

## 炎症を背景とした消化器発癌過程におけるゲノム不安定性の生成機構の解明

Mechanism for genomic instability during inflammation-associated carcinogenesis

千葉 勉 (CHIBA TSUTOMU)

京都大学・大学院医学研究科・教授



### 研究の概要

消化器癌の多くは「炎症」を背景に発症する。一方、発癌には様々な遺伝子異常の蓄積が重要な役割を果たしている。本研究は、内因性の genome mutator である Activation-induced cytidine deaminase (AID) が、炎症発癌にどのように関与するのかを明らかにすることを目的とした。その結果、消化器の各種炎症臓器において AID が異所性に発現し、癌関連遺伝子に、変異や欠失など様々な遺伝子不安定性を誘発することによって、「炎症発癌」に深く関与していることが明らかとなった。

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：上部消化管学（食道、胃、十二指腸）、下部消化管学（小腸、大腸）、肝臓学

### 1. 研究開始当初の背景

消化器癌の発症には *H. pylori* や肝炎ウイルス感染などによる炎症の持続が重要な役割を果たしている。一方発癌過程では癌関連遺伝子に変異や欠失などの異常が生成蓄積する。遺伝子編集酵素の一つ AID は、正常では B 細胞にのみ発現し、免疫グロブリン遺伝子に somatic mutation を導入し、かつクラススイッチ組み換えを起こすことによって、その多様性獲得に必須の役割を果たしている。申請者らは、この AID が炎症からの発癌過程における遺伝子変異の蓄積に重要な役割を果たしている事実を明らかにしてきた。

### 2. 研究の目的

そこで本研究では、消化器系の炎症発癌において、遺伝子変異やゲノム不安定性が生じる機序、及びその意義について、AID に焦点をあてて明らかにすることを目的とした。

### 3. 研究の方法

- 1) 炎症からの消化器発癌における AID 関与の普遍性を明らかにする：バレット腺癌発症における AID の関与を検討し、炎症発癌における AID 関与の普遍性を明らかにする。
- 2) 炎症からの消化器発癌における AID の関与を AID-KO マウスで証明する：種々の炎症発癌モデルマウスに AID-KO を交配して、発癌がどのように影響されるかを検討する。
- 3) AID の標的遺伝子が各組織で異なる理由を明らかにする：AID-TG マウス、AID 導入

細胞を用いて各組織の AID 標的遺伝子を明らかにする。同時に癌関連遺伝子の転写及び翻訳レベルと変異導入効率との関連を検討する。

- 4) AID による遺伝子変異導入に対する修復系の関与を解析する：AID 導入細胞から遺伝子修復酵素 MSH2 や変異塩基を除去する酵素 UNG をノックダウンして、AID による変異導入がこれらの分子によっていかに修復されているのかをみて、AID の変異導入に対する修復系の関与を明らかにする。
- 5) AID の染色体不安定性への関与を検討する：AID-TG マウスさらに AID 導入細胞の染色体の変化を CGH 解析にて網羅的に検討する。
- 6) AID による遺伝子変異生成におけるメチル化の役割を解明する：AID はシトシン (C) を標的とするが、非メチル化 C とメチル化 C では変異導入効率が異なる可能性がある。そこでメチル化レベルと遺伝子変異の関連を臨床検体と AID-TG マウス組織で調べる。
- 7) 発癌母地としての組織幹細胞における AID の役割を明らかにする：各組織幹細胞に AID を発現させた TG マウスを作成し、幹細胞での AID 発現の意義を検討する。

### 4. これまでの成果

- 1) 逆流性食道炎からのバレット発癌における AID の関与が明らかとなった：GERD 粘膜、バレット粘膜、さらにバレット癌組織に、AID が異所性に発現している事実を認めた。一

方通常の食道扁平上皮癌、その背景粘膜ではAID発現はなかった。ヒト食道上皮細胞を用いた *in vitro* 実験で、デオキシコール酸によってNF $\kappa$ Bが活性化されAIDが発現誘導されることを認めた。以上GERD、バレット食道、バレット癌という食道の炎症発癌過程においてもAIDが関与していることが判明した

- 2) AIDのノックアウトによってIL10-KOマウスでの大腸癌発症が著明に抑制された：  
IL10-KO+AID-KOマウスを作成し、IL10-KOマウスの炎症発癌におけるAIDの役割を検討した。IL10-KOマウスでは炎症部位に一致して強いAIDの発現を認めた。このIL10-KOマウスに抗TNF $\alpha$ 抗体を投与したところ、大腸粘膜のAID発現は著明に抑制された。またIL-10KOでは27.2%で大腸癌が発症したのに対して、AID-KO+IL-10KOマウスでは4.3%しか発症しなかった。さらにIL10-KOマウスの大腸粘膜ではp53に高頻度に遺伝子変異を認めたがAID-KOマウスでは抑制されていた。
- 3) AIDによる変異パターン臓器特異性は遺伝子の転写レベルに依存していた：臨床検体等を用いて主要な癌関連遺伝子の変異の頻度を検討してきた。その結果、p53,  $\beta$  catenin, Pten, c-myc, k-ras, CDKN2A-CDKN2Bなど、各消化器臓器においてAIDがターゲットとする遺伝子が異なる事実が判明した。またこれらの遺伝子は、発現量が多い遺伝子ほど変異が生じやすい傾向を認めた。
- 4) AIDによる遺伝子変異の多様性に修復遺伝子MSH2が関与している可能性が示唆された：ヒト胃癌細胞株AGSにAIDを導入し、MSH2をsiRNAでノックダウンしてp53変異パターンを比較した。その結果MSH2のノックダウン細胞ではC/G to T/A変異以外の変異は激減した。以上より、MSH2はAIDによって生じる変異を修飾している可能性が示唆された。
- 5) AID発現によって欠失、重複などの遺伝子異常が導入されることが明らかとなった：*in vitro*実験で、ヒト胃上皮細胞株へのAID過剰発現によって、様々な遺伝子領域の欠失、重複が誘導された。興味深いことにAIDによって再現性をもって欠失が生じる領域にはCDKN2A-CDKN2B locusが含まれていた。またAID-TGマウス、さらに*H. pylori*長期感染マウスでは胃粘膜のCDKN2A-CDKN2B領域のDNAコピー数が明らかに減少していたが、AID-KOマウスではコピー数の減少を認めなかったことから、*H. pylori*感染によるDNAコピー数の減少はAID依存性であることが明らかとなった。
- 6) 発癌における組織幹細胞領域でのAID発現の重要性が示唆された：未熟肝細胞に発現しているTNAP特異的にAIDを発現させたマウスを作成したところ、通常AID-TGマウスよりも特異的に、かつ高頻度に肝癌発生を見た。以上の成績は、発癌における組織幹細胞の重要性を示唆するとともに、

AIDが幹細胞領域に発現することが、重要である可能性を示している。

## 5. 今後の計画

- 1) IgG4 関連膵炎でも膵癌の合併が多い。このためIgG4 関連膵炎の発癌例について、AID関与の可能性を検討する。
- 2) HCV全長を肝細胞に発現するconditional TGマウスとAID-KOマウスの交配をおこない、HCV肝炎からの肝発癌におけるAIDの役割をさらに追求する。
- 3) AID-KOマウスでは免疫グロブリンのクラススイッチが生じず高IgM血症を呈するため、免疫異常が発癌に影響する可能性が否定できない。このため消化管上皮や肝細胞特異的なAID-KOマウスを作成して、AID-KOの影響を検討する。
- 4) AIDによる遺伝子変異の全体像を包括的に把握するために、次世代シーケンサーを用いた大規模遺伝子解析をおこなう。
- 5) AID-TG + MSH2-KOマウスを作成し、MSH2のAIDによる変異に及ぼす影響を検討する。
- 6) HCV肝発癌における染色体不安定性について、AID-TGマウス、ヒト肝細胞株、臨床検体を用いて検討する。
- 7) 次世代シーケンサーを用いたエピゲノム解析によってAIDによる遺伝子変異誘導とメチル化の関係を明らかにする。
- 8) 肝、腸上皮、胆管上皮の幹細胞マーカーであるEpiCAM, Lgr5, Sox9に特異的なAIDマウスを作成して、幹細胞でのAID発現の発癌における意義を検討する。

## 6. これまでの発表論文

1. Okuyama S, Marusawa H, Ueda Y, Chiba T, et al.: Excessive activity of apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide 2 (APOBEC2) contributes to liver and lung tumorigenesis. *Int J Cancer* 2011 (in press)
2. Marusawa H, Takai A, Chiba T: Role of activation-induced cytidine deaminase (AID) in inflammation-associated cancer development. *Adv Immunol* 2011 (in press).
3. Watanabe T, Chiba T, Strober W, et al.: NOD1 contributes to mouse host defense against *Helicobacter pylori* via induction of type I IFN and activation of the ISGF3 signaling. *J Clin Invest* 120: 1645-1662:2010.
4. Matsumoto Y, Marusawa H, Chiba T, et al.: Up-regulation of activation-induced cytidine deaminase causes genetic aberrations at the CDKN2b-CDKN2a in gastric cancer. *Gastroenterology* 139: 1984-1994:2010.
5. Takai A, Marusawa H, Chiba T, et al.: A novel mouse model of hepatocarcinogenesis triggered by AID causing deleterious p53 mutations. *Oncogene* 28:469-478:2009.