

京都大学	博士（医学）	氏 名	澤井 勇悟
論文題目	Activation-Induced Cytidine Deaminase Contributes to Pancreatic Tumorigenesis by Inducing Tumor-Related Gene Mutations (Activation-induced cytidine deaminase は腫瘍関連遺伝子に変異を誘導することにより膵腫瘍形成に寄与する)		
(論文内容の要旨)			
<p>膵癌は、様々な遺伝子変異の蓄積により形成されることが知られている。しかし、その遺伝子変異の導入機構については未だ不明な点が多い。近年、種々の癌における変異誘導物質とその誘導遺伝子変異のパターンには、密接な関連があることが示されてきた。遺伝子編集酵素である Activation-induced cytidine deaminase (AID) は、生理的条件下では B 細胞の抗体遺伝子座において、クラススイッチ組み換えと体細胞高頻度突然変異を誘導し、抗体遺伝子の多様化を制御している。一方、炎症条件下では上皮細胞に異所性に発現し、腫瘍関連遺伝子の変異誘導により、胃癌・肝細胞癌・肝内胆管癌などの発癌へ関与することが報告されている。本研究では、膵癌における遺伝子変異パターンの多くが AID によって誘導される変異パターンと一致していることに着目し、膵発癌への AID の関与について検討した。</p> <p>本研究では、膵癌の形成における AID の役割を明らかにすることを目的とし、膵癌を含む各種のヒト膵組織における AID 蛋白質の発現を免疫組織化学染色法により検討した。次に、AID 遺伝子を導入した AID transgenic (AID Tg) マウスを用い、AID の強制発現による膵組織の表現型について解析した。さらに、AID Tg マウス膵における腫瘍関連遺伝子の変異について、ディープシーケンス法、あるいはサンガーシーケンス法により検討した。ヒト膵癌の切除組織を用いた免疫組織化学染色法による検討では、膵癌周囲の Acinar-ductal metaplasia (ADM) や Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) といった膵前癌病変に、弱～中程度の AID 蛋白質の発現を認めた。また、膵浸潤癌では高頻度に強い発現を認めた。一方、ヒト慢性膵炎の切除組織における ADM や PanIN にも AID 蛋白質の発現を認めた。これらの AID 発現は核内の NF-κB 発現を伴っており、膵組織における炎症刺激が NF-κB の活性化を介して AID 発現を誘導した可能性が示唆された。AID Tg マウスにおける膵組織の表現型の検討では、月齢 6 か月より ADM を、また月齢 11 か月より PanIN を認め、これらの形成頻度は月齢を経るごとに増加した。一方で Wild type (WT: 野生型) マウスには ADM、PanIN といった前癌病変の出現は認められなかった。次に、AID Tg マウス膵における腫瘍関連遺伝子の変異を検討した。まず、月齢 13 か月の AID Tg マウスと WT マウスの全膵組織より DNA を抽出し、Kras、c-Myc、Trp53 の遺伝子変異をディープシーケンス法にて解析した。その結果、WT マウスにはいずれの遺伝子にも変異を認めなかったが、AID Tg マウスには Kras、および c-Myc 遺伝子に変異を認めた。さらに AID Tg マウス膵における遺伝子変異プロファイルを明らかにするため、月齢 13 か月の AID Tg マウスと WT マウスの膵組織より DNA を抽出し、全エクソームシーケンスを行った。その結果、AID Tg マウス膵において、42 遺伝子、117 か所の変異を認め、そのうち 37% が AID によって誘導される C:G&gt;T:A パターンであった。最後に、</p>			

*AID* Tg マウス膵に形成された ADM、および PanIN における遺伝子変異について検討した。*AID* Tg マウスの正常膵組織、ADM、PanIN、および *WT* マウスの正常膵組織を Laser capture microdissection にて分離回収し、DNA を抽出後に *Kras*、*c-Myc* および *Smad4* の遺伝子変異をサンガー法にて解析した。その結果、*WT* マウスの膵組織にはいずれの遺伝子変異も認められなかったが、*AID* Tg マウスの ADM および PanIN には、*Kras*、*c-Myc*、および *Smad4* 遺伝子のいずれにも変異が認められた。さらに、これらの *Kras* および *c-Myc* 遺伝子変異には、AID に特徴的な GpCpX あるいは ApCpX を背景とした変異が認められた。

以上の結果から、AID 発現は膵前癌病変の形成に関与すること、ならびに腫瘍関連遺伝子の変異生成に寄与する可能性が示唆された。*AID* Tg マウスは、従来の膵発癌モデルマウスと異なり、特定の腫瘍関連遺伝子の異常を導入することなく膵前癌病変を形成することから、膵発癌に関わる遺伝子変異の解析に有用なマウスモデルとなり得るものと考えられる。

（論文審査の結果の要旨）

膵癌は、様々な遺伝子変異が蓄積することにより、Acinar-ductal metaplasia (ADM) や Pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) といった前癌病変を経て、多段階に形成されることが知られている。しかし、その遺伝子変異導入機構については未解明な部分が多い。申請者は、膵癌における遺伝子変異パターンに加え、膵癌の形成に炎症が関与することに着目し、遺伝子編集酵素である Activation-induced cytidine deaminase (AID) の膵発癌への関与について検討した。

本研究では、ヒト膵組織を用いた検討により、AID 蛋白が ADM や PanIN といった膵前癌病変に発現していること、さらに膵浸潤癌部では高頻度に強発現していることが明らかとなった。また、*AID* transgenic (*AID* Tg) マウスを用いた検討により、*AID* Tg マウスの膵臓には ADM および PanIN が形成され、月齢と共に増加することが示された。さらに、これらの *AID* Tg マウスの膵前癌病変には、*K-ras*, *c-Myc*, *Smad4* などの腫瘍関連遺伝子の変異を認めることが明らかとなった。以上の結果から、AID 発現は膵前癌病変の形成に関与すること、ならびに腫瘍関連遺伝子の変異生成に寄与する可能性が示唆された。*AID* Tg マウスは、従来の膵発癌モデルマウスと異なり、特定の腫瘍関連遺伝子の異常を導入することなく膵前癌病変を形成することから、膵発癌機構の解析に有用なマウスモデルとなり得るものと考えられる。

以上の研究は膵発癌メカニズムの解明に貢献し、今後の膵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 28 年 1 月 18 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： 平成 年 月 日 以降