

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07133

研究課題名(和文)非腫瘍組織における加齢性遺伝的変化の解析 - がん間質発生機序との関連を探る -

研究課題名(英文)Analysis of age-related genetic changes in non-tumour tissues - Investigating links to mechanisms of cancer-associated fibroblast development

研究代表者

梅津 知宏 (Umezu, Tomohiro)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：40385547

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：臨床サンプルを用いた非腫瘍部と腫瘍部との全エクソーム解析、およびがん間質だけでなくその個体における加齢性遺伝的変化の検出を目的とし、cell free DNA (cfDNA) からの体細胞変異の抽出を行った。その結果、癌患者由来cfDNAだけでなく健康者由来cfDNAからもVUSを含む体細胞変異が検出された。また、健康者由来cfDNA特有のmutational signatureの存在を確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の最大の成果として、非腫瘍組織における加齢に伴って蓄積する遺伝的変化(ゲノムの傷)と、CAFを含むがん微小環境が誘導する発がんとの関与が示唆された。これらの加齢性の体細胞変異を標的とした発がんの超早期診断の開発として、非侵襲性の高いLiquid biopsyとしてのcell free DNAから検出できる可能性が示された。今後はがん間質細胞を標的とした新規治療法の開発へと繋げていく。

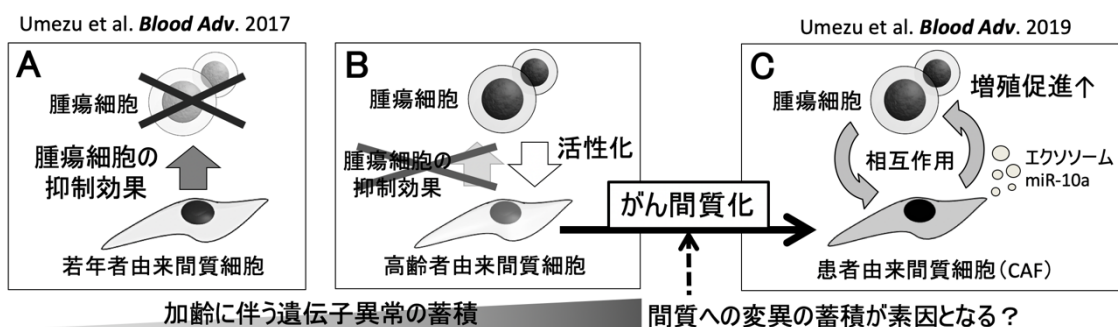
研究成果の概要(英文)：Somatic mutations were extracted from cell free DNA (cfDNA) with the aim of analysing the whole exome between non-tumour and tumour areas using clinical samples and detecting age-related genetic changes in the individual as well as in the cancer stroma. As a result, somatic mutations including VUS were detected not only in cfDNA from cancer patients but also in cfDNA from healthy individuals. In addition, the presence of a mutational signature specific to cfDNA from healthy individuals was confirmed.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：がん間質 cell free DNA mutational signature

1. 研究開始当初の背景

(1) これまでの科研費 (H25-25 科研費若手 B, H27-29, H30-R2 科研費基盤 C) による研究で「がん関連間質細胞の発生機序」の解明を目指し、独自の *in vitro* モデル系を用いて解析を進めてきた。間質細胞の加齢に伴う機能変化と機能低下が「がん間質化」の要因となっているのではないかと仮説を立て、若年および高齢健康者由来間質細胞を用いてその加齢性変化について解析した。さらに、腫瘍細胞との共培養により健康者由来間質をがん間質へと誘導を試みた。その過程で健康者由来間質細胞の「防御力」の高さに気づき、特に若年者由来間質細胞が放出するエクソソームには「腫瘍血管新生を抑制する miRNA (miR-340)」が内包されていることを見出した (Umezu et al. *Blood Adv.* 2017;1:812-823)。また、がん患者由来間質細胞 (CAF) が特異的に放出しているエクソソーム miRNA (miR-10a) を見出し、さらにこのエクソソームの放出を阻害すると CAF のアポトーシスが誘導された。すなわち、CAF が自身の増殖に邪魔な miR-10a を排出するのと同時に腫瘍細胞の増殖をサポートしていることが示唆された (Umezu et al. *Blood Adv.* 2019;3:3228-3240)。このように、健康者とがん患者由来間質細胞の特徴や機能の違い、加齢性変化についてシークレットーム解析を中心に紐解いてきたが、何がその変化の起因となっているのか判明していない。



(2) がん発症には加齢 (aging) が深く関わっている。加齢に伴い細胞の DNA 修復能が低下し、修復しきれなかった損傷がゲノムに蓄積していき、ゲノム不安定性が誘発されると考えられている。実際に、一見正常な組織や細胞でも加齢に伴った遺伝子異常が検出されたとの報告が散見される。たとえば、骨髄異形成症候群 (MDS) に関連する体細胞遺伝子変異が、40 歳代の血球細胞ではほとんど見られないのに対し、70 歳になると 2%、90 歳以上では 18.4%と、血液に異常のない高齢者で頻出する。この状態は CHIP (clonal hematopoiesis of indeterminate potential) という血液領域の新しい疾患概念として定義された (*Blood.* 2017;129:3371-3378)。このような加齢に伴う正常組織でのクローン性増殖は、食道上皮 (*Nature.* 2019;565:312-317) や皮膚のメラノサイト (*Nature.* 2020;585:600-605) でも見つかっている。しかし、これらの解析は加齢を伴った「組織」での解析であり、遺伝子異常が生じているのは上皮なのか間質なのか細胞種は特定されていない。上皮系腫瘍に比べると肉腫などの間質系の腫瘍は発生頻度がかかなり低いことから、間質細胞は遺伝的に安定で DNA 修復能力が高いのかもしれない。しかし、高齢者の生体内では組織損傷の修復、慢性的な炎症によって間質細胞も増殖および活性化を繰り返していると思われ、加齢に伴って間質細胞のゲノム上にも傷が蓄積していく可能性はありうる。

2. 研究の目的

最近の研究において、一見正常な組織・細胞でも加齢に伴った遺伝子異常の蓄積が見つかり、それらが高齢者でのがん好発メカニズムに関与することが示されている。そこで、本研究の目的として、①がん間質における遺伝的变化 (体細胞変異) の有無を明らかにし、②間質細胞における加齢性の遺伝子異常が「がん間質化」の素因となっているか証明する。本研究は CAF を含むがん微小環境側の細胞における体細胞変異解析を、病理学講座所属という地の利を活かして肺がんをはじめとした複数のがん種を用いて行う。

3. 研究の方法

① エクソーム解析によるがん間質の体細胞変異の検出

対象：肺がん (40 歳代、50 歳代、60 歳代、70 歳代、80 歳代)

病型：Stage IV、Stage III、Stage II、Stage I

DNA 抽出および NGS ライブラリ調整：中央検査室で保存管理されている FFPE ブロックより腫瘍組織を切片化し、マイクロダイセクションで、[腫瘍部の間質部分][非腫瘍部の間質部分]を採取する (がん変異検出のコントロールとして腫瘍部分も採取しておく)。各サンプルから DNeasy FFPE mini kit (Qiagen) を用いて DNA 抽出を行い、エクソームシーケンス用のライブラリーは SureSelect XT HS2 kit (Agilent、ユニークデュアルインデックスを用いてインデックスホッピングを防ぎ、検出頻度が低いことが予想されるので分子バーコードを挿入) を用いて作製する。

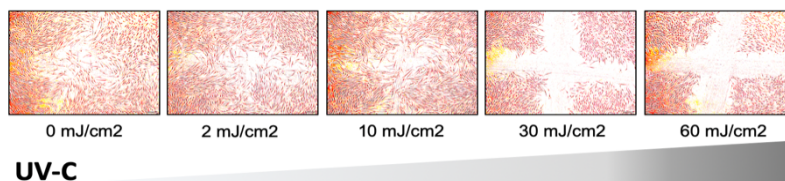
エクソームシーケンスおよびデータ解析：当研究室設置の NextSeq2000 (Illumina) を使用し、解析は既設の DRAGEN プラットフォームで行う。

### ② 患者由来血漿中 DNA (cell free DNA; cfDNA) のエクソーム解析による加齢に伴う体細胞変異の検出

患者由来血漿からの cfDNA 抽出および NGS ライブラリ調整：2NA-EDTA 管で採血された患者血液から遠心分離により血漿成分を回収する。MiniElute ccfDNA isolation kit (Qiagen) を用いて cfDNA を回収し、TapeStation D1000 にて泳動を行い 170bp にピークを示すバンドを確認する。エクソームシーケンス用のライブラリーは SureSelect XT HS2 kit (Agilent) を用いて作製する。エクソームシーケンスおよびデータ解析：当研究室設置の NextSeq2000 (Illumina) を使用し、解析は既設の DRAGEN プラットフォームで行う。

### ③ がん間質誘導モデル系を用いたメカニズム解析

加齢 (aging) による変化が、組織内の老化 (senescence) 細胞の蓄積による個体・組織の老化と想定し、間質細胞における加齢性の遺伝子異常を擬似的に誘導するため、ヒト正常皮膚繊維芽細胞 (NHDF, LONZA) に UV、放射線、化学物質を低照射、低濃度で持続的に処理する培養モデル系を構築する。予備実験において、NHDF に細胞老化を誘導しつつ継代維持可能な UV 照射強度の条件を既に確認済みである。この老化誘導型 NHDF のエクソーム解析の結果、UV 照射による損傷と修復の繰り返しで生じたと考えられるゲノム上の variant が確認されている。この遺伝子異常が蓄積された NHDF と正常 NHDF を腫瘍細胞株 (メラノーマ由来など) と共培養してがん間質化を試みる。共培養系は直接接触型、カルチャーインサートを用いた非接触型を検討し、SASP (Senescence-associated secretory phenotype) や  $\alpha$ -SMA の発現量・分泌量の変化を指標にがん間質化をモニタリングする。マトリゲルを用いて腫瘍細胞と混合してヌードマウス皮下に移植し、生体内での挙動を確認する。

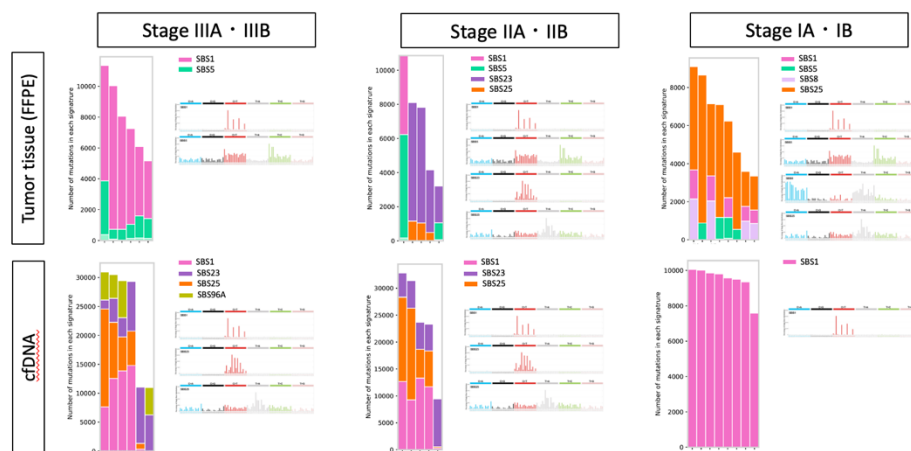


## 4. 研究成果

本研究では、「加齢に伴う遺伝的变化が (上皮系のいわゆる「癌」のタネになる細胞種だけでなく) 間質系の細胞にも生じているのではないか」「加齢性の遺伝的变化の生じた間質細胞が、一見正常に見える前がん病変の微小環境を形成しているのではないか」との着想から、臨床サンプルを用いた全エクソーム解析と培養モデル系によるメカニズム解析によって、これまで一定の見解を示すことのできていなかったがん関連間質細胞の遺伝的变化について明確な解答を導き出すことを目的とした。

初年度 (R3 年度) では、研究計画に従い肺癌患者 23 検体、膵癌患者 10 検体 (FFPE 切片) を用いてエクソーム解析を行った。非腫瘍部の間質系組織をマイクロダイセクションで単離し、腫瘍部との体細胞変異を比較検討した。腫瘍部では、KRAS, TP53, PIK3CA, SMAD4 などのドライバー変異が抽出された。一方、間質組織からも体細胞変異が抽出されたものの、いわゆる上記のようなドライバー変異は検出されず、VUS 変異 (variant of uncertain significance) と考えられた。

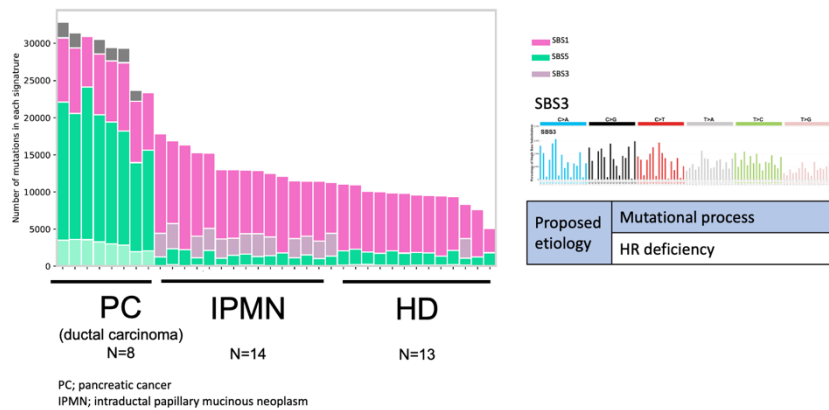
一方、がん間質だけでなくその個体における加齢性遺伝的变化の検出を目的し、cell free DNA (cfDNA) からの体細胞変異の抽出も行った。その際、ctDNA (circulating tumor DNA) を検出するような deep sequencing



sequencing は行わず、通常のカバレッジ (x300-500) で解析することにより癌患者の正常細胞由来体細胞変異の検出を行えると予想のもと解析を行った。その結果、腫瘍組織における mutational signature では、病型ごとに (Stage III, Stage II, Stage I) 特徴的なパターンを示していた (上図) が、cfDNA を用いた mutational signature 解析では、Stage I では特徴的な signature が検出されなかった (次頁図)。一方、膵癌患者検体において、IPMN (前癌病変) で特徴的な mutational signature のパターン (Signature 3) が観察された。

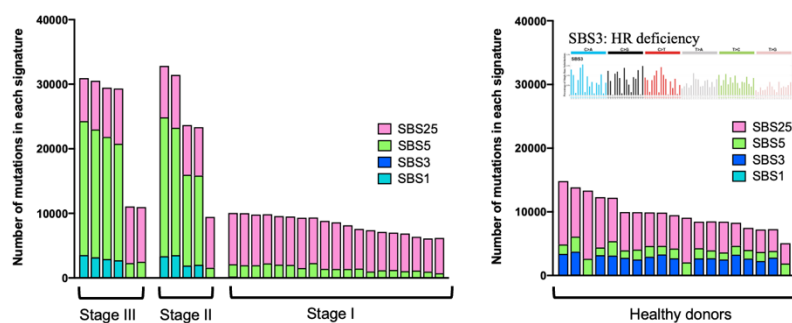
さらに、癌患者由来 cfDNA だけでなく健常者由来 cfDNA からも VUS を含む体細胞変異が抽

出された。R4 年度では、この VUS 変異およびその病態に関与が不明であるパッセンジャー変異に注目して解析を進めた。がん間質だけでなくその個体における加齢性遺伝的変化の検出を目論み、cell free DNA (cfDNA) からの体細胞変異の抽出を行った。その結果、癌患者由来 cfDNA



だけでなく健常者由来 cfDNA からも VUS を含む体細胞変異が抽出された。この意義不明の変異を可視化および意義付けするために、SigProfiler を用いて mutational signature 解析を行った。肺癌患者および健常者由来 cfDNA を用いて行ったエクソームシーケンスの VCF ファイルを用いて de novo および COSMIC にカタログ化された mutational signature へのアノテーションを行い、健常者由来 cfDNA 特有の mutational signature の存在を確認した。

最終年度では、この cfDNA から抽出された体細胞変異 (特に single nucleotide variants: SNVs) について SigProfiler を用いて mutational signature 解析を行った結果から、肺癌患者および健常者由来 cfDNA を用いて行ったエクソーム解析データを用いて



Increased number of variants associated with SBS5 in cfDNA derived from Stage III and Stage II lung cancer patients.

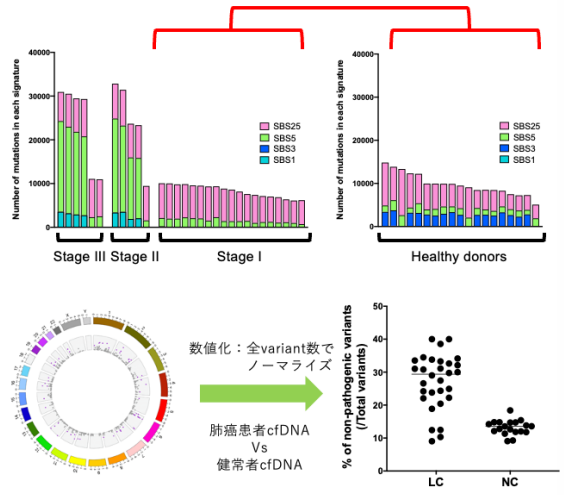
SBS3 was prominently detected in cfDNA from healthy donors

mutational signature へのアノテーションを行い、健常者由来 cfDNA 特有の mutational signature の存在を確認した。さらに、signature のような変異「パターン」ではなく、変異の「位置」にも特徴があるのではないかと推測し、ゲノム上の SNVs が存在する位置情報を解析し、肺癌患者 (特に Stage I) と健常者においてそれぞれに特徴的な変異蓄積領域が存在することを見出した。

cfDNAから「正常細胞」由来DNAに蓄積した変異variantの検出を試みる。

- Mutational signatureでの比較では、Stage I 肺癌患者と健常者に顕著な差が見られない。
- がん遺伝子領域に絞って解析すると、肺がん患者由来cfDNAの方が変異variantが多く検出された。

全遺伝子領域における変異数を解析 Stage I 肺癌患者群 vs 健常者群



数値化：全variant数でノーマライズ  
肺癌患者cfDNA Vs 健常者cfDNA

% of non-pathogenic variants (Total variants)  
LC NC



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Yoshida M, Matsuzaki J, Fujita K, Kimura M, Umezu T, Tokuda N, Yamaguchi T, Kuroda M, Ochiya T, Saito Y, Kimura K.	4. 巻 14(1)
2. 論文標題 Plasma extracellular vesicle microRNAs reflecting the therapeutic effect of the CBP/ -catenin inhibitor PRI-724 in patients with liver cirrhosis.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 6266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-024-56942-1.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takamizawa S, Kojima J, Umezu T, Kuroda M, Hayashi S, Maruta T, Okamoto A, Nishi H.	4. 巻 20(2)
2. 論文標題 miR-146a-5p and miR-191-5p as novel diagnostic marker candidates for ovarian clear cell carcinoma.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Mol Clin Oncol.	6. 最初と最後の頁 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/mco.2023.2712.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Umezu T, Tanaka S, Kubo S, Enomoto M, Tamori A, Ochiya T, Taguchi YH, Kuroda M, Murakami Y.	4. 巻 7(2)
2. 論文標題 Characterization of circulating miRNAs in the treatment of primary liver tumors.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Rep	6. 最初と最後の頁 e1964
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/cnr2.1964.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Naito S, Nakamura I, Umezu T, Hata A, Madarame A, Uchida K, Koyama Y, Morise T, Yamaguchi H, Kono S, Sugimoto M, Kawai T, Harada Y, Kuroda M, Fukuzawa M, Itoi T.	4. 巻 4(1)
2. 論文標題 Effect of COVID-19 infection on the gastrointestinal tract considering preventive methods during endoscopic procedures.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 DEN Open.	6. 最初と最後の頁 e290
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/deo2.290.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Furusaka Y, Inoue S, Mizoguchi I, Hasegawa H, Katahira Y, Watanabe A, Sakamoto E, Sekine A, Miyakawa S, Umezu T, Owaki T, Yoneto T, Yoshimoto T.	4. 巻 114(6)
2. 論文標題 Potent antitumor effects of the conditioned medium of bone marrow-derived mesenchymal stem cells via IGFBP-4.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 2499-2514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15789.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Watanabe N, Umezu T, Kyushiki M, Ichimura K, Nakazawa A, Kuroda M.	4. 巻 73(3)
2. 論文標題 Optimal DNA quality preservation process for comprehensive genomic testing of pediatric clinical autopsy formalin-fixed, paraffin-embedded tissues.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pol J Pathol	6. 最初と最後の頁 255-263.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5114/pjp.2022.124492.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suzuki K, Igata H, Abe M, Iwanaga T, Kanzaki H, Kato N, Tanaka N, Kawasaki K, Matsushita K, Samashima R, Tsukino K, Yokomizo A, Miyashita Y, Sumiyoshi I, Takahashi K, Serizawa N, Tomishima K, Umezu T, Kuroda M, Yamamoto Y, et al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Multiple cancer type classification by small RNA expression profiles with plasma samples from multiple facilities.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15309.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計15件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Tomohiro Umezu, Akira Saito, Masahiko Kuroda
2. 発表標題 Analysis of Mutation Signatures Involved in Colorectal Cancer Prognosis
3. 学会等名 第112回日本病理学会学術集会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Tomohiro Umezu, Yujin Kudoh, Yoshihisa Shimada, Tatsuo Ohira, Yoshiki Murakami, Norihiko Ikeda, Masahiko Kuroda
2. 発表標題 Identification and biological significance of de novo mutational signatures in cfDNA derived from lung cancer patients
3. 学会等名 第8回Liquid biopsy研究会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yoshiki Murakami, Tomohiro Umezu, Shogo Tanaka, Shoji Kubo, Masaru Enomoto, Akihiro Tamori, Takahiro Ochiya, Y-h Taguchi, Masahiko Kuroda
2. 発表標題 Circulating miRNA analysis of hepatocellular carcinoma induced by chronic liver disease C after clearance of HCV
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomohiro Umezu, Yujin Kudoh, Yoshihisa Shimada, Tatsuo Ohira, Yoshiki Murakami, Norihiko Ikeda, Masahiko Kuroda
2. 発表標題 Identification and biological significance of de novo mutational signatures in cfDNA derived from lung patients
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梅津知宏、黒田雅彦
2. 発表標題 リキッドバイオプシーを用いたがんゲノム医療の新しい展開ーパッセンジャー変異の意義と臨床応用ー
3. 学会等名 第131回東京脳腫瘍研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梅津知宏、斎藤彰、黒田雅彦
2. 発表標題 大腸癌予後に関与するMutation Signatureの解析
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 梅津知宏、樋口恒星、高梨正勝、大野慎一郎、原田裕一郎、黒田雅彦
2. 発表標題 アセロラ果汁由来小胞を担体とした薬物脳内デリバリーの試み
3. 学会等名 第9回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 村上善基、梅津知宏、中嶋弘一、田口善弘、黒田雅彦
2. 発表標題 エクソソーム中miRNAによる潜在性結核診断法の開発
3. 学会等名 第9回日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 齋藤彰、梅津知宏、黒田雅彦
2. 発表標題 AIによる病理組織形態解析とゲノム変異解析の融合
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年



1. 発表者名 梅津知宏, 工藤良平, 村上善基, 大野慎一郎, 工藤勇人, 池田徳彦, 黒田雅彦
2. 発表標題 Cell-free DNAから前癌病変に特徴的なmutational signatureの同定とリキッドバイオプシーへの応用
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梅津知宏, 黒田雅彦
2. 発表標題 正常細胞および腫瘍細胞のCell-free DNAの産生メカニズムの解明とLiquid biopsyへの応用
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 梅津 知宏、斎藤 彰、工藤 勇人、嶋田 善久、大平 達夫、池田 徳彦、黒田 雅彦
2. 発表標題 血中遊離DNAからのmutational signatureの検出と非侵襲性早期診断システムの開発
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomohiro Umezu, Yoshiki Murakami, Masahiko Kuroda
2. 発表標題 Analysis of miRNA expression in liver and blood in precancerous state of hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 The 80th Annual Meeting of the Japan Cancer Association
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅津 知宏、高梨 正勝、大野 慎一郎、原田 裕一郎、黒田 雅彦
2. 発表標題 経口投与によるアセロラ果汁由来小胞のDDS担体としての有用性
3. 学会等名 The 8th Annual Meeting of the Japanese Society for Extracellular Vesicles
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 梅津 知宏、工藤 勇人、嶋田 善久、大平 達夫、池田 徳彦、黒田 雅彦
2. 発表標題 血中遊離DNAにおけるゲノムsignatureの検出および早期診断・再発リスク予測システムの開発
3. 学会等名 第62回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関