

濱田航一郎 論文内容の要旨

主 論 文

MIEAP and ATG5 are tumor suppressors
in a mouse model of BRAF^{V600E}-positive thyroid cancer
MIEAP、ATG5 は BRAF^{V600E} 陽性甲状腺癌マウスモデルにおいて
腫瘍抑制因子である

濱田 航一郎、蔵重 智美、嶋村 美加、荒川 博文、中村 康之、永山 雄二

(Frontiers in Endocrinology, 15 Sep 2022 (doi: 10.3389/fendo.2022.932754))

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科先進予防医学共同専攻
(主任指導教員：永山雄二教授)

【緒 言】

甲状腺オンコサイトーマは異常ミトコンドリアが蓄積した好酸性細胞質を持ち、ミトコンドリア遺伝子変異により電子伝達系の complex I、IIIの機能が低下していることが特徴である。

ミトコンドリア蓄積の機序としてミトコンドリア機能異常によるミトコンドリア産生の代償的増加が言われているが、通常異常ミトコンドリアはミトコンドリア品質管理機構によって除去される。この機構には canonical mitophagy と呼ばれる選択的オートファジーの一つであるマイトファジーが含まれる。最近これ以外に mitochondria-eating protein (MIEAP) が不可欠な役割を果たす別の non-canonical mitophagy と呼ばれるミトコンドリア品質管理機構が発見された。これまでの報告では結腸癌等で MIEAP は発現が低下しており腫瘍抑制因子であると考えられている。

我々は以前、甲状腺腫瘍臨床検体で MIEAP の発現を検討し、良性腫瘍では conventional な腫瘍（非オンコサイトーマ）で MIEAP 発現正常、オンコサイトーマで発現低下、癌では conventional ・オンコサイトーマとも発現低下していたことから、「オンコサイトーマでは良性腫瘍・癌ともに MIEAP 発現欠損による異常ミトコンドリア除去能低下とミトコンドリアの代償的産生増加によってミトコンドリアが集積するが、conventional な癌では MIEAP 欠失はあるがミトコンドリア代償的産生増加がないためミトコンドリアは集積しない」と結論づけた。

このように MIEAP の発現はオンコサイトーマに限らず甲状腺癌全般で低下しているので、今回甲状腺癌における腫瘍抑制因子としての MIEAP の役割を調べる目的で、以前当研究室で確立した BRAF^{V600E} 陽性甲状腺癌マウスモデル（サイログロブリン (Tg) プロモーター下に Cre を発現するアデノウイルス (Ad-TgP-Cre) を *Braf*^{CA/wt} マウスの甲状腺内に注射することで1年後に甲状腺癌を発症させるマウスモデル) を用いて、MIEAP 欠損 *Braf*^{CA} マウス (*Braf*^{CA/wt};*Mieap*^{KO/KO}) を作出し、それらの甲状腺癌の発生と形態を検討した。さらに canonical mitophagy を欠く AUTOPHAGY-RELATED 5 (ATG5)欠損 *Braf*^{CA} マウス (*Braf*^{CA/wt};*Atg5*^{flox/flox}) も作出して比較検討した。

【対象と方法】

Braf^{CA}、*Mieap*^{KO}、*Atg5*^{flox} マウスから *Mieap*^{KO/KO}、*Atg5*^{flox/flox}、*Braf*^{CA/wt}、*Braf*^{CA/wt};

Mieap^{KO/KO}、*Braf*^{CA/wt};*Atg5*^{flox/flox} マウスを作出した。生後 4~6 週で甲状腺左葉に Ad-TgP-Cre を注射し、6、12 ヶ月で甲状腺を採取した。甲状腺組織は H&E 染色、免疫組織染色、TUNEL 染色に供した。統計学的解析には Student t 検定を用いた。

【結 果】

Braf^{CA/wt} マウスでは 6 ヶ月では甲状腺癌の発生はみられず、12 か月で甲状腺癌がほぼ全例に認められた。*Braf*^{CA/wt};*Mieap*^{KO/KO} マウスと *Braf*^{CA/wt};*Atg5*^{flox/flox} マウスでは、6、12 ヶ月で甲状腺癌の発生が認められた。*Mieap*^{KO/KO} マウス、*Atg5*^{flox/flox} マウスの甲状腺は 6、12 ヶ月とも正常であった。したがって、*Braf*^{CA/wt};*Mieap*^{KO/KO} マウスと *Braf*^{CA/wt};*Atg5*^{flox/flox} マウスでは、*Braf*^{CA/wt} マウスよりも早期に甲状腺癌が発症した。

Braf^{CA/wt}、*Braf*^{CA/wt};*Mieap*^{KO/KO}、*Braf*^{CA/wt};*Atg5*^{flox/flox} マウスでの甲状腺癌の Tg 発現は、3 群とも heterogeneous であったが、ほぼ同程度であったことから甲状腺癌の分化度は同等であると判断した。Ki-67 陽性細胞、TUNEL 陽性細胞、すなわち増殖能及びアポトーシス細胞の割合は、3 群ともコントロール群より高値を示した。また、*Braf*^{CA/wt};*Mieap*^{KO/KO} における TUNEL 陽性細胞の割合は、*Braf*^{CA/wt} 群よりも有意に高値であった。さらに異常ミトコンドリアは活性酸素種 (ROS) を産生することが報告されており、53BP1 染色 (ROS による DNA2 重鎖切断のマーカ) を評価したところ、3 群における 53BP1 foci の数は対照群よりも高値であり、*Braf*^{CA/wt};*Mieap*^{KO/KO} では *Braf*^{CA/wt} よりも有意に高値であった。最後に細胞質のミトコンドリアの蓄積を TOMM20 による免疫染色により評価したが、発現レベルは 3 群で同等であった。したがって、MIEAP や ATG5 の KO のみではミトコンドリアは蓄積しないことが示された。

【考 察】

異常なミトコンドリアを排除するミトコンドリア品質管理機構には、canonical mitophagy (選択的オートファジーの 1 つ) と non-canonical mitophagy が含まれる。我々は non-canonical mitophagy に関与する分子である MIEAP とオートファジー機構の構成要素である ATG5 が甲状腺発癌における腫瘍抑制因子であるかどうかを遺伝子組み換えマウスを用いて調べ、*Braf*^{CA/wt};*Mieap*^{KO/KO}、*Braf*^{CA/wt};*Atg5*^{flox/flox} マウスでは *Braf*^{CA} マウスよりも甲状腺癌の発生が促進されることを明らかにした。これらの結果より、ATG5 及び MIEAP の両方が実際に腫瘍抑制因子であることを示した。緒言で述べたように MIEAP の発現低下は conventional な甲状腺癌でも見られるので、MIEAP はオンコサイトーマに限らず甲状腺癌全体で腫瘍抑制因子として作用していると言える。しかし *Mieap*^{KO/KO}、*Atg5*^{flox/flox} マウスの甲状腺では腫瘍形成がみられず、MIEAP、ATG5 単独欠損では甲状腺における腫瘍発生には不十分であることも示した。

Braf^{CA/wt}、*Braf*^{CA/wt};*Mieap*^{KO/KO}、*Braf*^{CA/wt};*Atg5*^{flox/flox} でみられた甲状腺癌は細胞増殖能及び分化度は同等であったが、ROS 産生、アポトーシス細胞の割合は *Braf*^{CA/wt};*Mieap*^{KO/KO} において最も高値であった。MIEAP KO は、ATG5 KO よりもミトコンドリアによりダメージを与え、ROS 産生とアポトーシスを誘導すると考えられた。

最後に *Braf*^{CA/wt};*Mieap*^{KO/KO}、*Braf*^{CA/wt};*Atg5*^{flox/flox} マウスの甲状腺癌にはミトコンドリアの蓄積は認められなかった。これはミトコンドリアの蓄積にはミトコンドリア除去機構低下と産生増加の両方が必要であるという我々の以前の結果に合致する。このため甲状腺オンコサイトーマのマウスモデルを作出するためにはミトコンドリア品質管理機構異常に加えてミトコンドリア機能異常 (と代償的ミトコンドリア産生増加) が必要であると考えられる。