

令和 6 年 6 月 21 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2022～2023

課題番号：22K19457

研究課題名（和文）ヒト食道上皮細胞の形質転換メカニズムの解明

研究課題名（英文）Study of the mechanism of transformation in human esophageal epithelial cells

研究代表者

垣内 伸之（Kakiuchi, Nobuyuki）

京都大学・白眉センター・特定准教授

研究者番号：90839721

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究により、食道ヨード濃染部(Normal)においても、TP53変異は存在するが、3番染色体のコピー数異常を伴うことは少ないのに対して、LVL-NDにおいては、2サンプルを除いて、食道ドライバー変異を有しており、TP53変異が65%で最も多く認められ、TP53変異を認めたLVL-NDでは、3番染色体短腕のコピー数loss、3番染色体長腕のコピー数 gainのbroad CNVを高頻度に認めており、これらの変化を有することで、ヨード不染のphenotypeを獲得する、すなわち、がんの起源が形成されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

わが国の死亡原因第1位はがんであり、食道がんは男性において7番目に多く、男女併せて年間約1万人強が死亡している。これまでの研究により、正常食道上皮は加齢や食道がんリスク因子への暴露によりがんドライバー変異クローンによって再構築されることが判明したが、正常上皮から異型上皮への形質転換メカニズムについては未だ詳細は不明であった。本研究により、発がん最初期におけるヒト食道上皮細胞の形質転換メカニズムの一旦が解明され、食道がんの発がん予防や発症前治療の開発に資する知見を得ることが出来た。

研究成果の概要（英文）：This study revealed that while TP53 mutations exist in iodine-stained areas of the esophagus (Normal), abnormalities in chromosome 3 copy number are rare. In contrast, in LVL-ND, esophageal driver mutations were present in all but two samples, with TP53 mutations being the most common, observed in 65% of cases. LVL-ND samples with TP53 mutations frequently exhibited broad CNVs, including loss of the short arm of chromosome 3 and gain of the long arm of chromosome 3. These changes suggest that acquiring these alterations leads to the iodine-unstained phenotype, indicating the formation of cancer origins.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：食道がん クローン進化 ドライバー変異 前がん病変

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

最近、血液や皮膚などの組織において、一見正常な組織にも加齢に伴って遺伝子異常が蓄積し、がんで観察されるような遺伝子異常を有するクローンが拡大しており、発がんリスクとなっていることが明らかとなった。申請者らはこのような知見に着目し、加齢、喫煙・飲酒といった環境因子や炎症によって遺伝子変異クローンが選択され拡大し、また、時に腫瘍への進展においては特定の遺伝子変異クローンは陰性選択されうる事を明らかにした(横山、垣内ら、Nature 2019 565 (7739) 312-317、垣内ら、Nature 2020 577 (7789) 260-265)。これらの知見は、多細胞生物であるわれわれヒトを構成する細胞は、しばしば 100 年にわたる個体の生涯の間、正常組織においても時間経過や環境因子によって絶えず遺伝子変異を蓄積し続け、細胞同士は増殖速度の違いから必然的に相互に陽性選択(クローン拡大)もしくは陰性選択(自然淘汰)されるという自然選択の原理に従うことを示している。

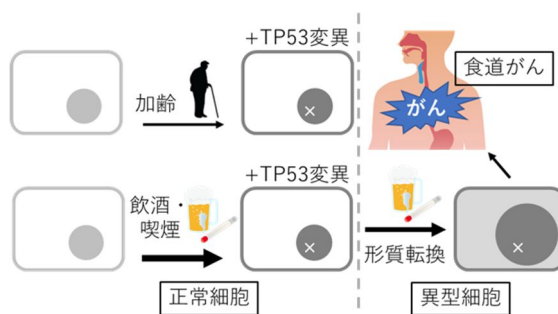
これらの発見により正常組織における発がんの起源クローンの存在が明らかとなったが、がんに至るためには正常細胞は腫瘍細胞へと形質転換し、臓器の組織構築を破壊して浸潤する必要がある。ゲノム異常の観点からは正常細胞にも初期の腫瘍細胞にも同程度のドライバー変異が観察されることがしばしばあり、両者の違いを生じせしめる分子機序については未だ不明であった。

### 2. 研究の目的

わが国の死亡原因第 1 位はがんであり、食道がんは男性において 7 番目に多く、男女併せて年間約 1 万人強が死亡している。申請者らのこれまでの研究により、正常食道上皮は加齢や食道がんリスク因子への暴露によりがんドライバー変異クローンによって再構築されることが判明したが、正常上皮から異型上皮への形質転換メカニズムについては未だ詳細は不明である。本研究では微小検体採取技術とゲノム・トランスクリプトーム同時解析技術を用いて、発がん最初期におけるヒト食道上皮細胞の形質転換メカニズムを解明し、食道がんの発がん予防や発症前治療の開発に資する知見を得ることを目的とする。

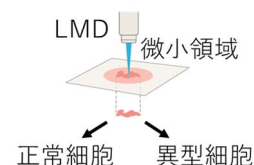
### 3. 研究の方法

近年、正常組織においても既にごんと観察される遺伝子変異(ドライバー変異)を獲得した細胞集団(クローン)が拡大していることが明らかとなり、申請者らは正常食道におけるドライバー変異クローンの拡大について世界に先駆けて報告した。これによれば、飲酒・喫煙といった食道がんリスク因子に暴露されていない発がん低リスク群においても TP53 遺伝子変異クローンが検出されたが、これらの遺伝子変異クローンは病理組織学的に異型性を呈さず、周囲の野生型正常細胞と形態学的に区別する事が困難であった。一方、食道がんリスク因子に暴露された発がん高リスク群においては、低リスク群と同様に TP53 遺伝子変異クローンが検出されたが、これらの一部は細胞異型を示し、食道上皮内腫瘍を形成していた(右図)。このことは、ゲノム異常の観点から差異がない細胞において、形質転換を制御する機構の存在を示唆している。このメカニズムを解明するため、以下の通り研究を計画した。



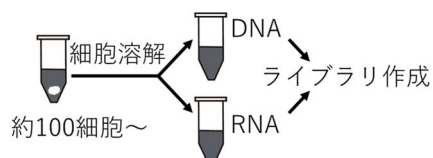
#### (1) 検体採取

上部消化管内視鏡検査を受ける患者より同意を得た上で食道粘膜を通常の生検法で採取する。採取した食道粘膜は核酸に影響がないアルコールベースの固定液により固定し、パラフィン包埋を行う。10um 厚の切片を作成し、核酸に影響が少ない変法 HE 染色を行い、病理学的評価を行った上で異型上皮とその周辺の非異型上皮をレーザーマイクロダイセクションによりそれぞれ採取する(右図)。

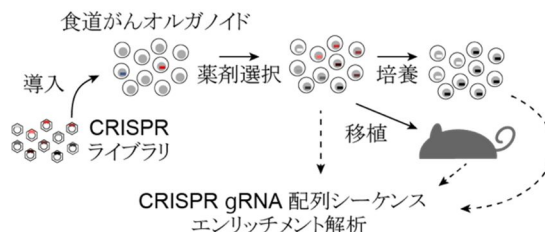


#### (2) ゲノム・トランスクリプトーム同時解析

微小領域には少数の細胞しか含まれておらず、DNA は 1 細胞あたり常染色体で 2 分子しか存在しないことから、微小検体のゲノム解析は従来困難とされてきた。申請者はこの問題の解決に取り組んだ結果、DNA 抽出操作が核酸の喪失の最大の原因であることを突き止め、細胞の溶解液から直接、次世代シーケンサーでの解析用ライブラリを作成する方法を開発した。この



方法により最小で 100 個の細胞からでも正確な網羅的ゲノム解析が可能になった。また、細胞溶解液には RNA も含まれていることに着目し、溶解液の一部を用いて同一検体からトランスクリプトーム解析用ライブラリをも作成することに成功した(右図)。この方法を用いて、ゲノム解析により検出した同一のゲノム異常を共有する拡大クローン内で、異型を呈する細胞と異型を呈さない細胞におけるトランスクリプトームの相違を抽出し、形質転換を制御するメカニズムを解析する。



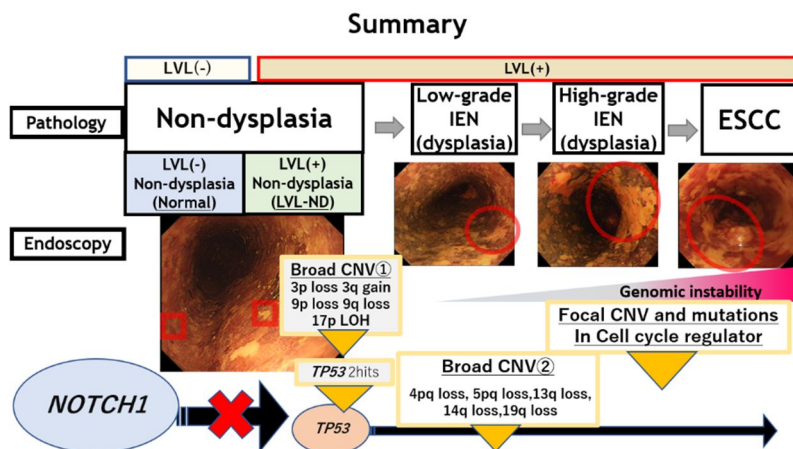
### (3) 機能解析

(2)において抽出された形質転換を駆動する遺伝子に着目し、ヒト食道がんオルガノイド・細胞株を用いて、CRISPR/Cas9 ノックアウトによりがん細胞の増殖、Xenograft 形成能に与える影響を解析する(右図)。

## 4. 研究成果

ヨード不染(LVL; Lugol voiding lesion)という phenotype に注目して、非腫瘍部を、ヨード濃染 (LVL(-)Non-dysplasia; Normal)とヨード不染 (LVL(+))Non-dysplasia (LVL-ND))を区別して、前がん病変の腫瘍性病変である上皮内腫瘍 (Intraepithelial neoplasia (IEN))も low-grade と high-grade に区別して、病理診断とゲノム解析を対比させて行うことを試みた (右下図)。

上部消化管内視鏡検査で、ヨード不染部を狙撃生検して採取したサンプルから実体顕微鏡下に0.2mm<sup>2</sup>のサイズで計153サンプル(ヨード濃染部であり正常部と考えられる濃染部(Normal)(n=30)、腫瘍性変化を認めないもののヨード不染の phenotype を認める Non-dysplasia (LVL-ND) (n=69)、Low grade IEN (n=21)、そして、Tis 病変を含めた早期がん(n=33))を採取して、全エクソン解析し、残りのサンプルで病理診断を行うことで、多段階発がんに対応するゲノム異常を調べた。



ヨード濃染部(Normal)では73% (22/30)で *NOTCH1* 変異を認め、*NOTCH1* 変異の77% (17/22)では既に2hitsを獲得していた。Normal で次に多く認められるドライバー変異は、*TP53* 変異で43% (13/30)に認められた。LVL-NDは非腫瘍にも関わらず、65% (45/69)は *TP53* 変異を認め、*TP53* 変異の91% (41/45)は2hitsを獲得しており、3番染色体短腕のコピー数 loss (71% (49/69))、3番染色体長腕のコピー数 gain(61% (42/69))の broad CNV を既に獲得していた。この一方で、*TP53* 変異を認めないLVL-NDでは、broad CNV の変化に乏しかった。LGDでは、1 sample の例外を除いて *TP53* 変異を認め、Broad CNV に加えて、33% (7/21)に *CDKN2A* homozygous deletion を認めたが、*TP53* 以外の cell cycle の異常は38% (8/21)のみであったが、T1のEarly cancerになると *TP53* 以外の cell cycle 異常が全例 (33/33)で認められ、上皮内腫瘍以降で、cell cycle の異常の獲得が重要な変化であることが示唆された。その一方で、上皮内腫瘍以前では、限定的な broad CNV であったが、dysplasia carcinoma sequence の中で、genome with CNV は有意に増加し、genome instability が、がん化に寄与していると考えられた。

以上の結果から、ヨード濃染部(Normal)においても、*TP53* 変異は存在するが、3番染色体のコピー数異常を伴うことは少ないのに対して、LVL-NDにおいては、2サンプルを除いて、食道ドライバー変異を有しており、*TP53* 変異が65%で最も多く認められ、*TP53* 変異を認めたLVL-NDでは、3番染色体短腕のコピー数 loss、3番染色体長腕のコピー数 gain の broad CNV を高頻度に認めており、これらの変化を有することで、ヨード不染の phenotype を獲得する、すなわち、がんの起源が形成されることが示唆された。更に、マルチオミックス解析を用いることで、食道発がんの初期の変化の詳細を明らかにするため、同一サンプルの残DNAを用いて、メチル化解析を構築した。これにより、DNA/RNA、そして、メチル化をすべて微小サンプルから解析する系の構築が完了した。本技術を用いて、今後、食道におけるがん化過程でエピゲノム異常が果たす役割についての検討を行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 垣内 伸之
2. 発表標題 正常組織におけるクローン拡大と発がん
3. 学会等名 がん予防学術大会2022京都（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 垣内 伸之
2. 発表標題 Clonal expansion in normal tissues
3. 学会等名 The 40th Sapporo International Cancer Symposium（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 垣内 伸之
2. 発表標題 Early cancer evolution
3. 学会等名 第82回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 横山 顕礼、平野 智紀、石田 雄大、菊池 理、竹内 康英、南口 早智子、小川 誠司、武藤 学、垣内 伸之
2. 発表標題 食道扁平上皮癌の生物進化
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 垣内 伸之
2. 発表標題 腫瘍進化の多様性
3. 学会等名 第61回日本がん治療学会（招待講演）
4. 発表年 2023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
研究分担者	横山 顕礼  (Yokoyama Akira)  (20515514)	京都大学・医学研究科・助教    (14301)	

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		
米国	Weill Cornell Medical College		