

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：25430124

研究課題名(和文)p53誘導性タンパク質Mieapの大腸腫瘍発生進展に果たす役割についての研究

研究課題名(英文) Potential role of the Mieap-regulated mitochondrial quality control in murine intestinal tumorigenesis

研究代表者

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

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)：p53誘導性Mieapタンパク質はミトコンドリアの品質管理機能に重要な役割を果たしている。Mieapの生体内における機能を調べるためMieap欠損大腸がんモデルマウスApcMin/+マウスを作成した。このマウスは消化管ポリープの数およびサイズがApcMin/+マウスと比較して顕著に増加しており、寿命が著しく短縮した。さらに、このマウスの消化管腫瘍は病理組織学的に悪性度が高く、その腫瘍細胞には不良なミトコンドリアが蓄積して過剰なROS産生が見られた。これらの結果から、Mieapによるミトコンドリア品質管理がマウス消化管の腫瘍抑制に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Mieap, a novel p53-inducible protein, plays a key role in maintaining healthy mitochondria in various pathophysiological states. To understand the role that Mieap plays in in vivo tumorigenesis, we generated Mieap-deficient ApcMin/+ mice. The Mieap-deficient ApcMin/+ mice revealed remarkable shortening of the lifetime compared to ApcMin/+ mice. A substantial increase in the number and size of intestinal polyps was associated with Mieap gene deficiency. Histopathologically, intestinal tumors in the Mieap-deficient ApcMin/+ mice clearly demonstrated advanced grades of adenomas and adenocarcinomas. We demonstrated that the significant increase in morphologically unhealthy mitochondria and trace accumulations of ROS may be mechanisms underlying the increased malignant progression of the intestinal tumors of Mieap-deficient ApcMin/+ mice. These findings suggest that the Mieap-regulated mitochondrial quality control plays a critical role in preventing mouse intestinal tumorigenesis.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：p53 ミトコンドリア ROS 腫瘍抑制 がん ApcMin/+マウス

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアの重要な役割は、細胞生存に必要なエネルギー源である ATP の産生と、細胞死に重要なアポトーシスの誘導である。ミトコンドリアの ATP 産生は、酸化的リン酸化という複雑な過程から成り、その過程で活性酸素種 (ROS) が産生される。ミトコンドリアから産生された ROS は、細胞内のタンパク質、脂質、DNA に酸化ダメージを与え、老化やがん・神経変性疾患などの原因になる。一方、ミトコンドリアは、シトクロム c を放出することで、アポトーシス誘導経路において中心的役割を果たす。多細胞生物の体内では、細胞が常にかん化の危険にさらされているにもかかわらず、前がん状態の細胞は、アポトーシスによって取り除かれているため、がん化が未然に防がれている。従ってアポトーシスの破綻は、がん化の原因となる。このようにミトコンドリアには、細胞に対して生と死という二つの役割を持っている。

がん細胞は増殖が盛んであるにもかかわらず、ミトコンドリア機能は低下している。実際にかん細胞のミトコンドリアからは ROS が過剰産生され、ミトコンドリア DNA には多くの変異が認められる。ミトコンドリアの酸化的リン酸化反応に関わるタンパク質は、過剰な ROS により酸化され、ATP 産生能が著しく低下していることから、がん細胞は 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いる (Warburg 効果)。また、がん細胞からの高いレベルの ROS は、NF- κ B や HIF1 α を介した細胞増殖シグナル、血管新生あるいは、がん浸潤転移を促進することによって、がんの進展に深く関係している。従って、がん細胞は不良なミトコンドリアを積極的に増やすことで、正常細胞と比べて、高レベルの ROS を維持し、利用しているとも言える。しかし、一定レベル以上の大過剰の ROS が発生すると、がん細胞に細胞死が誘導される。故に、がん細胞はミトコンドリアからの高いレベルの ROS を利用しながら、そのレベルをある一定の範囲に制御する必要があると考えられる。以上のことから、ミトコンドリアの品質管理機構の破綻は、がん細胞への不良なミトコンドリアの蓄積と、そこから産生される ROS レベルの上昇に密接に関連しており、新しいがん抑制のメカニズム解明につながると共に、がん予防・診断・治療戦略に大きく貢献しうる可能性がある。

2. 研究の目的

我々は、Mieap タンパク質が不良なミトコンドリア内に蓄積した酸化タンパク質を除去することにより、ミトコンドリアの ATP 産生能を改善し、ROS 産生を抑制するという全く新しいミトコンドリア品質管理機能を見出した。さらに、動物実験やヒトがん組織を用いた解析から、Mieap によるミトコンドリア品質管理機構が、抗腫瘍効果に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。そこで、

大腸がんモデルマウスである ApcMin/+マウスを用いて、大腸腫瘍の発生及び進展過程に Mieap 機能がどのように影響するかを解析し、Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構による、全く新しいがん抑制のメカニズムとその役割を解明することを目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 大腸がんモデルマウス ApcMin/+マウスを用いて、Mieap 欠損 ApcMin/+マウスの作成を試みた。具体的には、Mieap 遺伝子ホモ欠損 (Mieap^{-/-}) マウスと ApcMin/+マウスとの交配を繰り返して、ApcMin/+Mieap^{+/-}マウス及び ApcMin/+Mieap^{-/-}マウスを作成した。

(2) ApcMin/+マウス、ApcMin/+Mieap^{+/-}マウス及び ApcMin/+Mieap^{-/-}マウスの 17 週齢時における血液検査及び小腸及び大腸に発生するポリープ数及びサイズを測定し、これらを比較した。

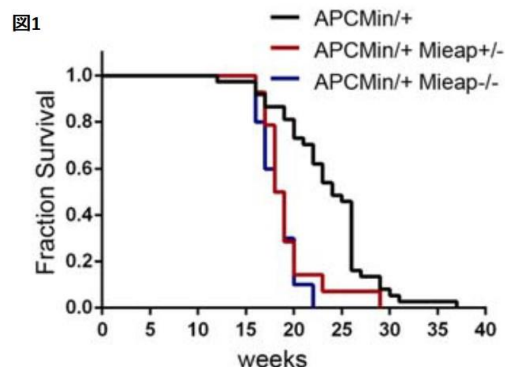
(3) ApcMin/+マウス、ApcMin/+Mieap^{+/-}マウス及び ApcMin/+Mieap^{-/-}マウスの消化管ポリープの悪性度を判定するため、17 週齢時に各マウスから小腸および大腸を採取し、病理組織学的解析を行った。

(4) ApcMin/+マウスにおける Mieap 遺伝子欠損が腫瘍細胞内ミトコンドリアに与える影響を検討するため、17 週齢時に野生型マウス、ApcMin/+マウス、及び ApcMin/+Mieap^{-/-}マウスから小腸及び大腸腫瘍を採取し、電子顕微鏡を用いてミトコンドリア形態の観察を行った。さらに、各マウスから採取した小腸腫瘍における酸化タンパク質 (ニトロチロシン) 及び核酸 (8-OHdG) の免疫組織学的解析を行い、不良なミトコンドリアが産生する ROS の検出を検討した。

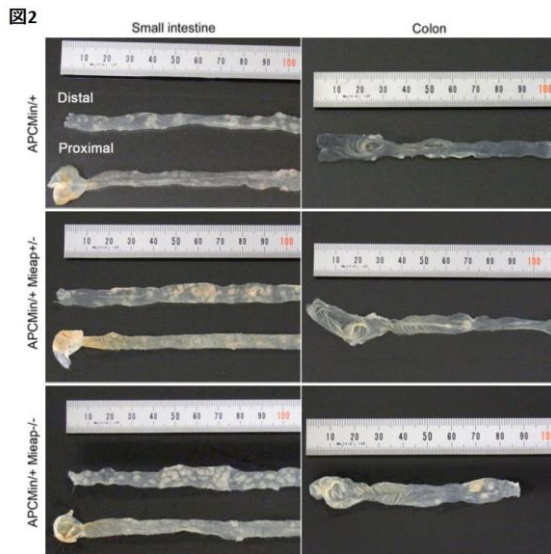
4. 研究成果

(1) Mieap^{-/-}マウスと ApcMin/+マウスとの交配を繰り返して、ApcMin/+Mieap^{+/-}マウス及び ApcMin/+Mieap^{-/-}マウスを作成に成功した。

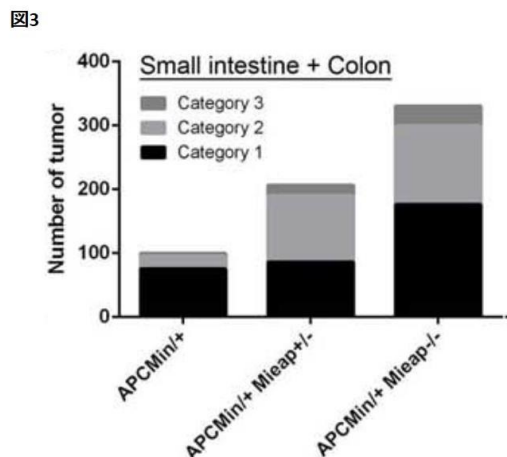
(2) Mieap 欠損 ApcMin/+マウスの寿命の短縮を認めた (図 1)。



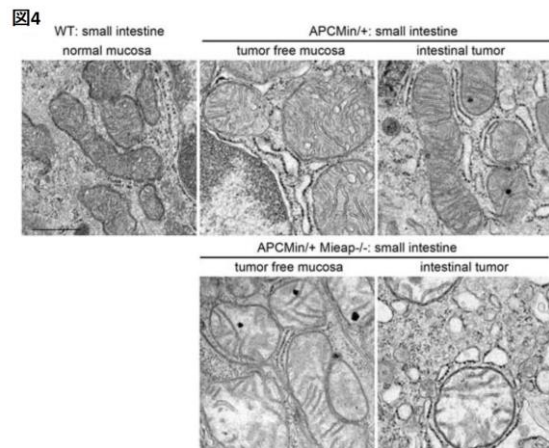
(3) ApcMin/+マウス、ApcMin/+Mieap+/-マウス及び ApcMin/+Mieap-/-マウスの 17 週齢時における血液検査の結果、ApcMin/+マウスで見られる貧血が Mieap 遺伝子の欠損に伴い増悪化した。これらのマウスから採取した小腸及び大腸を観察したところ、ApcMin/+マウスの小腸に見られるポリープの数およびサイズは、Mieap 遺伝子の欠損に伴い増加した。ApcMin/+マウス腸管におけるポリープの好発部位はヒトと異なり小腸であるが、ApcMin/+Mieap+/-マウス及び ApcMin/+Mieap-/-マウスでは、大腸におけるポリープの発生が増加した(図 2)。



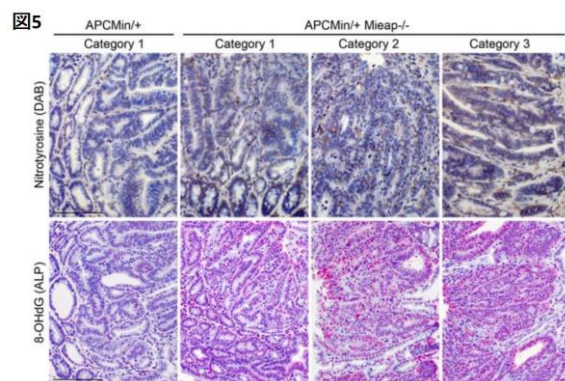
(4) ApcMin/+マウス、ApcMin/+Mieap+/-マウス及び ApcMin/+Mieap-/-マウス(17 週齢時)に採取した小腸及び大腸の病理組織学的解析を行った。がんの悪性度をカテゴリー 1: 低異型度腺腫、カテゴリー 2: 高異型度腺腫、カテゴリー 3: 腺がんの 3つのカテゴリーに分類した。その結果、ApcMin/+マウスと比較して、ApcMin/+Mieap+/-マウス、さらに ApcMin/+Mieap-/-マウスでは、腫瘍の悪性度及びがん化が顕著に増加した(図 3)。



(5) ApcMin/+マウスにおける Mieap 遺伝子欠損が腫瘍内ミトコンドリアに与える影響を検討するため、17 週齢時に野生型マウス、ApcMin/+マウス及び ApcMin/+Mieap-/-マウスから小腸及び大腸を採取し、電子顕微鏡を用いて腫瘍内ミトコンドリア形態の観察を行った。その結果、ミトコンドリアにおける ATP 産生を担う酸化的リン酸化を行うための場であるクリステ構造が、野生型マウス、ApcMin/+マウスでは高い密度で存在しているが、ApcMin/+Mieap-/-マウスでは大きく欠損していた(図 4)。このことから、ApcMin/+Mieap-/-マウスの腫瘍内ミトコンドリアでは、ATP 産生が低下し、酸化的リン酸化が正常に働かないために ROS が増加すると考えられた。



さらに、各マウスから採取した小腸腫瘍組織における酸化タンパク質(図 5 上段: ニトロチロシン)及び核酸(図 5 下段: 8-OHdG)の免疫組織学的解析から、ApcMin/+Mieap-/-マウスでは、ミトコンドリアから産生される酸化ストレスが腫瘍の悪性化、がん化に深く関与すると考えられた。



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 2 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.

〔学会発表〕(計 31 件)

1. 中村康之、常木雅之、中西るり、荒川博文、「Mitochondria-eating protein は巨大液胞様構造物を誘導してミトコンドリアを食べることで細胞死を引き起こす」平成 27 年 11 月 19 日-平成 27 年 11 月 20 日 第 15 回日本ミトコンドリア学会年会 福井県国際交流会館 (福井県福井市)

2. 常木雅之、中村康之、中西るり、荒川博文、「マウス全身組織における Mieap 発現とミトコンドリア局在の関連性」平成 27 年 11 月 19 日-平成 27 年 11 月 20 日 第 15 回日本ミトコンドリア学会年会 福井県国際交流会館 (福井県福井市)

3. 中村康之、常木雅之、中西るり、荒川博文、「Mitochondria-eating protein は巨大液胞様構造物を誘導してミトコンドリアを食べることで細胞死を引き起こす」平成 27 年 11 月 16 日-平成 27 年 11 月 17 日 第 9 回オートファジー研究会 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市)

4. 常木雅之、中村康之、中西るり、荒川博文、「マウス全身組織における Mieap 発現とミトコンドリア局在の関連性」平成 27 年 11 月 16 日-平成 27 年 11 月 17 日 第 9 回オートファジー研究会 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市)

5. 中村康之、常木雅之、金城貴夫、荒川博文、「Mieap はミトコンドリア品質管理を介してマウス腸管腫瘍を抑制する」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)

6. 中村康之、常木雅之、金城貴夫、喜多村憲章、荒川博文、「Critical role of Mieap, a p53-inducible protein, in intestinal tumor suppression」平成 27 年 4 月 18 日-平成 27 年 4 月 22 日 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2015 フィ

ラデルフィア (アメリカ)

7. 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 3 日-平成 26 年 12 月 5 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)

8. 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 11 月 9 日-平成 26 年 11 月 11 日 第 8 回オートファジー研究会 シャトレーゼガトーキングダムサッポロ (北海道札幌市)

9. 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」平成 26 年 9 月 25 日-平成 27 年 9 月 27 日 第 73 回日本癌学会学術総会 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)

10. 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 5 日-平成 26 年 4 月 9 日 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2014 サンディエゴ(アメリカ)

11. 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 a in Mieap-induced vacuole generation through an interaction with UVRAG」平成 26 年 4 月 5 日-平成 26 年 4 月 9 日 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2014 サンディエゴ(アメリカ)

12. 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 5 日-平成 26 年 4 月 9 日 American Association for Cancer Research Annual Meeting 2014 サンディエゴ(アメリカ)

13. 中村康之、加美野宏樹、佐野仁哉、村井竜也、齋藤有理、小池正人、内山安男、荒川博文、「Physiological roles of the Mieap-regulated mitochondrial quality control」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)

14. 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 α 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)

15. 佐野仁哉、中村康之、加美野広樹、二村学、吉田和弘、荒川博文、「Potential role of the Mieap-regulated mitochondrial quality control pathway in gastric tumor suppression」平成 25 年 12 月 16 日-平成 25 年 12 月 18 日 The 4th Japanese Cancer Association - American Association for Cancer Research Special Joint Conference 東京ベイ舞浜ホテル(千葉県千葉市)

16. 中村康之、加美野広樹、佐野仁哉、吉田将紀、村井竜也、齋藤有理、荒川博文、「Potential role of the Mieap-regulated mitochondrial quality control in mouse intestinal tumorigenesis」平成 25 年 11 月 6 日-平成 25 年 11 月 7 日 International Symposium Mitochondria 2013 六本木アカデミーヒルズ 49 (東京都)

17. 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 Mitochondria 2013 六本木アカデミーヒルズ 49 (東京都)

18. 佐野仁哉、中村康之、加美野宏樹、齋藤有理、二村学、吉田和弘、荒川博文、「Potential role of the Mieap-regulated mitochondrial quality control pathway in gastric tumor suppression」平成 25 年 11 月 6 日-平成 25 年 11 月 7 日 International Symposium Mitochondria 2013 六本木アカデミーヒルズ 49 (東京都)

19. 齋藤有理、中村康之、加美野広樹、佐野仁哉、吉田将紀、村井竜也、荒川博文、「Critical role of Mieap in sperm motility through mitochondrial quality control」平成 25 年 11 月 6 日-平成 25 年 11 月 7 日 International Symposium Mitochondria 2013 六本木アカデミーヒルズ 49 (東京都)

20. 中村康之、加美野宏樹、佐野仁哉、村井竜也、齋藤有理、荒川博文、「Potential role of the Mieap-regulated mitochondrial

quality control in mouse intestinal tumorigenesis (マウス消化管腫瘍の発生と進展における 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 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)

21. 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)

22. 佐野仁哉、中村康之、加美野宏樹、村井竜也、齋藤有理、二村学、吉田和弘、荒川博文、「Potential role of the Mieap-regulated mitochondrial quality control pathway in gastric tumor suppression (胃がんのがん抑制における 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 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)

23. 齋藤有理、中村康之、加美野宏樹、佐野仁哉、村井竜也、吉田将紀、荒川博文、「Critical role of Mieap in sperm motility through mitochondrial quality control (精子運動能におけるミトコンドリア品質管理機構を介した Mieap の極めて重要な役割について)」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)

24. 中村康之、加美野宏樹、佐野仁哉、村井竜也、齋藤有理、荒川博文、「Potential role of the Mieap-regulated mitochondrial quality control in mouse intestinal tumorigenesis (Mieap ノックアウトマウスの解析について)」平成 25 年 9 月 4 日-平成 25 年 9 月 7 日 平成 25 年度文科省科研費 新学術領域研究『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』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)

25. 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、「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 年度文科省科研費 新学術領域研究『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』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)

26. 中村康之、吉田将紀、喜多村憲章、加美野宏樹、村井竜也、齋藤有理、佐野仁哉、荒川博文、「Hypoxia induces accumulation of lysosomal proteins within 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)

27. 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)

28. 中村康之、加美野宏樹、喜多村憲章、宮本裕士、佐野仁哉、荒川博文、「Hypoxia induces accumulation of lysosomal proteins within mitochondria」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)

29. 中村康之、加美野宏樹、喜多村憲章、宮本裕士、佐野仁哉、荒川博文、「Mieap, a p53-inducible protein, controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria」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)

30. 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)

31. 佐野仁哉、加美野宏樹、中村康之、吉田将紀、村井竜也、齋藤有理、二村学、吉田和弘、荒川博文、「Frequent inactivation of the p53/Mieap/BNIP3 mitochondrial quality control pathway in gastric 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

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・研究員

研究者番号：90569063

(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

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