

令和 5 年 6 月 7 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：20H03660

研究課題名(和文)食道がん化における初期のゲノム異常の解明-多発ヨード不染の網羅的ゲノム解析-

研究課題名(英文) Early genomic aberrations in esophageal carcinogenesis: Comprehensive genomic analysis of multiple lugol voiding lesions

研究代表者

横山 顕礼 (Yokoyama, Akira)

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20515514

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)：「Solitaryサンプリング」では、計123カ所の食道ヨード不染部(LVL)と30カ所の濃染域の全エクソン解析を行った。食道において、LVLの非腫瘍部(n=69)では、97%に食道ドライバー変異が存在し、TP53変異が、最も多くクローン選択され、NOTCH1、FAT1の順であった。「High-density サンプリング」では、20カ所のヨード不染から計113カ所0.2mm マルチサンプリングして全エクソン解析を行った。20カ所すべてにおいて、ヨード不染の拡がりとは一致して食道ドライバー変異クローンが拡大しており、非腫瘍部の2LVLを除いて、TP53変異は共通変異を有していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食道がんの主たる組織型である食道扁平上皮がんは、過度の飲酒、喫煙が発がんリスクとなる。過度の飲酒・喫煙例では、ヨード色素内視鏡で、多数のヨード不染色帯を呈し、このような症例では5年間の経過観察で累積食道がん発生率が約50%と極めて高い異時性多発がんの発症が報告されている。本研究では、小さなヨード不染域を内視鏡下に狙撃生検して、直径0.5mmのパンチで精密にサンプリングすることで、がんの起源となる無数のヨード不染1つ1つが、食道がんに関連する遺伝子変異の拡がりて構成されており、特に、腫瘍性変化を生じる前の非腫瘍の段階で既に、食道がんに至る変化であるTP53変異を65%に認めることを解明した。

研究成果の概要(英文)：In "Solitary sampling", a total of 123 esophageal lugol-voiding lesion (LVL) and 30 stained areas were analyzed for whole exome sequencing. Driver mutations were present in 97% of the LVL-nondysplasia(n=69), with TP53 mutations being the most frequently clonally selected, followed by NOTCH1 and FAT1. In "high-density sampling", a total of 113 sites were multi-sampling at 0.2 mm from 20 LVLs for whole exome sequencing, and in all 20 sites, Driver mutation clones expanded consistent with the spread of LVL, TP53 mutations were common mutations, with the exception of 2 LVLs that did not show any TP53 mutations in nondysplasias.

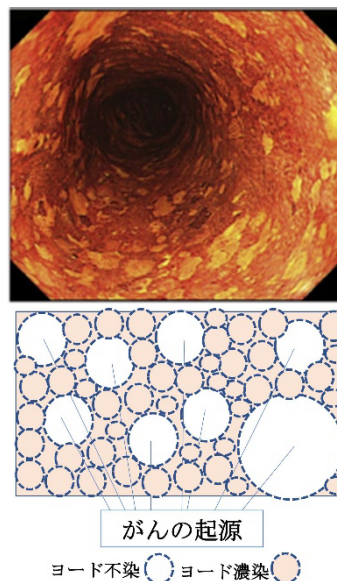
研究分野：ゲノム研究

キーワード：食道がん 飲酒 喫煙 ヨード不染 がんの起源

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

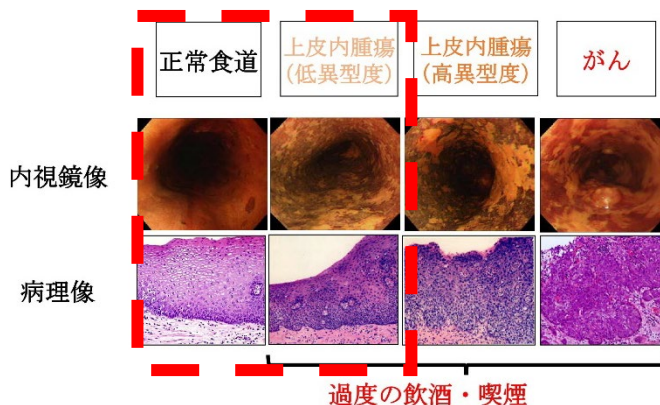
### 1. 研究開始当初の背景

わが国の死亡原因第1位はがんであり、年間1万人以上が死亡するが、その約85%は高齢者が占める。がんはドライバー変異を獲得した細胞のクローン性増殖によって特徴づけられる病気であるが、近年、一見正常に見える血液において、加齢と伴にこのようなクローン性増殖が生じていること、すなわちクローン造血が報告されている。その一方で、飲酒、喫煙に代表されるがんの発症要因が広く知られており、食道がんの主たる組織型である食道扁平上皮がん (ESCC) は、過度の飲酒、喫煙が発がんリスクとなる。過度の飲酒・喫煙例では、ヨード色素内視鏡で、多数のヨード不染色帯 (右図) を呈し、このような症例では5年間の経過観察で累積食道がん発生率が約50%と極めて高い異時性多発がんの発症が報告された<sup>1</sup>。ESCCは難治性がんであるが、このように主病巣以外にも食道全体にがんが多発する「フィールドがん化」が予後不良をきたす要因の一つである。フィールドがん化は、飲酒や喫煙などの発がん物質への慢性暴露により、食道粘膜全体に前がん病変である異型上皮が多発し最終的にがんが多発性に発生するという概念である<sup>2</sup>。このことは、**多発するヨード不染の中で、何らかのゲノム異常が加わることで数少ないヨード不染が腫瘍性変化を持ち、がん化していくことを示唆している**。本研究の学術的問いは、**加齢にリスク因子が加わりゲノム異常が加速的に蓄積する正常食道上皮からどのようなゲノム異常が加わることでがん化するのか**である。更に食道がんにおけるゲノム異常の自然史を理解することにより、リスクの層別化が可能となり、がんの予防に大きく貢献できると考えた。



### 2. 研究の目的

ESCC の発育形式は、多発ヨード不染帯の中の限られたヨード不染域が前がん病変である上皮内腫瘍を経て段階的に進展し、最終的にがん化すると考えられている (Dysplasia-carcinoma sequence ; 右図)。病理診断を対応させる研究手法で、ヨード不染という phenotype に注目して選択的にゲノム解析を行うことは、Dysplasia-carcinoma sequence の最も初期のゲノム異常を解明するとともに、食道がん化におけるゲノム異常の全貌を明らかにすることを目的とする。



### 3. 研究の方法

多発ヨード不染を有し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、内視鏡下に図1に示す不染色域を狙撃生検する。採取した生検サンプルを生体外でもヨード染色を行い、実体顕微鏡下に「Solitary サンプルング」と「High-density サンプルング」の2つの方法 (下図) で微小サンプルを採取し、微量DNAを採取する。採取部位 (位置情報) は、実体顕微鏡で写真として記録する。

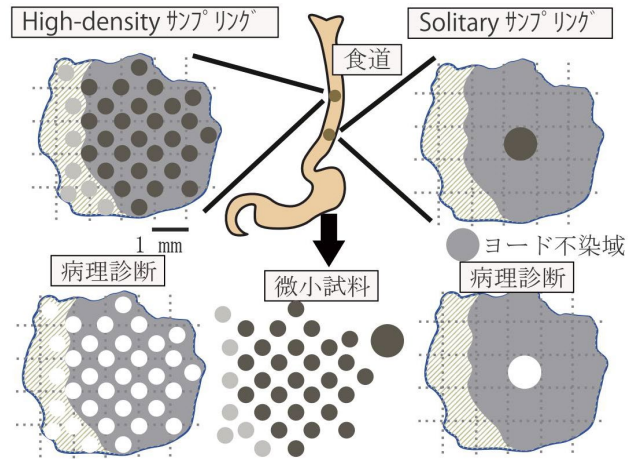
#### 1) 「Solitary サンプルング」

内視鏡生検内の1つのヨード不染色部から1つずつ最小で直径0.5mmの微小サンプルを採取し、微量DNAから全エクソン解析を行うことで、がんの起源であるヨード不染におけるゲノム異常（ドライバー変異やコピー数異常）の特徴を明らかにする

## 2) 「High-density サンプリング」

内視鏡生検の1つのヨード不染から多数の近接した直径0.5mmの微小サンプルを採取する「High-density サンプリング」を

加えることで、「Solitaryサンプリング」で抽出された不染域のゲノム異常を獲得した個々のクローンが局所的にどのようなドライバー変異によってどの程度の領域に拡大しているかを検討することで、ヨード不染とゲノム異常の拡がりの一致性を確認する。



## 4. 研究成果

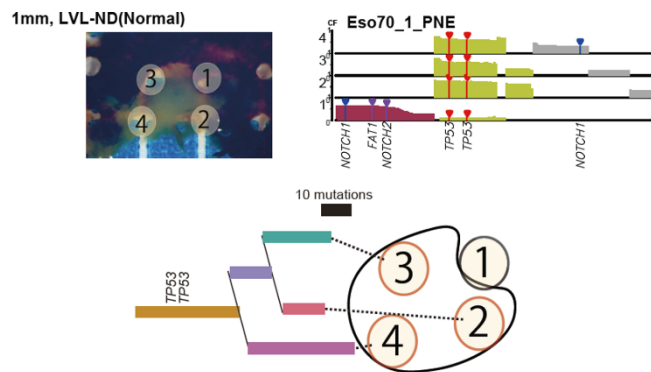
### 1) 「Solitaryサンプリング」

計 123 カ所の食道ヨード不染域 (LVL) に対して、全エクソン解析を行うとともに病理診断を行った。これに対して、濃染部からも 30 カ所のサンプル採取を行い、こちらは、経験的に非腫瘍部であるために、病理診断は行わずに全エクソン解析を行った。その結果、LVL においては、非腫瘍部が 69 サンプル、低異形度上皮内腫瘍が 21 サンプル、高異形度上皮内腫瘍または上皮内がんが 14 サンプル、そして、stage T1 となる早期がんが 19 サンプルの病理診断であった。この中で、LVL の非腫瘍部(n=69)で、最も多くクローン選択されるのが、*TP53*(65%)であり、次点は *NOTCH1*(35%)、*FAT1*(12%)の順であり、2 サンプルを除いて、食道ドライバーを有していた。

### 2) 「High-density サンプリング」

計 20 カ所の LVL からマルチサンプリングを行った。病理診断の内訳は、非腫瘍部 5 LVLs、低異形度上皮内腫瘍が 5 LVLs、高異形度上皮内腫瘍または上皮内がんが 4 LVLs、そして、stage T1 となる早期がんが 6 LVLs であった。非腫瘍部の LVL は、平均サイズは 2.4mm であり、

その中、または境界部から直径 0.5mm の微小サンプルを平均 5.8 個行った。典型的を提示する。右図のように狙撃生検後に、実体顕微鏡下に 1mm の不染域から 3 カ所、境界部から 1 カ所のサンプル採取を行った。その結果、LVL の拡がりとも一致して、変異クローンが拡大していた。さらに、この変異クローンには *TP53* が共通変異として存在し、メジャークローンとして存在していた。病理診断が非腫瘍部であった 5 LVLs の中に *TP53* を認めたものが 3 LVLs あったが、全ての LVL で同様に、樹形図の幹に *TP53* 変異を認めた。以上から、頻度、そして、変異を獲得した順番からも、*TP53* が ESCC の主ながんの起源と考えられた。以上から、上図のようなヨード不染色域の一つ一つは、*TP53* 変異を主体とする食道がんの



ドライバー遺伝子のクローン拡大を可視化していることがわかった。

<引用文献>

- 1 Katada, C. *et al.* Alcohol Consumption and Multiple Dysplastic Lesions Increase Risk of Squamous Cell Carcinoma in the Esophagus, Head, and Neck. *Gastroenterology* **151**, 860-869 e867, doi:10.1053/j.gastro.2016.07.040 (2016).
- 2 Slaughter, D. P., Southwick, H. W. & Smejkal, W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer* **6**, 963-968 (1953).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	玉置 将司  (Tamaoki Masashi)  (00796948)	京都大学・医学研究科・特定助教    (14301)	
研究分担者	小川 誠司  (Ogawa Seishi)  (60292900)	京都大学・医学研究科・教授    (14301)	
研究分担者	垣内 伸之  (Kakiuchi Nobuyuki)  (90839721)	京都大学・白眉センター・特定准教授    (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
---------	---------