

審 査 結 果 の 要 旨

論文題目 「腫瘍関連遺伝子AMBRA1の機能解析」

学位申請者 赤塚 尚子

本論文は、家族性腫瘍の1つである Cowden 症候群の原因遺伝子探索の過程で、日本人家系から独自に単離され非同義置換を伴う遺伝子変異を認めた遺伝子: *AMBRA1* に着目し、いまだに明瞭でないその機能を評価する新たな実験系を確立した研究成果である。

AMBRA1 は、オートファジー開始反応を担う *Beclin1* と結合することが知られ、オートファジー系での役割が想定されてきたが、その機能については十分な解析がなされていない。申請者らは、CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術を用い、マウス未分化 T 細胞株: OVA53 にて、*Ambra1* 遺伝子欠損細胞を新たに樹立し、同時に樹立した *Atg7* 遺伝子欠損細胞と比較し、その細胞生物学的意義を検証した。その結果、*Ambra1* は、オートファゴソームの形成に必須の *Atg7* とは異なり、飢餓状態あるいはラパマイシン誘導性のオートファジーにおいて、そのリソソームとの融合を伴う終結反応に重要であることが示された。また、*Ambra1* は、TCR シグナル依存的な細胞周期の停滞、解糖系からミトコンドリア系へのエネルギー代謝の変換（代謝リプログラム）に必須であり、*Atg7* 依存的なオートファジーとは独立して、細胞状態の制御に関与することが示唆された。このような *Ambra1* の新たな機能発現には、その下流分子として *c-Myc* が機能している可能性も指摘され、細胞の生存・増殖制御といった腫瘍化を支持する事象との関連も想定された。今回樹立された *Ambra1* 欠損細胞の形質は、*AMBRA1* cDNA の遺伝子導入により正常に回復することから、*AMBRA1* の機能を適切に評価することが可能となった。今後、本系を用いて、Cowden 症候群患者由来変異型 *AMBRA1* の機能の詳細な解析が待たれる。

このような新たな研究成果に対し、各審査委員から以下のような質疑、コメントがなされた。

1) OVA53 細胞において p53 及び Rag2 の欠損は、オートファジーや細胞周期等の結果に影響しないか。

2) ミトコンドリア代謝系が亢進しているという具体的なデータはあるか。

3) 構造物を含まないオートファゴソーム（空胞）が *AMBRA1* 欠損で増加する機構について。

4) Cowden 症候群でみられた *AMBRA1* の変異は具体的にはどんな変異か？他の因子との結合に重要なドメインに変異があるのか？

5) Cowden 症候群で同定された変異型 *AMBRA1* は、dominant-negative 効果を示すのか？

6) Cowden 症候群の腫瘍では *AMBRA1* の2つ目のアレルはどうなっているか？

7) Cowden 症候群で既に報告されている *PTEN* 遺伝子の異常と本研究で明らかにされた *AMBRA1* 遺伝子の異常はどのような関係にあるのか？

8) 本研究で T 細胞機能の異常が示されたが、Cowden 症候群でも免疫機能の異常が報告されているのか？

9) OVA53 細胞は p53 欠損細胞であるが、他の p53 欠損細胞におけるオートファジーについての知見はいかがか？

これらの質問に対し、申請者は、自身の研究から得られた知見に加え、既報にて発表されたデータやその考察を踏まえ、的確な答弁を行った。こうした議論の過程で、*AMBRA1* と、すでに Cowden 症候

群発症との関連が示された PTEN や同症候群に頻発する過誤種・良性腫瘍との関係について、活発な議論がなされた。申請者はすでに、誘導型 *Ambra1* 遺伝子欠損マウスも樹立し、その生理的意義についても追求しつつあり、稀少難病発症の病因論のみならず、医学・生命科学研究全般における幅広い知識と考察力が備わっていることが伺え、今後の研究の発展が期待された。

以上の結果、本論文は学位論文として十分な内容を有するものと審査委員全員の一致で判定された。したがって、申請者 赤塚 尚子 は東海大学博士（医学）の学位を授与されるに値すると判断した。

論文審査委員

主査	博士（薬学）	穂積 勝人	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	理学博士	木村 穰	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	博士（医学）	秦野 伸二	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	博士（医学）	谷口 俊恭	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）
委員	博士（医学）	安藤 潔	医学部教授	（医学研究科先端医科学専攻）