

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430125

研究課題名(和文) ヒトがん組織におけるp53/Mieap経路の異常解析

研究課題名(英文) Analysis of p53/Mieap pathway in primary human cancer tissues

研究代表者

加美野 宏樹 (Kamino, Hiroki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・研究員

研究者番号：00625692

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がん・膵がん・乳がん・胃がん・食道がん症例のがん組織について解析したところ、50～70%の症例でMieap制御性ミトコンドリア機構が異常をきたしていることが明らかとなった。また、その結果として、ほぼ100%の症例でがん細胞特異的に多量の異常ミトコンドリアの集積を認めた。このミトコンドリアからは高いレベルの活性酸素種(ROS)が産生されており、この異常ミトコンドリア由来ROSはがん細胞の遊走及び浸潤活性を顕著に促進させた。以上の結果から、Mieapは生体内の低酸素がん微小環境下においてミトコンドリアの品質管理を介して、がんの増殖・浸潤・転移を抑制している可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The Mieap-regulated mitochondrial quality control is inactivated in 50～70% tumors of colorectal, pancreatic, breast, gastric, and esophageal cancer patients. As the result, unhealthy mitochondria dramatically and specifically accumulated in the cancer cells in the in vivo tumor microenvironment. The cancer-specific unhealthy mitochondria produce high level of reactive oxygen species, leading to the enhanced activities of cancer migration and invasion under hypoxic conditions. These results suggest that the Mieap-regulated mitochondrial quality control has a critical role in tumor suppression in the in vivo hypoxic tumor microenvironment.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：p53

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは真核生物の細胞小器官であり、その主な生理的役割は、細胞の生存に必要なエネルギー源である ATP 産生である。その反応はクエン酸回路を介した複雑な酸化還元反応からなり、電子伝達系による酸化的リン酸化によって ATP が産生されるが、その過程において種々の活性酸素種 (ROS) を発生する。一方でミトコンドリアは Superoxide dismutase (SOD) 等を介した抗酸化機能も併せ持つことで、細胞内 ROS を適切なレベルに維持していると考えられている。

細胞に対する過剰な ROS は DNA、タンパク質、脂質を酸化することによりダメージを与え、不安定性を惹起することによって、がんを始めとする様々な疾患の原因になると言われている。事実、がん細胞のミトコンドリア DNA には変異が多く、ATP 産生を酸化的リン酸化より効率の劣る解糖系に依存しており (Warburg 効果)、ROS レベルも高く維持されていることから、がん細胞ではむしろ不良なミトコンドリアを持つことが特徴であるとさえ言える。しかしながら、がん細胞でもあるレベル以上の ROS が蓄積すると細胞死が誘導されるため、がん細胞の ROS を標的にした治療の試みや化合物の開発も進められている。このように、がんを始めとする様々な疾患における不良なミトコンドリアの蓄積は、現象として語られてはいるものの、その詳細なメカニズムについては未だ解明には至ってはいない。

我々は長年「p53 標的遺伝子の同定とその機能解析に関する研究」を行い、様々な標的遺伝子の同定とその機能を報告してきた。その一連の研究の進展の過程から、新規 p53 標的遺伝子として Mieap 遺伝子を同定し、その機能解析から Mieap タンパク質によるミトコンドリア品質管理に関する全く新しい機構を発見するに至った (PLoS One 17: e16054, 2011) (PLoS One 17: e16060, 2011)。

我々のこれまでの解析から、がん細胞に特異的な不良ミトコンドリアにより生成される ROS に反応して p53 が活性化し、活性化 p53 によって誘導される Mieap タンパク質が、(1) ミトコンドリアの構造破壊を伴わずに、ミトコンドリア内へリソソームタンパク質を集積させ (MALM: Mieap-induced Accumulation of Lysosome-like organelles within Mitochondria)、結果としてミトコンドリアの酸化タンパク質を除去し、不良なミトコンドリアを修復するか、あるいは(2)液泡様構造物 (MIV: Mieap-Induced Vacuole) を誘導し、不良なミトコンドリアを液泡内へ丸ごと飲み込み除去するか、という2つの機能を制御することでミトコンドリアの品質管理に重要な役割を果たす事実を見いだした (PLoS One 17: e16054, 2011) (PLoS One 17: e16060, 2011)。

この機構は p53/Mieap 経路によって ROS 依存的に制御を受けているが、p53 の変異や Mieap 遺伝子プロモーターのメチル化に起因する発現の消失は、様々な臓器由来のがん細胞株で見ることができる。このことはがん細胞における不良なミトコンドリアの蓄積が、p53/Mieap 経路の異常によるものであると推測される。一方で Mieap タンパク質はミトコンドリア外膜に局在する BNIP3 や BNIP3L(NIX) といったタンパク質と結合することで、MALM を制御していることが明らかとなっている (PLoS One 7: e30767, 2012)。

先行研究より、Mieap 遺伝子や BNIP3 遺伝子のプロモーター領域がヒト臨床大腸がん組織において高頻度にメチル化を受けていることを見いだしており、p53 変異とも組み合わせると、実に 80% 近くの大腸がんでは p53/Mieap/BNIP3 経路に異常をきたしている可能性を明らかにしている。このことから Mieap を介したミトコンドリア品質管理機構を詳細に検討することは、がん細胞の特徴や本質に迫ることにもなり得ると考えた。

2. 研究の目的

これまでの研究から、細胞株レベルにおいて、Mieap のプロモーターは両アレルとも高頻度にメチル化によって不活性化されており、様々ながん種において Mieap の発現は完全に消失している。その結果多くのがん細胞株において Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構は完全に不活性化されていた。これら細胞株では、高いレベルの ROS を産生する不良なミトコンドリアが蓄積して、このミトコンドリア由来 ROS は低酸素状態でがん細胞の遊走活性と浸潤活性を顕著に亢進させた。

そこで、この細胞株で観察された現象が、「果たして臨床がん組織においても重要な意味を持ちうるか？」という疑問に対して、大腸がん・膵がん・乳がん・胃がん・食道がん症例のがん組織における Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構の異常を詳細に解析し、ヒト臨床がん組織における本機能の意義を明らかとする。また、本機能の不活性化によって引き起こされると予想される、生体内のがん組織のがん細胞への異常ミトコンドリアの集積の有無や、そこから生成される酸化ストレスの状況についても明らかとする。

3. 研究の方法

(1) 臨床がん組織検体

解析対象の臨床がん組織検体は、国立がん研究センター中央病院や共同研究先である岐阜大学附属病院で手術を行った大腸がん・膵がん・乳がん・胃がん・食道がん症例の診療残余検体について、いずれもそれぞれの施設における倫理審査委員会によって承認された研究計画に基づいて解析を進める。

(2) ゲノム・エピゲノム解析

臨床がん組織より DNA を抽出し、ゲノム・エピゲノム解析を行う。検査項目は、いずれもこれまでの研究成果から明らかとなってい

る Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構に不可欠な、p53, Mieap, BNIP3, NIX の 4 項目とし、p53 については遺伝子変異の有無を直接シーケンス法によって行い、Mieap/BNIP3/NIX については、プロモーターのメチル化についてメチル化 PCR 法によって行う。

(3) 免疫組織化学染色

臨床がん組織に対して、抗 Mieap 抗体、抗ミトコンドリア抗体（異常ミトコンドリアの評価）、抗ニトロチロシン抗体（酸化ストレスの評価）、抗 p53 抗体などを用いて免疫組織化学染色を行う。

4. 研究成果

(1) ゲノム・エピゲノム解析

大腸がん症例については 70%、膵がん症例については 70%、胃がん症例については 60%、乳がん症例については 50%、食道がん症例については 50% の頻度で、p53 変異あるいは Mieap/BNIP3 のプロモーターメチル化の少なくともいずれか一つの異常を認めたことから、Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構は臨床がん組織において少なくともこれらの頻度で不活性化されている可能性が示唆された。未だ明らかとなっていない Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構に不可欠の関連遺伝子・関連分子の異常の存在を考慮すると、本機能は臨床がん組織においてほぼ 100% 近く不活性化されている可能性が推測された。

大腸がん症例の結果については、LS174T 大腸がん細胞株を用いて、p53 変異及び Mieap/BNIP3 プロモーターメチル化を *in vitro* で模倣・再現し、(1) 本機能が低酸素で活性化すること、(2) p53/Mieap/BNIP3 のいずれかのノックダウンで Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構が完全に不活性化されること、(3) 結果としてがん細胞に高

いレベルの ROS を産生する不良なミトコンドリアが蓄積すること、(4) この異常ミトコンドリア由来 ROS ががん細胞の遊走活性・浸潤活性を顕著に亢進することを示し、以上の結果を論文発表した (Oncogenesis 5: e181, 2016)。

(2) 免疫組織化学染色

大腸がん症例、胃がん症例、乳がん症例について免疫組織化学染色を行った。結果として、Mieap の発現は高頻度に消失あるいは異常を示した。それに対応して、大腸がん・胃がん・乳がんのいずれのがん組織においても、がん細胞には異常な形態を示す不良ミトコンドリアが多量に集積していることを明らかとした。さらに、これら異常ミトコンドリアからは高いレベルの酸化ストレスが発生していることを確認した。

以上の結果から、細胞株で観察された Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構の高頻度の不活性化は、臨床がん組織においても同様に発生していることが示された。さらに本機能の不活性化は、生体内のがん組織において異常なミトコンドリアの多量の集積を招いている可能性があり、このがん特異的異常ミトコンドリアから発生する高いレベルの ROS ががん細胞の浸潤転移に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。

本研究課題の成果から、「Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構は生体内の臨床がんにおいても重要な役割を果たしている」と考えられ、新しいがん抑制機能としてのメカニズムであると考えられる。

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 3 件)

1. Mieap-regulated mitochondrial quality control is frequently inactivated in human

colorectal cancer.

Kamino H, Nakamura Y, Tsuneki M, Sano H, Miyamoto Y, Kitamura N, Futamura M, Kanai Y, Taniguchi H, Shida D, Kanemitsu Y, Moriya Y, Yoshida K, Arakawa H. Oncogenesis. 査読有 2016; 4: e181. doi: 10.1038/oncsis.2015.43.

2. Mieap suppresses murine intestinal tumor via its mitochondrial quality control.

Tsuneki M, Nakamura Y, Kinjo T, Nakanishi R, Arakawa H. Sci Rep. 査読有 2015; 5:12472. doi: 10.1038/srep12472.

3. P53 誘導性蛋白質 Mieap による新規ミトコンドリア品質管理機構 がん抑制遺伝子 p53 の新しい機能 荒川博文 医学のあゆみ 2014 年 250 巻 p.505-510

[学会発表](計 14 件)

1. 常木 雅之、中村康之、金城貴夫、荒川博文、「Mieap は胃粘膜上皮悪性化機転を抑制する」平成 27 年 10 月 8 日-平成 27 年 10 月 10 日 第 74 回日本癌学会学術総会 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市)

2. 中村康之、喜多村憲章、安田さや香、諸田沙織、常木雅之、中西るり、荒川博文、「消化管腫瘍の発生及び進展における Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構の役割について」平成 26 年 12 月 4 日 第 14 回日本ミトコンドリア学会年会 九州大学百年講堂(福岡県福岡市)

3. 荒川博文「Mieap によって制御されるミトコンドリア品質管理機構とそのがんでの異常について」平成 26 年 9 月 25 日 第 73 回日本癌学会学術総会(招待講演)パシフィコ横(神奈川県横浜市)

4. 中村康之、喜多村憲章、加美野宏樹、佐野仁哉、荒川博文、「マウス消化管腫瘍の発生及び進展における Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構の役割」平成 26 年 9 月 26 日 第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横(神奈川県横浜市)

5. 荒川博文 「Mitochondrial quality control and cancer - a new function of p53」平成 26 年 4 月 17 日 ソウル大学がん研究所国際がんシンポジウム(招待講演)木浦(韓国)

6. 加美野宏樹、中村康之、佐野仁哉、村井竜也、齋藤有理、二村学、吉田和弘、平岡伸介、金井弥栄、九嶋亮治、片桐豊雅、荒川博

文、「Frequent inactivation of the Mieap-regulated mitochondrial quality control in pancreatic and breast cancer」平成26年4月6日 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2014 サンディエゴ(アメリカ)

7. 中村康之、加美野宏樹、齋藤有理、喜多村憲章、佐野仁哉、荒川博文、「Specific role of Mieap alpha in Mieap-induced vacuole generation through an interaction with UVRAG」平成26年4月6日 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2014 サンディエゴ(アメリカ)

8. 中村康之、喜多村憲章、加美野宏樹、佐野仁哉、村井竜也、齋藤有理、荒川博文、「p53-dependent and independent functions of Mieap」平成26年4月7日 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2014 サンディエゴ(アメリカ)

9. 加美野宏樹、中村康之、喜多村憲章、宮本崇史、吉田将紀、齋藤有理、佐野仁哉、平岡伸介、金井弥栄、九嶋亮治、荒川博文、「Mieap 誘導性液胞様構造物の形成における UVRAG との結合を介した Mieap の役割について」平成25年12月19日-平成25年12月21日 第7回オートファジー研究会 ヤマハリゾートつま恋(静岡県掛川市)

10. 加美野宏樹、中村康之、佐野仁哉、村井竜也、齋藤有理、二村学、吉田和弘、平岡伸介、金井弥栄、九嶋亮治、荒川博文、「Frequent inactivation of the Mieap-regulated mitochondrial quality control in pancreatic and breast cancer」平成25年11月6日-平成25年11月7日 International Symposium on Mitochondria 2013 六本木アカデミーヒルズ49(東京都)

11. 加美野宏樹、中村康之、佐野仁哉、村井竜也、齋藤有理、二村学、吉田和弘、平岡伸介、金井弥栄、九嶋亮治、荒川博文、「Frequent inactivation of the Mieap-regulated mitochondrial quality control in pancreatic and breast cancer (膵臓がん及び乳がんで見られる Mieap によるミトコンドリア品質管理機構の破綻とその意義について)」平成25年10月3日-平成25年10月5日 第72回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

12. 加美野宏樹、中村康之、佐野仁哉、齋藤有理、二村学、吉田和弘、平岡伸介、金井弥栄、九嶋亮治、荒川博文、「Frequent inactivation of the Mieap-regulated mitochondrial quality control in different types of cancer 様々ながんで見られる Mieap によるミトコンドリア品質管理

機構の破綻とその意義について」平成25年9月4日-平成25年9月7日 平成25年度がん若手研究者ワークショップ 蓼科グランドホテル滝の湯(長野県茅野市)

13. 加美野宏樹、中村康之、喜多村憲章、佐野仁哉、市ノ瀬志津子、荒川博文、「Mieap, a p53 inducible protein, controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria」平成25年5月5日-平成25年5月7日 Cell Symposia 2013 Mitochondria リスボン(ポルトガル)

14. 加美野宏樹、中村康之、喜多村憲章、二村学、吉田将紀、村井竜也、齋藤有理、佐野仁哉、金井弥栄、森谷宜皓、荒川博文、「Frequent inactivation of the Mieap-regulated mitochondrial quality control in colorectal cancer」平成25年4月6日-平成25年4月10日 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013 ワシントン(アメリカ)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

〔その他〕
ホームページ情報
<http://www.nccri.ncc.go.jp/s004/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加美野 宏樹 (KAMINO HIROKI)
国立研究開発法人国立がん研究センター・
研究所・研究員
研究者番号：00625692

(2) 連携研究者

荒川 博文 (ARAKAWA HIROFUMI)
国立研究開発法人国立がん研究センター・
研究所・分野長
研究者番号：70313088

中村 康之 (NAKAMURA YASUYUKI)
国立研究開発法人国立がん研究センター・
研究所・主任研究員
研究者番号：90569063