

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670125

研究課題名(和文)乳がん新規治療標的としてのカルシウムシグナル

研究課題名(英文)Calcium signal as a potential clinical target for breast cancer

研究代表者

大洞 將嗣 (Masatsugu, Oh-hora)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号：40351506

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：乳腺におけるカルシウムシグナルに焦点をあて、乳腺上皮細胞におけるストア作動性カルシウム流入の役割を解析した。まず、乳腺上皮細胞においてストア作動性カルシウム流入が活性化していることを明らかにした。次に、Stim1とStim2の両遺伝子を欠損するマウスの解析の結果、ストア作動性カルシウム流入が欠損した場合、未経産メスマウスの乳腺上皮細胞の発生や形成に影響はない一方、経産メスマウスではミルク分泌などが減少するため、産仔が発育不良となった。以上から、ストア作動性カルシウム流入は、乳腺上皮細胞の機能を正に制御することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the function of calcium signaling in the mammary gland, we have analyzed the role of store-operated calcium entry in mammary epithelial cells using cell-type specific Stim1 or Stim2 or both knockout mice. We found that store-operated calcium entry is activated in mammary epithelial cells. We then established mice in which store-operated calcium entry is ablated in mammary epithelial cells. The mice normally grew up and no abnormality of the development of mammary gland, however, new-born pups nursed by female mice ablated both Stim1 and Stim2 in mammary epithelial cells showed severe growth retardation because of impaired secretion or production of milk. These results indicate that store-operated calcium entry is essential for the function of mammary epithelial cells.

研究分野：免疫学

キーワード：受容体・チャネル シグナル情報伝達系 カルシウム

1. 研究開始当初の背景

生体は、細胞内、細胞間、あるいは組織間のシグナル伝達を適切に行うことによって、正常な生命活動を維持している。シグナル伝達に異常が生じた場合、組織の機能不全あるいは亢進、細胞死や細胞のがん化などが惹起される。様々ながんのうち、乳がんは女性の20人に1人(世界では8人に1人)が経験すると報告されている。さらに、乳がんは再発率が高く、肺などへの遠隔転移を起こしやすいがんであり、その転移を防ぐことが可能となれば、良好な予後につながる。したがって、乳腺組織の形成・維持とその破綻のメカニズムを解明することは、乳がんの発生、転移のメカニズムの理解を深め、乳がんの新規治療法の開発に大きく貢献すると考えられる。これまでに、カルシウムシグナル経路の最も代表的な転写因子 nuclear factor of activated T cells (NFAT)など、様々な分子が乳がんの転移に関与していることが報告されている。がん細胞においてNFATが活性化することによって、シクロオキシゲナーゼ2などの産生、プロスタグランジンE2の合成が誘導され、がん細胞の転移が促進される。さらに、血管内皮細胞増殖因子(VEGF)の産生を惹起して、血管新生を促進し、がん細胞の増殖に寄与する。近年、ストア作動性カルシウム流入と呼ばれる細胞外カルシウム流入機構の活性化が、乳がん細胞などのがん細胞における増殖や転移に関与するとの報告がされた。申請者は、ストア作動性カルシウム流入を欠損するStim1とStim2欠損マウスを世界に先駆けて樹立し、その活性化メカニズム、T細胞などの免疫細胞など様々な組織における生理的な役割を明らかにしてきた。しかし、乳腺組織の発生や機能における役割は不明である。一方、ヒトの場合、先天的にストア作動性カルシウム流入を欠損する患者は、重症複合免疫不全症だけでなく、汗腺の形成不全など、外胚葉異形成症も発症する。このことは、ストア作動性カルシウム流入が乳腺の形成や機能を制御する可能性を強く示唆しており、その異常が乳がんの発生や転移に関与する可能性は十分ある。

2. 研究の目的

本研究は、乳がんに対する新規がん治療戦略の候補として、ストア作動性カルシウム流入-カルシウムシグナルの可能性を検証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)乳腺上皮細胞におけるストア作動性カルシウム流入を、シングルセルイメージング法によって測定した。

(2)カルシウムシグナルによる乳腺細胞の分化・機能の制御機構を、以下の研究方法で解析を行った。Stim1(flox/flox)マウス、

Stim2(flox/flox)マウス、MMTV-Cre Tgマウスを用いて、乳腺細胞の分化、機能におけるストア作動性カルシウム流入の役割の解析を試みた。また別ラインとして、K14-Cre Tgマウスとも交配し、より広範な外胚葉由来細胞でストア作動性カルシウム流入を欠損するマウスを作製し、その解析を行った。

(3)カルシウムシグナルの標的候補分子を、網羅的な遺伝子発現解析を用いて同定し、その候補分子について、発現制御機構の解析や遺伝子欠損マウスの作製を行った。

(4)ヒト乳がん細胞でカルシウムシグナルの活性化を可視化できるレポーター細胞を、様々な遺伝子導入法によって試みた。

4. 研究成果

(1)乳腺上皮細胞におけるストア作動性カルシウム流入の活性化を解析した。野生型の未経産メスマウスから腹部と鼠蹊部の乳腺を切除し、酵素処理を行い、定法にしたがって乳腺上皮細胞を単離した。細胞をガラスプレートに播種し、レシオメトリックなカルシウム蛍光指示薬Fura-2でラベル後、灌流システムが付属した蛍光顕微鏡下でストア作動性カルシウム流入を測定した。ストア作動性カルシウム流入は、小胞体SERCA阻害剤タプシガルギン(thapsigargin)で惹起させた。その結果、乳腺上皮細胞においてストア作動性カルシウム流入が惹起された。したがって、T細胞などと同様に、外胚葉由来細胞である乳腺上皮細胞においてもストア作動性カルシウム流入が活性化していることが明らかとなった。

(2)ストア作動性カルシウム流入による乳腺器官形成・機能に関する解析を行った。MMTV-Cre Tgマウスとの交配では、Stim1やStim2を欠損するマウスを得ることができなかった。そのため、平行して作製していたK14-Cre Tgを用いたストア作動性カルシウム流入を欠損するマウスで解析を行った。その結果、Stim1あるいはStim2を単独で欠損するメスマウスは、乳腺の形成に大きな異常はなく、妊娠可能であり、保育も正常であった。Stim1とStim2を2重欠損するマウスは、オス・メスともに正常に発育した。またこのマウスにおける爪などの他組織の発生に大きな以上は認められなかった。しかし、Stim1とStim2を2重欠損するメスマウスは、妊娠可能で胎児の発生も正常であったが、遺伝形質にかかわらず全ての産仔において、その成長が不良であった。Stim1とStim2を2重欠損するメスマウスは、巣作りや産仔の回収といった保育行動は正常であった。また、コントロールのメスマウスに比べ、2重欠損メスマウスが保育する産仔の腹部のミルクスポットは著しく小さかった。さらに、産仔を別のマウスに保育させた場合、産仔は正常に成長した。一方、Stim1あるいはStim2を単独で欠損するメス

マウスの産仔において体重の減少は認められなかった。以上の結果から、Stim1とStim2は乳腺上皮細胞のストア作動性カルシウム流入の活性化において重複して機能していることが示唆された。さらに、ストア作動性カルシウム流入が、ミルクの生成、ミルクの分泌など乳腺の機能を制御していることが明らかとなった。

(3)野生型とStim1とStim2を2重欠損するT細胞を用いて、網羅的な遺伝子解析を行った結果、ヒストンリジン残基の脱メチル化酵素Kdm5bをカルシウムシグナルの標的分子として同定した。ストア作動性カルシウム流入が欠損した場合、無刺激の状態でも、この分子の発現が低下していた。本結果は、メラノーマ細胞においてもストア作動性カルシウム流入の減少によって、Kdm5bの発現が低下するという報告(Stanisz H., et al. 2014)と一致した。Kdm5bのプロモーター領域にはNFATで発現が誘導されるearly growth response 2 (Egr2)の結合領域が複数存在する。そこで、レポーターアッセイによってその可能性を検証したが、有意な差は認められなかった。

(4)Kdm5bの組織特異的ノックアウトマウスを樹立した。エクソン6の前後にIoxPサイトを挿入し、C57BL/6由来のES細胞を用いてマウスを作製した。キメラマウスから、ジャームライトランスミッションしたマウスを得ることができ、Flpe Tgマウスとの交配によってneo耐性遺伝子を除去することができた。現在、乳腺上皮細胞特異的Kdm5b欠損マウスの樹立を行っている。

(5)ヒト乳がん細胞株MCF7を用いて、カルシウムシグナルの活性化をGFPで測定するレポーター細胞の作製を試みた。NFATプロモーターによってGFPが発現するレポーター遺伝子を通常のトランスフェクション、ウイルスプロモーターを不活化したレトロウイルスを用いた遺伝子導入で行った。しかしいずれの方法においても、カルシウムシグナル活性化依存的にGFPが発現するもののS/N比が低いために、実用に堪えられるレポーター細胞をえることはできなかった。

(6)乳腺上皮細胞においてStim1とStim2が重複して機能しており、Stim1とStim2が活性化するカルシウムチャネルの機能も同様に重複している可能性が高いと考えられた。そこで、Stim分子が活性化するカルシウム遊離活性化カルシウムチャネルOraiファミリー分子を欠損するマウスの作成を行った。特にOrai1遺伝子とOrai2遺伝子は同一染色体上に存在するため、ゲノム編集で各遺伝子のノックアウトマウスの作製を行い、これまでに1ラインを作製した。作製したマウスでは、標的とした遺伝子のmRNAおよびタンパク質

の発現は消失していた。また、他の分子の発現レベルに変化はないことも確認した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

McDonald BD, Bunker JJ, Erickson SA, Oh-hora M, Bendelac A. Crossreactive $\alpha\beta$ T cell receptors are the predominant targets of thymocyte negative selection. *Immunity*. 43, 859-869 (2015) Doi: 10.1016/j.immuni.2015.09.009

Kiyotake R, Oh-hora M, Ishikawa E, Miyamoto T, Ishibashi T, Yamasaki S. Human Mincle binds to cholesterol crystals and triggers innate immune responses. *J Biol Chem*. 290, 25322-25332 (2015) Doi: 10.1074/jbc.M115.645234.

Garcia-Alvarez G, Shetty MS, Lu B, Yap KA, Oh-hora M, Sajikumar S, Bichler Z, Fivaz M. Impaired spatial memory and enhanced long-term potentiation in mice with forebrain-specific ablation of the Stim genes. *Front Behav Neurosci*. 9, Article 180 (2015) Doi: 10.3389/fnbeh.2015.00180.

Miyake Y, Oh-hora M, Yamasaki S. C-type lectin receptor MCL facilitates Mincle expression and signaling through complex formation. *J Immunol*. 94, 5366-5374 (2015) Doi: 10.4049/jimmunol.1402429.

Yonekawa A, Saijo S, Hoshino Y, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, Inoue H, Tanaka M, Yoneyama M, Oh-hora M, Akashi K, Yamasaki S. Dectin-2 is a direct receptor for mannose-capped lipoarabinomannan of mycobacteria. *Immunity*. 41, 402-413 (2014) Doi: 10.1016/j.immuni.2014.08.005.

[学会発表](計 9 件)

Oh-hora, M., Lu, X. and Yamasaki, S. T-cell specific loss of store-operated calcium entry causes Th2-type chronic inflammation. 第44回日本免疫学会学術集会、2015年11月18-20日、札幌

Oh-hora, M., Lu, X. and Yamasaki, S. Role of STIM-mediated calcium signaling in immune system. The 10th International Symposium of the Institute Network、2015年7月23-24日、札幌

Yoshikawa, S., Oh-hora, M., Miyake, K., Li, L., Ohta, T., Horiguchi, K.,

Yamanashi, Y. and Karasuyama, H. Endoplasmic reticulum calcium sensors, Stim1 and Stim2, control dendritic cell functions. NIPS International Workshop, TRPs and SOCs, 2015年6月4-5日、岡崎

大洞将嗣, 陸修遠, 山崎晶: Deficiency of Stim-dependent Ca^{2+} entry in T cells promotes IL-4-producing follicular helper T cell differentiation and causes chronic inflammation. Kyoto T cell Conference, 2015年5月15-16日、京都

Yoshikawa, S., Oh-hora, M., Wakamori, M., Miyake, K., Li, L., Horiguchi, K., Ohta, T., Adachi, T., Yamanashi, Y. and Karasuyama, H. Molecular mechanism of Ca^{2+} influx by IgE/antigen stimulation in basophils. 第43回日本免疫学会学術集会、2014年12月10-12日、京都

Yonekawa A, Saijo S, Miyake Y, Ishikawa E, Suzukawa M, Yoneyama M, Oh-hora M, Yamasaki S. Dectin-2 recognizes mycobacterial lipoarabinomannan and contributes to host defense during infection. 第43回日本免疫学会学術集会、2014年12月10-12日、京都

Lu, X., Oh-hora, M., Mori, M., and Yamasaki, S. Endoplasmic reticulum calcium sensors, Stim1 and Stim2, control dendritic cell functions. 第43回日本免疫学会学術集会、2014年12月10-12日、京都

Oh-hora, M., Lu, X. and Yamasaki, S. Calcium signaling in chronic inflammation. 24th Hot Spring Harbor International Symposium, 2014年11月7-8日、福岡

Oh-hora, M., Lu, X., Yamasaki, S. and Takayanagi, H. Mechanism of chronic inflammation by the lack of store-operated calcium entry. FASEB Science Research Conference, Calcium and cell function, 2014年6月1-6日、Nassau, Bahamas

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://www.bioreg.kyushu-u.ac.jp/mib/divisions/summary_in_mi.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大洞 将嗣 (OHORA, Masatsugu)

九州大学・生体防御医学研究所・准教授

研究者番号: 40351506