

令和 2 年 6 月 23 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10542

研究課題名(和文) 不良ミトコンドリア由来の活性酸素種を標的にした新規癌治療法の開発

研究課題名(英文) Novel cancer therapy to target ROS from unhealthy mitochondria

研究代表者

二村 学 (FUTAMURA, MANABU)

岐阜大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：10415515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：がん細胞の持つ、不良なミトコンドリアを修復する可能性のあるMieap遺伝子の働きを、乳癌細胞を用いて研究した。Mieap蛋白を乳癌細胞に多量に発現させると、カスパーゼ依存性のアポトーシスが起きる事が分かった。しかし乳癌の手術検体を見ると、多くの癌でMieapの発現は減少し、その制御機構の破綻が見られた。すなわち癌細胞は癌抑制機能を持つMieapの発現を押さええて生存しようとしていると考えることが出来る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がん細胞のミトコンドリア機能不全はWarburg 効果の一端を表しており、がんの特徴である。今回Mieapは多量発現で癌細胞にアポトーシスを誘導した。一方少量ではミトコンドリアの修復に携わっており、Mieapの重要な腫瘍抑制作用と考える。癌種による違いも明らかになってきた。これらは癌種による違いも明らかになってきており臨床応用のための重要な基礎データになっていくと考える。

研究成果の概要(英文)：Mieap has been known for involvement of mitochondrial quality control (MQC). We investigated the potential role of Mieap, a downstream of p53, in breast cancer. First, we observed the phenotype of breast cancer cell lines after infected with Ad-Mieap in vitro. Overexpression of Mieap induced caspase-dependent apoptosis in a moi-dependent manner. Particularly, NIX, a co-factor of MQC, is associated with Mieap-induced apoptosis. Second, Mieap expression was decreased in invasive ductal carcinoma less than ductal carcinoma in situ and fibroadenoma by immunohistochemistry. Breast cancer patients with impaired p53/Mieap-regulated MQC showed shorter disease-free survival than those without the MQC pathway. These findings demonstrated that Mieap may play an important role in MQC in cancer

研究分野：分子腫瘍学乳腺外科

キーワード：Mieap p53 Breast Cancer promoter methylation

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアの主な生理的役割は細胞生存に重要なエネルギー源である ATP 産生であるが、その過程で種々の活性酸素種(ROS)を発生する。過剰な ROS の産生は DNA、蛋白質、脂質に酸化ダメージを与え DNA の不安定性を惹起し、種々の疾患の原因になるとされる。一方でミトコンドリアは抗酸化作用も併せ持ち細胞内 ROS レベルは適正に保たれている。癌細胞は増殖が盛んであるにもかかわらず ROS レベルが高く ATP 産生の劣る解糖系に依存しており(Warburg 効果)、不良なミトコンドリアを持つことで正常細胞より高いレベルの ROS を維持している。

Mieap は p53 下流遺伝子として 2011 年国立がん研究センターで単離された。この遺伝子は検索しえた癌細胞株の半数以上でプロモーターのメチル化による発現消失を認めた。数多くの p53 下流遺伝子の中で、癌細胞においてこれほど顕著な発現異常をきたす遺伝子はなく、Mieap と癌との密接な関係が示唆された。更に *in vitro* で Mieap を強制発現させるとミトコンドリア内の酸化蛋白質の除去、ATP 産生能改善、ROS 産生低下、ミトコンドリア構造の形態的改善が見られた (MALM: Mieap-induced accumulation of lysosome-like organelles within mitochondria と命名)。修復不能な場合、Mieap 発現量に依存し不良なミトコンドリアが除去 (MIV: Mieap-induced vacuole と命名)されることも判った。一連の現象は Mieap ノックダウンの際も確認され、ミトコンドリア自浄作用(mitophagy)の一つと考えられる。即ち Mieap は、エネルギー産生効率が悪く ROS を産生し続ける不良なミトコンドリアに対し、ROS をセンサーとして感知し修復あるいは除去することでミトコンドリアの機能を改善・維持している、と考えられる。我々は、「Mieap は発癌や癌の増殖・進展に対して抑制的に働き、癌は生存のためにプロモーターのメチル化や p53 不活化により Mieap の発現を消失させる」というモデルを提唱した。小腸に腫瘍(腺腫)を多発する Min マウスと Mieap ノックアウトマウスを交配させると、有意な腫瘍数の増加と悪性度の増加を認めた。この実験的事実からもヒト癌臨床検体を用いた Mieap の解析は喫緊の課題である。最近の大腸癌臨床検体を用いた解析では 70%以上の癌で p53 変異、Mieap および co-factor である BNIP3 の遺伝子変異やプロモーターメチル化が認められている。

2. 研究の目的

乳癌は日本のみならず全世界で罹患率の最も高い女性の癌であるが、増殖シグナルとしてエストロゲン受容体と増殖因子膜型受容体 (HER2) の 2 系統が知られており、各受容体間にシグナルクロストークが存在し、治療抵抗性にも深く関わっている。これまでの研究結果から Mieap の腫瘍増殖抑制を利用した臨床応用への可能性を以下のように考えている。

Mieap によって癌細胞のミトコンドリア機能が回復すると ROS 産生が減少し癌細胞増殖シグナルが抑制され腫瘍増殖抑制に至る。癌の悪性度を下げ Tumor dormancy を誘導し、正常の細胞に近付けるような癌の形質転換をめざす。このような ROS ならびにミトコンドリアを標的とした新たな癌治療の道を開拓したいと考えている。

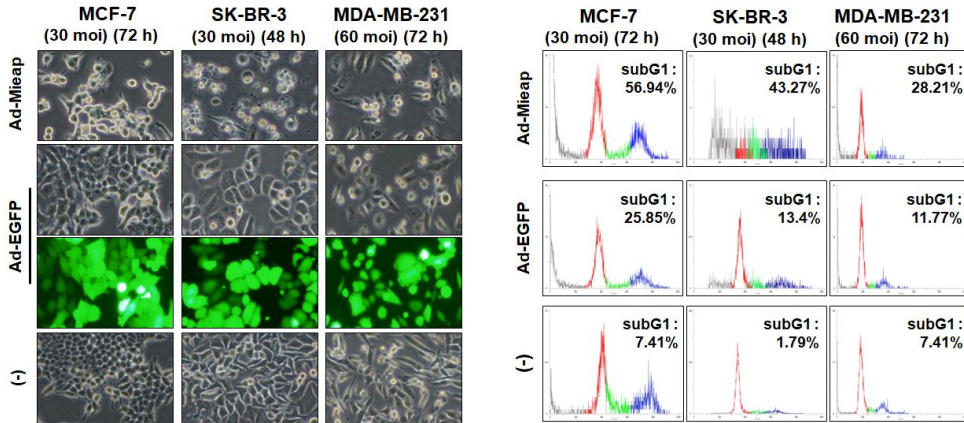
3. 研究の方法

不良なミトコンドリアが自然発生ヒト腫瘍においてどの程度見られるかは不明である。当院で生検・手術時に採取保存した乳癌(浸潤癌、非浸潤癌)と乳腺良性腫瘍検体を用いて以下の実験を行った。(1) アデノウイルスを用いて Mieap をがん細胞株に導入したときに見

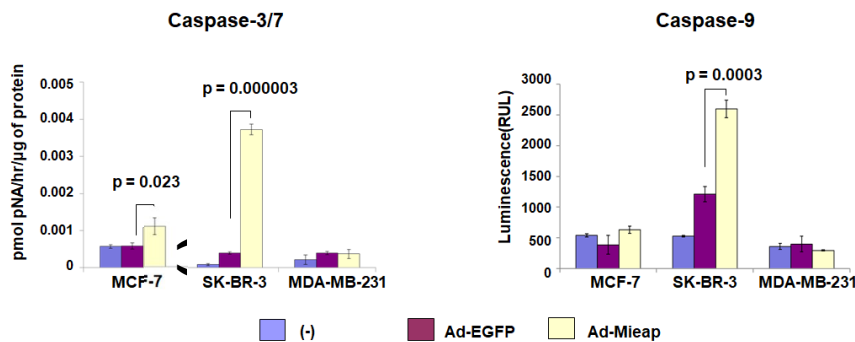
られる表現型を、分子生物学的に解析を行いその意義について検討する。(2) Mieap とその制御機構 p53-Mieap-BNIP3 経路の genetic, epigenetic な遺伝子変異検索を行う。

4 . 研究成果

Mieap 蛋白を乳癌細胞 (MCF7, SK-BR3, MDA-MB-231) に多量に発現させると、24 時間経過後から MIV と呼ばれる黒玉があらわれ、やがて細胞は浮き断片化していった(左下)。これを FACS で見るとアデノウイルスの量依存的に SubG1 の増加が見られた(右下)。



この時のカスパーゼ測定を行うと、カスパーゼ 3/7, 9 が Mieap 発現細胞で有意に増加していた(ウエスタンブロットでは断片化も見られた)このことから、Mieap はカスパーゼ依存性アポトーシスを来すことが分かった。

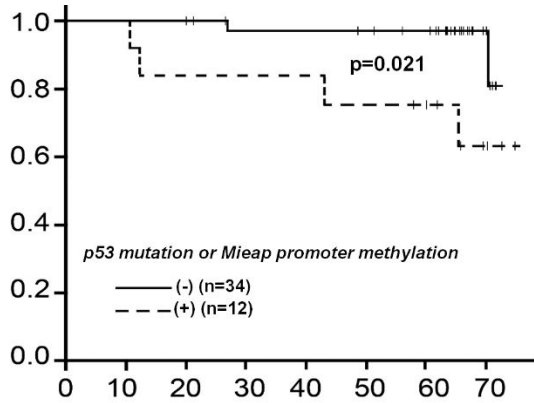


乳腺腫瘍摘出標本による、Mieap の免疫染色を行ったところ、浸潤性乳管癌 (Invasive ductal carcinoma) は非浸潤性乳管癌 (DCIS)、良性腫瘍 (線維腺腫 FA) よりも有意に発現が低下していた。

| | Mieap | | Positive rate (%) |
|---------------------------------|-------|-----|-------------------|
| | (+) | (-) | |
| Invasive ductal carcinoma (IDC) | 24 | 51 | 32 |
| Ductal carcinoma in situ (DCIS) | 15 | 12 | 55.6 |
| Fibroadenoma (FA) | 16 | 2 | 88.9 |

Statistical significance: p=0.0389 (IDC vs DCIS), p<0.0001 (IDC vs FA), p=0.0234 (DCIS vs FA).

また、乳癌組織における、Mieap のプロモーターメチル化、p53 変異検索を行った所、Mieap プロモーターのメチル化が 13% (6/46), p53 変異が 13% (6/46%)見られた。P53/Mieap によるミトコンドリア品質管理経路(MQC)の不具合は 26%(12/46%)。一方、MQC の Co-factor である、BNIP3 や NIX のメチル化はなかった。この経路の異常を来した乳癌は有意に予後不良（無再発生存期間の有意な短縮）であった。



これらの結果から、p53 の下流遺伝子 Mieap はミトコンドリア品質管理を通して、癌化を抑制して細胞代謝機能を正常に保とうとしていることが示された。特にこの p53/Mieap MQC 経路の異常を来していた乳癌 12 例は、Triple negative、HER2 陽性、Luminal B といった Aggressive phenotype であった点も興味深い。この特徴から臨床応用の可能性を探っていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Gaowa S, Futamura M*, Tsuneki M, Kamino H, Tajima JY, Mori R, Arakawa H, | 4. 巻 109 |
| 2. 論文標題 Possible role of p53/Mieap-regulated mitochondrial quality control as a tumor suppressor in human breast cancer. | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 3910-3920 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13824 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 二村 学 |
| 2. 発表標題 p53下流遺伝子Mieapの乳腺腫瘍における発現とその意義について |
| 3. 学会等名 日本乳癌学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Manabu Futamura |
| 2. 発表標題 Potential role of Mieap, a downstream gene of p53, and inactivation of Mieap-regulated mitochondrial quality control in breast cancer. |
| 3. 学会等名 第56回日本癌治療学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Manabu Futamura |
| 2. 発表標題 Possible role of p53/Mieap-regulated mitochondrial quality control as a tumor suppressor in human breast cancer |
| 3. 学会等名 an Antonio Breast cancer meeting 2019（国際学会） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 二村 学 |
| 2. 発表標題 p53下流遺伝子Mieapの乳癌における発現異常とその意義について |
| 3. 学会等名 第24回日本乳癌学会学術集会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 スチンゴア |
| 2. 発表標題 p53下流遺伝子Mieapの乳腺腫瘍における発現とその意義について |
| 3. 学会等名 第39回癌免疫外科研究会 |
| 4. 発表年 2018年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|