

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：17301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03454

研究課題名(和文)オートファジーの異常がもたらすゲノム情報の破綻と発がん

研究課題名(英文)The role of autophagy in the maintenance of genomic stability and tumor suppression

研究代表者

川端 剛 (Kawabata, Tsuyoshi)

長崎大学・原爆後障害医療研究所・助教

研究者番号：60734580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：オートファジーは正常組織の恒常性を維持して発がんを防ぐ。本研究では、オートファジーの破綻が、ファンconi貧血(FA)経路の機能低下と複製ストレスに伴うゲノム情報の異常を引き起こす事を明らかとした。オートファジー欠損細胞ではエピジェネティックな変化によりFA経路が機能低下し、さらに複数のがん抑制遺伝子をコードするゲノム領域の異常とこれら遺伝子の発現低下を引き起こす事が示された。これより、正常細胞からオートファジーの異常を介して遺伝的・エピジェネティックな異常と発がんが引き起こされるメカニズムが提唱された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

オートファジーは様々な疾患を予防する生体防御機構として働く。がんを防ぐ働きもあるが、様々な要因によりオートファジーの低下が起きる事が知られており、それが関連疾患に繋がる可能性が指摘されている。これまでに、ミトコンドリアの異常などがオートファジー欠損に伴う腫瘍形成の原因と考えられていたが、それが発がんに繋がる詳細なメカニズムはよく分かっていなかった。本研究では、オートファジーの異常が、がんの原因となりうるゲノム情報の変化を引き起こすメカニズムを解明した。これは新しいがん予防およびがん治療の方策を立てる際の道しるべとなるため、続く研究により大きな社会還元が期待される。

研究成果の概要(英文)：Autophagy maintains tissue homeostasis and prevents carcinogenesis. In this study, we show that disruption of autophagy leads to dysfunction of the Fanconi anemia pathway and genomic instability associated with replication stress. In autophagy-deficient cells, the expression of the FA protein FANCF was decreased due to epigenetic changes. Comprehensive genome-wide analysis revealed that autophagy deficiency induces copy-number variations in genomic regions encoding multiple cancer-suppressor genes, and results in decreased expression of these genes. This indicates that autophagy deficiency causes genetic and epigenetic abnormalities due to defects in the FA pathway, leading to loss of function of other tumor suppressors and promotion of early tumorigenesis. This study proposes a mechanism by which cancer cells arise from normal cells via abnormalities in autophagy, contributing to develop applications to new cancer prevention and treatment.

研究分野：細胞生物学

キーワード：オートファジー ゲノム安定性の維持 複製ストレス 発がん

1. 研究開始当初の背景

生物が飢餓に陥ると細胞内バルク分解系であるオートファジーが誘導され自己成分を非選択的に分解、生存に必須なエネルギーを確保する。オートファジーは細胞内に存在する様々な有害因子を選択的排除し、感染症や神経変性疾患等を防ぐ生体防御機構として機能する。これはがんにおいても例外ではなく、オートファジーは正常組織の恒常性を維持して発がんを防ぐ。オートファジー欠損は腫瘍形成を促進するが、その原因としてミトコンドリアの異常や酸化ストレスの上昇と DNA 損傷の蓄積などが考えられている。しかし、それらが発がんにつながるメカニズム、特に、発がんを引き起こすようなゲノム情報の異常につながるメカニズムは不明点が多かった。発がんの過程において染色体粉砕(chromothripsis)に代表される大規模なゲノム情報の再編が見られる。この原因として注目されているのが DNA 複製の異常、つまり複製ストレスである。DNA 複製は酸化ストレス等の内在性要因に加え、紫外線などの環境要因の影響を受けてゲノム情報の変化をもたらす。我々は、オートファジーが複製ストレスに由来するゲノム不安定性を防ぐ事を見出した。ゲノム領域には複製ストレスによる影響を受けやすい部位が存在する。オートファジー欠損細胞はこれら既知の領域に加え、複製ストレスとのリンクが認知されていないゲノム領域の変化を起こしやすいことが判明した。

2. 研究の目的

本計画では、オートファジーの異常が発がん抑制遺伝子の機能を損ない、さらに発がんの原因となるメカニズムの解明を目的とする。オートファジーに必須の遺伝子を欠損したモデルマウスを用いた研究によりオートファジーの生理学的機能が明らかとなってきた。特に、オートファジーの異常は肥満や尿路結石など様々な生活習慣病と関わりがある。これを踏まえ、本計画では病態におけるオートファジー異常から発がんに至る機構を明らかとする。

3. 研究の方法

本計画では上記目的を達成するため、細胞生物学および動物実験学的解析を行う。まずオートファジーが複製ストレスに起因するゲノム不安定性を防ぐ分子メカニズムを解明し、その破綻が発がん抑制遺伝子の異常へと至る道筋を示す。続いて詳細なゲノムワイド解析によりオートファジー依存型がん抑制遺伝子の全貌を明らかとする。さらに、オートファジーの異常からがん抑制遺伝子の機能破綻に至る道筋をマウス遺伝学的解析により示す。

4. 研究成果

(1) オートファジー欠損に伴うゲノム安定性維持に関わるタンパク質の変化の同定

クロマチン濃縮画分を比較する機能プロテオミクス解析により、オートファジー欠損細胞で顕著に発現が低下している 354 個のタンパク質を同定した。このリストに対して KEGG パスウェイ解析を行ったところ、DNA 架橋の修復および複製ストレス応答に重要な機能を果たす事が知られている FA パスウェイがトップヒットした。これらは詳細なウェスタンブロット解析により再確認された。主要な FA コア複合体の因子のほとんどがクロマチン結合に低下を示した。コア複合体は、FA 経路の駆動に必須の役割を果たす FANCD2 のユビキチン化に必須の因子である。これと一致して、オートファジー欠損細胞では FANCD2 のモノユビキチン化とクロマチン結合が減少していることが確認された。さらにオートファジー欠損細胞で複製ストレスに応答した FANCD2 の核内焦点の形成が減少していた。これらの結果より、オートファジー欠損細胞において FA 経路が機能低下していることが示された。

(2) オートファジー欠損細胞における FA 経路異常の分子基盤の解明

オートファジー欠損細胞のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、FA 経路に関連する因子の一つ *FANCF* 遺伝子発現の顕著な低下が見られた。FA コア成分をコードする遺伝子のうち、*FANCF* だけが有意に減少していた。これは、オートファジー欠損細胞において FA コア複合体の他の構成要素よりも、基質認識モジュールの構成要素 (*FANCC*-*FANCE*-*FANCF*) の顕著なクロマチン結合の減少を示すデータと一致した。*FANCF* 遺伝子をオートファジー欠損細胞に導入し、*FANCF*-mCherry を異所的に発現させると、*FANCD2* のユビキチン化の欠損が有意に回復することを見出した。この観察から、*FANCF* 遺伝子の発現低下が欠陥の主要な原因であることが示唆された。

一連の卵巣癌および子宮頸癌細胞は、エピジェネティックな変化による *FANCF* のサイレンシングおよび FA 経路の機能低下を示すことが知られている。そこで、同様のエピジェネティックな変化がオートファジー欠損細胞における欠陥の原因であるかどうかを検証した。オートファジ

一欠損細胞における FANCF の発現および FANCD2 のユビキチン化は、DNA メチル化酵素の阻害剤である 5-アザ-2'-デオキシシチジン (デシタピン : DAC) により一部レスキューされた。これよりオートファジー欠損細胞における FA-パスウェイの欠損の原因は、FANCF 遺伝子のエピジェネティック変化ではないかと推測された。そこで、reduced representation bisulfite sequencing (RRBS-seq) 解析を実施しゲノム全体の DNA メチル化を調べた。オートファジー欠損細胞のゲノム CpG メチル化率/塩基は野生型細胞のそれと有意差はなかったが、オートファジー欠損細胞では塩基メチル化の差異が観察された。特に、FANCF 遺伝子のプロモーターは、野生型細胞ではメチル化が検出されないのに対し、オートファジー欠損細胞では高いメチル化状態が観察された。したがって、オートファジー欠損によるエピジェネティックな変化は、ファンconi 経路の異常を引き起こすと結論した。

これらの欠損が複製フォークの安定性に与える影響を明らかにするために、新しく合成された DNA のエンドリセクションアッセイと複製フォークリカバリーアッセイの 2 つのアッセイを行った。新しく合成された DNA の分解は、複製フォークの不安定性によって引き起こされ、染色体の不安定性につながる。オートファジー欠損細胞は、複製ストレスによる複製フォークの停止時に、新たに合成された DNA の分解が加速していることが明らかになった。これは S 期後期でより顕著であった。さらに、オートファジー欠損細胞では、フォークの失速からの回復が低下することが分かった。これらのデータは、オートファジー欠損細胞における FA 経路の活性の低下により、複製フォークの安定性が低下していることを示唆している。

(3) オートファジー欠損が引き起こすゲノム情報の変化とがん抑制遺伝子の異常

予備実験結果で得られていたアレイ CGH (Comparative Genomic Hybridization) 解析より、オートファジー欠損は、複製ストレスに反応して不安定になるゲノム遺伝子座である脆弱部位 (common fragile sites: CFS) だけでなく、脆弱部位として特定されていない他の遺伝子座においても copy number variations (CNV : 特定のゲノム領域のコピー数の変化) の変化を増加させる事が分かっていた。これらオートファジー欠損に伴うゲノム情報の構造的変化が、特定の遺伝子の発現に与える影響を調べるため、複製ストレス後の発現の変化をマイクロアレイ解析遺伝子発現解析により調べた。細胞を複製ストレスに曝し、その後 2 週間の回復培養を行い、複製ストレスに対する一過性の変化ではなく、固定的な変化を同定した。その結果、野生型細胞における複製ストレス処理による遺伝子発現変化と、複製ストレス処理を行わないオートファジー欠損による遺伝子発現変化との間に強い相関があることを見出した。これは、内因性の複製ストレスが、オートファジー欠損による遺伝子発現パターンの変化を最も促進している可能性を示唆している。

同定された CNV に存在する遺伝子リストから COSMIC により注釈されたがん遺伝子を同定し、44 のがん関連遺伝子を得た。その中で、発現量が有意に変化した遺伝子を同定し、オートファジー関連がん遺伝子のリストを得た。これをウェスタンブロットングにより確認し、オートファジーに強く依存する腫瘍抑制因子が同定された。さらに、我々はオートファジー欠損細胞で顕著に発現が上昇する癌原遺伝子産物を同定した。がん遺伝子の維持におけるオートファジーの役割を生体内で検証するために、腎臓腫瘍の危険因子とされることが多い腎症による腎不全のオートファジー欠損モデルを利用した。腎石灰化症とそれに伴う腎不全を誘発するために、シュウ酸塩前駆体のグリオキシル酸 (GOX) をマウスに投与し、mTOR 活性を上昇させ、オートファジーの減少をもたらした。GOX 処理マウスの腎組織では、二つのがん抑制遺伝子が低下していた。これより、生体内のがん遺伝子の維持におけるオートファジーの役割が示された。

これらの実験結果より、オートファジー異常からエピジェネティック情報の混乱とゲノム情報の異常、さらにがん抑制遺伝子の機能低下と発がんが引き起こされる一連の分子病態モデルが提起された。なお、DNA メチル化の状態や特定の DNA 修復経路の活性は細胞ごと、特にがん細胞では大きくばらつきが見られるため、コンセンサスとしてオートファジー不全が必ず FA 経路の異常に繋がると考えてはならない。しかし、これより示された正常細胞からオートファジーの異常を介してがん細胞が生じる過程の一側面は、新しいがん予防およびがん治療への応用可能性を示しており、続く研究により大きな社会還元が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kawabata Tsuyoshi、Yoshimori Tamotsu	4. 巻 6
2. 論文標題 Autophagosome biogenesis and human health	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Discovery	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41421-020-0166-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Yamamuro Tadashi、Kawabata Tsuyoshi、Fukuhara Atsunori、Saita Shotaro、Nakamura Shuhei、 Takeshita Hikari、Fujiwara Mari、Enokidani Yusuke、Yoshida Gota、Tabata Keisuke、Hamasaki Maho、Kuma Akiko、Yamamoto Koichi、Shimomura Iichiro、Yoshimori Tamotsu	4. 巻 11
2. 論文標題 Age-dependent loss of adipose Rubicon promotes metabolic disorders via excess autophagy	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4150
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-17985-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Rei Unno、Tsuyoshi Kawabata、Kazumi Taguchi、Teruaki Sugino、Shuzo Hamamoto、Ryosuke Ando、 Atsushi Okada、Kenjiro Kohri、Tamotsu Yoshimori、Takahiro Yasui	4. 巻 16
2. 論文標題 Deregulated MTOR (mechanistic target of rapamycin kinase) is responsible for autophagy defects exacerbating kidney stone development.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 709-723
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2019.1635382	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tadashi Yamamuro、Shuhei Nakamura、Kyosuke Yanagawa、Ayaka Tokumura、Tsuyoshi Kawabata、 Atsunori Fukuhara、Hiroyuki Teranishi、Maho Hamasaki、Iichiro Shimomura、Tamotsu Yoshimori	4. 巻 -
2. 論文標題 Loss of RUBCN/rubicon in adipocytes mediates the upregulation of autophagy to promote the fasting response.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/15548627.2022.2047341	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Gota Yoshida, Tsuyoshi Kawabata, Hyota Takamatsu, Shotaro Saita, Shuhei Nakamura, Keizo Nishikawa, Mari Fujiwara, Yusuke Enokidani, Tadashi Yamamuro, Keisuke Tabata, Maho Hamasaki, Masaru Ishii, Atsushi Kumanogoh, Tamotsu Yoshimori	4. 巻 -
2. 論文標題 Degradation of the NOTCH intracellular domain by elevated autophagy in osteoblasts promotes osteoblast differentiation and alleviates osteoporosis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Autophagy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15548627.2021.2017587	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 T Yamamuro, S Nakamura, Y Yamano, T Endo, K Yanagawa, A Tokumura, T Matsumura, K Kobayashi, H Mori, Y Enokidani, G Yoshida, H Imoto, T Kawabata, M Hamasaki, A Kuma, S Kuribayashi, K Takezawa, Y Okada, M Ozawa, S Fukuhara, T Shinohara, M Ikawa, T Yoshimori	4. 巻 -
2. 論文標題 Rubicon prevents autophagic degradation of GATA4 to promote Sertoli cell function.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pgen.1009688	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tsuyoshi Kawabata, Rei Unno, Tadashi Yamamuro, Shun Kageyama, Kanako Akamatsu, Reiko Sekiya, Toshiharu Fujita, Maiko Sakamoto, Miho Kawakatsu, Maho Hamasaki, Shinji Goto, Shuhei Nakamura, Wataru Sakai, Norisato Mitsutake, Tao-Sheng Li, Yoshinobu Ichimura, Takahiro Yasui, Masaaki Komatsu, Tamotsu Yoshimori	4. 巻 -
2. 論文標題 Autophagy Protects Integrity of Tumor Suppressors From Replication Stress	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Sneak Peek	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2139/ssrn.3950748	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 川端剛
2. 発表標題 オートファジーの異常と複製ストレスに起因するゲノム情報の破綻
3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	安井 孝周 (Yasui Takahiro) (40326153)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・教授 (23903)	
研究 分担者	海野 怜 (Unno Rei) (40755683)	名古屋市立大学・医薬学総合研究院(医学)・研究員 (23903)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------