

京都大学	博士（医学）	氏名	清水孝洋
論文題目	Accumulation of Somatic Mutations in <i>TP53</i> in Gastric Epithelium with <i>Helicobacter pylori</i> infection. (<i>Helicobacter pylori</i> 感染に伴う慢性胃炎粘膜における <i>TP53</i> 遺伝子変異の蓄積)		
(論文内容の要旨) 研究の背景と目的： <i>Helicobacter pylori</i> (<i>H. pylori</i>) 感染に伴う慢性胃炎を背景として胃癌が発生することはよく知られているが、胃癌の発生機序についてはまだ不明な点が多い。これまでに、 <i>H. pylori</i> の持続感染による慢性炎症反応により、本来発現していない胃上皮細胞に遺伝子編集酵素 Activation-induced cytidine deaminase (AID) が発現誘導され、遺伝子変異やコピー数変化が生成、蓄積されることが、胃癌の発生に寄与していることが報告されてきた。そこで、本研究では、 <i>H. pylori</i> 感染による慢性胃炎粘膜に潜在する遺伝子異常の全体像を明らかにすることで、胃癌の発生機序を明らかにすることを目的とする。 方法： <i>H. pylori</i> 陽性の胃癌 5 症例の癌部ならびに非癌部胃炎粘膜について、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析を行った。コントロールとしては、各症例の末梢血のリンパ球分画から抽出した核酸を用い、個々の症例の一塩基多型 (SNP) を除外した。慢性胃炎組織に存在する頻度の低いゲノム異常を同定するために、 <i>H. pylori</i> 陽性の胃癌 28 症例及び萎縮性胃炎 6 症例について、胃炎組織における発癌関連遺伝子の deep sequencing 解析を行った。AID を持続発現させたヒト <i>TP53</i> ノックインマウスの胃粘膜におけるヒト <i>TP53</i> 遺伝子の deep sequencing 解析を行った。 結果： 全エクソン解析からは、胃癌部に平均 178 箇所、非癌部胃炎粘膜に平均 28 箇所の遺伝子変異が検出され、癌部だけでなく、慢性胃炎粘膜にもさまざまな遺伝子変異が蓄積していることが明らかとなった。 <i>H. pylori</i> 感染に伴う胃炎粘膜の deep sequencing 解析からは、胃癌症例 28 例中 11 例の胃炎粘膜に <i>TP53</i> 遺伝子変異が、4 例に <i>ARID1A</i> 遺伝子変異が存在することが分かった。さらに、胃炎症例 6 例中 4 例の胃炎粘膜においても <i>TP53</i> 遺伝子変異が生成していることが明らかとなった。一方、 <i>H. pylori</i> 陰性の正常胃粘膜にはそれらの遺伝子変異は検出されなかった。興味深いことに、それらの <i>TP53</i> 遺伝子変異のほとんどは、これまで胃癌で報告のある塩基部位と一致することも確認された。 次に、全エクソン解析にて得られた胃癌における遺伝子変異について、塩基変化パターンの解析を行ったところ、C:G>T:A 変異が 48.9% を占めることが分かった。さらに、C:G>T:A 変異の前後の配列を調べたところ、GpCpX 配列が有意に多い配列であることが明らかとなった。この配列は AID が変異を入れる時に特徴的な配列と言われている。また、萎縮性胃炎粘膜の deep sequencing 解析にて得られた <i>TP53</i> 遺伝子変異の塩基変化パターンの解析でも、やはり GpCpX 配列における C:G>T:A 変異が有意に多いことが明らかとなった。すなわち、胃癌部だけでなく非癌部胃炎粘膜における遺伝子変異パターンも AID に特徴的なパターンであることが明らかとなった。 最後に、胃粘膜でのヒト <i>TP53</i> 遺伝子変異生成における AID の役割をさらに明らかにするために、ヒト <i>TP53</i> 配列とマウス <i>Tip53</i> 配列を置換したヒト <i>TP53</i> ノックインマウスと、AID を恒常的に発現する AID トランスジェニックマウスを交配させ、12 月齢の胃粘膜に存在するヒト <i>TP53</i> 遺伝子変異について deep sequencing 解析を行った。7 匹中 6 匹の AID トランスジェニックマウスの胃粘膜にヒト <i>TP53</i> 遺伝子変異が存在することが明らかとなった。一方、野生型のヒト <i>TP53</i> ノックインマウスの胃粘膜には 6 匹中 1 匹にヒト <i>TP53</i> 遺伝子変異を認めたのみであった。興味深いことに、それらの変異部位のほとんどはヒト胃癌でよく見られる部位と一致するものであり、変異パターンも GpCpX 配列における C:G>T:A を呈していることが確認された。 考察： <i>H. pylori</i> 感染による慢性胃炎粘膜においては、発癌前から癌抑制遺伝子 <i>TP53</i> を含む様々な遺伝子に変異が蓄積していることが明らかとなった。また、 <i>H. pylori</i> 感染による胃発癌過程においては、遺伝子編集酵素 AID が遺伝子変異の生成に深く関与することが示唆された。			

(論文審査の結果の要旨)

胃癌は *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) 感染による慢性胃炎を背景に発生することが知られているが、その発癌機序については不明な点が多い。そこで申請者らは、胃癌の発生源地となる慢性胃炎粘膜に潜在する遺伝子異常を解析することにより、胃発癌過程で生じる遺伝子異常の生成機構についての検討を行った。

まず、*H. pylori* 感染による慢性胃炎粘膜に発生した胃癌およびその背景の慢性胃炎粘膜の全エクソン解析により、慢性胃炎粘膜にはさまざまな遺伝子異常が潜在することが明らかとなった。deep sequencing 解析からは、慢性胃炎粘膜には *TP53* 遺伝子変異が高率に潜在することが明らかとなった。これらの解析により同定された遺伝子変異の塩基変化パターンの検討からは、胃癌および *H. pylori* 感染による慢性胃炎粘膜に生じた遺伝子変異の多くは、遺伝子編集酵素 Activation-induced cytidine deaminase (AID) の作用に特徴的な塩基変化像を呈していることが分かった。そこで、ヒト *TP53* ノックインマウスと AID を恒常的に発現するトランスジェニックマウスの交配実験を行ったところ、胃粘膜に AID が恒常的に発現することにより、ヒト胃癌でよく見られる塩基部位に *TP53* 遺伝子変異が高率に生じることが確認された。

以上より、*H. pylori* 感染による慢性胃炎粘膜には *TP53* 遺伝子変異が潜在しており、その生成過程には遺伝子編集酵素 AID が深く関与している可能性が示唆された。

本研究は、*H. pylori* 感染による慢性胃炎における遺伝子異常の生成機序の解明に貢献し、胃癌研究の発展に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 26 年 7 月 9 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。

要旨公開可能日： 年 月 日以降