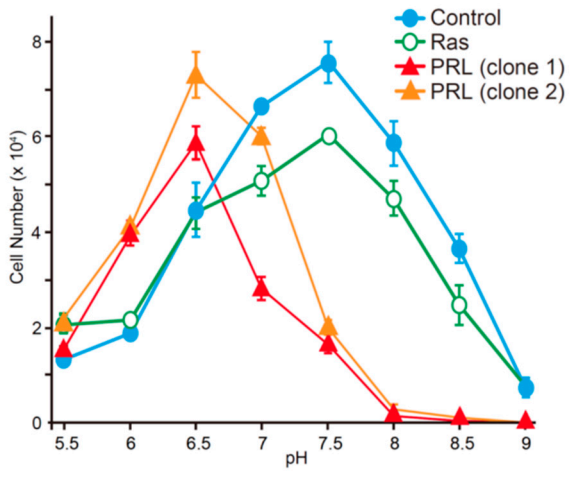
173　エネルギー代謝調節とがん微小環境酸性化の研究	船戸　洋佑

【目的】大腸がんの転移巣で特異的に高発現し、がんの悪性化に重要な働きをする PRL を上皮細胞で高発現させたところ、培地 pH に対する応答性が元の細胞と比べ大きく異なっていた。培地の pH を 7.5 に固定すると増殖がほぼ停止し、通常は増殖等に大きく影響しない pH 8.0 の弱アルカリ条件では細胞が死滅していた。その一方、培地の pH を悪性化したがん組織で見られる pH 6.5 の弱酸性状態に固定すると、細胞は旺盛に増殖することが分かった。つまり、PRL の高発現は周囲環境を酸性化させると共に、自らその pH 環境に適応して増殖しやすくなっている可能性が示唆された。PRL によるがん悪性化と密接に関わっていると想定され、本研究ではこの PRL 高発現応答性の酸性環境適応の分子機構解明を目指した研究を行った。

【方法】CRISPR/Cas9 法を用いたゲノムワイドなスクリーニングを行った。レンチウィルスを用いて sgRNA のプールを PRL 高発現細胞に導入したのち、PRL 高発現細胞のみが死滅する弱アルカリ条件で培養し、生き残った細胞のプールを得た。この集団より DNA を回収し、次世代シーケンサーを用いてどの遺伝子を標的とする sgRNA 配列が濃縮されているのか明らかにし、その後検証実験を行った。

【結果】次世代シーケンサーでの解析およびノックダウンによる検証の結果、*MYH9*、*GRIK5*、*SLC39A3* の 3 遺伝子のノックダウンにより PRL 依存的な pH 応答性の変化が消失した。このうち *MYH9* をコードする non muscle myosin IIA の機能としてリソソーム由来の小胞が細胞膜と融合してその内容物を放出する「lysosome exocytosis」と呼ばれる現象への関与が報告されていた。Lysosome exocytosis に伴って内腔の高濃度 H^+を細胞外に排出したり、細胞膜の酸抵抗性を高めることで酸性環境への適応に寄与している可能性が考えられ、実際 PRL 高発現細胞ではリソソーム内腔に局在する酵素 β-hexisaminidase が細胞外に盛んに分泌されていた。また *MYH9* のノックアウトによって β-hexisaminidase の放出と pH 応答性の変化の双方が消失しており、併せて PRL による pH 応答性の変化に non muscle myosin ⅡA と lysosome exocytosis が重要であると判明した。

PRL 高発現による環境 pH 応答性の変化



173. エネルギー代謝調節とがん微小環境酸性化の研究

船戸　洋佑

大阪大学 微生物病研究所 細胞制御分野

Key words：PRL，酸性適応，lysosome exocytosis

緒　言

がん細胞が乳酸を大量に産生するなど特殊なエネルギー代謝を行っていることは古くから知られ、その影響としてがんを取り巻く微小環境が酸性化してゆくことも示されている。このような酸性環境は周辺組織のリモデングを促しがん組織の増大に寄与する一方、がん細胞自身にとってのストレス因子でもあり、酸性環境に適応することはがん悪性化における重要なステップと考えられる。しかし、その具体的な仕組みはほとんど追究されてこなかった。私たちは大腸がんの転移巣で特異的に高発現し、がんの悪性化に重要な働きをしながら分子機能がまったく未解明だった PRL［1］の機能解析に取り組み、PRL が Mg^{2+}排出トランスポーターCNNM4 に結合して機能阻害することや、腸腫瘍が悪性化して筋層に浸潤するプロセスに重要であることなどを明らかにしてきた［2〜5］。この PRL を上皮細胞で高発現させたところ、培地が酸性化するなどエネルギー代謝に明確な変化が観察された。またこの細胞は培地 pH に対する応答性が元の細胞と比べて大きく異なっていた。培地の pH を 7.5 に固定すると増殖がほぼ停止し、通常は増殖等に大きく影響しない pH 8.0 の弱アルカリ条件で細胞が死滅していた。一方、培地の pH を悪性化したがん組織で見られる pH 6.5 の弱酸性状態に固定すると、細胞は旺盛に増殖することが分かった。つまり、PRL の高発現は周囲環境を酸性化させると共に、自らその pH 環境に適応して増殖しやすくなっている可能性が示唆された。PRL によるがん悪性化と密接に関わっていると想定され、本研究ではこの PRL 高発現応答性の酸性環境適応の分子機構解明を目指した研究を行った。

方　法

1.　CRISPR/Cas9 法を用いたゲノムワイドスクリーニング

HEK293FT 細胞に Human GeCKO v2 Library と Virapower Lentiviral Packaging Mix を遺伝子導入し、レンチウィルスを含む培養上清を回収し、超遠心によって濃縮後、薬剤誘導性 PRL3 発現 HEK293 細胞に添加した。その後、25 mM HEPES と NaOH の添加により pH を 8.25 に固定した DMEM にて DOX 存在下、3 日間培養した（この操作を以降「アルカリストレス」と称する）。生き残った細胞を通常の DMEM で再培養し、再度アルカリストレスを行った。このサイクルを細胞の生存率が上昇しなくなった、計 4 回行った。各細胞集団よりゲノム DNA を抽出後、sgRNA 配列およびその周辺を PCR にて増幅し、バンドを切り出し DNA を精製した。得られたサンプルの配列は HiSeq 2500（Illumina）を用いて解析した（約 1×10^7 リード）。取得したデータは MAGeCK、MAGeCK-VISPR、および RIGER プログラムにより解析した。

2.　shRNA 安定発現によるノックダウン

shRNA 発現コンストラクトは大阪大学大学院医学系研究科・附属共同研究実習センターよりご供与いただいた。レンチウィルスは前項と同様の手法にて作製し、細胞に感染させることで shRNA 安定発現株を得た。

3.　β-hexosaminidase 放出を指標とした lysosome exocytosis の評価

DOX 添加後 24 時間にて、培養上清を 2% BSA を含む血清不含 DMEM と交換し、さらに 3 時間培養した。培養上清を回収後、細胞を細胞溶解液（0.1% NP-40 in PBS）にてさらに回収し、それぞれ遠心後、上清を 1 mM の 4-Nitrophenyl N-acetyl-β-D-glucosaminide を含む 10 mM クエン酸緩衝液 （pH 4.5） と混和し 2 時間インキュベートした。400 mM の Na_2CO_3 を添加して反応を止めた後、OD_{405} を計測することで β-hexosaminidase の、培地中に放

出された活性と細胞中の活性のそれぞれを判定した。

結果および考察

1. ゲノムワイドスクリーニングによる pH 応答性関連遺伝子の同定

PRL 高発現による酸性環境適応の仕組みを明らかにするため、CRISPR/Cas9 法を用いたゲノムワイドなスクリーニングを行った。レンチウィルスを用いて sgRNA のプールを PRL 高発現細胞に導入したのち、PRL 高発現細胞のみが死滅する弱アルカリ条件で培養し、生き残った細胞のプールを得た。この集団より DNA を回収し、次世代シーケンサーでの解析の結果、濃縮されている遺伝子が同定でき（図 1）、そのうち FDR10%以下の 20 遺伝子についてノックダウンによる 2 次スクリーニングを行った。その結果、5 遺伝子については弱アルカリ条件での細胞死が有意に抑制されており、さらに各 pH 環境での培養も行ったところ、*MYH9*、*GRIK5*、*SLC39A3* の 3 遺伝子のノックダウンにより PRL 依存的な pH 応答性の変化が消失していた。

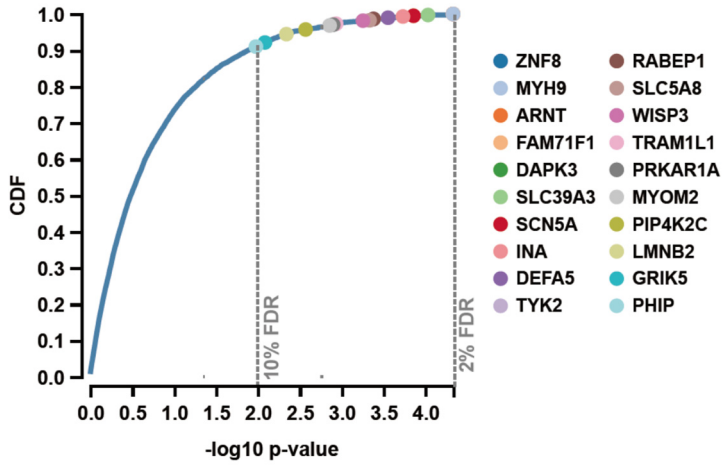


図 1. ゲノムワイドスクリーニングの結果

4 回目のアルカリストレス後のサンプルについての MAGeCK プログラムでの解析結果。各遺伝子についての p 値は MAGeCK プログラム中に実装されている MLE 法によって算出されている。

2. non muscle myosin IIA と lysosome exocytosis の重要性の発見

このうち *MYH9* をコードする non muscle myosin heavy chain IIA（NMHC-IIA）の機能としてリソソーム由来の小胞が細胞膜と融合してその内容物を放出する「lysosome exocytosis」と呼ばれる現象への関与が報告されていた[6]。Lysosome exocytosis に伴って内腔の高濃度 H^+を細胞外に排出したり、細胞膜の酸抵抗性を高めることで酸性環境への適応に寄与している可能性が考えられた。そこで PRL 高発現細胞における lysosome exocytosis の評価としてリソソーム内腔に局在する酵素 β-hexisaminidase の細胞外の放出を調べたところ、コントロール細胞と比べて有意に分泌される酵素の割合が増加していた。また *MYH9* のノックアウト細胞を CRISPR/Cas9 法により作製し、その重要性を調べたところ、β-hexisaminidase の放出と pH 応答性の変化の双方が消失しており、併せて PRL 高発現による pH 応答性の変化に NMHC-IIA と lysosome exocytosis が重要であると判明した（図 2）。本研究結果を踏まえて今後さらに解析を進めることで、がん細胞が酸性環境に適応し、悪性化を進めてゆくメカニズムが明らかになることが期待される。

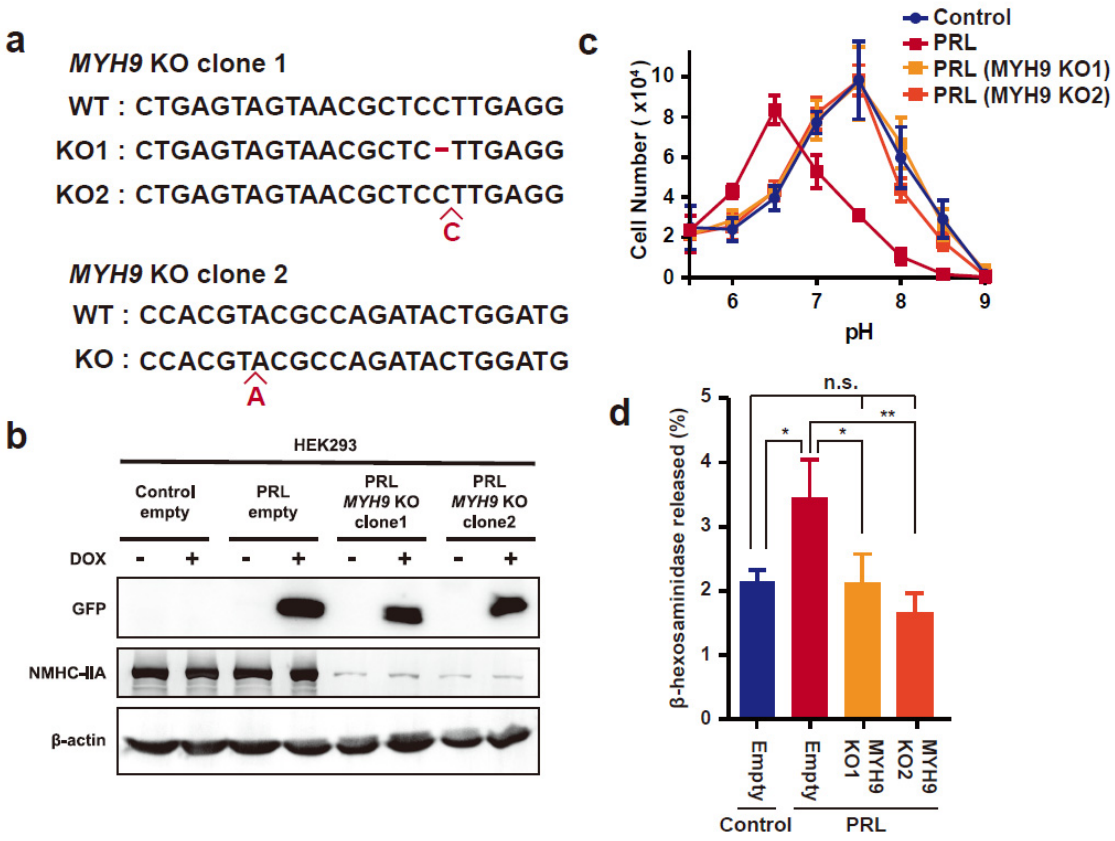


図 2. *MYH9* と lysosome exocytosis の重要性

a) *MYH9* ノックアウト細胞のシーケンス結果

b) 各細胞の細胞溶解液を回収し、図に示す抗体によるウェスタンブロットを行った。発現させた PRL には GFP タグがついており、抗 GFP 抗体にて検出している。

c) 各細胞を図に示す pH で固定した培地環境下で 3 日間培養し、生細胞数を計測した。

d) 各細胞から放出された β-hexisaminidase の活性の割合。3 回の実験結果の平均値および標準誤差を示しており、p 値は one-way ANOVA および two-tailed multiple Student's t-test with Tukey's correction によって求めた。それぞれ*$p < 0.05$、 **$p < 0.01$ を示す。

共同研究者・謝辞

本研究の実施にあたって、北海道大学遺伝子病制御研究所・分子腫瘍分野の藤田恭之先生および梶田美穂子先生、大阪大学微生物病研究所・遺伝情報実験センターの元岡大祐先生、大阪大学微生物病研究所・発癌制御研究分野の岡田雅人先生、梶原健太郎先生、大阪大学微生物病研究所・分子ウイルス分野の岡本徹先生、大阪大学微生物病研究所・分子細菌学分野の堀口安彦先生、照屋志帆乃先生にご助力いただきました。この場を借りて感謝申し上げます。

文　献

1) Saha S, Bardelli A, Buckhaults P, Velculescu VE, Rago C, St Croix B, Romans KE, Choti MA, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. A phosphatase associated with metastasis of colorectal cancer. Science. 2001 Nov 9;294(5545):1343-6. PMID: 11598267

2) Yamazaki D, Funato Y, Miura J, Sato S, Toyosawa S, Furutani K, Kurachi Y, Omori Y, Furukawa T, Tsuda T, Kuwabata S, Mizukami S, Kikuchi K, Miki H. Basolateral Mg^{2+} extrusion via CNNM4 mediates transcellular Mg^{2+} transport across epithelia: a mouse model. PLoS Genet. 2013;9(12):e1003983. PMID: 24339795 DOI: 10.1371/journal.pgen.1003983.

3) Funato Y, Yamazaki D, Mizukami S, Du L, Kikuchi K, Miki H. Membrane protein CNNM4-dependent Mg^{2+} efflux suppresses tumor progression. J Clin Invest. 2014 Dec;124(12):5398-410. PMID: 25347473 DOI: 10.1172/JCI76614.

4) Ishii T, Funato Y, Hashizume O, Yamazaki D, Hirata Y, Nishiwaki K, Kono N, Arai H, Miki H. Mg^{2+} Extrusion from Intestinal Epithelia by CNNM Proteins Is Essential for Gonadogenesis via AMPK-TORC1 Signaling in Caenorhabditis elegans. PLoS Genet. 2016 Aug 26;12(8):e1006276. eCollection 2016 Aug. PMID: 27564576 DOI: 10.1371/journal.pgen.1006276.

5) Gulerez I, Funato Y, Wu H, Yang M, Kozlov G, Miki H, Gehring K. Phosphocysteine in the PRL-CNNM pathway mediates magnesium homeostasis. EMBO Rep. 2016 Dec;17(12):1890-1900. PMID: 27856537

6) Encarnação M, Espada L, Escrevente C, Mateus D, Ramalho J, Michelet X, Santarino I, Hsu VW, Brenner MB, Barral DC, Vieira OV. A Rab3a-dependent complex essential for lysosome positioning and plasma membrane repair. J Cell Biol. 2016 Jun 20;213(6):631-40. doi: 10.1083/jcb.201511093. PMID: 27325790.