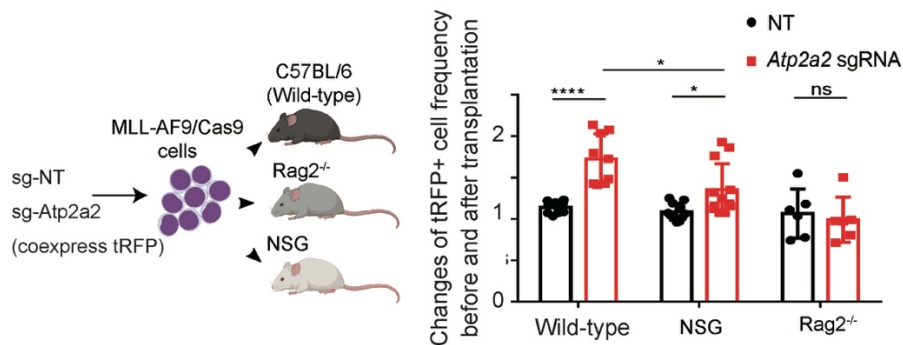


図4. *Atp2a2* 欠失は、骨髄系腫瘍細胞の免疫回避を促進する。

MLL-AF9 細胞において *Atp2a2* 欠失を誘導し、免疫正常 C57BL/6 マウスおよび免疫不全 (T/B リンパ球欠失 *Rag2*^{-/-} マウスと T/B リンパ球+NK 細胞欠失 NSG マウス) に移植した。野生型マウスで認められた *Atp2a2* 欠失の腫瘍増殖能は、免疫不全マウス内では減弱していた。2way ANOVA Turkey's multiple comparisons test、* p<0.05、**** p<0.000005。

考 察

本研究では、骨髄系腫瘍細胞を用いた *in vivo* CRISPR library スクリーニングにより、がん抑制遺伝子として *Atp2a2* を同定した。*Atp2a2* を欠失した骨髄系腫瘍細胞は、*in vivo* では増殖が促進されるのに対し、*in vitro* では逆に増殖が抑制された。*in vivo* の腫瘍微小環境と *in vitro* の環境では、*in vivo* には腫瘍以外の細胞が存在することや、栄養が限られていること、*in vitro* に比べて細胞にストレスがかかることなどの違いがある [5]。*In vivo* で腫瘍細胞が生存するには、様々な微小環境刺激に対応する必要があり、エネルギーを消費するため、成長遅延が見られる。一方、*in vitro* の条件は、細胞が増殖するために最適化されており、環境刺激やストレスに対応する必要がないため、細胞は急速に増殖する。増殖に適している *in vitro* では、骨髄系腫瘍細胞において *Atp2a2* 欠失による増殖抑制効果が強く出るが、増殖が比較的緩やかな *in vivo* では、刺激やストレス、免疫に対して鈍感な *Atp2a2* 欠失細胞が、増殖優位性を獲得するものと考えられる。

Atp2a2 欠失骨髄系腫瘍細胞では、小胞体内 Ca²⁺濃度の低下、細胞質内 Ca²⁺濃度の上昇、および SOCE の活性化などカルシウムシグナルの異常が認められた。SOCE の制御因子である STIM1/2 や ORAI1 は、乳癌、膠芽腫、前立腺癌、肝細胞癌、食道扁平上皮癌、淡明細胞型腎細胞癌などで過剰に発現していることが報告されている [6]。また、乳がん患者の腫瘍内の STIM1 高発現が生存率を著しく低下させることや、ORAI 1 高発現食道扁平上皮癌患者は予後不良であることも報告されている。加えて、STIM1 および ORAI1 のノックダウンおよび薬剤による SOCE の阻害によって、様々な腫瘍でがん細胞の増殖や転移を抑制することが示されている [7]。したがって、小胞体内のカルシウム低下およびそれに伴う SOCE 活性化は、がんの悪化に深く関与している可能性がある。また、これらのカルシウム制御因子は、難治性がんにおける有力な治療標的になり得ると考えられる。

共同研究者

本研究の共同研究者は、東京大学大学院新領域創成科学研究科先進分子腫瘍学研究室の田村萌である。

文 献

- 1) Tsherniak A, Vazquez F, Montgomery PG, Weir BA, Kryukov G, Cowley GS, Gill S, Harrington WF, Sasha Pantel S, Krill-Burger JM, Meyers RM, Ali L, Goodale A, Lee Y, Jiang G, Hsiao J, Gerath WFJ, Howell S, Merkel E, Ghandi M, Garraway LA, Root DE, Golub TR, Boehm JS, Hahn WC. Defining a Cancer Dependency Map Cell 2017 Jul 27;170(3):564-576.e16. PMID: 28753430 doi: 10.1016/j.cell.2017.06.010
- 2) Chemaly ER, Troncione L, Lebeche D. SERCA Control of Cell Death and Survival. Cell Calcium. 2018 Jan; 69: 46–61. PMID: 28747251 doi: 10.1016/j.ceca.2017.07.001
- 3) Tamura M, Yonezawa T, Liu X, Asada S, Hayashi Y, Fukuyama T, Tanaka Y, Kitamura T, Goyama S. Scientific Reports. 2019 Jun 3;9(1):8171. PMID: 31160638 doi: 10.1038/s41598-019-44496-6.
- 4) Hayashi Y, Goyama S, Liu X, Tamura M, Asada S, Tanaka Y, Fukuyama T, Wunderlich M, O'Brien E, Mizukawa B, Yamazaki S, Matsumoto A, Yamasaki S, Shibata T, Matsuda K, Sashida G, Takizawa H, Kitamura T. Antitumor immunity augments the therapeutic effects of p53 activation on acute myeloid leukemia. Nature Communications. 2019 Oct 25;10(1):4869. PMID: 31653912 doi: 10.1038/s41467-019-12555-1.
- 5) Miller TE, Liao BB, Wallace LC, Morton AR, Xie Q, Dixit D, Factor DC, Kim LJY, Morrow JJ, Wu Q, Mack SC, Hubert CG, Gillespie SM, Flavahan WA, Hoffmann T, Thummalapalli R, Hemann MT, Paddison PJ, Horbinski CM, Zuber J, Scacheri PC, Bernstein BE, Tesar PJ & Rich JN. Transcription elongation factors represent in vivo cancer dependencies in glioblastoma Nature 2017 Jul 20;547(7663):355-359. PMID: 28678782 doi: 10.1038/nature23000.
- 6) Xie J, Pan H, Yao J, Zhou Y, Han W. SOCE and cancer: Recent progress and new perspectives. Int J Cancer. 2016 May 1;138(9):2067-77. PMID: 26355642 doi: 10.1002/ijc.29840.
- 7) Yang S, Zhang JJ, Huang X-Y. Orai1 and STIM1 are critical for breast tumor cell migration and metastasis. Cancer Cell 2009 Feb 3;15(2):124-34. PMID: 19185847 doi: 10.1016/j.ccr.2008.12.019.