

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 5 月 8 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08954

研究課題名（和文）癌細胞の不良ミトコンドリア由来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）Development of novel cancer therapy against ROS produced by unhealthy mitochondria in cancer cells

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：がんのミトコンドリアは、ATP産性能が低下し活性酸素種（ROS）を多量に発生する。p53の標的遺伝子である、Mieapはこうした不良ミトコンドリアを排除・修復することで、ミトコンドリアの品質管理を担っている。我々は、大腸がんや乳がんではMieapの機能が著しく喪失していることを報告してきたが、胃がんや食道がんでもMieap機能が喪失していた。さらに、ヒックデータを用いた解析でも、Mieap機能の低下が、乳がん患者の予後を増悪させることも判明した。このように、Mieapはヒトがんにおいてがん抑制機能をもつ極めて重要な分子と考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちの研究はがん抑制遺伝子p53の研究に始まり、がんのミトコンドリア、いわゆるがん代謝の研究へとシフトしています。遺伝子の異常はタンパク質の異常、ひいては細胞の機能異常につながっていきます。がんにおいて、遺伝子異常のみならず代謝の異常が、がんの性質や悪性度を決めているといえます。Mieapの機能はミトコンドリアの品質管理をすることで、細胞の悪性化を阻止していますが、この機能がなくなると悪性度が増し、患者さんの生存率にまで影響しているという知見が得られました。こうした重要な因子をコントロールすることが、これからのがん征圧、がん治療の道を開くことになるでしょう。

研究成果の概要（英文）：Mieap, a downstream gene of p53, plays an important role in mitochondrial quality control by eliminating/repairing unhealthy cancer mitochondria which produce less ATP and lots of reactive oxygen species (ROS). We previously reported the role of Mieap in colorectal and breast cancer. Mieap-NIX/BNIP3-Mieap-axis was impaired in these cancers. Overexpression of Mieap induced caspase-dependent apoptosis in these cells. Here we found Mieap was paired in both gastric and esophageal cancers. High rates of p53 mutation and/or methylation of BNIP3 promoter were frequent. Furthermore, to investigate the clinical significance of Mieap in breast cancer, we performed in-silico search using TCGA and METABRIC data base. Interestingly, we found loss of Mieap expression was significantly associated with clinical stage and survival by both cohorts. These results indicates that Mieap is a strong candidate of tumor suppressor in solid cancers such as breast and gastrointestinal cancers.

研究分野：分子腫瘍学・乳腺外科学

キーワード：Mieap p53 ミトコンドリア がん代謝

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアは細胞生存に重要なエネルギー源である ATP を産生するが、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、種々の疾患の原因となりうる。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。

我々は、p53 の下流遺伝子 *Mieap* が、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・維持していることを報告してきた。乳癌を対象とした *Mieap* の解析では、乳癌細胞に *Mieap* を強制発現させると、カスパーゼ依存性に、細胞死を誘導することが示された。また、乳癌正常組織、良性腫瘍 (線維線種)、非浸潤性乳管癌、浸潤性乳管癌における、*Mieap* の発現は、悪性度が増すにつれ発現低下していた。浸潤性乳管癌における検討でも、p53-NIX/BNIP3-*Mieap* Axis の異常が 26% にみられる。またこの異常を認める場合、有意に予後不良であることを示した。これは過去に大腸がんの検討でも *Mieap* 制御機構の破綻が高頻度に見られることに一致していた。

### 2. 研究の目的

我々の研究は、*Mieap* のヒト癌における異常や腫瘍増殖抑制メカニズムを検討し、乳癌・消化器癌での p53-BNIP3/NIX-*Mieap* により制御されるミトコンドリア品質管理経路の破綻を明らかにする。そして、本研究を通して、癌細胞の不良ミトコンドリア由来の癌代謝機構を制御標的として革新的癌治療法の開発を目指すことである。

(1) *Mieap* 導入発現に伴う細胞内代謝産物と遺伝子発現変化の網羅的解析を行い、抗 ROS 療法に關与する治療標的分子を同定する。癌ミトコンドリアの損傷程度を指標にした癌悪性度の新たな評価方法を確立する。

(2) これまで行ってきた固形癌における、*Mieap* の役割について、大規模データベースによる検証、他の癌種における解析を進める。

### 3. 研究の方法

#### 1) 癌代謝における *Mieap* の役割

*Mieap* 陰性乳癌細胞株において、アデノウイルスを用いて *Mieap* を強制発現 (30moi) させ、24 時間、48 時間後の細胞内でのミトコンドリアを中心とした代謝状態を、CE-TOFMS, CE-QqQMS による代謝物の解析を試みた。

#### 2) 大規模データベースによる乳癌と *Mieap* の関連を検討した。

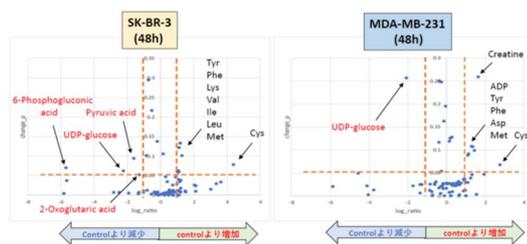
世界的大規模コホート、TCGA (1076 例) および METABRIC (1904 例) において、*Mieap* 関連遺伝子発現と予後との関係を乳癌に対して行った。

3) 上部消化管癌 (胃癌、食道癌) における p53-NIX/BNIP3-*Mieap* Axis の異常の検証、および胃癌細胞株を用いて *Mieap* 発現 (30moi) における表現型を検討した。

### 4. 研究成果

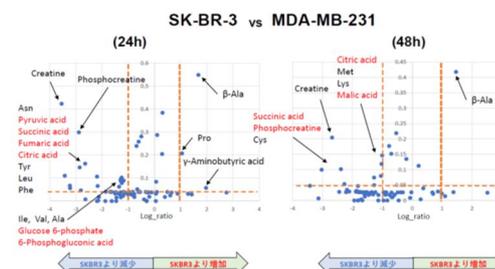
1) *Mieap* 感受性細胞 (SK-BR-3) では、*Mieap* 抵抗性細胞 (MDA-MB-231) より解糖系および TCA 回路に關連する代謝物の減少が著名であった。癌細胞は不良なミトコンドリアのため生存に必要なエネルギー産生が追い付かず、*Mieap* 発現によって細胞死に向かう可能性が示唆された。

#### 細胞間における代謝産物の比較



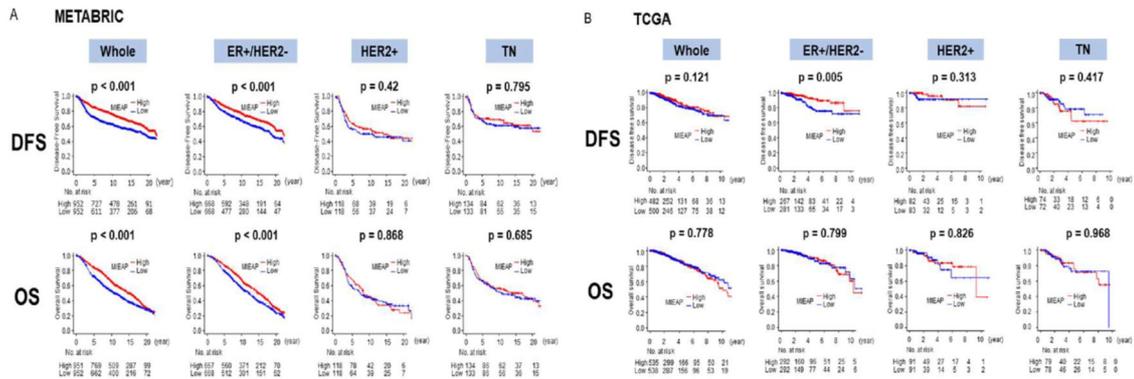
*Mieap* 感受性細胞 (SK-BR-3) では、*Mieap* 抵抗性細胞 (MDA-MB-231) より解糖系および TCA 回路に關連する代謝物の減少が著名である。

#### *Mieap* 発現における代謝産物の比較



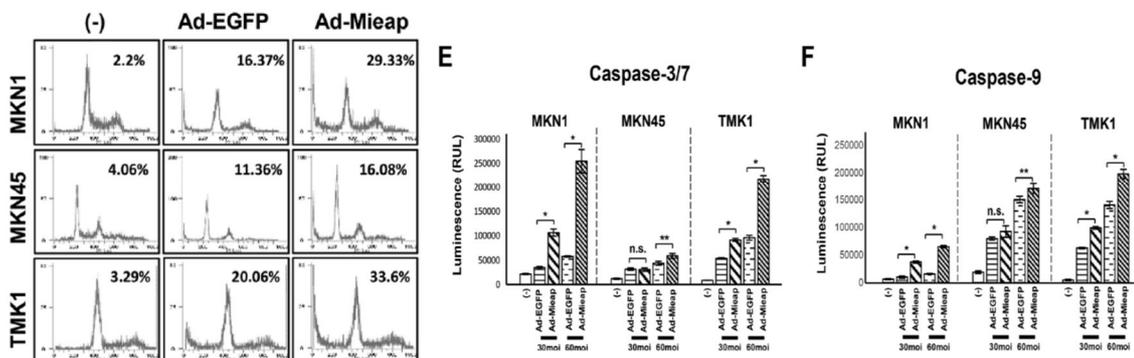
2) *Mieap* 高発現腫瘍は、低発現群と比べ優位に予後が良好であった。*Mieap* 発現と、細胞増殖

関連遺伝子 (Myc Targets, E2F Targets, G2M checkpoint, Mitotic spindle 等) の発現は負の相関があった。すなわち、Mieap は癌抑制遺伝子として細胞増殖抑制に働くことが、2つの大規模コホートで示された。



3) p53-NIX/BNIP3-Mieap Axis の異常が、胃癌で 70.2% (33/47) 食道癌で 83.3% (10/12) と高頻度に見られた。また、胃癌細胞株に Mieap を強制発現させると、カスパーゼ依存性の細胞死を認めた。以上から Mieap は多くの固形癌で癌抑制遺伝子と考えられる。

Inactivation of p53/Mieap-regulated MQC pathway for GC; 33/47 (70.2%).  
 Inactivation of p53/Mieap-regulated MQC pathway for EC; 10/12 (83.3%).



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Manabu Futamura, Yoshihisa Tokumaru, Kazuaki Takabe, Hirofumi Arakawa, Junichi Mase, Yoshimi Asano, Ryutaro Mori, Akira Nakakami, Kazuhiro Yoshida	4. 巻 11
2. 論文標題 Mieap, a p53-Downstream Gene, Is Associated with Suppression of Breast Cancer Cell Proliferation and Better Survival	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 American Journal of Cancer Research	6. 最初と最後の頁 6060-6073
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 該当する

1. 著者名 Sano H, Futamura M, Gaowa S, Kamino H, Nakamura Y, Yamaguchi K, Tanaka Y, Yasufuku I, Nakakami A, Arakawa H, Yoshida K	4. 巻 529
2. 論文標題 p53/Mieap-regulated mitochondrial quality control plays an important role as a tumor suppressor in gastric and esophageal cancers.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 582-589
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.05.168	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6件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 二村 学
2. 発表標題 P53下流遺伝子Mieapは乳癌予後と関係している
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 二村 学
2. 発表標題 Mieap, a p53-inducible gene, is associated with breast cancer prognosis.
3. 学会等名 第59回日本癌治療学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manabu Futamura
2. 発表標題 Mieap, a p53-downstream gene, is associated with suppression of breast cancer cell proliferation and better survival
3. 学会等名 San Antonio Breast Cancer Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Manabu Futamura
2. 発表標題 Potential role of p53/Mieap-regulated mitochondrial quality control as a tumor suppressor in gastric, esophageal and breast cancers
3. 学会等名 AACR 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Manabu Futamura
2. 発表標題 p53/Mieap-regulated mitochondrial quality control plays an important role as a tumor suppressor in upper GI cancers
3. 学会等名 第79回日本癌学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Manabu Futamura, Ryutaro Mori, Yoshimi Niwa, Yoshihisa Tokumaru
2. 発表標題 MIEAP functions as a tumor suppressor by cooperating with PTB1
3. 学会等名 第81回日本癌学会
4. 発表年 2022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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------