

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和3（2021）年度 中間評価用〕

令和元年度採択分
令和3年3月31日現在

先端ゲノミクスを駆使したがんの初期発生とクローン進化に
関わる分子基盤の解明

Comprehensive studies on the
molecular basis of early development and clonal evolution
in cancer using advanced genomics.

課題番号：19H05656

小川 誠司 (OGAWA Seishi)

京都大学・大学院医学研究科・教授



研究の概要（4行以内）

主要ながん種の変異の全体像が明らかにされた一方で、多数の変異の獲得とクローン選択によってがん細胞集団に高度な多様性は不明である。これらを理解するために、先端技術によるクローンの単離と全ゲノムシーケンス・単一細胞シーケンス、オルガノイド培養技術とマウスモデルの解析等を駆使して、これらの未解決の課題を解決することを目的とする。

研究分野：ライフサイエンス

キーワード：ゲノム生物学、腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

近年のシーケンス技術の進歩に伴い、多くの主要ながんにおいて、その原因となる変異の全体像が明らかにされた。しかしながら、ドライバー変異の獲得に始まる発がん初期のクローン選択の過程や、その後、多数の変異の獲得とクローン選択によってがん細胞集団に高度な多様性が生じ、浸潤・転移・再発が惹起される過程の分子機構については、なお多くが不明である。これらを理解するには、遺伝子変異やその組み合わせがどのように細胞の表現型を決定するのかを解明することが必須である。また、極めて高い頻度で生じているにも関わらず、多様性・複雑性が障害となり、ほとんど研究が進んでいないゲノムの構造異常が発がんにどう関わるのか、についての解明もまた喫緊の課題である。さらには、これまでに同定されたドライバー遺伝子の機能的な意義や臨床的な意義もまた十分に解明されているとは言えない。

2. 研究の目的

遺伝子変異の組み合わせと細胞の表現型との関連性、発がんに関わるゲノムの構造異常、新規ドライバー遺伝子の機能的・臨床的意義を明らかにする。

3. 研究の方法

先端技術によるクローンの単離と全ゲノムシーケンス・単一細胞シーケンス、オルガノ

イド培養技術とマウスモデルの解析等を駆使して、包括的な探求を行う。

4. これまでの成果

初期膵がん、切除後残存膵由来のオルガノイド樹立と全ゲノムシーケンスによるクローン履歴の推定とマウスモデル解析によるクローン選択のメカニズムの解明に関しては、治癒切除を行った初期の膵臓癌および、切除後の残存膵由来の膵癌について、切除標本からレーザーマイクロダイセクションを行い解析を行った。健常大腸粘膜および aberrant crypt foci (ACF)/UC 粘膜における単一クリプトの単離と時間・空間的なクローン進化の解明に関しても、UC 症例の大腸粘膜と、炎症性大腸がんの微少サンプリングによる大規模なゲノム解析を行い、UC 粘膜では、IL-17 シグナル経路の遺伝子変異を獲得した細胞が増加していること、またこの経路の *NFKB1Z* 等の変異は大腸がんではほとんど認められないこと、さらにこれらの遺伝子に変異を獲得した上皮細胞は発がんしがたいことを明らかにした。(垣内ら、Nature, 2020)

正常乳管と初期乳がんのマイクロダイセクション、オルガノイド培養によるクローン拡大の解明に関しては、乳腺における年間変異率を算定するために、正常乳腺由来試料から分離した乳管上皮細胞を用いて単一細胞由来のオルガノイド培養を行い、全ゲノムシーケンスにより単一細胞に蓄積した体細胞変異数を測定した (17 症例 45 検体)。様々な

年齢の検体を解析することで、一年当たりの変異獲得数を算出し、正常乳管上皮細胞の年間変異率を決定した。

血液腫瘍においては遺伝子変異とコピー数異常の2種類の異常が共存して認められるが、本解析においてはクローン性造血における遺伝子変異とコピー数異常を同時に検出することで、血液腫瘍の初期発生の段階から両者の共存が有意に起こっていることを明らかにした。単一細胞解析による検討では、両者の共存は細胞レベルで生じていた。また、血液腫瘍においては *DNMT3A*, *TET2*, *JAK2*, *TP53* といったドライバー遺伝子は、遺伝子変異とコピー数異常を同時に伴うことで両アリの異常を起こすことが知られているが、上記の検討により血液腫瘍発生初期のクローン性造血の段階でも両アリの異常を持った細胞が陽性選択されていることが明らかになった。

単一細胞シーケンスによる解析では、変異を有するクローンの細胞レベルでの表現型を解析するため、遺伝子変異と遺伝子発現を同時に同一の細胞で同定可能な系を開発し、クローン性造血を有する高齢者、および同年代の対象症例の骨髄の CD34 陽性造血幹細胞・前駆細胞分画の解析を行った。最適化の結果、凍結保存骨髄の CD34 陽性細胞においても高感度かつ高精度に変異細胞を同定することが可能となった。遺伝子発現によりクラスタリングを行い、造血幹細胞様分画や赤芽球様分画等に分類し、解析を行った。*DNMT3A*, *TET2*, *SF3B1*, *IDH1* の変異をそれぞれ有する複数の症例において、同一症例内の変異細胞と野生型との比較を行ったところ、変異細胞では E2F 標的遺伝子や MTOR 経路遺伝子等の細胞増殖に関わるパスウェイの活性化を示し、クローンが拡大する一因と考えられた。さらに興味深いことに、*TET2* 変異を 10% 程度の細胞が有する複数の症例での、変異を有しない野生型の細胞は、変異を有しない対象症例の細胞と比較し、増殖経路やインターフェロン反応の上昇を認めた。この野生型の細胞の表現型が *TET2* 変異細胞によって引き起こされたものであるかを検証するため、マウスで競合骨髄移植を行った。*Tet2* ヘテロ欠失マウスと共存する野生型マウスの細胞は、野生型マウスと共存する野生型マウスの細胞と比較し、増殖経路やインターフェロン反応の上昇を認め、上述のヒト野生型細胞での表現型は *TET2* 変異細胞によって引き起こされる可能性を示唆する所見であった。

非コード領域の遺伝子異常、構造異常の解明については、対象検体(頬粘膜)に腫瘍細胞の混入の少ない良質な検体が得られた 20 症例で高深度(100x)の全ゲノム解析を行うと共に、Nanopore 社の long read sequencing を用いて、多数の構造変異を有する 2 検体を解析し、長鎖リードを解析するための DNA 抽

出法および解析手法の検討を進めている。

遺伝子異常が、がんの病態・臨床像に及ぼす効果の解明についても、*TP53* 変異陽性骨髄異形成症候群 (MDS) はもっとも予後不良な病型の一つであるが、今回 3,324 例の MDS 症例の解析を行い、*TP53* 遺伝子が両アリ異常となっている状態が非常に重要な予後不良因子であることを明らかにした (南谷ら、*Nature medicine* 2020)。また、多数の患者検体から標的遺伝子シーケンスで同定した遺伝子異常の機能解析もマウスモデルを用いて進めており、MDS におけるコヒーシと *RUNX1* による病態の解明 (越智ら *Cancer Discovery* 2020) を進めている。

5. 今後の計画

今後は、消化器がん、血液がん、乳がんを含め様々ながん腫において、さらに多数例で解析を行うことで、上記の知見をより詳細に検討してゆくとともに、クローン性造血から血液腫瘍が発症するに至るまでの変化についても検討を進めてゆく。

また、クローン造血の遺伝子異常が白血病の病態に与える影響を大規模コホートで解析すると共に、大腸癌や尿路系腫瘍等の他のがん種においても、多数の患者検体を用いてゲノムや RNA のシーケンスを行い、臨床像に及ぼす影響の解析を進めている。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

- Bernard E, Nannya Y, Ogawa S, *et al.* Implications of TP53 allelic state for genome stability, clinical presentation and outcomes in myelodysplastic syndromes. *Nat Med.* 565:1579-1556, 2020.
- Kakiuchi N, Ogawa S. Clonal expansion in non-cancer tissues. *Nat Rev Cancer.* 21:239-256, 2020.
- Ochi Y, Kon A, Ogawa S, *et al.* Combined Cohesin-RUNX1 Deficiency Synergistically Perturbs Chromatin Looping and Causes Myelodysplastic Syndromes. *Cancer Discov.* 10:836-853, 2020.
- Mylonas E, Ochi Y, Ogawa S, *et al.* Single-cell analysis based dissection of clonality in myelofibrosis. *Nat commun.* 11:73, 2020.
- Dingler F, Ogawa S, *et al.* Two Aldehyde Clearance Systems Are Essential to Prevent Lethal Formaldehyde Accumulation in Mice and Humans. *Mol Cell.* 80:996-1012, 2020.
- Nagata Y, Makishima H, Ogawa S, *et al.* Invariant patterns of clonal succession determine specific clinical features of myelodysplastic syndromes. *Nature Commun.* 10:5386, 2019.

7. ホームページ等

http://plaza.umin.ac.jp/kyoto_tumorpatho/