

201220008A

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略事業

浸潤・転移等、がんの重要な臨床的特性の病理・病態学分子基盤の
解析とそれに基づく診断・治療法の開発に資する研究

平成24年度 総括研究報告書

主任研究者 落合 淳志

平成25（2013）年5月

目 次

I	総括研究報告書	1
	がん病理・病態学的特性の分子基盤の解析とそれに基づく	3
	診断・治療法の開発に資する研究	
	落合 淳志	
II	分担研究報告書	7
1.	MMP とADAMによるがん組織内微小環境因子代謝を	9
	介したがん細胞の増殖・浸潤・転移：胃がんの浸潤・転移と分子標的	
	治療後組織の解析	
	岡田 保典	
2.	病理材料・in vivo モデルを用いたがんの浸潤転移	13
	機構解明	
	坂元 亨宇	
3.	がんの発生と進展における TGF- β 関連分子の作用	17
	加藤 光保	
4.	新規ミトコンドリア品質管理機構とヒトがんにおけるその異常に関する研究	19
	荒川 博文	
5.	がん間質の免疫微小環境に関する研究	23
	平岡 伸介	
6.	グライコームの解析に基づくがんの診断法、治療応答性	27
	・転移再発予測法の開発	
	神奈木 玲児	
III	研究成果の刊行に関する一覧表	33

I 総括研究報告書

浸潤・転移等、がんの重要な臨床的特性の病理・病態学分子基盤の解析とそれに基づく診断・治療法の開発に資する研究

落合 淳志

がん病理・病態学的特性の分子基盤の解析とそれに基づく診断・治療法の開発に関する研究

研究代表者 落合 淳志 独立行政法人 国立がん研究センター東病院臨床開発センター
臨床腫瘍病理部・部長

研究要旨：本研究は、がん病理・病態学的特性をがん細胞と間質細胞を含めたがん組織全体の分子機構として明らかにすることにより、浸潤・転移やがん患者予後に関わる癌生物像に関わるがん細胞と間質細胞の相互作用やがん微小環境を明らかにするものである。また、がん組織において特徴的な、がん細胞と間質細胞の相互作用やがん微小環境を標的とした新しい診断法・治療法を見出すことを目的とするものである。本年度は以下の研究成果を得た。1) 膵臓がんの神経浸潤モデルを用いてがん性疼痛（異痛）には脊髄アストロサイトの活性化が関わり、PPFによる活性阻害はがん性疼痛阻害に働く前臨床試験ができた。2) 血管周囲外膜より培養した間質線維芽細胞によるヒト肺腺癌細胞の免疫不全マウスにおけるがん生着・生存能にはポドプラニンによる RhoA の活性化が重要な役割を果たしていることを示した。3) 神経内分泌細胞の増殖にはチロシン脱リン酸化酵素 PTPRZ1 およびそのリガンドが腫瘍因子として重要な役割を果たしていることを示した。国立がん研究センター東病院内視鏡科との共同研究により 4) 新しいレーザー内視鏡による組織内酸素濃度測定技術の開発を行い、第一相臨床試験により消化管前がん病変における酸素の濃度を測定した。

A. 研究目的

がんの生物像はがん細胞の遺伝子変化の蓄積に規定されるのではなく、がん細胞とがん組織を構築する間質線維芽細胞とが創り出すがん微小環境により大きく影響を受ける。特にがん組織に特徴的な病理形態・病態はがんの悪性度と強い相関を示し、これら病理・病態学的変化はがんの生物像を規定する分子基盤に関わっていることが強く推察される。今年度はこれまで作製された動物モデルを基にした診断・治療法の開発を行い、国立がん研究センター東病院肝胆膵内科、内視鏡科および関連企業と共同し、第1相および第II相臨床研究への応用を試みている。1) 膵臓がんの神経浸潤モデルを用いてがん性疼痛（異痛）だけでなく悪液質の形成には脊髄アストロサイトの活性化が関わっており、アストロサイトの活性阻害が食餌量減少を

伴わないマウス体重減少を抑制すること初めて示した。2) 管周囲外膜より培養した間質線維芽細胞が、ヒト肺腺癌細胞の免疫不全マウスにおけるがん生着・生存能には、線維芽細胞の Rho A の活性化が重要な役割を果たしていることを初めて示した。3) 神経内分泌細胞の増殖にはチロシン脱リン酸化酵素 PTPRZ1 およびそのリガンドが腫瘍因子として重要な役割を果たしているが、その分子機構として NOS の活性を上げることによる血管新生が重要な役割を果たしていることを明らかにした。4) 新しいレーザー光を用いてヘモグロビン酸化量を計測することで組織酸素濃度を測定する内視鏡を開発し、その有用性の臨床研究を開始した。

B. 研究方法

1) 膵臓がんの神経浸潤モデルを用いて、マ

ウスの食餌量と体重変化ならびに疼痛の変化を調べた。また、脊髄の組織における分子発現を網羅的解析するとともに、アストロサイトの活性化を免疫組織学的に評価した。アストロサイトの活性を抑制する PPF (プロペンとフィリン) を投与することで、食事量、体重、疼痛の変化を計測した。

2) 血管周囲外膜より培養した間質線維芽細胞はヒト肺腺癌細胞の免疫不全マウスにおける生着に関わることを示したが、この間質線維芽細胞の産生するポドプラニンの細胞内ドメインの欠失タンパクの発現を変化させ、ヒト肺腺がん細胞株 A549 の免疫不全マウスへの腫瘍形成能を確認した。細胞内 Rho A 活性を測定するとともに、活性化 Rho A 遺伝子を

3) 神経浸潤モデルで見出された膵がん患者の IL-6 のシグナルを阻害する抗 IL-6 受容体抗体治療の第一相臨床試験を膵臓がん患者に対して行った。がんの特徴的な病理形態を 3 次元的に観察する Optical coherent tomography (OCT) 技術をもとにした内視鏡システム μ VOIS を構築し、臨床機として第 I 相試験を開始した。

C. 研究結果

1) 膵臓がんの神経浸潤モデルを用いてがん性疼痛 (異痛) には脊髄アストロサイトの活性化が関わっていることを、遺伝子発現プロファイルで確認するとともに、実際の組織におけるアストロサイトの活性化を測定したところ、有意に増加していることを示した。また、アストロサイトの活性阻害薬を神経浸潤モデルに投与すると、マウスの異痛が有意に改善されたことより、アストロサイトの活性化阻害はがん性疼痛阻害に働くことを初めて示した。また、アストロサイトの活性化阻害は、食餌量減少を伴わないマウス体重減少を抑制することが示され、がん性悪液質の新しい治療法開発の可能性が示された。

2) 血管周囲外膜より培養した間質線維芽細胞はヒト肺腺癌細胞の免疫不全マウスにおける生着に関わることを示したが、この血管外膜由来線維芽細胞の発現するポドプラニ

ンを抑制すると、同時に移植したヒト肺腺癌細胞株 A549 の免疫不全動物への腫瘍形成能が抑制された。この分子機構を検討し、ポドプラニンの細胞内 ERM 結合ドメインを介して Rho A の活性化が引き起こされることを明らかにするとともに、Rho A 活性の高い線維芽細胞は腫瘍生着を促進することを明らかにした。現在、線維芽細胞の Rho A 活性化が何故がんの生着を促進するかの検討を行っている。

4) がん組織の酸素濃度を測定する目的で、組織内血液の酸化ヘモグロビンの量を可視化することにより、組織酸素濃度イメージング内視鏡を開発した。ブタを用いた前臨床研究を行った後、東病院内視鏡科との共同研究により、ヒト消化管の前がん病変および早期がん病変の組織酸素濃度を測定する第 I 相試験を開始した。

D. 考察

1) ヒト膵臓がん神経浸潤モデルは、ヒト膵臓がん患者の病態である悪液質および異痛モデルとして成り立ち、がんの神経浸潤によりがん性疼痛 (異痛) の程度は脊髄内のアストロサイトの活性化と相関性を示して来た。昨年度に引き続き、神経浸潤モデルを用いて脊髄アストロサイトの活性化をプロフェントフィリン (PPF) により抑制したところ、マウス異痛が有意に抑制されるとともに、食事量を変化しない体重減少が優位に抑制された。脊髄に起こる遺伝子発現変化を網羅的に解析したところ、炎症に関わる遺伝子群の発現が神経浸潤モデルに優位に高いことが示された。また、PPF 投与によりグリアの活性化は抑制され、同時に炎症関連分子発現の現象が認められた。このことは、これまでの動物モデルで用いられてきたような、比較的急性の神経障害モデルではなく、癌細胞の浸潤という慢性的な神経傷害モデルにより脊髄レベルで炎症が引き起こされることを示している。また、膵臓がん患者の癌性疼痛および悪液質に関して新しい治療法の可能性を提供するものである。炎症関連分子の中には、アルツハイマーなど発症機構との関係

のある分子発現も認められ、今後、臨床病態と神経変性やグリアの活性化などの関係を明らかにする必要があると考えられ、このモデルを用いて、がん性疼痛の分子機構を明らかにするとともに、新しいがん性疼痛の治療法を開発する予定である。

2) 血管周囲外膜より培養した間質線維芽細胞はヒト肺腺癌細胞の免疫不全マウスにおける生着に関わることを示したが、この間質線維芽細胞の産生するポドプラニンの発現を変化させ、ヒト肺線がん細胞株 A549 の免疫不全マウスへの腫瘍形成能を確認した。ポドプラニン分子の細胞内領域 8 アミノ酸は ERM 分子と結合し、Rho の活性化に関わることが明らかになったが、線維芽細胞の Rho 活性化が実際にどのような機構により、がん細胞の生着を促進するのかを今後明らかにする必要がある。

4) がん組織の酸素濃度を測定する目的で、組織内血液の酸化ヘモグロビンの量を可視化することにより、組織酸素濃度イメージング内視鏡を開発した。ブタを用いた前臨床研究を行った後、東病院内視鏡科との共同研究により、ヒト消化管の前がん病変および早期がん病変の組織酸素濃度を測定する第 I 相試験を開始した。

E. 結論

今年度の成果により、がん生物像に関わる新しい分子基盤の研究がすすみ、その一部は臨床への応用がすすめられた。今後、その他の分子機構に関してもモデル作製で得た情報を基に治療への応用を展開できると考えられる。

F. 健康危険情報

現在のところ、特記すべきものはありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

研究成果の刊行に関する一覧表のとおり。

2. 学会発表

落合淳志 第 30 回日本口腔腫瘍学会総会・

学術大会 2012 年

落合 淳志「HER2 検査とその標準化に向けての取り組み」第 84 回 日本胃癌学会総会 2012 年

松本 友寛・笹子 三津留・廣田 誠一・落合 淳志・九嶋 亮治・片井 均・田中 洋一・福島 紀雅・梨本 篤・円谷 彰「高度リンパ節転移 (Bulky N2 or cN3) を伴う進行胃癌における HER2 発現陽性割合の検討 (JCOG1005-A)

第 84 回 日本胃癌学会総会 2012 年

北田 浩二・落合 淳志・市川 度・寺島 雅典・倉橋 一成・桜本 信一・片井 均・佐野 武・今村 博司・笹子 三津留「ACTS-GC 登録症例における EGFR および Her2 の発現と生存期間との関連」第 84 回 日本胃癌学会総会 2012 年

落合 淳志「分子標的療法バイオマーカーと病理診断」第 101 回 日本病理学会総会 2012 年

落合 淳志「がん研究における病理学-基礎から臨床への架け橋-」第 101 回 日本病理学会総会 2012 年

合志 健一・小嶋 基寛・齋藤 典男・西澤 雄介・小林 明宏・伊藤 雅昭・杉藤 正典・落合 淳志「局所進行直腸癌に対する neo adjuvant chemotherapy による末梢神経変性の病理形態学的評価について」第 77 回大腸癌研究会 2012 年

落合 淳志「ヒト前立腺癌の骨転移機構 -Molecular mechanism of bone specific metastasis of human prostate cancer-」第 21 回日本がん転移学会学術集会・総会 2012 年

落合 淳志「頭頸部表在癌の内視鏡所見とその病理組織像」第 64 回日本気管食道科学会総会ならびに学術講演会 2012 年

落合 淳志「骨微小環境における腫瘍間質相互作用のメカニズム: 前立腺がんおよび乳がんを用いた動物モデルによる解析」第 58 回日病理学会秋期特別総会 2012 年

落合 淳志「がん発育進展に関わる間質線維芽細胞の起源と生物像」第 43 回高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム 2012 年

木下 智成・石井 源一郎・平岡 伸介・青景 圭樹・菱田 智之・吉田純司・永井 完治・落合 淳志「肺腺癌における間質へ浸潤する制御性 T 細胞の意義」第 71 回日本癌学

会学術総会 2012年

牧野嶋 秀樹・石井 源一郎・小嶋 基寛・
藤井 誠志・桑田 健・落合 淳志「神経内
分泌腫瘍で過剰発現する PTPRZ1 の肺小細胞
がん進展における機能解析」第71回日本癌
学会学術総会 2012年

石井 源一郎・衞里 真也・落合 淳志「が
ん関連線維芽細胞が、がん進展に及ぼす病態
病理機構」第71回日本癌学会学術総会
2012年

玉置 将司・青柳 一彦・三梨 桂子・日月 裕
司・小松崎 理絵・落合 淳志・武藤 学・千葉
勉・吉田 輝彦・佐々木 博巳「手術標本で認め
られる人為的に誘導された上皮間質転換：癌研究
における意味」第71回日本癌学会学術総会
2012年

小嶋 基寛・石井 源一郎・牧野嶋 秀樹・
樋口 洋一・齋藤 典男・落合 淳志「大腸
がんの転移を促進する漿膜直下微小環境の
特徴」第71回日本癌学会学術総会 2012年

II. 知的財産権の出願・登録状況

特にありません。

特許取得

国内

特にありません。

II 分担研究報告書

1. MMP と ADAM によるがん組織内微小環境因子代謝を介したがん細胞の増殖・浸潤・転移
岡田 保典
2. 病理材料・in vivo モデルを用いたがんの浸潤転移機構解明
坂元 亨宇
3. がんの発生と進展における TGF- β 関連分子の作用
加藤 光保
4. 新規ミトコンドリア品質管理機構とヒトがんにおけるその異常に関する研究
荒川 博文
5. がん間質の免疫微小環境に関する研究
平岡 伸介
6. グライコームの解析に基づくがんの診断法、治療応答性・転移再発予測法の開発
神奈木 玲児

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略事業）
（分担） 研究報告書

MMPとADAMによるがん組織内微小環境因子代謝を介したがん細胞の増殖・浸潤・転移：腎がんの浸潤・転移と分子標的治療後組織の解析

（分担）研究者 岡田 保典 慶應義塾大学医学部病理学教室
研究協力者 三上 修治 慶應大学病院病理診断部

研究要旨

ADAM17 (a disintegrin and metalloproteinase17) はTNF- α (tumor necrosis factor- α)等の膜タンパク質をシェディングすることでがん細胞の増殖・浸潤・転移に関わると考えられている。本研究では、TNF- α が腎細胞がん細胞株(786-OおよびACHN)のE-cadherin発現抑制とmatrix metalloproteinase-9発現上昇によりがん細胞の浸潤能を高め、がん幹細胞マーカーであるCD44発現を誘導することを明らかにした。また、786-OのADAM17発現をsiRNAにより抑制するとがん細胞の遊走能と浸潤能が低下した。腎細胞がん切除検体では、ADAM17、TNF- α 、CD44発現は原発巣の進展度、遠隔転移、組織学的異型度と相関しており、これらの分子を高発現している症例は早期に再発し予後不良であった。また、vascular endothelial growth factorやplatelet-derived growth factorなどの受容体キナーゼを阻害する分子標的薬スニチニブ治療後に残存している治療耐性がん細胞はADAM17、TNF- α 、CD44を高発現していた。以上のデータより、ADAM17/TNF- α /CD44経路は、腎細胞がんの増殖・浸潤・転移に重要な役割を果たすのみならず、分子標的薬スニチニブに対する治療耐性に関わっていることが示唆された。

A. 研究目的

腎細胞がんは術後に高率に再発することが知られている。転移性腎細胞がんには抗がん化学療法の効果はなくサイトカイン療法が行われてきたが、奏効率は10~20%に留まっている。近年、転移性腎細胞がんに対し血管新生阻害薬スニチニブ等の分子標的薬による治療が導入され腫瘍縮小効果が得られているものの、抗腫瘍効果は未だ不十分であり、大部分の症例で治療耐性になることが問題となっている。しかし、耐性機構の解明につながる基礎的研究は殆ど行われていない。

我々の経験では、スニチニブ治療後の腎細胞がん組織では、脱分化傾向の顕著な紡

錘細胞がんの残存を確認している。形態学的に通常型の腎細胞がんから紡錘細胞がんへの移行は上皮-間葉転換(epithelial-mesenchymal transition: EMT)と考えられ、腎細胞がんではEMTがスニチニブ治療に対する耐性獲得に関与していることが示唆された。そのため、腎細胞がんのEMT誘導機構が特定出来れば、根治療法の開発につながることを期待される。

Tumor necrosis factor- α (TNF- α)は当初腫瘍壊死因子として発見されたが、近年低用量のTNF- α はむしろ腫瘍の増殖を促進することが報告されている。また、TNF- α はtransforming growth factor- β (TGF- β)とともに主要なEMT誘導因子である。また、乳が

んではがん幹細胞マーカーである CD44 を TNF- α が誘導することも知られている。TNF- α は細胞膜タンパク質として産生され、TNF-converting enzyme (TACE) である ADAM (a disintegrin and metalloproteinase) 17 によってシェディングされることで細胞外に放出される。ADAM17 が種々のがんにおいて過剰発現しており、がん細胞の浸潤・転移および治療抵抗性にかかわっていると報告されている。しかし、腎細胞がんにおける ADAM17 や TNF- α 発現と臨床病理学的因子や予後との相関についての報告はない。

本研究では、腎細胞がん細胞株における TNF- α による EMT 誘導機構を解析するとともに、がん幹細胞マーカーである CD44 の誘導を解析した。また、ADAM17 を siRNA により特異的に抑制し、がん細胞の浸潤能の変化を検討した。腎細胞がん外科切除検体における ADAM17、TNF- α 、CD44 発現を免疫組織学的に解析し、臨床病理学的因子、予後との関連を調べた。さらに、分子標的薬治療前後の腎がん切除検体における ADAM17、TNF- α 、CD44 発現を検討し、治療耐性との関連を検討した。

B. 研究方法

- ・ 腎細胞がん外科切除検体における ADAM17、TNF- α 、CD44 発現の解析: 原発性淡明細胞型腎細胞がん113例のパラフィン切片を用いて ADAM17、TNF- α 、CD44 発現を免疫組織学的に検討し、臨床病理学的因子および予後との関連を統計学的に解析した。
- ・ TNF- α による腎細胞がん由来細胞株の EMT 誘導機構の解析: 腎細胞がん由来細胞株である 786-O と ACHN の培養系に主要な EMT 誘導因子である TNF- α と TGF- β を添加し、trans-well culture insert や Matrigel invasion chamber を用いて遊走能と浸潤能の変化を測定するとともに、E-cadherin、matrix metalloproteinase-9 (MMP-9)、TNF- α 発現の変化を定量 PCR 法で測定した。

- ・ TNF- α による CD44 発現の誘導: TNF- α を 786-O と ACHN の培養系に加えた際の CD44 発現の変化を定量 PCR 法とイムノブロット法によって検討した。

- ・ siRNA による ADAM17 発現の抑制と遊走・浸潤能変化の測定: 786-O の ADAM17 発現を siRNA によって特異的に抑制し、その効果を定量 PCR 法によって確認するとともに、上記と同様の方法で *in vitro* における遊走能と浸潤能の変化を測定した。

- ・ スニチニブ治療後残存がん細胞における ADAM17、TNF- α 、CD44 発現解析: スニチニブ治療によるがん細胞の形質変化を検討するため、上記の原発性腎細胞がん113例に加え、スニチニブ治療後の原発性腎細胞がん4例および転移性腎細胞がん（未治療12例とスニチニブ治療後10例）における TNF- α 、CD44、ADAM17 発現を調べ治療との相関を検討した。

- ・ 腎細胞がん外科切除検体における血管密度の測定: スニチニブ治療による血管新生抑制効果を調べるため、CD34 染色を行って微小血管密度を測定した。

- ・ 倫理面への配慮: ヒトがん患者の組織を用いた解析にあたっては、患者本人のインフォームドコンセントを得た上で用い、慶應義塾大学倫理委員会の承認のもと、厚生労働省の倫理指針を遵守して行った。

C. 研究結果

1. 腎細胞がんにおける ADAM17、TNF- α 、CD44 の発現と臨床病理学的因子の相関: ADAM17、TNF- α 、CD44 発現は腎細胞がんの原発巣の進展度、遠隔転移、組織学的異型度と相関していた。また、ADAM17、TNF- α 、CD44 高発現例は低発現例に比べ、早期に再発し、死亡率が高いことがわかった。

2. 腎細胞がんにおける TNF- α 、ADAM17、CD44 発現の関連: 腎細胞がん組織における TNF- α と ADAM17 発現には正の相関があり、

ADAM17によるTNF- α のシェディングがTNF- α の発現亢進に関与していると考えられた。TNF- α 高発現症例は低発現例に比べ有意にCD44発現が高い傾向がみられ、腎細胞がん組織においてTNF- α がCD44発現を誘導していることが示唆された。

3. TNF- α による786-OとACHNのEMT誘導：TNF- α を添加して786-OとACHNを培養するとE-cadherin発現が低下し、vimentinとMMP-9発現が上昇するとともに、*in vitro*における遊走能と浸潤能が亢進した。また、興味深いことにTNF- α 投与によりがん細胞のTNF- α mRNA発現が誘導された。

4. TNF- α によるCD44発現の誘導：TNF- α 投与によりがん細胞のCD44 mRNA発現が上昇した。イムノブロット法によりCD44蛋白発現の上昇も確認された。

5. siRNAによる786-OのADAM17発現の抑制と遊走能と浸潤能の低下：siRNAにより786-OのADAM17発現を特異的に抑制すると*in vitro*におけるがん細胞の遊走能と浸潤能がcontrol siRNAを加えた細胞株に比べ有意に抑制された。

6. スニチニブ治療後がん組織におけるADAM17とCD44発現の相関：スニチニブ治療後の腎細胞がん原発巣では未治療組織に比べ、有意にCD44とADAM17発現が上昇していた。同様にスニチニブ治療後の転移性腎細胞がん組織は未治療の症例に比べCD44とADAM17陽性細胞の比率が有為に増加していた。

7. スニチニブ治療と微小血管密度の相関：スニチニブ治療と微小血管密度の間には有意な関連は認めなかった。

D. 考察

EMTはがん細胞の浸潤・転移の重要なステップであり、EMTではE-cadherinの低下により細胞接着能が低下し、MMPの誘導により浸潤能が亢進することが重要と考えら

れている。本研究によりTNF- α が腎細胞がんのEMTを誘導し、E-cadherin発現の抑制およびvimentinとMMP-9発現の誘導によってがん細胞の遊走能と浸潤能を高めていることが明らかとなった。

転移性腎細胞がんに対するスニチニブ治療は従来の免疫療法と比較すると有意に生存期間が延長するとされているが、多くの患者において治療耐性となり、最終的には死亡する。そのために、スニチニブ治療後に残存する耐性がん細胞の形質を解析することは極めて重要である。がんの治療抵抗性にはがん幹細胞が関与していると考えられ、EMTとがん幹細胞の分子機構には共通点が多いことが最近明らかとなってきている。スニチニブ治療後の腎細胞がん組織は、未治療の組織に比べ有意にCD44陽性のがん細胞の比率が上昇していた。CD44は化学療法に対する治療抵抗性に関与していることが報告されており、CD44を標的とした治療がスニチニブ抵抗性腎細胞がんに対する効果的な新規治療法の開発につながることを期待される。

スニチニブはvascular endothelial growth factor receptorの作用を阻害し血管新生を抑制することで治療効果を発揮していると考えられている。本研究ではスニチニブ治療の有無と微小血管密度の関連を検討したが、治療後がん組織での有意な微小血管密度の低下を認めなかった。スニチニブ治療を2クール後早期に摘出した腎細胞がん組織では有意な血管密度低下が報告されている。スニチニブ治療により当初は血管密度が低下すると考えられるが、多くの症例では耐性となり、血管新生の再活性化により、長期治療後がん組織では血管密度の低下がみられなくなると推定された。

ADAM17はTNF- α やepidermal growth factor receptor ligandのシェディングに関与しており、卵巣がん、乳がん、膵がん、結腸がん、頭頸部がん等の多くのがんにおいて過剰発現し、がん細胞の増殖・浸潤・血管新生に関わっている。さらに乳がんではハーセプチンに対する治療耐性に関与し、

胃がんのがん幹細胞では CD44 と共発現していることが報告されている。本研究では、ADAM17 が腎細胞がんの原発巣の進展度、遠隔転移、組織学的異型度と相関し、ADAM17 高発現症例は早期に再発し、予後不良であることが判明した。*In vitro* の実験では、ADAM17 発現抑制は遊走能と浸潤能の低下につながる事が明らかとなった。また、スニチニブ治療後がん組織では CD44 とともに残存がん細胞に ADAM17 が高発現しており、ADAM17 と CD44 が腎細胞がんのがん幹細胞マーカーである可能性が示唆された。

E. 結論

腎細胞がんでは、TNF- α がEMTおよびがん幹細胞マーカーであるCD44発現を誘導した。一方、TACEであるADAM17発現のsiRNAによる特異的な抑制ががん細胞の遊走能と浸潤能を抑制した。また、ADAM17、TNF- α 、CD44を高発現している腎細胞がんは早期に再発し、死亡率が高いことが明らかとなった。スニチニブ治療後に残存しているがん細胞ではADAM17とCD44が過剰発現していた。ADAM17によるTNF- α のシェディングおよびTNF- α によるCD44発現の誘導が腎細胞がんの浸潤・転移及び治療耐性に関与していると考えられ、ADAM17/TNF- α /CD44経路の特異的な阻害が既存の分子標的治療に耐性となった腎細胞がんの新規治療標的になることが示唆された。

F.健康危険情報

現在のところ、特記するべきものはありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1). Mochizuki S., Soejima K., Shimoda M., Abe H., Sasaki A., Okano H.J., Okada H. and Okada Y.: Effect of ADAM28 on carcinoma cell metastasis by cleavage of von Willebrand factor. *J Natl Cancer Inst* 104: 906-922, 2012.

(2). Shirotake S., Miyajima A., Kosaka T., Tanaka N., Kikuchi E., Mikami S., Okada Y. and Oya M.: Regulation of monocyte-chemoattractant protein-1 through angiotensin II type 1 receptor in prostate cancer. *Am J Pathol* 180:1008-1016, 2012.

(3). Mochizuki S. and Okada Y.: ADAM28. In: *Handbook of Proteolytic Enzymes*. Ed by Rawlings N.D. and Salvesen G. Elsevier Ltd, Oxford, UK. pp1136-1139, 2013.

2. 学会発表

(1). 三上修治、大家基嗣、勝部憲一、向井万起男、岡田保典：腎細胞癌の異型性と浸潤・転移。第44回日本臨床分子形態学会総会。シンポジウム：腎がん研究の分子形態学的アプローチ。2012年9月28日-29日。

(2). 三上修治、大家基嗣、石田勝、水野隆一、向井万起男、岡田保典：腎細胞癌におけるADAM17発現の意義。第101回日本病理学会総会。2012年4月26日-4月28日

H. 知的財産権の出願・登録状況

Miyakoshi A., Matsumoto R., Katoh S., Hayami Y., Mochizuki S., Shimoda M. and Okada Y.: Anti-ADAM28 antibodies for therapeutics for carcinomas. 2012年11月9日、国際特許出願。出願番号61724484。

「病理材料・in vivo モデルを用いたがんの浸潤転移機構解明」

分担研究者 坂元 亨宇 慶應義塾大学医学部病理学教室

研究要旨

浸潤性膵管癌（膵癌）検体の異種管移植マウスを用いたマイクロアレイ解析から、腫瘍内に見られる上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) に伴い高発現を示す分子として SMAD3 を同定した。SMAD3 の高発現は、リンパ節転移や術後生存率低下と有意な相関を示した。膵癌細胞株を用いた in vitro 実験においては、RNAi により SMAD3 の発現を抑制することにより、EMT の抑制および運動能の低下が認められた。

A.研究目的

ヒトのがん組織は、多段階発がん過程により、あるいはがん間質相互作用などの多様な細胞間相互作用により、多彩な発育進展様式を示す。そして、各臓器がんの病理学的特性は、臨床的特性と対応することが示されてきている。なかでも癌の浸潤転移は、がんの多様な病態を理解しがんを克服する上で、最も重要な課題である。本研究では、病理組織ならびに in vivo モデルを用い相補的に解析を行うことで、多彩な浸潤転移像を規定する分子基盤を明らかにすることを目的とする。特に浸潤転移における EMT/MET、micropapillary パターンとリンパ節転移、肝細胞がんの肝内転移、膵がんの神経周囲浸潤などの特徴的な病理像をターゲットとした研究を行う。

B.研究方法

がんの中でも特に難治のがんで新規診断・治療法の確立が望まれる肺がん・肝がん・膵がん・卵巣がん等を主な対象とする。臓器がんの特徴的な病理像の中でも、特に特徴的な浸潤・転移として、がん浸潤転移における EMT/MET、がんの micropapillary パターン、肝細胞がんの肝内転移、膵がんの神経周囲浸潤・リンパ節転移、浸潤転移と幹細胞性の獲得を主な課題として、その詳細な臨床病理学的解析、背景の分子基盤の解析を行う。

具体的な方法としては、凍結検体を用いた網羅的遺伝子発現解析、病理組織・Tissue マイクロアレイと免疫組織化学、蛍光抗体、in situ hybridization とを組み合わせた in situ 分子解析、病理画像デジタル化による定量解析を行い、臨床病理像との多次元的な解析を行う。さらには、これらの Tissue Biology の成果を実際の臨床へと展開するための橋渡しとして、病理像を再現する in vivo アッセイ系としてのがん同所移植モデルの確立と応用を行う。

(論理面への配慮)

本研究計画では、がん組織で新たに生じた遺伝子の変化、発現の変化の解析ならびにがん組織の移植による機能解析を目的としており、三省合同指針にあるヒトゲノム・遺伝子解析研究は含まれない。ヒト由来の組織を用いた研究に当たっては、三省合同による「遺伝子解析研究に付随する倫理問題等に対応するための指針」及び科学技術会議生命倫理委員会により制定された「ヒトゲノム研究に関する基本原則について」を遵守すると共に、当大学の倫理審査委員会の承認を得て実施する（承認番号 15-57-2, 15-59, 16-34, 16-90）。動物実験に関しては、米国実験動物資源協会の「実験動物の管理と使用に関する指針」ならびに「慶應義塾大学医学部動物実験ガイドライン」を遵守する。

C. 研究結果

膵癌臨床検体を免疫不全マウスの膵臓へ移植することによりマウス膵臓内に腫瘍を形成させ、膵癌モデルマウスとした。マウス内で形成された腫瘍を用いたマイクロアレイ解析により、EMT の指標である孤立性浸潤細胞の出現頻度に伴い発現量が変動する遺伝子として SMAD3 を同定した。約 90 例の膵癌臨床検体を用いた免疫組織染色の結果、SMAD3 高発現と、血管侵襲 ($P=0.010$)、リンパ節転移 ($P<0.001$)、WHO グレーディングに基づく高グレード ($P=0.001$) との間に有意な相関が見られた。TGF- β シグナルにおいて重要な役割を担う SMAD4 は多くの膵癌症例において遺伝子変異・欠失による不活化が知られており、上述の症例の半数においても陰性であった。SMAD3 は TGF- β シグナル伝達の仲介因子であるが、SMAD3 高発現と SMAD4 染色性との間に相関は見られなかった ($P=0.265$) が、EMT 様特徴である E-カドヘリン発現低下 ($P=0.013$) やビメンチン発現上昇 ($P=0.032$)、高頻度弧在性浸潤 ($P<0.001$) との間には有意な相関が見られた。EMT 様特徴である E-カドヘリン発現低下やビメンチン発現上昇、高頻度弧在性浸潤は、単変量解析においてどれも生存率

低下と相関（それぞれ $P=0.001$, $P=0.005$, $P=0.002$ ）するが、SMAD3 高発現も生存率低下と相関 ($P<0.001$) していた。これらの 4 因子を用いた多変量解析では、SMAD3 高発現 ($P=0.030$) および E-カドヘリン発現低下 ($P=0.021$) が独立因子として同定された。

遺伝子変異・欠失により SMAD4 が不活化された細胞では、TGF- β による細胞抑制や EMT 誘導は見られなかった。RNAi により膵癌細胞の SMAD3 発現量を抑制することにより、TGF- β による EMT 誘導 (E-カドヘリン発現低下およびビメンチン発現上昇) は抑制され、さらに SMAD4 変異細胞においては、TGF- β の関与しない EMT が抑制された。また、SMAD4 遺伝子変異の有無に関わらず、SMAD3 発現抑制により、細胞運動の低下が見られた。

D. 考察

SMAD3 は、同所性移植膵癌モデルマウスを用いたマイクロアレイ解析により同定された、EMT 様特徴と関連する因子である。EMT 様特徴（腫瘍細胞での E-カドヘリン発現低下やビメンチン発現上昇など）は、多くのがんにおいて、予後悪化と関連することが報告されている。膵癌を含む多くのがんで過剰発現している TGF- β は EMT の誘導因子としても知られているが、およそ半数の症例で SMAD4 が不活化されている膵癌においては、TGF- β 以外の因子も EMT を誘導に関与していると考えられる。本研究において、約半数の症例で SMAD4 の腫瘍内陽性を認めたが、EMT 様特徴との相関は見られなかった。しかし、TGF- β シグナル伝達の仲介因子のひとつである SMAD3 は、腫瘍内での高発現と EMT 様特徴との間に相関が見られ、その高発現は、EMT 様特徴と同様、術後生存率低下に関連していた。これらの結果から、SMAD4 変異の有無に関わらず、SMAD3 が EMT を介した膵癌悪性化に関与していることが示唆された。

遺伝子変異・欠失により SMAD4 が不活化された細胞では、TGF- β による細胞抑制

や EMT 誘導は見られなかった。RNAi により膵癌細胞の SMAD3 発現量を抑制することにより、TGF- β による EMT 誘導は抑制され、さらに SMAD4 変異細胞においては、TGF- β の関与しない EMT が抑制された。また、SMAD4 遺伝子変異の有無に関わらず、SMAD3 発現抑制により、細胞運動の低下が見られた。これらの結果から、SMAD3 は、TGF- β またはそれ以外による EMT 誘導に関与し、細胞の運動能を亢進させることが示唆された

1. 特許取得
特になし
2. 実用新案登録
特になし
3. その他
特になし

E. 結論

多様ながんの浸潤転移機構を解明するために、病理組織ならびに in vivo モデルを用い相補的に解析を行うことで、浸潤転移像を規定する分子基盤を明らかにすることを目的とする。本年度は特に、SMAD3 の膵癌悪性化への関与および機能解析について検討し、新たな知見が得られた。。

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Effendi K, Yamazaki K, Mori T, Masugi Y, Makino S, Sakamoto M: Involvement of hepatocellular carcinoma biomarker, cyclase-associated protein 2 in zebrafish body development and cancer progression. *Exp Cell Res* 319: 35-44, 2013

Fukuma M, Tanese K, Effendi K, Yamazaki K, Masugi Y, Suda M, Sakamoto M: Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 regulates epithelial cell phenotype and survival of hepatocellular carcinoma cells. *Exp Cell Res* 319:113-21, 2013

2. 学会発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

がんの発生と進展における TGF- β 関連分子の作用

分担研究者 加藤 光保 筑波大学・医学医療系教授

研究要旨

がんの発生と進展に関わる TGF- β 関連分子の機能を明らかにし、がんの診断や治療に応用することを目的として、がん細胞で発現が亢進している TGF- β の標的遺伝子であることを発見した TMEPAI と MafK について、腫瘍形成促進作用があることを証明するとともに、その作用機序を解析した。また、臨床病理学的研究や診断への応用を目指して、これらの分子に対する抗体を作製した。

A. 研究目的

TMEPAI と MafK の腫瘍形成促進能を調べ、その作用機序を明らかにするとともに、これらの分子に対する抗体を作製して、がん診断への応用を目指した。また、この研究を元に分子標的治療を開発することも研究目的とした。

B. 研究方法

作製した TMEPAI 抗体によって恒常的に TMEPAI が発現していることが示された肺がん細胞群で、この遺伝子をノックダウンし、腫瘍形成に関与する作用を細胞増殖、細胞運動、スフェア形成、腫瘍形成について検討した。また、MafK については、乳腺上皮細胞（NMUMG）への恒常的発現や乳がん細胞でのノックダウンが腫瘍形成に及ぼす作用を検討した。MafK の発現は上皮間葉転換(EMT)を誘導することが示唆されたため、E カドヘリン、N カドヘリン、フィブロネクチンなどの EMT マーカー分子の発現も調べた。さらに、MafK の導入によって発現が亢進した遺伝子を DNA マイクロアレイ解析を行ってスクリーニングした。この中から腫瘍形成に関わる MafK の標的遺伝子の同定を行った。

（倫理面での配慮）

組替え DNA 実験と動物実験は、法律に則り、筑波大学に実験計画を提出し、許可を受けて実施した。

C. 研究結果

TMEPAI は、肺腺がん細胞で恒常的に発現しており、これをノックダウンするとスフェア形成能と腫瘍形成能が有意に低下することが示された。また、TMEPAI の作用標的分子が Smad2, Smad3 以外にもあることを示唆する結果を得て、さ

らなる解析を加えている。

MafK は、乳腺上皮細胞に発現させるとスフェア形成、細胞運動、腫瘍形成、転移をすべて亢進することが示された。MafK の発現が亢進している乳がん細胞で MafK をノックダウンすると上記の活性が大きく低下したことから、MafK は、乳がんの発生と進展を促進することが示された。また、腫瘍形成に関与する MafK の標的遺伝子として Gpnmb を発見した。

MafK と Gpnmb は、いずれも上皮間葉転換を誘導し、がんの浸潤性増殖と転移形成も活性化させていた。

D. 考察

TMEPAI は、多くの癌で発現が亢進して、腫瘍形成を促進しているため、がんの再発診断や治療の分子標的となる可能性が示された。MafK は、乳がん細胞で Gpnmb の発現を亢進させ、さらに上皮間葉転換を誘導して、腫瘍形成、浸潤、転移を誘導していた。乳がんの予後判定に有用な新たな腫瘍マーカーとなることが期待される。また、両者ともに治療の分子標的となることが示唆される。

E. 結論

TGF- β 関連分子である TMEPAI と MafK に腫瘍形成促進作用があることを発見し、その作用機序を解析した。新しい診断法・治療法の開発に繋がる基礎研究成果が得られた。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Itoh F et al. Smad2/Smad3 in endothelium is indispensable for vascular stability via

S1PR1 and N-cadherin expressions. Blood. 119: 5320-5328, 2012.

2. 学会発表

Okita Y. et al. MafK mediates tumorigenic potential and EMT in breast cancer cells. AACR-JCA Joint

Conference, Feb. 25, 2013, Hawaii, USA,

Vo Nguyen Thanh Thao et al. Tumorigenic function

of TMEPAI in lung cancer cells, Aug. 30, 2012, Leiden, The Netherlands

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし。

新規ミトコンドリア品質管理機構とヒトがんにおけるその異常に関する研究

分担研究者 荒川 博文 国立がん研究センター研究所腫瘍生物学分野長

研究要旨

我々は p53 及びその標的遺伝子 *Mieap* によって制御される全く新しいミトコンドリア品質管理機構を見いだした。ヒトがん細胞においては、p53 の変異や *Mieap* のメチル化で、この機能が異常となっており、結果的に不良なミトコンドリアの蓄積を招いている。正常細胞とがん細胞の違いを、がん細胞における異常ミトコンドリアの蓄積ととらえ、その発がんやがん進展における役割の解明と、異常ミトコンドリアを標的とした新しいがん診断法や治療法の開発の基盤を作ることをこの研究の目的とする。ヒトがんにおけるがん細胞における *Mieap* やミトコンドリアの状況を調べ、異常ミトコンドリアから産生される活性酸素による酸化ストレスの役割を、がん細胞及びがん間質細胞の両者において明らかとする。移植腫瘍モデルを用いた解析から、*in vivo* におけるその意義を解明する。この研究の成果から、がんに特徴的な代謝異常のメカニズム解明と、がん細胞特異的な異常ミトコンドリアを標的とした新しいがん診断法や治療法の開発が期待される。

A 研究目的

我々は p53 及びその標的遺伝子 *Mieap* によって制御される全く新しいミトコンドリア品質管理(MQC)機構を見いだした。ある種のヒトがん細胞においては、*Mieap* はメチル化で不活性化されていることを見いだした。従って、多くのがん細胞において、p53 の変異や *Mieap* のメチル化で、ミトコンドリアの MQC 機構が異常となり、結果的に不良なミトコンドリアの蓄積を招いている可能性がある。正常細胞とがん細胞の違いを、がん細胞における異常ミトコンドリアの蓄積ととらえ、その発がんやがん進展における役割の解明と、異常ミトコンドリアを標的とした新しいがん診断法や治療法開発の基盤を作ることをこの研究の目的とする。

B 研究方法

国立がん研究センター研究所の尾野らとの共同研究から開発した免疫沈降物に対する網羅的プロテオーム解析法である IP-2DICAL 法を用いて、*Mieap* 結合タンパク質の同定と機能解析を進める。候補タンパク質に対して、内在性 *Mieap* タンパク質との結合確認や、機能喪失及び機能亢進実

験を行うことで、機能を明らかとして、*Mieap* による MQC 機構のメカニズムの詳細を明らかとする。

Mieap 及び関連タンパク質である BNIP3 と NIX のメチル化異常と p53 の変異について、50 例程度の膀胱がん組織検体を用いて解析を行う。臨床検体で認められた異常の意義について、がん細胞株を用いて、それらの異常による *Mieap* による MQC 機構への影響を調べる。

C 研究結果

(1) *Mieap* 結合タンパク質として昨年度までに報告の NIX、BNIP3 に加えて、14-3-3gamma を同定した。*Mieap* との結合により、細胞質ゾルからミトコンドリア内へ移動して、ミトコンドリア内の酸化蛋白質分解に重要な働きを有することを明らかにした。(2) 膀胱がん組織において、*Mieap*、BNIP3、NIX についてメチル化異常、p53 変異の有無を調べたところ、膀胱がん症例の約 70%において *Mieap* 制御性 MQC 機構に異常が生じていることが明らかとなった。(3) 低酸素環境における *Mieap* 制御性 MQC 機構の破綻は、がん細胞の遊走能・浸潤能を加速する事が明らかとなった。(4) 実験に十分な数を得るためのノックアウトマウス

の繁殖を行って、順調にノックアウトマウスの数を増やすことが可能であった。

D. 考察

本年度の研究成果から、細胞質に局在する 14-3-3gamma が、MALM (Mieap-induced accumulation of lysosome-like organelles within mitochondria) 発生時に、Mieap と結合してミトコンドリア内へ移動し、ミトコンドリア内における酸化蛋白質の分解に必須の分子であることが明らかとなった。昨年報告したミトコンドリア外膜タンパク質である BNIP3 及び NIX は、同様に Mieap 結合タンパク質でありながら、その結合はミトコンドリア外膜に限局しており、一過性の結合であった。しかし、14-3-3gamma は、細胞質ゾルで Mieap と結合した後に、ミトコンドリア二重膜を通過して、ミトコンドリアマトリックス領域へ移動し、MALM による酸化蛋白質の分解に極めて重要な役割を果たしている。おそらく、Mieap によって誘導されるミトコンドリア内リソソーム様オルガネラの辺縁に Mieap と共に局在し、ミトコンドリア内酸化蛋白質とリソソーム様オルガネラの間で、アダプターとしての役割を果たし、酸化蛋白質の認識と取り込みに関与しているのではないかと推測している。さらなる詳細な解析を進める必要がある。

本年度解析を行った 50 例の膵がん症例においては、約 70% の症例において、p53 の変異または、Mieap あるいは BNIP3 のプロモーター領域のメチル化が生じており、臨床がん組織においては、大腸がんのみならず、かなり高頻度に、様々ながん種で、Mieap による MQC 機構が不活性化されている可能性が示された。

MEF 細胞を用いた実験から、正常細胞においても、p53 の欠失あるいは Mieap の欠失によって、低酸素状態における細胞の遊走能と浸潤能が顕著に亢進した。この作用は、ミトコンドリアから産生される ROS によるものであることが確認された。ヒトがん組織における Mieap による MQC 機構の不活性化は、がんの微小環境における低酸素状態において、不良なミトコンドリアの蓄積とそこから発生する高いレベルの ROS を介して、がんの増殖・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。

ノックアウトマウスの解析は、生体内におけるこの新規機能の生理的意義を知る上で極めて重要と考えられる。現在、解析に十分量の繁殖が進められており、来年以降の実験開始が可能になると思われる。

E. 結論

Mieap によって制御される MQC 機構は、上流で p53 が、下流で BNIP3 が極めて重要な活性化分子やメディエーターとして機能しており、p53/Mieap/BNIP3 経路はヒト大腸がん組織のみならず膵がん組織に於いても、高頻度に不活性化されている。また、この MQC 機構は、低酸素ストレスで正常細胞に於いて活性化することが明らかとなり、ヒトがんにおけるその破綻は、がんの微小環境におけるがん細胞への不良なミトコンドリアの蓄積とそこから発生する高いレベルの ROS を介して、がんの増殖・浸潤・転移に極めて重要な役割を果たす可能性がある。引き続き、ノックアウトマウスを含めた慎重な解析を進める必要がある。

F. 健康危険情報

総括研究報告書を参照のこと。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Miyamoto T, Kitamura N, Ono M, Nakamura Y, Yoshida M, Kamino H, Murai R, Yamada T, Arakawa H. Identification of 14-3-3gamma as a Mieap-interacting protein and its role in mitochondrial quality control. *Scientific Reports* 2: 379, 2012.

2. 学会発表

1. 荒川博文、シンポジウム：がん・組織障害とオートファジー

演題「p53誘導性タンパク質Mieapによる新規ミトコンドリア品質管理機構とヒトがんにおけるその破綻について」、平成24年9月24日、第21回日本 Cell Death 学会（名古屋市）

2. 荒川博文、シンポジウム：オートファジー・プロテオステイシスとがん

演題「ミトコンドリア品質管理のメカニズムとがん：p53誘導性タンパク質Mieapによる新規ミトコンドリア品質管理機構」、平成24年9月19日、第71回日本癌学会学術総会（札幌市）

3. 村井竜也、中村康之、吉田将紀、加美野宏樹、齋藤有理、佐野仁哉、荒川博文ポスター発表、演題「ミトコンドリア由来活性酸素種のがん治療標的としての意義」、平成24年9月19日、第71回日本癌学会学術総会（札幌市）

4. 齋藤有理、中村康之、喜多村憲章、吉田将紀、加美野宏樹、佐野仁哉、荒川博文ポスター発表、演題「Mieap が誘導する液胞様構造物の形成においてUVRAG と結合して働くMieap- α の特異的な役割」、平成24年9月19日、第71回日本癌学会学術総会（札幌市）

5. 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、荒川博文ポスター発表、演題「食道がん及び胃がんにおけるミトコンドリア品質管理に関わるp53/Mieap/BNIP3 経路の解析」、平成24年9月19日、第71回日本癌学会学術総会（札幌市）

6. 吉田将紀、中村康之、喜多村憲章、加美野宏樹、村井竜也、齋藤有理、佐野仁哉、荒川博文口演発表、演題「低酸素環境下におけるミトコンドリア品質管理機構を介したMieap の腫瘍抑制作用について」、平成24年9月20日、第71回日本癌学会学術総会（札幌市）

7. 加美野宏樹、中村康之、喜多村憲章、二村学、加美野宏樹、吉田将紀、村井竜也、齋藤有理、佐野仁哉、金井弥栄、荒川博文口演発表、演題「大腸がんで高頻度に生じるMieap によるミトコンドリア品質管理機構の破綻について」、平成24年9月20日、第71回日本癌学会学術総会（札幌市）

8. 中村康之、尾野雅哉、宮本嵩史、喜多村憲

章、加美野宏樹、吉田将紀、村井竜也、齋藤有理、佐野仁哉、山田哲司、荒川博文口演発表、演題「Mieap 結合タンパク質としての14-3-3 γ の同定とそのミトコンドリア品質管理における役割について」、平成24年9月20日、第71回日本癌学会学術総会（札幌市）

9. Yasuyuki Nakamura, Masaki Yoshida, Noriaki Kitamura, Hiroki Kamino, Ryuya Murai, Yuri Saito, Hitoya Sano, Hirofumi Arakawa. Hypoxia induces accumulation of lysosomal proteins within mitochondria. The 6th International Symposium on Autophagy 2012, Oct 29, 2012, Okinawa

10. Hiroki Kamino, Yasuyuki Nakamura, Masaki Yoshida, Noriaki Kitamura, Ryuya Murai, Yuri Saito, Hitoya Sano, Shizuko Ichinose, Hirofumi Arakawa. Mieap controls mitochondrial quality by repairing or eliminating unhealthy mitochondria. The 6th International Symposium on Autophagy 2012, Oct 29, 2012, Okinawa

11. 中村康之、尾野雅哉、宮本嵩史、喜多村憲章、加美野宏樹、吉田将紀、村井竜也、齋藤有理、佐野仁哉、山田哲司、荒川博文ポスター発表、演題「Mieap 結合タンパク質としての14-3-3 γ の同定とそのミトコンドリア品質管理における役割について」、平成24年12月11日、第35回日本分子生物学会年会（福岡市）

12. 加美野宏樹、中村康之、喜多村憲章、二村学、加美野宏樹、吉田将紀、村井竜也、齋藤有理、佐野仁哉、金井弥栄、荒川博文ポスター発表、演題「大腸がんで高頻度に生じるMieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構の不活性化」、平成24年12月11日、第35回日本分子生物学会年会（福岡市）

13. 齋藤有理、中村康之、喜多村憲章、吉田将紀、加美野宏樹、佐野仁哉、荒川博文ポスター発表、演題「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