

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32644

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16755

研究課題名(和文) 家族性腫瘍新規原因遺伝子AMBRA1の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of AMBRA1 a new candidate of Cowden syndrome

研究代表者

赤塚 尚子 (Akatsuka, Hisako)

東海大学・医学部・特定研究員

研究者番号：20826317

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： 家族性腫瘍であるCowden症候群患者から、新規原因遺伝子としてAMBRA1を見出した。患者は機能に重要と考えられるアミノ酸が置換したAMBRA1を有していた。本研究によって患者型AMBRA1が機能欠失であることが認められた。またこれまでAMBRA1の生体内における機能が十分に解析されていなかったことから欠損マウスを作成した。当該マウスは細胞増殖の異常な亢進により臓器肥大、腫瘍感受性の亢進が認められた。他に顆粒球系細胞の異常な増殖、肺・肝臓への浸潤が認められた。以上のことからAMBRA1は腫瘍抑制遺伝子、血球系細胞の分化に重要であることが本研究によって明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では世界で初めてヒトの生殖系細胞にAMBRA1遺伝子の変異を見出し、かつ機能欠失型であることを明らかにした。また、AMBRA1が腫瘍抑制遺伝子として機能することを生理的な実験系で証明できた。家族性腫瘍は稀な疾患であるが、そのほとんどが腫瘍抑制遺伝子の変異による。家族性腫瘍の原因遺伝子の解析によって、生命の理解に重要な知見が重ねられてきた。Cowden症候群も同様に稀な家族性腫瘍であるが、AMBRA1の解析によって生命の新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)： We detected "AMBRA1" as a new candidate gene of Cowden syndrome. Patient AMBRA1 had amino acid change which was conceived as cause functional severe defect. Actually, patient AMBRA1 was dysfunction. So far, AMBRA1 had not been analyzed in physiological condition, we made Ambra1 conditional Knock Out mice (here in Ambra1 cKO mice). The organ size of this mice is larger than that of the control mice, which is considered to be an dysregulation of cell proliferation. And tumor sensitivity were high. In addition, abnormaly proliferation and infiltration of myeloid cell was detected in liver and lung of Ambra1 cKO mice. Therefore we uncovered that AMBRA1 suppresses tumor and regulates blood cell differentiation correctly.

研究分野：分子生物学

キーワード：AMBRA1 細胞増殖 腫瘍

1. 研究開始当初の背景

Cowden 症候群は3胚葉由来全ての組織に良性腫瘍を頻発し、高頻度で悪性化する常染色体顕生遺伝の稀な家族性腫瘍である。Cowden 症候群では腫瘍抑制遺伝子である *PTEN* 遺伝子に変異を持つ患者が報告されている一方、診断基準を満たすが *PTEN* 遺伝子に変異を持たない患者も多く存在する。それ故発症に至る詳細な分子メカニズムは未だ不明である。

申請者は *PTEN* 遺伝子に変異を持たない日本人 Cowden 症候群患者家系のエクソーム解析により、新規原因遺伝子候補として *AMBRA1* (*activating molecule in Beclin1-regulated autophagy*) 遺伝子を同定した。これまで *AMBRA1* が腫瘍抑制遺伝子であることを *in vivo* において決定づけた核心的な報告は存在しない。

申請者は *AMBRA1* の生理学的機能をより詳細に検討するため、*Easi-CRISPR* 法によって世界に先駆けて *Ambra1* conditional Knock Out マウス(以下 *Ambra1* cKO マウス)を作成した(Quadros et al. 2016)。Cre-ERT2 マウスと交配し、タモキシフェン投与によって全身で *AMBRA1* を欠損させたところ *Ambra1* cKO マウスではコントロール群に比べて体重の増加が顕著となり、肝臓、腎臓、膵臓、消化管等主要な臓器の肥大化が観察された。この表現系は良性腫瘍、前がん状態の前段階を模していると考えられ、*AMBRA1* が将来腫瘍になるポテンシャルを持つ細胞を抑制することを示唆する。

一方患者型 *AMBRA1* には同一ハプロ上に2箇所の点変異が生じていた。患者型 *AMBRA1* の機能解析を行ったところ、C末変異体では、オートファジー、細胞周期制御両方の機能が欠失していたがN末変異体はオートファジー機能が回復し、細胞周期制御に障害があった。このことは *AMBRA1* が部位特異的に独立してオートファジーと細胞周期制御機能を有することを示唆している。

以上より本研究では *AMBRA1* が腫瘍抑制機能を有するか検討し、腫瘍に対する生命の防御機構を理解したい。

2. 研究の目的

本研究は下記2項目に分けて取り組んだ。

- (1) *Ambra1* が腫瘍抑制遺伝子として機能するか
- (2) 患者型 *AMBRA1* では腫瘍抑制機能が欠失しているか

(1)のテーマについては *Ambra1* cKO マウスの解析を通して前がん状態、悪性腫瘍形成のメカニズムを解明することを目的とした。細胞株を用いた *AMBRA1* の生化学的解析による機能探索の報告は多数存在するが、これまで *Ambra1* cKO マウスを用いた研究は報告されていない。これまでの結果から当該マウスが前がんの初期状態を示すモデルとして非常に適していると考えており、生体において *AMBRA1* と腫瘍発生メカニズムがどのように関連するのか本研究によって初めて解明されることを期待した。

(2)のテーマについては、患者型 *AMBRA1* の機能解析を目的とした。これまで生殖細胞系で *AMBRA1* 遺伝子に変異をもつ家系が存在すること、ヒトの *AMBRA1* 遺伝子変異による家族性腫瘍は報告されていない。予備実験の結果から、*AMBRA1* が部位特異的にオートファジーと細胞周期制御2つの機能をもつことが示唆された。患者型 *AMBRA1* を用いて *AMBRA1* を中心とした分子ネットワークを解明したい。さらに①のテーマで重ねた知見をもとに、患者型 *AMBRA1* が腫瘍抑制効果を欠失し、増殖能の亢進、前がん状態、悪性腫瘍を誘発するか検討した。

3. 研究の方法

- (1) *Ambra1* が腫瘍抑制遺伝子として機能するか

【*Ambra1* cKO マウスの解析】

Ambra1 cKO マウスで生じた臓器肥大の原因について組織学的・生化学的手法を用いて詳細に解析した。細胞増殖マーカーである Ki67、cyclin D の免疫組織化学染色を行いどの細胞で増殖が亢進しているか組織学的に観察した。また、解剖24時間前に BrdU の *in vivo* 投与を行い、各組織で BrdU 陽性の細胞数を検討した。

また、先進ゲノム支援のもと肝臓、大腸の RNAseq を行い転写レベルで違いがあるか検討した。

肝臓、肺に集積した血球系細胞の解析は、Percoll1 によって組織内の血球系細胞を回収し、細胞表面マーカーを染色し FACS で解析した。

致死量の放射線照射を行った野生型マウスに *Ambra1* cKO マウスから採取した骨髓細胞を移植し、血球分化能について検討した。肝臓に形成された腫瘍は先進ゲノム支援のもとエクソーム解析を行った。

【*Ambra1* 欠損腫瘍モデルマウスの作成・解析】

a) 長期飼育、b) 発ガン剤投与、c) 放射線照射の3種の手法によって *Ambra1* cKO マウスに腫瘍が誘発されるか検討した。採取した腫瘍は組織学的に悪性腫瘍であるか検討した一方、先進ゲノム支援のもとエクソーム解析を行いドライバー遺伝子に変異が認められるか検討した。

薬剤依存的に活性型 RAS を発現するマウスと *Ambra1* cKO マウスとを交配し、MEF を採取した。4-OHT 添加後の細胞増殖能について検討した。

(2) 患者型 AMBRA1 は腫瘍を誘発するか？

【患者型 AMBRA1 の機能解析】

細胞株を用いた各種 AMBRA1 の解析によりオートファジーと細胞増殖制御を分離する変異体を得ることができた。各種 AMBRA1 でそれぞれ相互作用するタンパク質をスクリーニングし比較・検討した。具体的には *Ambra1* 欠失細胞株に Myc-Flag タグを付加させた各種 AMBRA1 を発現させ、タンパク質を回収した。抗 Myc 抗体、抗 Flag 抗体による2段階の免疫沈降を行い、結合タンパク質を1次元または2次元電気泳動により解析する。患者型、また各片側変異体で結合しないバンドに着目し、LC MS/MS で特定した。

上記で得た情報をもとに *Ambra1* KO 細胞と患者型 AMBRA1 を発現させた *Ambra1* KO 細胞に cyclin D を発現させ、シクロヘキシミド(以下 CHX) 添加後の cyclin D 分解速度について検討した。

4. 研究成果

(1) AMBRA1 は腫瘍抑制機能を有する

タモキシフェン投与後、*Ambra1* cKO マウスの肝臓と肺には ki67 陽性の細胞数が野生型と比較して有意に増大していた。また、BrdU の *in vivo* 投与後の *Ambra1* cKO マウスの肝臓、肺、大腸には BrdU 陽性の細胞数が野生型と比較して優位に増大していた(図1)。

また、a) 長期飼育、b) 発ガン剤投与、c) 放射線照射の3種の方法によって *Ambra1* cKO マウスは野生型マウスと比較して有意に腫瘍形成頻度が高かった。これらの腫瘍の種類は胸腺腫、B細胞リンパ腫、肉腫、腺癌等多岐に渡った(図2)。長期飼育、発ガン剤投与によって発症した腫瘍の一部をエクソーム解析したところ、5種の腫瘍のうち2種に *Kras* G12D、*Ctnnb1* G34E といったドライバー遺伝子の変異が認められた。

また、活性型 RAS を発現させかつ *Ambra1* が欠損した MEF は細胞増殖速度が非常に亢進していた。しかし AMBRA1 を発現した活性型 RAS 発現細胞では現象がキャンセルされたことから、AMBRA1 はドライバー変異に対して抑制的に機能することが示唆された。

このことから AMBRA1 は腫瘍抑制機能を有していることが明らかとなった。

(2) 患者型 AMBRA1 は cyclin D の分解が停滞する

AMBRA1 と結合する分子の網羅的解析を行ったところ、多数の分子と結合していた。その中でも、細胞周期制御に関連する分子、ユビキチン関連分子等のタンパク質分解に関与する分子が多く同定された。その中で cyclin D、CUL4/DDB1 に着目した。すでに AMBRA1 が CUL4 と結合してユビキチンライゲースとして機能することが報告されている (Antonioli et al., *Developmental cell*, 2014)。 *Ambra1* KO 細胞株2種(T細胞、MEF)において CHX 処理後の cyclin D 分解速度の検討を行ったところ、*Ambra1* 欠損により cyclin D の分解が滞ることが明らかとなった。

一方患者型 AMBRA1 はオートファジー、細胞周期制御において機能欠失型であった。患者型 AMBRA1 を発現させた *Ambra1* KO 細胞株の CHX 処理後の cyclin D 分解速度を検討したところ、野生型 AMBRA1 を発現させた *Ambra1* KO 細胞と比較し有意に分解速度が停滞していた(図3)。

したがって患者型 AMBRA1 は cyclin D の蓄積による細胞周期制御異常が生じていることが示唆された。

(3) AMBRA1 は血球系の分化に関与する

タモキシフェン投与後長期飼育した *Ambra1* cKO マウスの肝臓と肺に異常な血球系細胞の浸潤

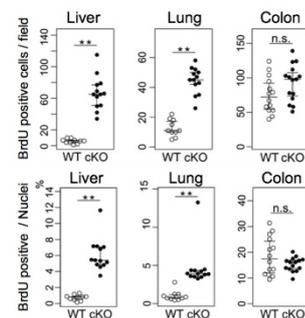


図1 BrdU 陽性細胞数、BrdU 陽性核数の比較

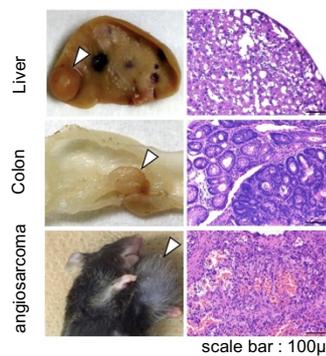


図2 発ガン剤投与で生じた各種腫瘍

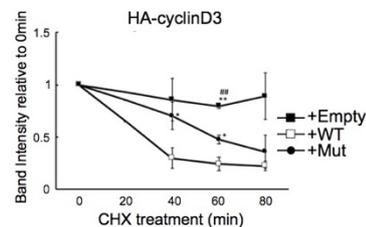


図3 CHX 処理後の cyclin D3 分解速度の比較

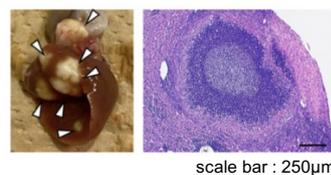


図4 肝臓にできた腫瘍と HE 染色像

が目立った。各組織に存在する血球系細胞の解析を行ったところ CD45⁺ CD11b⁺ Gr1⁺の顆粒球系細胞が目立った。血球系細胞の分化に異常があるか検討するため致死量の放射線照射を行った野生型マウスに *Ambra1* cKO マウスの骨髄を移植し、移植後に血中に現れた血球系細胞を解析したところ同様であった。興味深いことにリンパ球系の分化も障害されていた。頻度は低いが *Ambra1* cKO マウスの骨髄細胞を移植したマウスの肝臓に白い腫瘍が形成された(図 4)。形態学的に観察すると好中球様の細胞であった。エクソーム解析を行ったところ特に悪性腫瘍と関連する遺伝子の変異は認められなかったため、好中球が異常に増殖し、腫瘍を形成したと考えられた。

以上のことから AMBRA1 は血球分化の方向づけに関与することが明らかとなった。

以上のことから、本研究によって AMBRA1 は cyclin D を直接分解することで細胞周期制御を行うこと、腫瘍抑制機能を有すること、血球分化を制御することが明らかとなった。また、患者型 AMBRA1 は cyclin D 分解制御以上によって細胞周期制御が破綻し腫瘍発症へつながることが示唆された。今後は患者型 AMBRA1 の変異部位を手掛かりに、AMBRA1 と cyclin D、Cul4/DDB1 の詳細な結合部位を検討して AMBRA1 の分子制御メカニズムを解明していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masuhara Kaori, Akatsuka Hisako, Tokusanai Mizuki, Li Chenyang, Iida Yumi, Okada Yoshinori, Suzuki Takahiro, Ohtsuka Masato, Inoue Ituro, Kimura Minoru, Hosokawa Hiroyuki, Hozumi Katsuto, Sato Takehito	4. 巻 33
2. 論文標題 AMBRA1 controls antigen-driven activation and proliferation of naive T cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Immunology	6. 最初と最後の頁 107 ~ 118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/intimm/dxaa063	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 赤塚 尚子 増原 香織 大塚 正人 本杉 奈美 木村 稯 佐藤 健人
2. 発表標題 家族性腫瘍新規原因候補遺伝子AMBRA1の機能解析
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaori Masuhara Hisako Akatsuka Takehito Sato
2. 発表標題 Ambra1 is involved in T cell response at effector/memory phase through controlling glycolysis/OXPHOS transition
3. 学会等名 第48回日本免疫学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 戸草内 瑞生 榎川 智広 李 晨陽 細川 裕之 大塚 正人 Ibrahim Abd 八幡 崇 細道 一善 中岡 博史 井ノ上 逸朗 木村 稯 増原 香織 赤塚 尚子 佐藤 健人
2. 発表標題 AMBRA1がサイクリンD安定性の制御に関わり腫瘍抑制活性を有する分子遺伝学的エビデンス
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------