

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20840

研究課題名（和文）全ゲノム解析による正常血液細胞に獲得された体細胞変異の解析

研究課題名（英文）Study of somatic mutations in normal blood cells using whole-genome sequencing

研究代表者

吉田 健一（Yoshida, Kenichi）

国立研究開発法人国立がん研究センター・研究所・分野長

研究者番号：50738226

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では正常な血液細胞に遺伝子変異が蓄積する原因を解析し、さらに年齢や飲酒、喫煙などの環境因子との関連を調べることで、血液腫瘍の発症機序を明らかにすることを目的として研究を行った。検診受診者100名から末梢血検体を収集して、喫煙歴、飲酒歴、年齢などの情報から解析する症例を選定した。臍帯血1検体および検診受診者11例から174個の造血コロニーを作製して全ゲノム解析を行なった。その結果、正常血液細胞では1年間に約14個の変異が蓄積していると推定され、これは過去の欧米からの報告と概ね一致していた。一方、遺伝子変異の蓄積量には個人差がみられ、生活歴と関連している可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では日本人の正常血液細胞における加齢や環境因子による体細胞変異の蓄積の全貌が明らかになったが、このデータは今後全ゲノム解析などにより日本人における骨髄性腫瘍の発症の機序を明らかにする上で重要なデータとなると考えられる。また、本研究で健康人から得られたデータは今後、様々な造血器腫瘍に対するがん感受性を有する疾患における血液細胞の研究においても重要なコントロールデータとなると考えられ、学術的な意義が大きい。さらに、今後の研究で血液細胞における体細胞変異の蓄積における個人差や造血器腫瘍発症のリスクと生活習慣との関係が明らかになれば、社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to reveal the accumulation of somatic mutations in normal blood cells and its relationship with aging and environmental factors, such as alcohol drinking and smoking, for the further understanding of the mechanisms of development of hematological malignancies. We collected peripheral blood samples from one hundred healthy donors who visited medical checkup and selected the cases who will be subjected to the genetic studies based on their age and smoking and drinking histories. We performed whole-genome sequencing of 174 single-cell blood cell colonies derived from one cord blood sample and 11 healthy donors. As a result, 14 mutations accumulated per year in normal blood cells, which was consistent with the previous reports. There was also a heterogeneity of mutation burden between individuals, which might be related with life history of the donors.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：正常血液細胞

### 1. 研究開始当初の背景

(1) がんは遺伝子異常により起こる疾患であるが、がんを発症する以前の正常組織においても遺伝子異常が加齢や環境因子により蓄積しており、発がんの直接の原因として知られているドライバー遺伝子変異も獲得されていることが様々な組織について報告されている。例えば、食道上皮や気管支上皮では *TP53*、*NOTCH1* などのドライバー変異を獲得したクローンの拡大がみられ、前癌病変となっていると考えられている (Martincorena et al., *Science*. 2018, Yokoyama et al., *Nature*. 2019; Yoshida et al., *Nature*. 2020)。したがって、早期の発がんメカニズムの解明には腫瘍を発生する以前の正常組織における遺伝子異常を理解することが重要である。

(2) 近年の多数のがんゲノム解析により、喫煙、飲酒、紫外線照射などの環境因子で腫瘍細胞にはこれらの因子に起因する塩基置換パターン(シグネチャー)を持った遺伝子変異が増加していることがわかってきた。一方、これまでの正常組織における遺伝子変異の解析は各臓器につき数症例のみと十分ではなく、環境因子の正常細胞における遺伝子異常の獲得におよぼす影響については、正常気管支上皮細胞における煙草による変異などを除いて解明されていない。血液についても、喫煙により白血病の発症のリスクが高まることや (Ugai et al., *Br J Haematol*. 2017)、喫煙歴のある症例ではより高頻度に Y 染色体の欠損がみられることや (Dumanski et al, *Science*. 2015)、特定のドライバー遺伝子変異が高頻度に認められることが報告されているが (Bolton et al., *Nat Genet*. 2020)、そのメカニズムは明らかになっていない。

(3) 同じがんでも頻度の高い遺伝子異常などが人種によって異なることも知られており (Carrot-Zhang et al, *Cancer Discov*. 2021)、遺伝学的背景や生活習慣などが原因であると考えられている。血液を含めて、多くの正常組織においてはこれまでの解析は欧米のみで行われており、日本人などアジア人の検体を解析することは必要があると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、健常人由来の正常血液細胞の全ゲノム解析により、日本の健常人の血液細胞に蓄積する遺伝子異常を解析し、加齢や環境因子と遺伝子異常の蓄積量との関係、ドライバー変異の獲得される過程など発がんにつながるメカニズムを明らかにする。さらに、欧米のデータとの比較により、環境因子の遺伝子変異の蓄積に及ぼす影響や欧米の症例との人種差についても明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

喫煙歴や飲酒歴など異なった背景を持った健常人あるいは血液疾患のない患者症例の正常血液細胞における遺伝子異常の解析を目的に末梢血あるいは骨髓検体由来の単一造血前駆細胞コロニーを作成して全ゲノム解析を行う。全ゲノム解析により、造血前駆細胞に獲得される遺伝子異常(変異、挿入欠失、構造異常、染色体コピー数異常)の蓄積量の比較検討や、塩基置換のパターン(シグネチャー)から変異が獲得される原因が解析可能である。同一症例から多数のコロニーを作成して解析することにより、各コロニーで同定された遺伝子異常を基に解析した造血細胞の系統樹を作成し、系統樹の枝の単位で遺伝子異常を解析することにより、ドライバー遺伝子獲得のタイミングなどについても解析する(図1)。臨床データとあわせて、環境因子と遺伝子異常の関係について解析し、また過去の欧米のデータと比較して人種差による影響を解析する。具体的には、飲酒歴、喫煙歴のある症例も含めて健常人 10 例程度、各症例から 10 コロニー程度について全ゲノム解析を行う。



図1 造血前駆細胞コロニーの全ゲノム解析

### 4. 研究成果

(1) 末梢血検体から単核球を分離し、Methocult (STEMCELL Technologies 社) を用いて単一造血前駆細胞由来コロニーを作成して、Arcturus Pipopure DNA Extraction Kit により DNA を抽出し、全ゲノムシーケンスを行った。また、単一細胞由来検体の全ゲノムシーケンスデータのパイプラインを構築し、遺伝子解析については、変異(1塩基置換、挿入欠失)解析については EBCa11 (Shiraishi et al., *Nucleic Acids Res*. 2013) を使用して変異を同定し、体細胞性変異の同定は過去に使用されている方法を用いた (Yoshida et al., *Nature*. 2020)。実際に検出された変異のアレル頻度が 0.5 程度となっており、全ての検体が単一細胞由来であることを確認した。

(2)本研究への参加に同意が得られたがん検診受診者 100 名から末梢血検体を収集して、臍帯血 1 検体および検診受診者 11 例から 174 個の造血コロニーを作製して全ゲノム解析を行なった。1 年間に約 14 個の変異が蓄積していると推定され ( 図 2 )、これは過去の報告 ( Osorio et al., *Cell Rep.* 2018、Mitchell et al., *Nature.* 2022 )) と概ね一致していた。一方、遺伝子変異の蓄積量には個人差がみられ、さらに生活歴や遺伝子多型との関連を解析する必要があると考えられた。

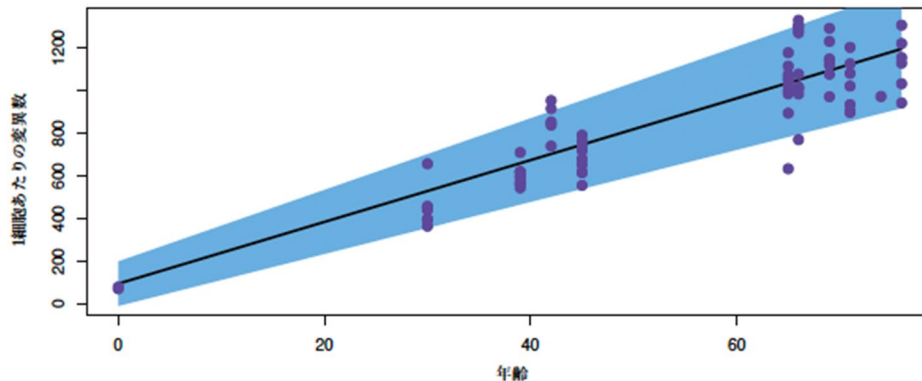


図 2 正常血液細胞における遺伝子変異数と年齢との関係

1 つ 1 つの点がコロニーを表し、同一症例から複数 ( 10 ~ 15 個 ) のコロニーを解析しているため、同じ年齢 ( x 軸 ) に複数の点が表示されているのは同一症例由来のコロニーである。

次に変異シグネチャーを MutationalPatterns ( Blokzijl et al., *Genome Med.* 2018 ) というツールを用いて行なった。解析では過去に骨髄性腫瘍で報告されていた SBS1、SBS5 が同定された ( 図 3 )。SBS1、SBS5 は clock-like signature と呼ばれ、どの臓器においても加齢と共に蓄積し、SBS1 は 5-メチルシトシンの自然な脱アミノ反応により生じると考えられている。SBS5 の原因は不明である。飲酒や喫煙歴のある症例においては、気管支や食道においては SBS4 ( 気管支、喫煙 ) や SBS16 ( 食道、飲酒 ) 特徴的な変異シグネチャーによる変異が正常細胞でも蓄積していることが知られているが、血液細胞においてそれらのシグネチャーは検出されなかった。

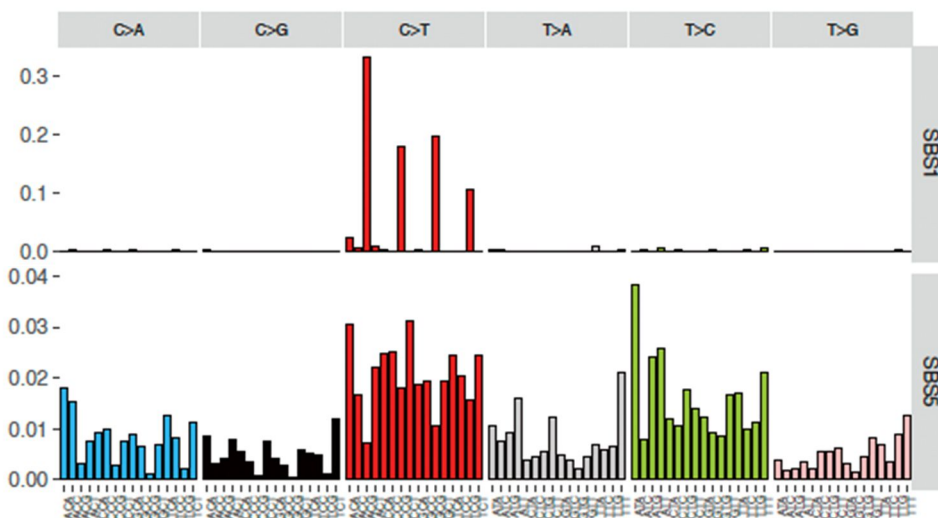


図 3 正常血液細胞において検出された変異シグネチャー

一塩基置換を C>A、C>G、C>T、T>A、T>C、T>G の 6 つのパターンに分け、さらに変異が見られた部位の前後塩基のパターンで 96 種類に集計して表示している。

さらに、ドライバー変異の解析では少数のコロニーで *PPM1D* 変異などドライバー変異を獲得したクローンが同定されたが、検診受診者で年齢が比較的若いことや解析したコロニー数が少ないこともあり、造血細胞の 10-20% 以上を占めるような明らかなクローン性造血は見られていなかった。ドライバー遺伝子を獲得した血液細胞の機能の変化についてはさらなる解析が必要である。

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 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kenichi Yoshida
2. 発表標題 Clonal evolution in normal lung tissue leading to lung cancer development
3. 学会等名 IMMUNO ONCOLOGY RESEARCH WORKSHOP (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 吉田健一
2. 発表標題 正常組織の全ゲノム解析によるがんの病態解明
3. 学会等名 令和4年度国際がん研究シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kenichi Yoshida
2. 発表標題 Somatic mutations in blood cells with constitutional genome instability.
3. 学会等名 The 2dn KAI-X Global Conference in GSMSE. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Kenichi Yoshida, Peter J. Campbell.
2. 発表標題 Somatic mutations and clonal evolution in normal blood cells in patients with cancer predisposition syndromes.
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 吉田健一
2. 発表標題 正常組織に見られるクローン進化から考える小児がんの発症.
3. 学会等名 第65回日本小児血液・がん学会学術総会（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

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