

審査の結果の要旨

氏名 久保 絵美

本研究は、低頻度点突然変異の測定法を活用・改良することにより、肺がんのリスク因子である喫煙に曝露した正常肺組織において既に突然変異が蓄積していることを明らかにすることを試みたものであり、下記の結果を得ている。

1. 既に胃や食道で確立されている 100 コピー法を用いて、正常肺組織における低頻度点突然変異の蓄積を解析した。その結果、喫煙歴のない正常肺組織 (Group 1 : G1) (n= 24) では  $1.9 \pm 0.5 \times 10^{-5}/\text{base}$  (平均  $\pm$  SD)、喫煙歴のある正常肺組織 (Group 2 : G2) (n= 19) では  $2.2 \pm 0.5 \times 10^{-5}/\text{base}$ 、喫煙歴のある肺がん患者の非がん部組織 (Group 3 : G3) (n= 34) では  $2.3 \pm 1.1 \times 10^{-5}/\text{base}$  の頻度で点突然変異が蓄積していることが示された。G1 群と G2 群の比較により、喫煙により低頻度点突然変異の蓄積量が増加していることが示された ( $P= 0.039$ ; Welch's t test)。一方、3 群間のリスクに応じた増加は、有意には認められなかった ( $P= 0.224$ ; Jonckheere-Terpstra trend test)。
2. より高精度に低頻度の点突然変異を測定するために分子バーコード (unique molecular indices; UMI) を導入した。single-stranded damage の検出を避けるために、両鎖において同一の variant が検出された場合に変異とした。また、PCR とシーケンスのエラーを避けるために、1 UMI あたり 10 リード以上で決定した variants の中で、反対方向からも variant がある ( $\geq 1$  リード/UMI) ものを、変異として抽出した。一方、解析した各塩基 position における UMI 数の総和を解析した全体の塩基数とした。変異原性物質 (4NQO) を投与した TK6 lymphoblast と、非投与の TK6 lymphoblast から抽出した DNA をサンプルに用い、変異頻度の上昇、特有の塩基置換割合の上昇を検出できた。
3. 低コスト化及び信頼性向上の目的で、シーケンサーを Ion Proton から HiSeq に変更した。1 UMI あたり 2 リード以上で決定した variants の中で、反対方向からも variant がある ( $\geq 1$  リード/UMI) ものを、変異として抽出した。また、稀な点突然変異と SNP とを区別するために、各塩基 position において variant UMI の頻度が 10% 以上であった variant を除いた。一方、全検体において 30 UMI ( $\geq 2$  リード/UMI) 以上が得られた塩基 position を抽出、前述の SNP が疑われる塩基 position を除いて、解析対象塩基 position とした。解析対象塩基 position における全 UMI 数 ( $\geq 2$  リード/UMI) の総和を解析した全体の塩基数とした。なお、サンプル間の解析条件をそろえ

る目的で解析対象塩基 position 数が 300 万未満の症例と 500 万を超える症例は除いた。その結果、G1 群 (n= 11) は  $4.3 \pm 2.8 \times 10^{-6}/\text{base}$  (平均  $\pm$  SD)、G2 群 (n= 12) は  $6.8 \pm 3.7 \times 10^{-6}/\text{base}$ 、G3 群 (n= 16) は  $7.1 \pm 3.5 \times 10^{-6}/\text{base}$  の頻度で点突然変異が蓄積していることが示された。3 群間のリスクに応じた増加は、傾向が認められたのみであった ( $P= 0.097$ )。しかし、G1 群と G2+G3 群の比較により、喫煙により超低頻度点突然変異の蓄積量が増加していることが示された ( $P= 0.039$ )。

4. Infinium HumanMethylation450 BeadChip を用いてゲノム網羅的に DNA メチル化異常の蓄積を測定した。G3 群の (n= 2) と G1 群 (n= 3) における DNA メチル化レベルの変化を全プローブについてマッピングした結果、全体で明らかな差は認められなかった。肺がんにおける発がんの場として、メチル化異常の蓄積は明らかではないと考えられた。

以上、本論文は、一見正常に見える肺組織において、喫煙により低頻度の点突然変異が蓄積していることを明らかにし、発がんリスク上昇と関連している傾向を示唆した。一方で、少ない症例数ながら、喫煙によるメチル化異常蓄積の増加はほとんどなく、胃や食道とは異なっていることも示唆した。さらに、本研究で高精度化した解析法は更に改良の余地があるものの、今後様々な発がんの場の研究に重要な貢献をなすと考えられる。よって本論文は学位の授与に値するものと考えられる。