

20143800/A

別紙1

厚生労働科学研究委託費

革新的がん医療実用化研究事業

(委託業務題目)

がんにおけるミトコンドリア品質管理機構の異常とその臨床的特性における意義に関する研究

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 荒川 博文

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の科学研究委託事業による委託業務として、独立行政法人国立がん研究センターが実施した平成26年度「がんにおけるミトコンドリア品質管理機構の異常とその臨床的特性における意義に関する研究」の成果を取りまとめたものです。

目 次

I. 委託業務成果報告（総括） がんにおけるミトコンドリア品質管理機構の異常と その臨床的特性における意義に関する研究 荒川 博文	1
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. 臨床がん組織における解析 荒川 博文	8
2. モデルマウスにおける解析 中村 康之	13
3. 細胞レベルでの解析 喜多村 憲章	17
III. 学会等発表実績	21
IV. 研究成果の刊行物・別刷	23

作成上の留意事項

委託業務成果報告（業務項目）の題名及び研究者名は、様式第 2 「業務計画書」に記載された業務項目及び担当責任者を記入すること。

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（総括）

がんにおけるミトコンドリア品質管理機構の異常と
その臨床的特性における意義に関する研究

業務主任者 荒川 博文 分野長

研究要旨

Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理 (MQC) 機構の臨床がん組織における異常とその結果としてもたらされるがんの発生・増殖・浸潤・転移などのがん臨床的特性への意義を明らかにすることを目的に研究を行った。結果として、(1) 大腸がん症例の80%の臨床がん組織においてこの機能は不活性化されていること、(2) Mieap 欠損大腸がんモデルマウスにおいて、Mieap 欠損が消化管腫瘍の発生・進展を顕著に加速すること、(3) 大腸がん細胞株を用いて、Mieap 制御性 MQC 機構の不活性化が、低酸素環境において不良なミトコンドリアをがん細胞に蓄積させ、そこから産生される ROS が、がん細胞の遊走・浸潤を増強することを明らかとした。このことから、Mieap 制御性 MQC 機構は p53 の重要ながん抑制機能であり、その不活性化が、不良なミトコンドリアの蓄積を招き、そこから発生する高いレベルの ROS が、がんの発生・増殖・浸潤・転移に極めて重要な役割を果たすと考えられる。

荒川 博文
独立行政法人国立がん研究センター
分野長

A. 研究目的

がん抑制遺伝子 p53 は様々な臨床がん組織で異常を生じており、がんの臨床特性に大きく影響を及ぼしていると推測されているが、その分子基盤の本態は未だ不明である。我々は、長年にわたる p53 標的遺伝子研究の成果として、p53 によるがん抑制機能として、新規 p53 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

(以下 MQC) 機構を見いだした。本研究課題の目的は、p53 がん抑制機能として最も重要と考えられる Mieap 制御性 MQC 機構の臨床がん組織における異常とその結果としてもたらされるがんの発生・増殖・浸潤・転移・抗がん剤耐性などのがん臨床的特性への意義を明らかにすることで、がんの本態解明に貢献し、これまで予想されなかった全く新しい標的分子・標的経路の導出を目指し、革新的医療実現化へ繋げることである。

B. 研究方法

(1) 臨床がん組織の解析 (荒川・常木、及び研究協力者)、(2) マウスモデルを用いた解析 (中村)、(3) 細胞レベルの解析 (喜多村) の3つを、それぞれの研究者が主体となって進める。最も中心となるのは、臨床がん組織における p53/Mieap 制御性 MQC 機構の異常に関する解析であり、異常の認められたがん種についてはマウスモデルを用いた解析、及び細胞レベルの解析へ進め、その臨床的特性における役割について分子レベルで明らかとする。これら3つの解析は、それぞれの情報を、双方向性に互いに検証することで、相乗的に分子基盤の解明を加速する。年度ごとに、がん種のグループを分け、段階的に研究を進める予定である。本年度の研究方法は以下の通りである。

①臨床がん組織における解析

a. 大腸がん

大腸がんにおける、Mieap 制御性 MQC 機構に不可欠な p53/Mieap/BNIP3/NIX の4つの分子それぞれの役割を明らかとする。大腸がんにおける Mieap 制御性 MQC 機構の異常の頻度を明確とする。そのために50例程度の大腸がん患者検体を用いて、がん組織と正常組織からゲノムDNAを抽出して、p53については変異解析を直接シーケンス法によって、Mieap/BNIP3/NIXについては、それぞれのプロモーターのメチル化の状況をメチル化PCRによって解析する。大腸がん組織に対して、Mieap 及び関連タンパク質に対す

る特異抗体を用いて、免疫組織学的解析を行う。また、組織における酸化ストレス状態を調べるために、抗ニトロチロシン抗体を用いて、解析を行う。

b. 膵がん、胃がん

大腸がんと同様に、膵がん・胃がんにおける、Mieap 制御性 MQC 機構に不可欠な p53/Mieap/BNIP3/NIX の4つの分子それぞれの役割を明らかとする。膵がん・胃がんにおける Mieap 制御性 MQC 機構の異常の頻度を明確とする。そのために50例程度の膵がん・胃がん患者検体を用いて、がん組織と正常組織からゲノムDNAを抽出して、p53については変異解析を直接シーケンス法によって、Mieap/BNIP3/NIXについては、それぞれのプロモーターのメチル化の状況をメチル化PCRによって解析する。

②モデルマウスにおける解析

a. 大腸がんモデルマウス

Apc^{MIN+}マウスに発生する消化管腫瘍の発生・進展における Mieap 制御性 MQC 機構の役割を明らかとする。そのために、大腸がんモデルマウスである Apc^{MIN+}マウスと Mieap ノックアウトマウスを交配し、Apc^{MIN+}マウスの消化管腫瘍の状況 (小腸・大腸ポリープ数、ポリープの大きさ、病理組織学的解析、転移の有無)、消化管出血による貧血の程度 (血液生化、脾臓重量) やマウスの寿命 (生存曲線) を検討することで、Mieap 欠損が生体内における消化管腫瘍の臨床的特性 (発生・増殖・浸潤・転移) に及ぼす

影響を調べる。

b. 膵がん・胃がんモデルマウス

大腸がんと同様の実験を行うための膵がんモデルマウスと胃がんモデルマウスの導入と繁殖を進め、Mieap ノックアウトマウスとの交配実験を行うにあたって、十分な数のマウスを整えることを目標とする。そのために、膵がんモデルマウスと胃がんモデルマウスの導入と繁殖を進める。

③細胞レベルでの解析

臨床がん組織で異常の認められた分子について、がんの臨床的特性における意義を明らかとする。大腸がんを主体として、実験を進める。大腸がん細胞株を用いて、p53 変異、Mieap 及びBNIP3 などのプロモーターメチル化を模倣したノックダウン細胞を樹立して、がんの臨床特性（増殖能・遊走能・浸潤能・血管新生）について、三次元培養やヌードマウスへの移植実験、Boyden chamber 法によって評価していく。がんの微小環境を模倣するため低酸素インキュベーターを用いた培養条件を基本として、ミトコンドリアから産生される活性酸素種（ROS）の役割を調べるために、

MitotrackerRed や Dihydrorhodamine を用いた ROS の定量実験や、Ebselen や NAC などの ROS 消去剤を用いた実験を行っていく。臨床がん組織における Mieap 制御性 MQC 機構の異常の原因となる Mieap 関連分子を明らかとするため、網羅的プロテオミクス解析法である 2D-ICAL 法を駆使して、Mieap 結合タ

ンパク質を同定する。

（倫理面への配慮）

臨床がん組織の解析については、国立がん研究センター倫理審査委員会へ実験計画を申請し、研究の倫理的、科学的妥当性について審査を受け、審査委員会の承認を受けている。また、実験動物を使用した実験についても、国立がんセンター動物実験倫理委員会による実験の倫理的、科学的妥当性について審査を受け、委員会の承認を受けることを前提として進める。共同研究における臨床がん組織の解析については、共同研究先の施設における倫理審査委員会の承認を受けた研究計画へ共同研究者として参加し、国立がん研究センター倫理審査委員会において共同研究の承認を受けることを前提として進める。

C. 研究結果

①臨床がん組織における解析

a. 大腸がん

57 例の大腸がん患者検体を用いて、がん組織と正常組織からゲノム DNA を抽出して、p53 については変異解析を直接シーケンス法によって、Mieap/BNIP3/NIX については、それぞれのプロモーターのメチル化の状況をメチル化 PCR によって解析した。結果として、大腸がん患者の 80%以上の症例で Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理（MQC）機構が不活性化されている事が明らかとなった。

大腸がん組織に対して、Mieap 及び関連タンパク質に対する特異抗体を用いて、免疫組織学的解析を行った。結果として、前がん病変である腺腫領域で、Mieap 蛋白質の強い発現を認め、がん領域では、むしろ消失していた。また、p53 は Mieap と相反的に、腺腫領域では陰性であるのに対し、がん領域では陰性または強い陽性を示した。興味深いことに、正常粘膜から腺腫領域、さらにはがん領域へとかけて、ミトコンドリアのシグナルが増強していった。つまり、大腸がんにおいては、Mieap 制御性 MQC 機構が高頻度に不活性化され、不良なミトコンドリアが蓄積されている可能性があることが、生体内のがんではじめて示された。

b. 膵がん、胃がん

大腸がんと同様に、膵がん・胃がんにおける、Mieap 制御性 MQC 機構に不可欠な p53/Mieap/BNIP3/NIX の4つの分子について調べたところ、膵がん・胃がんのいずれも70%程度の症例において Mieap 制御性 MQC 機構が不活性化されていることが明らかとなった。

②モデルマウスにおける解析

a. 大腸がんモデルマウス

Apc^{MIN/+}マウスに発生する消化管腫瘍の発生・進展における Mieap 制御性 MQC 機構の役割を明らかにするために、大腸がんモデルマウスである Apc^{MIN/+}マウスと Mieap ノックアウトマウスを交配し、Mieap 欠損 Apc^{MIN/+}マウスを作成し、その開発に成功した。

Mieap の欠損は Apc^{MIN/+}マウスの消化管腫瘍の発生数を2倍以上に増加させ、また腫瘍のサイズの増大を認めた。結果的に消化管腫瘍からの出血による貧血の増悪を来とし、寿命の顕著な短縮を認めた。さらに、消化管上皮及び腫瘍細胞には電子顕微鏡観察で明白な不良ミトコンドリアの蓄積を認めた。これらのミトコンドリアからは高いレベルの活性酸素種 (ROS) が産生されていた。病理組織学的解析により、Mieap 欠損マウスに発生した消化管腫瘍は、劇的に腫瘍の組織学的異型度の増悪化及びがん化を生じていた (論文投稿準備中)。

b. 膵がん・胃がんモデルマウス

大腸がんと同様の実験を行うための膵がんモデルマウスと胃がんモデルマウスの導入と繁殖を進めた。Mieap ノックアウトマウスとの交配実験を行うにあたっての、十分な数のマウスを整えることが出来た。

③細胞レベルでの解析

大腸がん細胞株を用いて、Mieap 制御性 MQC 機構破綻の意義を調べたところ、低酸素状態における、がん細胞に蓄積した不良なミトコンドリアから産生される ROS が、がん細胞の遊走能・浸潤能を顕著に上昇させることが明らかとなった (論文投稿準備中)。

D. 考察

当該年度の研究成果より、(1) 大腸がん患者の臨床がん組織においてMieap制御性MQC機構の高頻度の不活性化を明らかとしたこと、(2) 消化管腫瘍モデルマウスにおいて、Mieap欠損が消化管腫瘍の発生・進展を顕著に加速する事実を見いだしたこと、(3) 大腸がん細胞株を用いて、Mieap制御性MQC機構の不活性化が、低酸素環境において不良なミトコンドリアをがん細胞に蓄積させ、そこから産生されるROSが、がん細胞の遊走・浸潤を増強する事実を明らかとしたことは、大腸がんにおける、Mieapによって制御されるミトコンドリア品質管理機構の異常が、大腸がんの発生・増殖・浸潤・転移に極めて重要な役割を果たしている事を明らかにできたと考えており、当該年度の達成状況としては、期待以上の成果が得られたと考えている。

既に、膵がんや胃がん症例においても、そのゲノム・エピゲノム解析の予備的結果から、Mieap制御性MQC機構の不活性化が高頻度に発生している可能性が高く、大腸がんで明らかとなったMieapによって制御されるミトコンドリア品質管理機構の異常が、膵がんや胃がんの発生・増殖・浸潤・転移に極めて重要な役割を果たしている可能性が高いと考えられる。引き続き、臨床がん組織とがんモデルマウスの解析によって、その臨床的特性における意義を明らかとしていく事が重要と考えられた。

細胞レベルの解析から、このMieap制

御性MQC機構は低酸素ストレスで誘導される機能であること、低酸素環境下でこの機能を不活性化すると、ミトコンドリアから高いレベルのROSが産生され、大腸がん細胞の遊走能と浸潤能を顕著に亢進することが明らかとなった。このことは臨床がん組織やモデルマウスで明らかとなったように、人の生体内に発生したがんにおいては、その微小環境が低酸素であることから、Mieap制御性MQC機構の不活性化が、不良なミトコンドリアの蓄積を招き、そこから発生する高いレベルのROSが、がんの発生・増殖・浸潤・転移に極めて重要な役割を果たすことを示していると考えられる。

引き続き、他がん種を含めた詳細な解析が重要と考えられる。

E. 結論

Mieap制御性MQC機構は臨床がんで高頻度に不活性化されており、そのため生体内の低酸素状態にあるがん微小環境において、がん細胞には不良なミトコンドリアが蓄積し、そこから産生されるROSが、がんの発生・増殖・浸潤・転移に極めて重要である可能性が示された。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 荒川博文 「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」 医学のあゆみ 250, 505-510, 2014

2. 学会発表

1. Hiroki Kamino, Yasuyuki Nakamura, Hitoya Sano, Ryuya Murai, Yuri Saito, Manabu Futamura, Kazuhiro Yoshida, Nobuyuki Hiraoka, Yae Kanai, Ryoji Kushima, Toyomasa Katagiri, and Hirofumi Arakawa. Frequent inactivation of the Mieap-regulated mitochondrial quality control in pancreatic and breast cancer. AACR Annual Meeting 2014, April 6, San Diego, USA.

2. Yasuyuki Nakamura, Hiroki Kamino, Yuri Saito, Noriaki Kitamura, Hitoya Sano, and Hirofumi Arakawa. Specific role of Mieap α in Mieap-induced vacuole generation through an interaction with UVRAG. AACR Annual Meeting 2014, April 6, San Diego, USA.

3. Yasuyuki Nakamura, Hiroki Kamino, Yuri Saito, Hitoya Sano, and Hirofumi Arakawa. p53-dependent and independent functions of Mieap. AACR Annual Meeting 2014, April

7, San Diego, USA.

4. Hirofumi Arakawa. Mitochondrial quality control and cancer. 2104 Soul National University Cancer Research Institute Cancer Symposium, April 17, Mokpo, Korea.

5. Noriaki Kitamura, Yasuyuki Nakamura, and Hirofumi Arakawa. Mieap-regulated mitochondrial quality control and its alteration in cancer. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, September 25, 2014, Yokohama.

6. Yasuyuki Nakamura, Noriaki Kitamura, Hiroki Kamino, Hitoya Sano, and Hirofumi Arakawa. Potential role of the Mieap-regulated mitochondrial quality control in mouse intestinal tumorigenesis. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, September 26, 2014, Yokohama.

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 第14回日本ミトコンドリア学会年会 平成26年12月3日 福岡

8. 中村康之、荒川博文 消化管腫瘍の発生
及び進展における Mtap 制御性ミトコンド
リア品質管理機構の役割について 第 8 回
オートファジー研究会 平成 26 年 11 月 10
日 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

臨床がん組織における解析

担当責任者 荒川 博文 分野長

研究要旨

大腸がん・膵がん・胃がんなどの臨床がん組織における、Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理（MQC）機構の異常について解析した。結果として、大腸がん症例の 80%の患者の臨床がん組織において、Mieap あるいは BNIP3 のプロモーターのメチル化や p53 の点変異によって、この機能は不活性化されていた。さらに、病理組織学的解析により、大腸がん組織においては、ほぼすべての症例で不良と思われるミトコンドリアが顕著に蓄積していた。また、膵がんや胃がんに関して、いずれのがんにおいても、症例の 70%以上の患者の臨床がん組織において、この機能は不活性化されていた。このことから、臨床がん組織においては、様々ながん種において、Mieap 制御性 MQC 機構は高頻度に破綻しており、結果としてがん細胞への不良なミトコンドリアの蓄積が生じている可能性が高い。

A. 研究目的

研究代表者の荒川は、文部科学省及び厚生労働省などからの支援を受け、「p53 標的遺伝子の同定とその機能解析に関する研究」を行ってきた。今回、こ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 (Mitochondria-eating protein: ミトコンドリアを食べるタンパク質) 遺伝子を同定し、その機能解析から、p53 のがん抑制機能として全く新しいメカニズムを発見するに至った (① PLoS ONE 6: e16054, 2011.; ② PLoS ONE 6: e16060, 2011.; ③ 実験医学 30,

1407-1417, 2012.)。

この機能は、不良なミトコンドリアより生成される活性酸素種 (ROS) に反応して、(1) Mieap が、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)、ミトコンドリアの酸化蛋白質を特異的に分解し、不良なミトコンドリアを修復するか、あるいは (2) Mieap が液胞様構造物の形成を誘導し (MIV)、不良なミトコンドリアを液胞内へ丸ごと飲み込み分解し排除するという二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。

先行研究の成果として、(1) この機能は低酸素で活性化されること、(2) 大腸がんや膵がんなどの臨床がん組織に於いて、この Mieap 制御性 MQC 機構は高頻度に不活性化されていること、(3) その結果、がん細胞には、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いること、(4) がんの微小環境に於いて、不良なミトコンドリアから産生される ROS が、がんの増殖能・遊走能・浸潤能を促進することが見いだされた。

本研究開発においては、大腸がんや膵がんに加え、さらに難治がんを含む胃がん・乳がん・肺がん・肝がん及び希少がんの臨床がん組織における本機能のゲノム・エピゲノム及び病理組織学的異常に関する解析を進め、臨床病態との比較検証を行い、がんの臨床的特性との関連を明らかとし、異常の認められたがん種については、動物モデル及び試験管内モデルへと展開して、この機能の異常によってもたらされる臨床的特性の分子基盤の解明を進める。

B. 研究方法

【研究開発項目】

(1) 大腸がん組織における Mieap 制御性 MQC 機構の異常とその臨床的特性における意義

(2) 膵がん組織における Mieap 制御性 MQC 機構の異常とその臨床的特性にお

る意義

(3) 胃がん組織における Mieap 制御性 MQC 機構の異常とその臨床的特性における意義

【研究開発方法】

(1) 大腸がん組織におけるゲノム・エピゲノム・免疫組織学的解析

(2) 膵がん組織におけるゲノム・エピゲノム・免疫組織学的解析

(3) 胃がん組織におけるゲノム・エピゲノム・免疫組織学的解析

大腸がん、膵がんについては、国立がん研究センターバイオバンクを主体とした患者検体を用いて解析する。胃がんについては、研究協力者・二村学が岐阜大学病院で参集した患者検体を用いて解析する。ゲノム・エピゲノム解析については、Mieap 制御性ミトコンドリア品質管理機構に必須の分子である p53 の点変異をシーケンシング法によって、また Mieap 及び BNIP3 のプロモーターメチル化の有無については、メチル化特異的 PCR 法によって解析する。

免疫組織学的解析については、抗 Mieap 抗体、抗 p53 抗体、抗酸化ストレスマーカー抗体などを用いて、患者検体の正常組織、前がん病変、がん病変について染色を行い、遺伝子変化との関連・病理組織学的悪性度との関連、臨床病態との関連を検討する。

(倫理面への配慮)

臨床がん組織の解析については、国立がん研究センター倫理審査委員会へ実験計画を申請し、研究の倫理的、科学的妥当性について審査を受け、審査委員会の承認を受けている。共同研究における臨床がん組織の解析については、共同研究先の施設における倫理審査委員会の承認を受けた研究計画へ共同研究者として参加し、国立がん研究センター倫理審査委員会において共同研究の承認を受けることを前提として進める。

C. 研究結果

①臨床がん組織における解析

a. 大腸がん

57例の大腸がん患者検体を用いて、がん組織と正常組織からゲノムDNAを抽出して、p53については変異解析を直接シーケンス法によって、Mieap/BNIP3/NIXについては、それぞれのプロモーターのメチル化の状況をメチル化PCRによって解析した。結果として、大腸がん患者の80%以上の症例でMieap制御性ミトコンドリア品質管理(MQC)機構が不活性化されている事が明らかとなった。

大腸がん組織に対して、Mieap及び関連タンパク質に対する特異抗体を用いて、免疫組織学的解析を行った。結果として、前がん病変である腺腫領域で、Mieap蛋白質の強い発現を認め、がん領域では、むしろ消失していた。また、p53

はMieapと相反的に、腺腫領域では陰性であるのに対し、がん領域では陰性または強い陽性を示した。興味深いことに、正常粘膜から腺腫領域、さらにはがん領域へとかけて、ミトコンドリアのシグナルが増強していった。つまり、大腸がんにおいては、Mieap制御性MQC機構が高頻度に不活性化され、不良なミトコンドリアが蓄積されている可能性があることが、生体内のがんではじめて示された。

b. 膵がん、胃がん

大腸がんと同様に、膵がん・胃がんにおける、Mieap制御性MQC機構に不可欠なp53/Mieap/BNIP3/NIXの4つの分子について調べたところ、膵がん・胃がんのいずれも70%程度の症例においてMieap制御性MQC機構が不活性化されていることが明らかとなった。

D. 考察

大腸がん57例について、Mieap制御性MQC機構は、MieapあるいはBNIP3のプロモーターのメチル化か、p53の点変異などで、その80%の症例で不活性化されていた。現時点で、未だ明らかとなっていないMieap関連分子の存在とその臨床がん組織における異常の存在を考慮すると、大腸がん患者のほぼ100%において、Mieap制御性MQC機構は不活性化されていると推測される。つまり、がん細胞におけるMieap制御性MQC機構の不活性化は、がんの発生・増殖・浸潤・

転移などの臨床的特性における本質的かつ普遍的な異常の可能性がある。この機能が、がんで最も高頻度に不活性化される癌抑制遺伝子 p53 の機能であることも、この仮説に矛盾しない。

本年度の本業務項目において、もっとも重要な成果は、大腸がんの臨床がん組織において、抗ミトコンドリア抗体を用いて、免疫組織学的解析を行い、ミトコンドリアの状況を調べたところ、大腸正常粘膜上皮細胞からアデノーマ、がんと変化するにつれて、ミトコンドリアのシグナルが段階的に増強し、がん組織においては、ほぼすべての症例で強陽性を示したことである。このことは、上で述べたように、Mieap 制御性 MQC 機構の破綻が、大腸がんにおいてはほぼ 100%生じている可能性を示しており、大腸がんの臨床がん組織においてはほぼすべての症例で、不良なミトコンドリアが蓄積している可能性を示している。

今後は、他がん種についても同様の解析を進める必要があると思われる。

E. 結論

Mieap 制御性 MQC 機構は大腸がん・膵がん・胃がんなどの各種臨床がんで高頻度に不活性化されており、そのため生体内の低酸素状態にあるがん微小環境において、がん細胞には不良なミトコンドリアが蓄積し、そこから産生される ROS が、がんの発生・増殖・浸潤・転移に極

めて重要である可能性が示された。Mieap 制御性 MQC 機構の臨床がん組織における破綻はほぼ 100%の症例で発生して可能性がある。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 荒川博文 「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」医学のあゆみ 250, 505-510, 2014

2. 学会発表

1. Hiroki Kamino, Yasuyuki Nakamura, Hitoya Sano, Ryuya Murai, Yuri Saito, Manabu Futamura, Kazuhiro Yoshida, Nobuyuki Hiraoka, Yae Kanai, Ryoji Kushima, Toyomasa Katagiri, and Hirofumi Arakawa. Frequent inactivation of the Mieap-regulated mitochondrial quality control in pancreatic and breast cancer. AACR Annual Meeting 2014, April 6, San Diego, USA.

2. Hirofumi Arakawa. Mitochondrial quality control and cancer. 2104 Soul National University Cancer Research Institute Cancer Symposium, April 17, Mokpo, Korea.

3. Noriaki Kitamura, Yasuyuki Nakamura, and Hirofumi Arakawa. Micap-regulated mitochondrial quality control and its alteration in cancer. The 73rd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association, September 25, 2014, Yokohama.

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

モデルマウスにおける解析

担当責任者 中村 康之 主任研究員

研究要旨

Mieap 制御性 MQC 機構の破綻が、個体における大腸がんの発生・進展に及ぼす影響、及びその生理学的意義を明らかとするため、Mieap 欠損大腸がんモデルマウスの開発と解析を行った。Mieap 欠損大腸がんモデルマウスは、通常の大腸がんモデルマウスに比べ、顕著な消化管腫瘍の発生数の増加と、腫瘍サイズの増大を認めた。さらに、消化管上皮及び腫瘍細胞には不良ミトコンドリアの蓄積を認め、これらのミトコンドリアからは高いレベルの活性酸素種（ROS）が産生されていた。Mieap 欠損マウスに発生した消化管腫瘍は、劇的に腫瘍の病理組織学的異型度の増悪化及びがん化を生じていた。以上の結果から、Mieap 制御性 MQC 機構は、p53 の重要ながん抑制機能であり、その破綻は生体内の消化管腫瘍の発生・進展を加速することが明らかとなった。

A. 研究目的

Mieap 制御性 MQC 機構の破綻が、個体におけるがんの発生・進展に及ぼす影響、及びその生理学的意義を明らかとするため、各種臨床がん組織で異常の認められたがん種については、各種がんモデルマウスと Mieap ノックアウトマウスを交配させ、Mieap 欠損がんモデルマウスを作成し、Mieap の有無が、各種がんの発生・進展に及ぼす影響を調べる。本年度は、大腸がんモデルマウスの開発と解析を行い、Mieap 欠損大腸がんモデルマウスの解析結果に関する論文発表を目指す。また、Mieap 欠損胃がんマウスや Mieap

欠損膵がんマウスの作成のため、胃がんマウス及び膵がんマウスを導入して、繁殖を進め、Mieap ノックアウトマウスとの交配を進める。

B. 研究方法

【研究開発項目】

- (1) 大腸がんモデルマウスの開発と解析
- (2) 胃がんモデルマウスの開発
- (3) 膵がんモデルマウスの開発

【研究開発方法】

- (1) Mieap 欠損大腸がんモデルマウスの開発と解析

・大腸がんモデルマウスとして $Apc^{MIN/+}$ マウスを使用する。

・Mieap ノックアウトマウスと $Apc^{MIN/+}$ マウスを交配させ、Mieap 欠損 $Apc^{MIN/+}$ マウスを作成する。

・作成に成功した場合、Mieap 欠損 $Apc^{MIN/+}$ マウスの消化管腫瘍の発生状況や病理組織学的悪性度を調べる。

(2) Mieap 欠損胃がんモデルマウスの開発

・胃がんマウスとして GAN マウスを使用する。

・Mieap ノックアウトマウスと GAN マウスを交配させ、Mieap 欠損 GAN マウスを作成する。

(3) Mieap 欠損膵がんモデルマウスの開発

・膵がんモデルマウスとして Ptf1a-Cre/Kras-LSL-G12D マウスを使用する。

・Mieap ノックアウトマウスと Ptf1a-Cre/Kras-LSL-G12D マウスを交配させ、Mieap 欠損 Ptf1a-Cre/Kras-LSL-G12D マウスを作成する。

(倫理面への配慮)

実験動物を使用した実験については、国立がんセンター動物実験倫理委員会による実験の倫理的、科学的妥当性について審査を受け、委員会の承認を受けることを前提として進める。

C. 研究結果

a. 大腸がんモデルマウス

$Apc^{MIN/+}$ マウスに発生する消化管腫瘍の発生・進展における Mieap 制御性 MQC 機構の役割を明らかにするために、大腸がんモデルマウスである $Apc^{MIN/+}$ マウスと Mieap ノックアウトマウスを交配し、Mieap 欠損 $Apc^{MIN/+}$ マウスを作成し、その開発に成功した。Mieap の欠損は $Apc^{MIN/+}$ マウスの消化管腫瘍の発生数を 2 倍以上に増加させ、また腫瘍のサイズの増大を認めた。結果的に消化管腫瘍からの出血による貧血の増悪を来し、寿命の顕著な短縮を認めた。さらに、消化管上皮及び腫瘍細胞には電子顕微鏡観察で明白な不良ミトコンドリアの蓄積を認めた。これらのミトコンドリアからは高いレベルの活性酸素種 (ROS) が産生されていた。病理組織学的解析により、Mieap 欠損マウスに発生した消化管腫瘍は、劇的に腫瘍の組織学的異型度の増悪化及びがん化を生じていた (論文投稿準備中)。

b. 膵がん・胃がんモデルマウス

大腸がんと同様の実験を行うための膵がんモデルマウスと胃がんモデルマウスの導入と繁殖を進めた。Mieap ノックアウトマウスとの交配実験を行うにあたって、十分な数のマウスを整えることが出来た。

D. 考察

本年度は、Mieap 欠損大腸がんモデルマ

ウスの開発に成功し、その解析を行った。驚いたことに、Mieap 欠損大腸がんモデルマウスは、通常の大腸がんモデルマウスに比べ、顕著な消化管腫瘍の発生数の増加と、腫瘍サイズの増大を認めた。結果として、消化管出血及びそこから生じる貧血の増悪によって、顕著な寿命の短縮を認めた。大変に重要な知見として、消化管粘膜上皮細胞における不良なミトコンドリアの蓄積とそこから発生する ROS が、この原因であることが明らかとなったことである。さらには、詳細な病理組織学的解析によって、腫瘍の異型度の悪性化とがん化が促進されていた。

これらの結果は、Mieap 制御性 MQC 機構の破綻が、生体内における消化管腫瘍の発生・進展を、不良なミトコンドリアの蓄積とそこから発生する ROS によって、促進する事実を、個体レベルで確認したという意味で極めて重要な知見と考えられる。大腸がん患者の臨床がん組織において、ほぼ 100%の症例で Mieap 制御性 MQC 機構の破綻が生じている可能性を考慮すれば、大腸がんモデルマウスの結果と合わせて、本機能は p53 がん抑制機能の極めて重要な機能の一つと推測される。今後は、細胞レベルの解析において、不良なミトコンドリアとそこから産生される ROS が、がんの発生・増殖・浸潤・転移を加速するメカニズムの解明を進めるべきと考える。また、他がん種における同様の解析を推し進め、本機能

のがんの臨床的特性における役割の全容解明を目指したい。

E. 結論

個体レベルの解析において、Mieap 制御性 MQC 機構の破綻は、生体内の消化管腫瘍の発生・進展を加速することが明らかとなった。このことは、臨床がん組織の解析で明らかとなった、大腸がん症例において、ほぼ 100%の患者で Mieap 制御性 MQC 機構が不活性化されている事実の生理的意義を明確に示したと考えられる。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

該当無し

2. 学会発表

1. Yasuyuki Nakamura, Hiroki Kamino, Yuri Saito, Hitoya Sano, and Hirofumi Arakawa. p53-dependent and independent functions of Mieap. AACR Annual Meeting 2014, April 7, San Diego, USA.

2. Noriaki Kitamura, Yasuyuki Nakamura, and Hirofumi Arakawa. Mieap-regulated mitochondrial quality control and its alteration in cancer. The 73rd Annual

Meeting of the Japanese Cancer Association,
September 25, 2014, Yokohama.

3. Yasuyuki Nakamura, Noriaki Kitamura,
Hiroki Kamino, Hitoya Sano, and Hirofumi
Arakawa. Potential role of the
Mieap-regulated mitochondrial quality
control in mouse intestinal tumorigenesis.
The 73rd Annual Meeting of the Japanese
Cancer Association, September 26, 2014,
Yokohama.

4. 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 第 14 回日本ミトコ
ンドリア学会年会 平成 26 年 12 月 3 日
福岡

5. 中村康之、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
第 8 回オートファジー研究会 平成 26
年 11 月 10 日 札幌

H. 知的財産権の出願・登録状況
該当無し

厚生労働科学研究委託費（革新的がん医療実用化研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

細胞レベルでの解析

担当責任者 喜多村 憲章 主任研究員

研究要旨

Mieap 制御性 MQC 機構のメカニズムの解明と、その破綻によって生じる不良なミトコンドリアから産生される ROS の役割について解析した。結果として、Mieap 制御性 MQC 機構は、低酸素で活性化される、これまでのオートファジーとは全く異なった細胞の新しい生理的機能であることが示された。がん細胞におけるこの機能の破綻は、低酸素環境下において、不良なミトコンドリアの蓄積とそこから産生される ROS の上昇を招き、がん細胞の遊走能・浸潤能を亢進させることが明らかとなった。このことから、Mieap 制御性 MQC 機構の破綻は、がん細胞へ集積した不良なミトコンドリアが産生する ROS を介して、低酸素環境下において、がんの浸潤・転移を加速する可能性がある。

A. 研究目的

Mieap 制御性 MQC 機構は、MALM と MIV によって健常なミトコンドリアを維持し、不良なミトコンドリアからの活性酸素種の発生を防御する、リソソームあるいはリソソームタンパク質を介した全く新しいメカニズムである。本機能のメカニズムの解明は、細胞生物学領域に新しい分野・概念を切り開くだけでなく、がんで異常を生じる新規がん関連遺伝子・分子の同定に繋がる。事実、この機能の重要な関連分子である p53、Mieap、BNIP3 は大腸がん患者や膵がん患者で高頻度に異常を生じている事実を見いだしており、これら分子のうち、いずれか一つの分子

の機能を阻害した場合、Mieap 制御性 MQC 機構は機能しなくなる。それらががん細胞には、不良なミトコンドリアが蓄積し、そこから高いレベルの活性酸素種が生成され、がんの発生・増殖・浸潤・転移に深く関わりと推測している。

本研究開発においては、MALM 及び MIV のメカニズム解明を進める中で、新規 Mieap 制御性 MQC 機構関連分子を同定し、臨床検体において異常の有無を調べ、動物実験における検証へと繋げる。さらに、臨床がん組織で Mieap 制御性 MQC 機構が異常を生じた際に、がんの微小環境で起こりうる活性化シグナル経路や分子を明らかにし、がんの発生・増殖・浸潤・転