

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03513

研究課題名(和文)大腸上皮細胞のゲノム解析による大腸がん基盤の解明

研究課題名(英文) Deciphering colorectal carcinogenesis by the genomic analysis of colorectal 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) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では従来想定されていた腺腫から始まる大腸がんの多段階発がん仮説を超えて、未だ詳細が明らかとなっていない正常大腸組織における遺伝子変異クローンの詳細を明らかにし、初期の腫瘍性病変から進行期のがんまでを解析することで、大腸がん基盤を包括的に理解することを試みた。正常組織から大腸がんの起源細胞が生じる機序や、腫瘍進化の過程などは完全な理解に至らなかったが、本研究を通して開発した研究手法や知見は今後の大腸がん研究の発展に寄与するものとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんは現在わが国の悪性腫瘍による死因の第2位で、年間約5万人が死に至る疾患であり、現在も増加傾向にあるとともに今後さらなる増加が見込まれている。大腸がんの予後改善のためには早期発見・早期治療を目的としたスクリーニング、および進行がんにおける治療成績の向上が急務であり、本研究により大腸がんの発生機序や正常細胞から癌へのクローン進化に関する知見が得られ、これらは大腸がんの早期発見・早期治療およびがんの発症前治療に対する新たな戦略の構築に資すると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aims to comprehensively understand the colon carcinogenesis by analyzing mutations in the normal colon mucosa, early tumor, and advanced cancer and establish a new model rewriting the conventional adenoma-carcinoma sequence theory. Although the mechanism by which the origin of cancer cells arises in the normal colon and the process of cancer development is still to be elucidated, the knowledge and research technique developed through this study will contribute to the future development of colon cancer studies.

研究分野：腫瘍性生物学

キーワード：大腸がん ドライバー変異 クローン拡大 腫瘍進化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

散発性大腸がんは現在わが国の悪性腫瘍による死因の第2位で、年間5万人が死に至る疾患である(がんの統計'18)。胃がんや肝がんとは異なり、大腸がんは現在も増加傾向にあり、今後さらなる増加が見込まれている。大腸がんの予後改善のためには早期発見・早期治療を目的としたスクリーニング、および進行がんにおける治療成績の向上が急務である。大腸がんのリスク因子として肥満や高脂肪食などが知られているがその寄与度は小さい(Aleksandrova K. et al., BMC Med., 2014)。効率的なスクリーニングのためにより正確な発症リスクの層別化が必要であるものの、未だ知見は乏しい。また、大腸がんの治療に関しても、大規模な大腸がんのゲノム解析がなされ複数のがん関連遺伝子(ドライバー遺伝子)が特定されたが治療応用可能な標的分子は限られており、これまでにない観点からの新規分子の発見が望まれている。

最近、血液や食道などの組織において、正常細胞にも加齢に伴って遺伝子異常が蓄積し、がんでは観察される遺伝子変異を有する細胞がその集団サイズを増大(クローン拡大)させ、発がんリスクとなっていることが明らかになった。また、正常組織で観察される遺伝子変異の一部は、がんでは観察される遺伝子変異の頻度とは異なっており、正常組織とがん組織の間で異なるメカニズムによる自然選択がなされる可能性が指摘されている(Yokoyama, Kakiuchi et al., Nature, 2019)。さらには、このような遺伝子変異の一部は発がん抑制(陰性選択)に関わり新たな治療標的となり得ることを申請者らは最近発見した(Kakiuchi et al., Nature, 2020)。

### 2. 研究の目的

近年、大腸上皮の幹細胞特性の理解が進み、正常大腸上皮細胞を *in vitro* で培養するオルガノイド培養技術が確立された。原理的に1つの幹細胞から増殖させたオルガノイドは単一クローンであり、正常組織におけるゲノム解析のために用いられている。この手法の問題点は、(1)初代培養時に *in vitro* 環境に適應できない細胞は増殖せず観察不可能なこと、(2)*in vitro* 培養中に新たに遺伝子変異が蓄積し解析結果に影響を及ぼすこと、(3)生体内でのクローン拡大を観察する目的の場合、微小領域における遺伝子変異クローンの占める割合が培養によって歪められること、などである。これらの問題を克服すべく、代表者らは大腸上皮がとる最小の構造単位である陰窩に着目し、単一陰窩から直接網羅的ゲノム解析を行う独自手法を確立した。

本研究は従来想定されていた腺腫から始まる大腸がんの多段階発がん仮説を超えて、未だ詳細が明らかとなっていない正常大腸組織における遺伝子変異クローンの詳細を明らかにし、初期の腫瘍性病変から進行期のがんまでも同時に解析することで、大腸発がん基盤を包括的に解明しようとする研究である。これにより時に100年に及ぶヒトの一生の間で正常大腸上皮細胞にどのような遺伝子変異クローンがいつ頃出現し、拡大ないし淘汰されるかが解明されれば、発がんリスクの層別化による早期発見・早期治療およびがんの発症前治療に対する新たな戦略が創造される。

### 3. 研究の方法

#### 研究項目 正常大腸粘膜のゲノム解析

主に大腸切除術を受けた高齢者の正常大腸粘膜からパンチ生検鉗子をもちいて一定面積(4mm<sup>2</sup>)の粘膜を採取する。採取した粘膜は申請者らが最適化した条件で上皮細胞と基底膜との接着をEDTA処理により阻害した後、実体顕微鏡下で行うマイクロマニピュレーションにより高効率に陰窩単離を行い、上皮細胞のみからDNAを抽出し全エクソン解析を行う。同定された変異情報からクローン拡大の原因遺伝子の特定を試みる。

#### 研究項目 初期良性腫瘍のゲノム解析

大腸腫瘍の最初期病変として Aberrant crypt foci (ACF) が指摘されている。ACF は異型腺管が数十～数百個集簇した病変で、その遺伝子異常として APC・KRAS 変異の報告があるが、未だ網羅的ゲノム解析を行った報告はない。申請者らは大腸がん患者の切除標本からメチレンブルー生体染色を用いて ACF を同定し、病変内の陰窩を単離することに成功している。これを研究と同じく微小検体からの正確な全エクソン解析を行うことで ACF が有するドライバー変異を同定することで正常大腸上皮と最初期の大腸腫瘍性病変の遺伝学的特徴および変異原の異同を明らかにする。

#### 研究項目 大腸がんの解析

で検出した正常組織と大腸良性腫瘍における遺伝子変異について、TCGA などの大規模がんゲノム解析プロジェクトの公開データを利用して大腸がんのドライバー遺伝子と比較することで、悪性化に関与する遺伝子(変異頻度: 正常大腸 < 良性腫瘍 < 大腸がん)の特定を試みる。

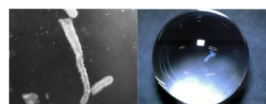
#### 研究項目 機能解析

研究項目 ~ により見いだされた重要な遺伝子の候補について、マウスおよびヒト大腸オルガノイドを用いて機能解析を行う。具体的には候補遺伝子を標的とした CRISPR/Cas9 ライブラリを作成し、大腸癌細胞株に導入し、一定期間の培養の前後で細胞に導入されたライブラリの構成比率の変化を調べることで、増加する標的遺伝子 (=ドライバー遺伝子)の機能的検証を行う。このような自然選択は環境に依存する可能性を考慮し、in vitro 培養に加えてがんオルガノイドを免疫不全マウスに接種して Xenograft を作成し、同様の解析を行う。

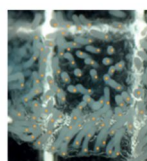
#### 4. 研究成果

##### 研究項目 正常大腸粘膜のゲノム解析

大腸癌もしくは大腸腺腫を外科的に、ないし内視鏡的に切除した標本を用いて、腫瘍から離れた正常大腸粘膜を研究に用いた。単一陰窩採取法では、様々な年齢から合計で 43 個の陰窩を集積した。微小領域から陰窩を高効率に回収する方法では、3 名の患者から合計で 146 陰窩を集積した。それぞれ胚細胞性



単一陰窩採取法



微小領域から高効率に陰窩を回収する方法

43陰窩

146陰窩

計189陰窩より約8000変異を検出  
統計学的検定では、陽性選択遺伝子は同定出来なかった。

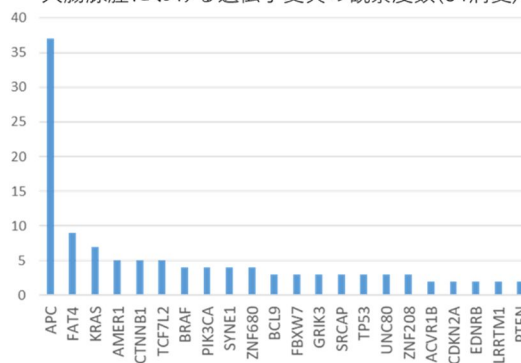
英国サンガー協会から報告された大腸陰窩1,403個の解析では、既知のがんドライバー遺伝子に限った解析において、2つの遺伝子 (*AXIN2*, *STAG2*)が陽性選択されたとの報告に合致する。

変異情報を取得するために血液由来 DNA とともにペアで全エクソン解析を行った結果、約 8000 個の体細胞変異の同定に成功した。これらの体細胞変異にはアミノ酸配列を変えない同義置換と、アミノ酸配列を変える非同義置換があるが、ランダムに変異が生じた場合に期待される同義置換と非同義置換の数に対して、観察された変異の数との差の非(非同義置換・同義置換比、dN/dS 比)を求めたところ、中立である「1」から有意に遷移する遺伝子は確認されなかった。このことは、健全な大腸粘膜では陽性選択は頻繁には起こっていないことを意味する。このことを裏付ける研究として、英国サンガー協会から、1,403 個の大腸陰窩のゲノム解析研究がなされ、これによれば、本研究の観察と同じく全遺伝子を対象とした検討では陽性選択遺伝子を認めず、解析対象を既知のがんドライバー遺伝子に限った場合に *AXIN2* と *STAG2* の 2 遺伝子が陽性選択の証拠を示したとされた。本解析の制限として、大腸ポリープなど腫瘍化した陰窩は解析対象から外しているため、大腸ポリープで高頻度に認められる *APC* や *KRAS* 遺伝子の選択を過小評価している可能性があるが、患者一人当たり数個~数十個のポリープが存在するのに対し、大腸陰窩は約 1,000 ~ 1,500 万個あることを考慮すれば、この制限が本解析結果に与えた影響は微小であると考えられる。

##### 研究項目 初期良性腫瘍のゲノム解析

大腸腫瘍の最初期病変とされている ACF を、大腸切除標本を用いて検索した。インジゴカルミン散布により大腸粘膜上に低隆起が認識可能となり、かつ、陰窩の開口パターン(pit pattern)が II 型のものを ACF と定義した。この定義に基づいて ACF を 3 個採取し、陰窩を単離しシーケンスしたところ、ドライバー変異として *KRAS* を認めた。次に、内視鏡的に認識される大腸ポリープを 34 個採取し、大腸癌ドライバー遺伝子を標的としてターゲットシーケンスにより解析したところ、腫瘍を捉えられていた 31 個の内 28 個で *APC* 変異を確認したが、*KRAS* 変異は 6 個と限定的であった。このことから、ACF から大腸腺腫へは遺伝子変異の蓄積によるクローン進化ではなく、ACF と大腸腺腫はそれぞれ正常大腸陰窩に *KRAS* もしくは *APC* 変異が生じて発生したものと捉えられ、ACF の大腸発がんにおける意義について興味深い知見が得られた。本解析の制限は ACF の解析数が少数であることであり、今後、さらに解析数を増やすことで ACF の大腸発がんにおける位置付けを再定義したい。

大腸腺腫における遺伝子変異の観察度数(34病変)



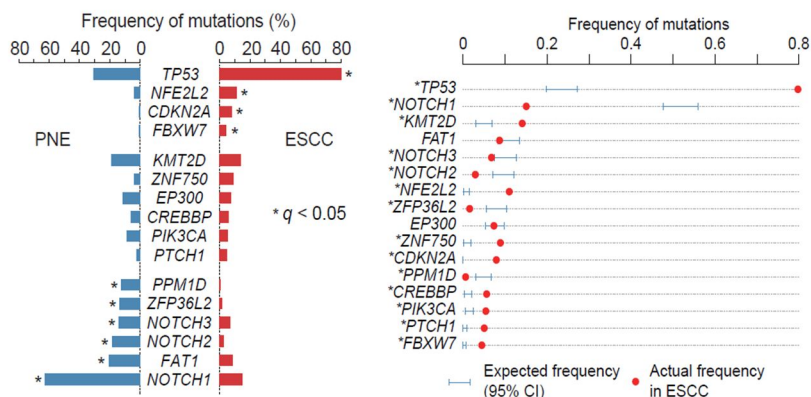
##### 研究項目 大腸がんの解析

正常大腸粘膜におけるドライバー変異クローンがなかったこと、また、前がん病変においても特異的なドライバー変異として新規なものは見いだせなかったことから、散发性大腸がんにおける組織学的グレードに応じたドライバー変異の蓄積の観点としては、従来から提唱されている Adenoma-carcinoma sequence を超える発見には至らなかった。その一方で、大腸の慢性炎症性疾患である潰瘍性大腸炎に長期罹患した患者の背景粘膜には陽性選択を受けたクローンが多数存在し、かつクローン拡大しており、大腸炎関連大腸がんと背景粘膜におけるドライバー変異頻



度の比較により、*NFKB1Z* や *ZC3H12A* といった炎症関連遺伝子の変異は背景粘膜と比較し癌で観察されがたく、正常組織と癌組織における自然選択機序の違いが明らかとなっていた。代表者らのグループでは正常食道における遺伝子変異と食道扁平上皮がんにおける遺伝子変異の頻度が異なることを以前報告したが、その際は背景粘膜におけるクローン拡大の程度を加味することが出来ていなかった。このため、データを再解析し、高齢者の正常食道粘膜におけるドライバー

遺伝子毎に変異クローンが占める面積割合を計算した。その上で、正常食道粘膜からランダムに癌が生じるとするならば、正常組織における変異クローンの面積割合を反映した頻度で食道がんにおいてドライバー変異が観察される(帰無仮説)と想定し、実際の食道がんにおける変異頻度(観察結果)との乖離を統計学的に検定した。これに寄れば、正常

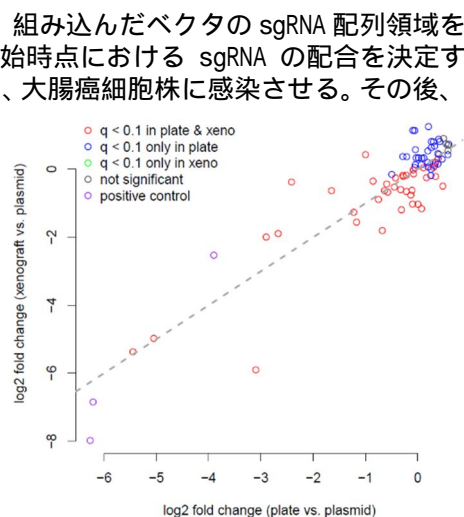
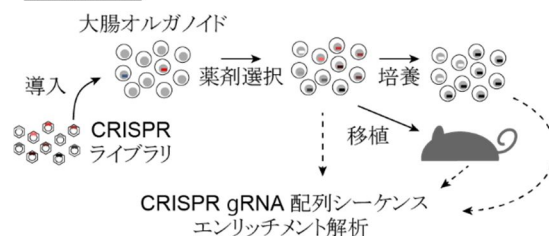


食道においては *NOTCH1* 変異クローンは食道がんへと進行し難い一方、*TP53* 変異クローンは食道がんへと進行するポテンシャルが高い事が明らかとなった。さらに興味深いことに、従来は食道がんのドライバー変異とされてきた *KMT2D*、*EP300* などは正常食道における変異クローンの割合と食道がんにおける変異割合に差がなく、必ずしもがんドライバーではなく、正常食道において選択されたクローンから偶然、癌が発生したという可能性も考えられた。この解釈の制限として、たとえ同じ変異であっても正常組織と発がん過程では細胞増殖に与える影響が異なる可能性があり、*TP53* は癌化の初期から重要な遺伝子変異である一方、その他の遺伝子は癌化のより後期になって選択されるドライバーであるという可能性も否定できない。今後、様々な臓器で正常組織、前がん病変、そして癌のドライバー変異が明らかとなり、そのプロファイルを比較することで未だ詳細が不明な各ドライバー遺伝子の機能が解明されることを期待する。

### 研究項目 機能解析

研究項目 ~ により新規のドライバー遺伝子を見出すことは出来なかったが、CRISPR/Cas9 を用いたライブラリスクリーニングは、細胞の増殖能への影響を観察するのに適している事から、実験系の立ち上げを行った。sgRNA 配列は米国ブロード研究所や英国サンガー協会の網羅的遺伝子ライブラリが公開されており、ここから 1 遺伝子あたりランダムに 3 個ないしは 4 個の配列を取得する。この配列情報を元にオリゴを合成し、PCR で増幅した後に sgRNA 発現ベクタに組み込む。組み込んだベクタの sgRNA 配列領域を PCR で増幅して次世代シーケンサーで解析する事で、開始時点における sgRNA の配合を決定する。次に、sgRNA 発現ベクタからレンチウイルスを作成し、大腸癌細胞株に感染させる。その後、*in vitro* で長期に培養した場合と、免疫不全マウスの皮下に Xenograft した場合で、環境の違いを反映して遺伝子変異の選択様式が変わるか、検討を行った。その結果、全体としては *in vitro* と *in vivo* での各遺伝子の選択は良く相関していたが、一部、*in vitro* と比較して *in vivo* で選択が強くなる遺伝子が認められた。従来の CRISPR/Cas9 スクリーニングは網羅的に行われるが故にその多様性を維持するため、*in vitro* で大規模な培養実験により実施されてきた。この結果を受けて、検討したい遺伝子を抽出した上で、細胞数がより少なくともライブラリスクリーニングが可能であることを担保した上で、*in vivo* 環境における検討を行うことでより実際の癌の環境に近い検討が可能になると考えられた。また、マウス由来大腸癌細胞株を用いる事で、免疫システムが正常に作動している環境における各遺伝子の機能を解析することも将来的な展開として重要であると考えられた。

### 機能解析



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kumagai Ken, Shimizu Takahiro, Takai Atsushi, Kakiuchi Nobuyuki, Takeuchi Yasuhide, Hirano Tomonori, Takeda Haruhiko, Mizuguchi Aya, Teramura Mari, Ito Takahiko, Iguchi Eriko, Nikaido Mitsuhiro, Eso Yuji, Takahashi Ken, Ueda Yoshihide, Miyamoto Shin-ichi, Obama Kazutaka, Ogawa Seishi, Marusawa Hiroyuki, Seno Hiroshi	4. 巻 -
2. 論文標題 Expansion of gastric intestinal metaplasia with copy number aberrations contributes to field cancerization	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Research	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） 10.1158/0008-5472.CAN-21-1523	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 Kakiuchi Nobuyuki, Ogawa Seishi	4. 巻 21
2. 論文標題 Clonal expansion in non-cancer tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Reviews Cancer	6. 最初と最後の頁 239 ~ 256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41568-021-00335-3	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 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 9件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 垣内 伸之
2. 発表標題 On the origin of cancer
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 垣内 伸之
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎における大腸上皮細胞のクローン進化について
3. 学会等名 第57回日本消化器免疫学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 垣内 伸之, 妹尾 浩, 小川 誠司
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎における大腸上皮細胞のクローン進化と発がん
3. 学会等名 第62回日本消化器病学会大会(JDDW2020) (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 垣内 伸之
2. 発表標題 胃神経内分泌腫瘍の遺伝子異常
3. 学会等名 除菌時代について考える会2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 垣内 伸之, 小川 誠司
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎における上皮細胞のクローン進化と大腸発がん
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 垣内 伸之
2. 発表標題 潰瘍性大腸炎における上皮細胞のクローン進化
3. 学会等名 第29回日本癌病態治療研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 垣内 伸之
2. 発表標題 炎症性腸疾患の発癌メカニズム
3. 学会等名 日本消化器病学会近畿支部 第65回教育講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

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

〔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	妹尾 浩  (Seno Hiroshi)  (90335266)	京都大学・医学研究科・教授    (14301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	井上 善景  (Inoue Yoshikage)		
研究協力者	平野 智紀  (Hirano Tomonori)		
研究協力者	前田 紘奈  (Maeda Hirona)		
研究協力者	筑後 孝紀  (Chikugo Koki)		

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