

【目的】 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。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。著者は、マウス骨髄系腫瘍モデルを用いて *in vivo* CRISPR/Cas9 library スクリーニングを行い、骨髄系腫瘍の増殖を生体内特異的に抑制する分子として Ca²⁺シグナル制御分子 Atp2a2 (Serca) を同定した。そこで本研究では、Atp2a2 欠失が引き起こす Ca²⁺シグナルの異常が生体内特異的に骨髄系腫瘍の悪性を誘導するメカニズムの解析を行なった。

【方法】 MLL-AF9 をマウス骨髄細胞に導入して作製した急性骨髄性白血病細胞 (MLL-AF9 細胞) と、変異型 ASXL1・変異型 SETBP1 を導入して作製したマウス骨髄異形成症候群細胞 (combined expression of SETBP1 and ASXL1 Mutations : cSAM 細胞) に Cas9 および Atp2a2 標的 sgRNA を導入し、骨髄系腫瘍の増殖に及ぼす影響を移植モデルおよび *in vitro* 培養系で検証した。また、コントロールおよび Atp2a2 欠失細胞における細胞質、小胞体 Ca²⁺濃度を Fura-red を用いて測定し、Ca²⁺シグナルの変化を解析した。さらに、RNA-seq およびメタボローム解析を行い、Ca²⁺シグナルの変化が骨髄系腫瘍に及ぼす影響を多角的に解析した。

【結果】 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。これにより、骨髄系腫瘍細胞において Atp2a2 が生体内特異的に腫瘍抑制遺伝子として働いていることを確認した。さらに、Atp2a2 欠失骨髄系腫瘍細胞は生体内で抗がん剤に対する薬剤抵抗性を示すことを見出した。また、Atp2a2 欠失により小胞体内 Ca²⁺濃度の低下、細胞質内 Ca²⁺濃度の上昇、および store-operated Ca²⁺ entry (SOCE) の活性化などカルシウムシグナルに異常が生じることを突き止めた。さらに Atp2a2 欠失骨髄系腫瘍細胞が生体内特異的に増殖優位性を獲得する機序の1つとして、MHC class1 の発現低下により、T 細胞からの攻撃が減少することを明らかにした。本研究により、Atp2a2 欠失による Ca²⁺シグナル異常が生体内特異的に骨髄系腫瘍の悪性を促進するメカニズムが明らかとなった。また、腫瘍の発症・進展を生体内で制御する分子を探索するための *in vivo* CRISPR/Cas9 library スクリーニングの有用性を示すことができた。

Ca²⁺シグナル制御因子 ATP2A2 は、骨髄系腫瘍の増殖を生体内特異的に抑制する

