

氏名（本籍）	SIQINGAOWA（中国）
学位の種類	博士（医学）
学位授与番号	甲第1105号
学位授与日付	平成31年4月17日
学位授与要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	Possible role of p53/Mieap-regulated mitochondrial quality control as a tumor suppressor in human breast cancer
審査委員	（主査）教授 清水 雅仁 （副査）教授 中島 茂 教授 原 明

## 論文内容の要旨

### 【緒言】

p53は転写因子として多様な下流遺伝子の発現を制御し、癌抑制に働いている。p53の下流遺伝子である *Mieap* (Mitochondria-eating protein) は、リソソーム様タンパク質を集積させ、高レベルの活性酸素種 (ROS) を産生する不良なミトコンドリアの機能を修復・改善すること (Mieap-induced accumulation of lysosome-like organelles within mitochondria: MALM)、また巨大な液胞様の構造物を形成し、品質の劣化したミトコンドリアをこの構造物へ取り込んで分解・排除すること (Mieap-induced vacuole: MIV) が報告されている。すなわち *Mieap* は、細胞内の ROS レベルを下げ、ミトコンドリアの品質管理 (Mitochondria quality control: MQC) を行うことで癌抑制効果を発揮することが知られている。マウスモデルにおいても、*Mieap* が腸管のポリープや癌の発生に抑制的に働くことが示されているが、その他の癌腫における *Mieap* の腫瘍形成抑制機序については十分に解明されていない。本研究では、乳腺腫瘍における *Mieap* の発現とその意義について検討した。

### 【対象と方法】

- ① *Mieap* の発現が乳癌細胞株のアポトーシスに与える影響: *Mieap* 発現アデノウイルスを用いて、乳癌細胞株 {SK-BR-3 (HER2 type), MCF-7 (Luminal type), MDA-MB-231 (Triple negative)} に *Mieap* を強制発現させ、各細胞株の細胞周期 (FACS)、カスパーゼの活性 (カスパーゼアッセイ)、caspase-3/7/8/9 などアポトーシス関連タンパク質の変化 (ウエスタンブロッティング法) を観察した。
- ② ヒト乳癌検体における *Mieap* の発現に関する検討: 当院で切除を行った浸潤性乳管癌 (IDC: 75例)、非浸潤性乳管癌 (DCIS: 27例)、線維腺腫 (FA: 18例) の手術標本を用いて、抗 *Mieap* 抗体による免疫組織染色を行った。
- ③ MQC 経路 (p53-*Mieap*-BNIP3/NIX) の異常と乳管癌患者の予後に関する検討: IDC 46例について、*Mieap* および co-factor である *BNIP3* や *NIX* プロモーターの DNA メチル化の有無をメチル化 PCR にて、p53 遺伝子の変異の有無 (Exon 4-8) をダイレクトシーケンシング法にてそれぞれ検討した。

### 【結果】

- ① *Mieap* の強制発現によって、いずれの細胞株でも DNA 断片化を示す sub G1 の増加が見られたが、MDA-MB-231 ではその割合が低かった。アデノウイルス感染 24 時間以降に、全ての乳癌細胞株の

細胞質にリソソーム様のMIVが出現した。SK-BR-3細胞株では、Mieapを発現させた48時間以後にcaspase-9およびcaspase-3/7の活性化が見られた。MCF-7細胞株(caspase-3欠損株)ではcaspase-7のみの活性化が見られた。一方、MDA-MB-231ではカスパーゼの活性化、PARPの断片化は認めなかった。

- ② 免疫染色にてMieapは細胞質に発現が認められた。IDC, DCIS, FAにおけるMieap陽性率は、それぞれ32% (24/75), 55.6% (15/27), 88.9% (16/18)であり各群間で有意差を認めた。IDCよりDCISやFAの方が有意に陽性率は高かった (IDC vs DCIS :  $p = 0.0389$ , DCIS vs FA :  $p = 0.0234$ , IDC vs FA :  $p < 0.0001$ )。
- ③ IDCの13%の症例でMieapプロモーターのメチル化, 13%の症例でp53遺伝子の変異が認められ、p53-MieapによるMQC経路に異常を来していた。また、p53-Mieap経路に異常のある乳癌は無再発生存期間が有意に短縮していた ( $p = 0.021$ )。

### 【考察】

乳癌細胞にMieapを強制発現させると、カスパーゼ依存性のアポトーシスが誘導された。カスパーゼの活性化レベル(特にカスパーゼ 3/7/9)は、アポトーシスの程度と大きく相関していた。すなわちMieapは、MALM/MIVを介したMQCの制御のみならず、アポトーシスの誘導によって直接的に乳癌細胞に細胞死を誘導することが明らかになった。ヒト乳腺腫瘍検体を用いた検討では、Mieapは細胞質に発現が認められ、良性腫瘍FAよりもDCIS, IDCと悪性度が高まるにつれてMieapの発現は有意に低下していた。p53-BNIP/NIX-Mieapを介したMQC経路は、乳管癌患者の26%で破綻していたが、特にMieapプロモーター領域のメチル化およびp53遺伝子の変異を来した症例は、Triple negative, HER2 type, Luminal Bといった悪性度の高い腫瘍であり、その予後は有意に不良であった。本研究結果より、Mieapは乳腺細胞の悪性転化ならびに癌の悪性度に深く関与している可能性が示唆された。

### 【結論】

Mieapは乳腺腫瘍においても、細胞の悪性化あるいは悪性進行を阻止する癌抑制遺伝子である。

### 論文審査の結果の要旨

申請者 SIQINGAOWA は、ミトコンドリアの品質管理機構において重要な役割を果たすMieapが、ヒト乳癌細胞株にカスパーゼ依存性のアポトーシスを誘導することを証明した。またMieapの発現が乳腺腫瘍の悪性化に伴い低下すること、p53-Mieap経路の破綻・異常が乳腺腫瘍の悪性度に深く関与し、乳管癌患者の予後を規定する可能性を明らかにした。腫瘍細胞に対するMieapの新たな機能や、同分子の乳腺腫瘍における発現の意義を示した本研究結果の臨床的重要性は高く、今後の乳腺腫瘍学の発展・進歩に少なからず寄与するものと認める。

---

[主論文公表誌]

Siqin Gaowa, Manabu Futamura, Masayuki Tsuneki, Hiroki Kamino, Jesse Y. Tajima, Ryutaro Mori, Hirofumi Arakawa, Kazuhiro Yoshida : Possible role of p53/Mieap-regulated mitochondrial quality control as a tumor suppressor in human breast cancer. Cancer Science. 2018 Dec; 109(12): 3910-3920. Article DOI: 10.1111/cas.13824