

審査の結果の要旨

氏名 王 凌 华

本論文は膵臓癌の遺伝子変異解析を行うことで、41 個の新規遺伝子変異を複数の症例において同定すると同時に、ミスマッチ修復遺伝子である **MLH1** の欠失が、遺伝子の挿入欠失変異を高頻度で生じさせ、これが膵臓癌の癌化のメカニズムに関与することを示した論文である。

膵臓癌は、先進国では第 4 位の癌関連死を引き起こす癌であり、最も悪性度が高く予後が悪い癌の一つで、その生存率は過去 20 年以上改善されていない。癌は DNA の変異の蓄積によって起こるとされ、90%以上の膵臓癌は癌細胞での遺伝子変異によって生じると考えられているが、その機構の詳細な解明はまだ不十分である。本論文では、15 症例の膵臓癌の臨床サンプルを用いて変異探索を行うことで膵臓癌の発生メカニズムの解明を試みており、研究対象として意義のある課題を実施している。

本論文では、翻訳エクソン領域のゲノム DNA をターゲットキャプチャー法にて濃縮したのちに大量並列シーケンス法を用いて解析することで、1,300 以上の遺伝子変異を効率的に同定することに成功している。その中で **KRAS**, **TP53**, **CDKN2A**, および **SMAD4** が高頻度で変異していること示したが、これは先行研究の結果と一致する。さらに本論文では 41 の新規遺伝子変異を同定し、これらの変異が膵臓癌の発生に関与する可能性について論じている。

大量並列シーケンス法は近年急速に進歩した手法で、その解析能力を考慮すれば、多数の新規遺伝子変異を同定することはそれほど困難なことではない。しかしながら、本論文では同じく大量並列シーケンサーを用いた mRNA シーケンスを実施することで 970 個所中 914 個所の変異の検証に成功し、mRNA シーケンス法は、大量並列シーケンサーによって生成された膨大な数の体細胞変異の検証のための効率的かつ高スループットな手法であることを示している。

さらに本論文では、癌細胞の突然変異率が検体間で大きく異なることに着目し、これがミスマッチ修復遺伝子のコピー数変化に相関していることを発見し

ている。MLH1 タンパク質は、哺乳類ではミスマッチ修復系複合体の重要なコンポーネントであることが知られているが、その遺伝子のホモ接合欠失はこれまでに膵臓癌では報告されていない。本論文では 15 例中 1 例の MLH1 ホモ接合欠失と 4 例のヘミ接合欠失を発見し、それらの検体での挿入欠失変異率が他の症例の 10-70 倍以上であること発見している。特に MLH1 遺伝子のホモ接合欠失を示すサンプルは、膵臓の膵管内乳頭粘液性腫瘍に由来する浸潤癌であるという特徴的な病理学的背景を持っており、挿入欠失変異率の劇的な増加がゲノム全域にわたる遺伝子の不安定さを引き起こし、多くのがん抑制遺伝子の機能不全が膵臓癌の悪性化に関与していることを示唆している。

一方、MLH1 を含む 3p 遺伝子座の片側アレルの欠失(LOH)は膵臓癌の約 30-40%、腎細胞癌の 80%以上で報告されているが、これらとゲノムの不安定性の増加の関連は本論文が初めて明らかにした点である。MLH1 欠失による不活性化は劣勢であると考えられており、片側アレルの欠失のみではミスマッチ修復機能が保存されていると考えられていた。しかし、本論文が明らかにしたところでは、一塩基置換の変異率は LOH のサンプルでは増加していないが、マイクロサテライト部位で不安定性を引き起こす挿入欠失変異率は LOH の検体で有意に増加していることを示している。さらに 3p 遺伝子座のコピー数と遺伝子変異率の関連を腎細胞癌のデータを用いて検証し、挿入欠失変異の増加が発癌の原動力となっていることを示している。

また本論文では、既報では MLH1 の不活性化が劣勢と考えられてきた原因として、従来方法でのマイクロサテライト不安定性の検出の技術的な困難さを指摘し、マイクロサテライト不安定性の検出におけるターゲットシーケンス法の有用性を考察している。

以上のように本論文は、ターゲットシーケンス法を用いることで、膵臓癌での新規の遺伝子変異を効率的に同定できることを示し、また、コピー数解析のデータなど他の解析手法のデータを統合的に解析することで、MLH1 遺伝子の欠失と遺伝子変異の関連という、単独では解析できなかった知見を得ている。さらに、MLH1 遺伝子の不活性化が挿入欠失変異の増加に優性に機能するという新しい学説を提示し、腎細胞癌のデータを用いることでその検証に成功している。

よって本論文は博士（工学）の学位請求論文として合格と認められる。