

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：82674

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15353

研究課題名(和文) イメージングを活用したホルモン依存性癌におけるミトコンドリアの新たな役割の解明

研究課題名(英文) Functional analyses of mitochondrial roles in hormone-dependent cancer using new technologies

研究代表者

井上 聡 (Inoue, Satoshi)

地方独立行政法人東京都健康長寿医療センター(東京都健康長寿医療センター研究所)・東京都健康長寿医療センター研究所・研究部長

研究者番号：40251251

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ホルモン依存性癌増殖・進展におけるミトコンドリアの新たな役割を明らかにする目的で、イメージング・オミックス解析をはじめとする新技術を活用しミトコンドリア関連遺伝子の機能解析を行い、癌の診断・治療・予防のための新規分子標的の探索をめざした。特に、独自に発見したミトコンドリア蛋白質COX7RP等のエストロゲン応答遺伝子に注目し、乳癌細胞、子宮内膜癌細胞および癌組織での発現とその制御機構の詳細を示した。これらの因子、代謝経路の役割を示し、患者由来の臨床病理解析により、診断標的としての価値を明らかにし、動物モデルでの検討により、治療標的としての可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：To explore the roles of mitochondria in hormone-dependent cancers, we performed functional analyses of mitochondria-related genes using new technologies in cancer cells and tumors. We also studied translational and clinical relevance of these mitochondrial genes in breast cancer and endometrial cancer. We focused on estrogen-responsive mitochondrial COX7RP protein that was originally identified by our group previously. We revealed the role of COX7RP in tumor metabolism and progression in these cancers in the present study. Then we proposed that COX7RP could be a diagnostic factor and a therapeutic target, using clinicopathological analyses and animal models, respectively.

研究分野：内分泌代謝学

キーワード：乳癌 子宮内膜癌 ミトコンドリア エネルギー代謝 酸化リン酸化

## 1. 研究開始当初の背景

癌とミトコンドリア・エネルギー代謝の関係については、有酸素下でも解糖系が主体となる "Warburg 効果" が以前より知られている。一方、癌細胞において解糖系とミトコンドリア酸化的リン酸化 (OXPHOS) 経路の変容と相互作用が、我々の知見も含め最近明らかになってきており、癌における OXPHOS 経路の重要性が注目される。我々は、以前から、ゲノム結合部位クローニング法を開発して新規エストロゲン受容体標的遺伝子の探索を行い、ミトコンドリア呼吸鎖のチトクローム c オキシダーゼ (COX) 7a と構造が類似した COX7RP 遺伝子を同定した (Mol Cell Biol 18, 442, 1998)。特に、COX7RP が今まで謎であったミトコンドリア呼吸鎖のスーパー複合体形成因子であることを世界に先駆けて発見した (Nat Commun 4, 2147, 2013)。COX7RP ノックアウトマウスとトランスジェニックマウスの解析から、COX7RP は骨格筋の運動に必要なエネルギー産生に関わり、褐色脂肪組織での熱産生に必須であることを解明した。本研究では、我々はホルモン依存性癌の増殖・進展の過程における、エネルギー代謝動態を新技術を活用して観察し、ミトコンドリアとミトコンドリア関連遺伝子のこれらのがんにおける意義を探ることとした。

## 2. 研究の目的

一般的な癌細胞では、Warburg 効果で知られるように、ミトコンドリア機能が変容し、エネルギー代謝において解糖系が優位となる。我々は、ホルモン依存性癌においてミトコンドリア機能ならびに酸化的リン酸化 (OXPHOS) 経路の重要性を見出しつつある。本研究は、ホルモン依存性癌増殖・進展におけるミトコンドリアの新たな役割を明らかにする目的で、乳癌・子宮内膜癌において、多様な環境でミトコンドリア関連遺伝子の発現解析とイメージング・マルチオミクス解析などの新しい技術を活用して検討を加え、ホルモン応答性ならびにホルモン療法耐性にかかわる代謝経路、ミトコンドリア機能とその役割を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究は、ホルモン依存性癌におけるエネルギー代謝の動態を解明するため、各種のホルモン、薬剤刺激、低酸素状態等の各種条件下で、ミトコンドリア遺伝子、代謝遺伝子とミトコンドリア機能をイメージング、次世代シーケンサーやメタボローム解析を含む新技術も活用して解析するものである。特に、ミトコンドリア遺伝子の導入もしくはノックダウンでのミトコンドリア機能解析、代謝経路の解析をゲノムワイドの遺伝子発現・転写制御解析とメタボローム解析と併せて行った。以上の研究成果を統合して、エネルギー代謝の観点からホルモン依存性癌の診

断・治療・予防につながる新規分子標的とその意義を検討した。

## 4. 研究成果

一般的な癌細胞では、ミトコンドリア機能が変容し、エネルギー代謝において解糖系が優位となる。その一方で、われわれはホルモン依存性癌においてミトコンドリア機能の重要性を見出しつつある。本研究は、ホルモン依存性癌増殖・進展におけるミトコンドリアの新たな役割を明らかにするために、多様な環境でミトコンドリア関連遺伝子の解析を行い、ホルモン応答性ならびにホルモン療法耐性にかかわる代謝経路、ミトコンドリア動態を検討した。癌細胞とそれをマウスに導入した腫瘍モデルにおいてモニタリングし、代謝遺伝子発現および転写制御機構、メタボロームを解析して、癌の診断・治療・予防のための新規分子標的の探索をめざした。

特に、独自に発見したミトコンドリア蛋白質 COX7RP をはじめとするエストロゲン応答遺伝子に注目し、乳癌細胞および子宮内膜癌細胞および癌組織での発現とその制御機構の詳細を示した。乳癌細胞、子宮内膜癌細胞に COX7RP 発現ベクターと関連プラスミドを導入し、或いは siRNA によりノックダウンして機能変化と代謝変化を検討し、機能と代謝における役割を示した。特にこれら癌細胞における役割については、通常 20% 酸素濃度と低酸素状態 (1-3% 酸素濃度) に分けて解析し、代謝産物・メタボローム解析により、どの経路に変化が生じているかを明らかにした。これらの因子、代謝経路がホルモン依存性癌のエネルギー代謝に与える意義を示すとともに、患者由来の臨床病理解析により、診断標的としての価値を明らかにし、イメージングも含めた動物モデルでの検討により、治療標的としての可能性を示した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 26 件)

1. Misawa A, Takayama KI, Fujimura T, Homma Y, Suzuki Y, Inoue S: Androgen-induced lncRNA POTEf-AS1 regulates apoptosis-related pathway to facilitate cell survival in prostate cancer cells. *Cancer Sci* 2017 Mar;108(3):373-379. DOI: 10.1111/cas.13151. 査読あり
2. Shibata Y, Tokunaga F, Goto E, Komatsu G, Gohda J, Saeki Y, Tanaka K, Takahashi H, Sawasaki T, Inoue S, Oshiumi H, Seya T, Nakano H, Tanaka Y, Iwai K, Inoue JI: HTLV-1 Tax Induces Formation of the Active Macromolecular IKK Complex by Generating Lys63- and Met1-Linked Hybrid Polyubiquitin Chains. *PLoS Pathog* 2017 Jan 19;13(1): e1006162. DOI:10.1371/journal.ppat.1006162. 査読あり

3. Yamada Y, Takayama K, Fujimura T, Ashikari D, Obinata D, Takahashi T, Ikeda K, Kakutani S, Urano T, Fukuhara H, Homma Y, Inoue S: A novel prognostic factor TRIM44 promotes cell proliferation and migration, and inhibits apoptosis in testicular germ cell tumor. *Cancer Sci* 108(1), 32-41, 2017. DOI: 10.1111/cas.13105. 査読あり
4. Yamada Y, Nakagawa T, Sugihara T, Horiuchi T, Yoshizaki U, Fujimura T, Fukuhara H, Urano T, Takayama K, Inoue S, Kume H, Homma Y: Prognostic value of CD66b positive tumor-infiltrating neutrophils in testicular germ cell tumor. *BMC Cancer* 18,16(1), 898, 2016. DOI: 10.1186/s12885-016-2926-5. 査読あり
5. Nagai S, Ikeda K, Horie-Inoue K, Shiba S, Nagasawa S, Takeda S, Inoue S: Estrogen modulates exercise endurance along with mitochondrial uncoupling protein 3 downregulation in skeletal muscle of female mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2016 Nov 25;480(4):758-764. DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.10.129. 査読あり
6. Momozawa Y, Akiyama M, Kamatani Y, Arakawa S, Yasuda M, Yoshida S, Oshima Y, Mori R, Tanaka K, Mori K, Inoue S, Terasaki H, Yasuma T, Honda S, Miki A, Inoue M, Fujisawa K, Takahashi K, Yasukawa T, Yanagi Y, Kadonosono K, Sonoda K, Ishibashi T, Takahashi A, Kubo M: Low-frequency coding variants in CETP and CFB are associated with susceptibility of exudative age-related macular degeneration in the Japanese population. *Human Mol Genetics* 25(22), 5027-5034. DOI: 10.1093/hmg/ddw335. 査読あり
7. Aihara H, Nakagawa T, Mizusaki H, Yoneda M, Kato M, Doiguchi M, Imamura Y, Higashi M, Ikura T, Hayashi T, Kodama Y, Oki M, Nakayama T, Edwin Cheung, Aburatani H, Takayama K, Koseki H, Inoue S, Takeshima Y, Ito T: Histone H2A T120 Phosphorylation Promotes Oncogenic Transformation via Upregulation of Cyclin D1. *Mol Cell* 64(1), 176-188, 2016. DOI: 10.1016/j.molcel. 査読あり
8. Onodera Y, Takagi K, Miki Y, Takayama K, Shibahara Y, Watanabe M, Ishida T, Inoue S, Sasano H, Suzuki T: TACC2 (transforming acidic coiled-coil protein 2) in breast carcinoma as a potent prognostic predictor associated with cell proliferation. *Cancer Med* 5(8),1973-1982,2016. DOI: 10.1002/cam4.736. 査読あり
9. Misawa A, Takayama K, Urano T, Inoue S: Androgen-induced lncRNA SOCS2-AS1 promotes cell growth and inhibits apoptosis in prostate cancer cells. *J Biol Chem* 291(34),17861-17880,2016. DOI: 10.1074/jbc.M116.718536. 査読あり
10. Obinata D, Takayama K, Fujiwara K, Suzuki T, Tsutsumi S, Fukuda N, Nagase H, Fujimura T, Urano T, Homma Y, Aburatani H, Takahashi S, Inoue S: Targeting Oct1 genomic function inhibits androgen receptor signaling and castration-resistant prostate cancer growth. *Oncogene* 35(49), 6350-6358, 2016. DOI: 10.1038/onc.2016. 査読あり
11. Fujimura T, Inoue S, Urano T, Takayama K, Yamada Y, Ikeda K, Obinata D, Ashikari D, Takahashi S, Homma Y: Increased expression of Tripartite Motif (TRIM) 47 is a negative prognostic predictor in human prostate cancer. *Clin Genitourin Cancer* 14(4), 298-303, 2016. DOI: 10.1016/j.clgc.2016.01.011. 査読あり
12. Urano T, Shiraki M, Kuroda T, Tanaka S, Uenishi K, Inoue S: Preventive effects of raloxifene treatment on age-related weight loss in postmenopausal women. *J Bone Miner Metab* 35(1):108-113. DOI: 10.1007/s00774-015-0733-8. 査読あり
13. Huang L, Zhang H, Cheng CY, Wen F, Tam POS, Zhao P, Chen H, Li Z, Chen L, Tai Z, Yamashiro K, Deng S, Zhu X, Chen W, Li C, Lu F, Li Y, Cheung CMG, Shi Y, Miyake M, Lin Y, Gong B, Liu X, Sim KS, Yang J, Mori K, Zhang X, Cackett PD, Tsujikawa M, Nishida K, Hao F, Ma S, Lin H, Chen J, Fei P, Lai TYY, Tang S, Laude A, Inoue S, et al.(15名略、39番目): A missense variant in FGD6 confers increased risk of polypoidal choroidal vasculopathy. *Nat Genet* 48, 640-647, 2016. DOI: 10.1038/ng.3546. 査読あり
14. Obinata D, Takada S, Takayama K, Urano T, Ito A, Ashikari D, Fujiwara K, Yamada Y, Murata T, Kumagai J, Fujimura T, Ikeda K, Horie-Inoue K, Homma Y, Takahashi S, Inoue S: ABHD2, an androgen target gene, promotes prostate cancer cell proliferation and migration. *Eur J Cancer* 57, 39-49, 2016. DOI: 10.1016/j.ejca.2016.01.002. 査読あり
15. Matsushita S, Suzuki K, Ogino Y, Hino S, Sato T, Suyama M, Matsumoto T, Omori A, Inoue S, Yamada G: Androgen regulates Mafb expression through its 3'UTR during mouse urethral masculinization. *Endocrinology* 157,

- 844-857, 2016. DOI: 10.1210/en.2015-1586. 査読あり
16. Nakajima Y, Osakabe A, Waku T, Suzuki T, Akaogi K, Fujimura T, Homma Y, Inoue S, Yanagisawa J: Estrogen exhibits a biphasic effect on prostate tumor growth through the ER $\beta$ -KLF5 pathway. *Mol Cell Biol* 36, 144-156, 2015. DOI: 10.1128/MCB.00625-15. 査読あり
  17. Zhang P, Elabd S, Hammer S, Solozobova V, Yan H, Barte F, Inoue S, Heinrich T, Wittbrodt J, Loosli F, Davidson G, Blattner C: TRIM25 has a dual function in the p53/Mdm2 circuit. *Oncogene* 34, 5729-5738, 2015. DOI: 10.1038/onc.2015.21. 査読あり
  18. Fujimura T, Takahashi S, Kume H, Urano T, Takayama K, Yamada Y, Suzuki M, Fukuhara H, Nakagawa T, Inoue S, Homma Y: Toremifene, a selective estrogen receptor modulator, significantly improved biochemical recurrence in bone metastatic prostate cancer: a randomized controlled phase II a trial. *BMC Cancer* 15, 836, 2015. DOI: 10.1186/s12885-015-1871-z. 査読あり
  19. Miyazaki T, Ikeda K, Sato W, Horie-Inoue K, Okamoto K, Inoue S: MicroRNA library-based functional screening identified androgen-sensitive miR-216a as a player in bicalutamide resistance in prostate cancer. *J Clin Med* 4, 1853-1865, 2015. DOI: 10.3390/jcm4101853. 査読あり
  20. Saito-Kanatani M, Urano T, Hiroi H, Momoeda M, Ito M, Fujii T, Inoue S: Identification of *TRIM22* as a progesterone-responsive gene in Ishikawa endometrial cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 154, 217-225, 2015. DOI: 10.1016/j.jsbmb. 査読あり
  21. Takayama K, Misawa A, Suzuki T, Takagi K, Hayashizaki Y, Fujimura T, Homma Y, Takahashi S, Urano T, Inoue S: TET2 repression by androgen hormone regulates global hydroxymethylation status and prostate cancer progression. *Nat Commun* 6, 8219, 2015. DOI: 10.1038/ncomms9219. 査読あり
  22. Ikeda K, Horie-Inoue K, Ueno T, Suzuki T, Sato W, Shigekawa T, Osaki A, Saeki T, Berezikov E, Mano H, Inoue S: miR-378a-3p modulates tamoxifen sensitivity in breast cancer MCF-7 cells through targeting *GOLT1A*. *Sci Rep* 5, 13170, 2015. DOI: 10.1038/srep13170. 査読あり
  23. Izumi G, Koga K, Nagai M, Urata Y, Takamura M, Harada M, Hirata T, Hirota Y, Ogawa K, Inoue S, Fujii T, Osuga Y: Cyclic stretch augments production of neutrophil chemokines, matrix metalloproteinases, and Activin A in human endometrial stromal cells. *Am J Reprod Immunol* 73, 501-506, 2015. DOI: 10.1111/aji.12359 査読あり
- (総説)
24. Obinata D, Takayama K, Takahashi S, Inoue S: Crosstalk of the Androgen Receptor with Transcriptional Collaborators: Potential Therapeutic Targets for Castration-Resistant Prostate Cancer. *Cancers* 9(3), pii: E22. 28 February 2017. DOI: 10.3390/cancers9030022. 査読あり
  25. Takayama K, Inoue S: The emerging role of non-coding RNA in prostate 1 cancer progression and its implication on diagnosis and treatment. *Brief Funct Genomics* 15(3), 257-265, 2016. DOI: 10.1093/bfgp/elv057. 査読あり
  26. Misawa A, Inoue S: Estrogen-related receptors in breast cancer and prostate cancer. *Front Endocrinol (Lausanne)* 6, 83, 2015. DOI: 10.3389/fendo. 査読あり
- 〔学会発表〕(計 23 件)
1. Takayama K, Inoue S: [Symposium] Novel therapeutic strategy for castration-resistant prostate cancer by PI polyamide targeting Oct1. (2017.2.24) International symposium for the drug-discovery of the pyrrole-imidazole polyamides as novel biomedicines. Nihon University (Chiyoda-ku, Tokyo, Japan.)
  2. Inoue S, Horie-Inoue K, Ikeda K: Identification of growth-modulatory long noncoding RNA that activates estrogen receptor signaling in breast cancer. (2017.02.05-09) Keystone Symposia Conference, Noncoding RNAs: From Disease to Targeted Therapeutics, Fairmont Banff Springs, Banff, Alberta, Canada.
  3. 井上聡: [シンポジウム] アンドロゲン作用プログラムを制御する新しい分子機構の解明; CRPC モデルにおけるアンドロゲンシグナリングの解析 (2017.1.14-15) 第19回 UTP シンポジウム ホテル椿山荘東京 (東京都文京区)
  4. 井上聡: [特別講演] ミトコンドリア超複合体形成と筋肉、褐色脂肪 (2016.8.5-6) 第2回日本筋学会学術集会 国立精神・神経医療研究センター (東京都小平市)
  5. 井上聡、柴祥子、池田和博、宮崎利明、東浩太郎、田中伸哉、堀江公仁子: [優秀演題賞] エクソソームを介してがんの免疫エスケープを引き起こす EBAG9 の新しい作用メカニズムと骨における役

割 (2016.7.6-8) 第2回日本骨免疫学会  
ホテルモンテ沖縄スパ&リゾート(沖  
縄県恩納村)

6. Inoue S, Ikeda K: Estrogen-responsive COX7RP that stabilizes mitochondrial respiratory supercomplex assembly regulates tumor growth and metabolism in breast cancer. (2016.2.16-20) Tenth AACR-JCA Joint Conference “ Breakthroughs in Cancer Research: From Biology to Therapeutics”, Maui, HI, USA.
7. 井上聡: [指定講演] 性ホルモン作用プログラムを制御する新しい分子メカニズムとその破綻 (2016.1.30) 第16回関東ホルモンと癌研究会 東京大学医科学研究所附属病院(東京都文京区)
8. 井上聡: [シンポジウム] アンドロゲンシグナルの分子メカニズムと去勢抵抗性前立腺癌に対する治療戦略 (2015.10.8-10) 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)
9. 井上聡: [JCA-AACR joint symposium] 長鎖ならびに短鎖非コードRNAによるアンドロゲンのがんエピゲノム制御メカニズム ( Androgen-mediated long and short non-coding RNA biology that epigenetically regulates tumor growth ) (2015.10.8-10) 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)
10. 井上聡: [シンポジウム] アンドロゲン受容体による転写プログラムを制御する新しいエピゲノム作用メカニズム ( Novel epigenetic regulatory mechanisms that govern androgen receptor transcriptional program ) (2015.6.30-7.2) 第67回日本細胞生物学会 タワーホール船堀(東京都江戸川区)

(他13件)

〔図書〕(計2件)

1. Azuma K, Inoue S: Vitamin K, SXR, and GGCX. (2017) *Vitamin K2 - Vital for Health and Wellbeing*, InTech, Rijeka, Croatia, (pp. 21-32). ISBN: 978-953-51-3020-8(Online), 978-953-51-3019-2(Print), DOI: 10.5772/63983.
2. Takayama K, Inoue S: The role of androgen-regulated long noncoding RNAs in prostate cancer. (2015) *Long noncoding RNAs*, Chapter 11 (edited Kurokawa R) Springer Japan, Tokyo, (pp. 191-210) DOI: 10.1007/978-4-431-55576-6.

6. 研究組織  
(1)研究代表者

井上 聡 (INOUE, Satoshi)  
地方独立行政法人東京都健康長寿医療セ  
ンター(東京都健康長寿医療センター研  
究所)・東京都健康長寿医療センター研  
究所・研究部長  
研究者番号: 40251251