

東海大学大学院令和二年度博士論文

腫瘍関連遺伝子 *Ambra1* の
免疫細胞における機能解析

指導 穂積 勝人 教授

東海大学大学院医学研究科
先端医科学専攻

増原 香織

- ・この学位論文は、International Immunology に掲載された主要公刊論文を基に作成された。
- ・International Immunology に掲載された主要公刊論文の一部を学位論文に用いることに加えて、学位論文を機関リポジトリ [電子書庫システム] で公開することの承諾を得ている。

1. 総括

AMBRA1(Activating molecule in Beclin1-regulated autophagy)は、オートファジー開始反応に関わることが知られている BECN1(BECLIN1)と結合するタンパク質として同定され、オートファジー、細胞死、細胞増殖に関与すると考えられている。しかしながら、AMBRA1 欠損マウスは胎生致死であり、生理的条件下における機能は明らかになっていない。本研究では *Easi*-CRISPR 法により作成した *Ambra1* flox/flox マウスを、*CD4-Cre-Tg* マウスと交配して T 細胞特異的に AMBRA1 を欠損するコンディショナルノックアウト (*Ambra1*-cKO)マウスとし、T 細胞における AMBRA1 の生理的な機能を解明することを目的とし研究を行った。

本研究では、*Ambra1*-cKO T 細胞を移植したマウスで移植片対宿主 (GVH) 反応が増悪し、*Ambra1* 欠損 T 細胞では抗原刺激に対する細胞増殖と細胞傷害活性が亢進することを明らかにした。この免疫反応の促進は主として naive T 細胞の増殖活性亢進によるもので、解糖系

酵素の発現上昇を伴うものであった。これまでに報告された各種オートファジー関連遺伝子のノックアウトマウスでは、T細胞の機能はむしろ障害されており、AMBRA1がオートファジー制御とは独立にT細胞の反応に関わる可能性を示唆した。

一方、*Ambra1* cKOマウスでは定常時のnaive T細胞が減少しており、AMBRA1がnaive T細胞の生存維持に関わる可能性を示した。これは各種のオートファジー関連遺伝子のノックアウトマウスと類似する表現型であった。以上から、AMBRA1はオートファジーのみならず、オートファジー非依存的な様式によってT細胞機能を制御していることが推測された。

今後の研究により、AMBRA1が解糖系・酸化的リン酸化代謝の制御などを介して細胞増殖、生存の調節に寄与する分子機構が明らかとなれば、新たな免疫療法のターゲットとなりうること、また腫瘍形成のメカニズムを解明する一助となるものと期待する。

2. 研究の背景

免疫応答において、免疫細胞の増殖やホメオスタシスの維持など様々な細胞機能の制御にオートファジーが関わるということが報告されている。*Atg5* や *Atg7* 欠損 T 細胞では細胞生存と細胞増殖機能が障害され、naive T 細胞の生存維持、TCR シグナルによる T 細胞の活性化・増殖、memory T 細胞の形成が低下する。このように、オートファジーは T 細胞の増殖と生存に不可欠であると考えられる。

また、T 細胞活性化とクローンの増大、さらに T 細胞分化の運命決定に代謝リプログラミングが重要であることが注目されてきた。例えば、naive T 細胞が TCR シグナルにより活性化し effector T 細胞となると、解糖系が亢進し酸化的リン酸化 (OXPHOS) が減衰するが、制御性 T 細胞 (Treg) や memory CD8⁺ T 細胞では OXPHOS が有意に亢進する。このような代謝リプログラミングにオートファジー機能が重要であることが知られており、代謝制御とオートファジーの関連性や分子機構の解明が求められている。

T 細胞株 OVA53 細胞を用いた我々の先行研究では、AMBRA1 は ATG7 と同様にオートファジーの進行に重要な役割を果たす一方で、ATG7 とは異なり TCR シグナルを介した細胞内の代謝リプログラミングと細胞周期を制御する役割を担うことを示した。これらの結果から、AMBRA1 はオートファジーと細胞増殖・代謝制

御を協調的に行う可能性が考えられる。しかしながら *Ambra1* 遺伝子を完全に欠損させたマウスは重度の神経管欠損による胎生致死であり、その生理的な役割は明らかになっていない。そこで我々は *Easi-CRISPR* 法を用いて *Ambra1*-cKO マウスを作成し、T 細胞における *AMBRA1* の生理的機能を明らかにすることを目的とし研究を行った。

3. 考察と展望

本研究では、T 細胞特異的に AMBRA1 を欠損させたマウスを用いて、AMBRA1 の生理的な機能、特にオートファジー非依存的な T 細胞の制御について明らかにすることを目的とした。

Ambra1-cKO マウス T 細胞は、抗原刺激による反応性が亢進し、細胞増殖の亢進、effector/memory 様細胞の増加、細胞傷害活性の亢進、GVH 反応の増強が観察された。また抗原刺激により、*Ambra1*-cKO マウスでは naive T 細胞が減少する一方で、effector/memory 様細胞の数が増加していたが、effector/memory 細胞では細胞増殖の亢進は見られなかった。以上のことから *Ambra1*-cKO T 細胞では、naive T 細胞の活性化が亢進したことで effector/memory 細胞の割合が増加し、その結果として免疫反応が亢進したと推測される。

また AMBRA1 は BECN1 や VPS34 と結合し、オートファジー開始反応を正に制御しているが、各種のオートファジー関連遺伝子欠損マウスでは T 細胞の増殖に障害が起こるとされており、本研究とは相反する結果である。したがって *Ambra1*-cKO マウスでの免疫応答の促進は、AMBRA1 によるオートファジー非依存的な T 機能制御に障害が起きた可能性が考えられた。我々は *Ambra1*-cKO CD8⁺ T 細胞で c-Myc 下流で発現する解糖系関連酵素の発現が TCR シグナル活性下で亢進することを示した。AMBRA1 は代謝制御を介して T 細胞

機能に重要な働きをしている可能性がある。また、naive T 細胞、あるいは Treg 細胞、memory T 細胞の様な静止長期生存 T 細胞 (quiescent long-lived T cells) は、主にミトコンドリアにおける OXPHOS と脂肪酸酸化 (FAO) を用いて ATP を産生することが知られている。これらの報告から、細胞の長期生存にオートファジーや代謝制御は重要であり、AMBRA1 がメカニズムの制御に寄与している可能性が考えられる。

次に我々は抗原刺激前の *Ambra1*-cKO マウスでは、naive T 細胞の割合と細胞数が減少することを見出した。この現象は各種オートファジー関連遺伝子のノックアウトマウスでも観察されており、オートファジー欠損 naive T 細胞では損傷した細胞小器官が分解されず、活性酸素が蓄積することで細胞生存率の低下が引き起こされると考えられている。AMBRA1 は抗原刺激時の免疫反応亢進とは別に、オートファジー反応の促進を介して naive T 細胞の生存、維持に寄与する可能性が示唆された。

本研究では AMBRA1 が代謝調節とオートファジー両方の制御に関わるタンパク質である可能性を示した。今後、AMBRA1 の分子機能をより深く理解するために、AMBRA1 と相互作用するタンパク質の同定や、代謝経路の調節機構など詳細な分子メカニズムを明らかにする必要がある。

4. 結論

本研究では AMBRA1 の生理的機能を解析するために *Ambra1*-cKO マウスを作成し、AMBRA1 がオートファジー依存的、非依存的なメカニズムを介して T 細胞の制御に重要な役割を果たすことが示唆された。

Ambra1-cKO マウスでは、脾臓細胞中の $CD4^+$ および $CD8^+$ T 細胞数、特に naive T 細胞の割合が減少しており、AMBRA1 がオートファジー反応の促進を介して、naive T 細胞の生存に重要な役割を果たすと考えられた。一方、*Ambra1*-cKO マウスでは、T 細胞依存的な免疫反応が亢進し、アロ特異的な細胞傷害性が促進された。この反応は特に免疫反応活性化時に naive T 細胞の増殖が亢進したことによるものと考えられる。これは、AMBRA1 がオートファジー制御と独立に細胞増殖・代謝制御を行うことによると考えられた。以上より、AMBRA1 はオートファジーや細胞増殖・代謝制御を協調的に制御する重要な役割を担う可能性が示唆された。