

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 730

氏名 志田 健一

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地(派遣先国名) 用務地: ウェルカムトラスト・サンガー研究所 (国名: 英国)

2. 研究課題名(和文) ※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

次世代シーケンサーを用いた造血器腫瘍の発症機構および正常造血の研究

3. 派遣期間: 平成 30 年 2 月 28 日 ~ 令和 2 年 2 月 27 日

4. 受入機関名及び部局名

ウェルカムトラスト・サンガー研究所 Cancer, Aging and Somatic Mutation

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 書式任意(A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

派遣当初の研究計画は造血器腫瘍および正常造血における遺伝子異常について次世代シーケンサーを用いて解析する計画であったが、派遣開始時にすでにいくつかの先行研究が行われていたこと^{1,2}や派遣先で新たにオルガノイド(3次元培養システム)を用いた正常組織における遺伝子異常の解析を開始したという状況から、受け入れ研究者と派遣開始後に研究計画を再検討して、共同研究施設である Sam Janes 教授ら(University College London)のグループが開発した肺オルガノイドを用いた正常気管支上皮細胞における遺伝子異常の解析を行った³。

腫瘍は遺伝子異常の蓄積により起こるが、最近の研究により健常人においても血液、皮膚、食道などの組織では加齢に伴い遺伝子変異が蓄積し、また高頻度にドライバー遺伝子の獲得を伴うクローンの拡大がみられ、前癌病変となっていることが報告されている^{4,6}。正常組織の遺伝子解析には大きく2つの方法があり、一つは前述の血液、皮膚、食道などのように加齢とともに遺伝子変異を獲得してクローン拡大がみられる場合においては、比較的微小なサンプルを採取して遺伝子解析を行うことにより遺伝子変異を獲得したクローンをとらえることが可能である。さらにより最近ではレーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)を用いたサンプル採取と微量のDNAからのシーケンス技術により多くの正常組織で遺伝子解析が可能となってきたが、クローン拡大がみられる場合でも腫瘍と比べてクローンのサイズが小さく、また複数のクローンが混合していることもあり、解析は依然として困難である。もう一つの方法は単一細胞由来のオルガノド⁷やコロニー¹(造血細胞)を作成する方法であり、単一細胞由来の遺伝子解析ができるという点で微小サンプルの解析に比べて優れているが、解析が行われている臓器は現状では限られている。本研究では年齢や喫煙状態などの異なった背景を持つ16症例から生検により正常と考えられる気管支上皮細胞を採取して、気管支上皮細胞の起源である幹細胞と考えられている基底細胞を濃縮した後に単一細胞由来のオルガノドを合計662検体樹立した。基底細胞は肺扁平上皮癌の由来であると考えられており、肺癌を発症する以前の正常気管支上皮細胞における遺伝子異常や腫瘍化のメカニズムの解析を行うことを目的に、全ゲノムシーケンスにより遺伝子変異の解析を行った(図1)。

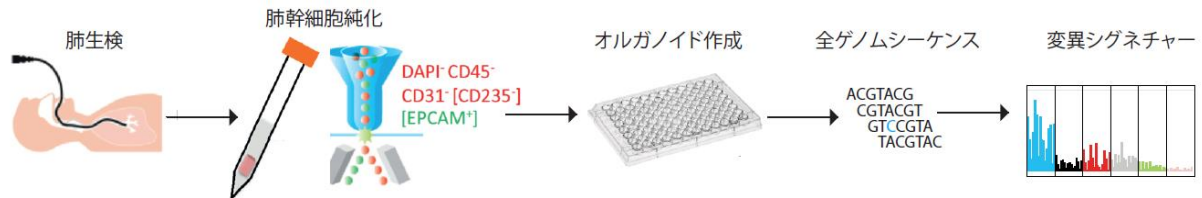


図 1. 肺オルガノイド細胞の全ゲノムシーケンス

1. 正常気管支上皮細胞の単一細胞レベルの遺伝子解析

正常気管支細胞由来オルガノイドの樹立にあたりマウス線維芽細胞をフィーダー細胞として使用したが、シーケンスにあたりマウス細胞由来のシーケンスリードの混入が問題であった。本解析では **Xenome**⁸ というツールを用いて、シーケンスリードをヒト由来、マウス由来、その他などに分類して、最終的にヒト由来と判定されたシーケンスリードのみを解析に使用した。マウス線維芽細胞あるいはヒト検体ではそれぞれ 97%、98% が正しくマウス、ヒト由来と判定されて (図 2a)、また実際にマウス由来のシーケンスリードの除去後のシーケンスデータを観察するとマウス由来の多くのヒトゲノムと異なった配列を持つシーケンスリードが除去され、マウス由来と考えられる遺伝子変異もほとんどが除去されていることが確認された (図 2b)。

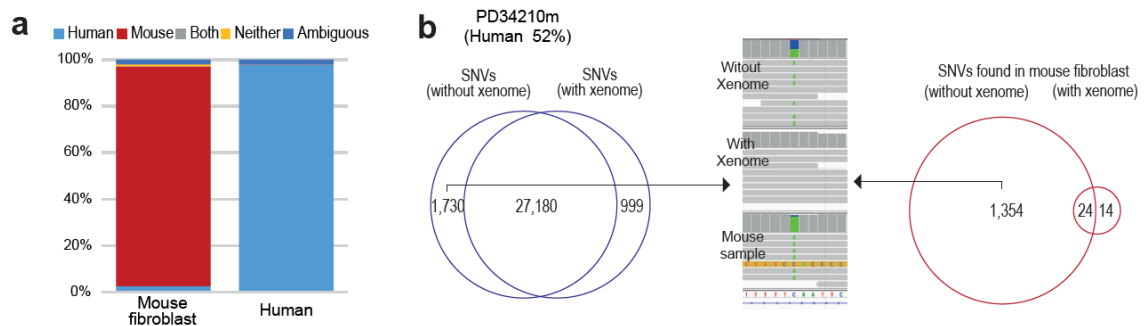


図 2. マウス由来のシーケンスリードの除去

マウス由来のシーケンスリードの除去後、662 検体のうち、642 検体について十分なシーケンスデータが得られた (図 3a)。さらに同定された遺伝子変異の変異アレル頻度の分布から 10 検体は単一細胞由来でないと考えられたが (図 3b)、残りの 632 検体は単一細胞由来と考えられ、以後の解析を行った (図 3c)。

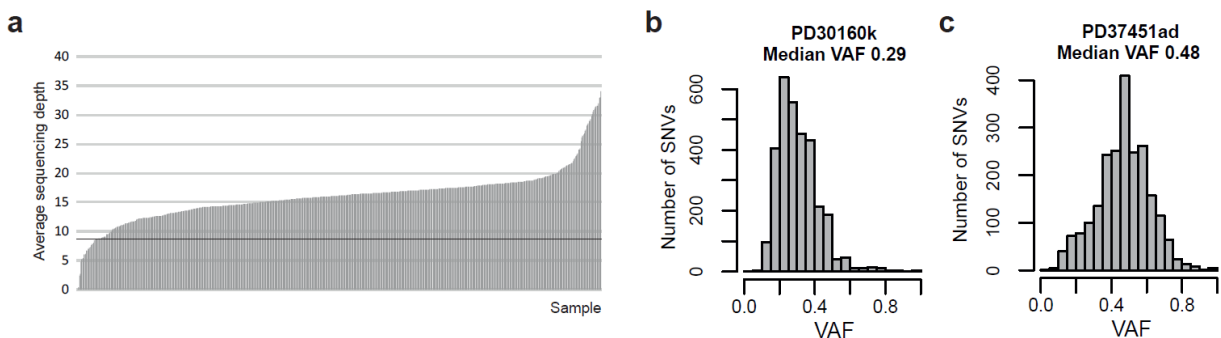


図 3. 全ゲノムシーケンスにより得られたデータの評価

2. 正常気管支上皮細胞における遺伝子変異の蓄積

正常気管支上皮細胞においても加齢に伴い遺伝子変異の蓄積が観察され、1 細胞あたりの年間の変異の蓄積率は約 22 個と推測された (linear mixed-effects model)。この数は過去に報告されている大腸、小腸、肝臓の年間 36 個という推定よりも少なく⁷、これらの臓器は肺に比べて幹細胞の分裂回数が多いことなどが反映されていると考えられた⁹。また、喫煙者の正常気管支細胞では遺伝子変異が増加しており、前喫煙者、喫煙者では非喫煙者に比べて平均してそれぞれ 2,330 個、5,300 個の遺伝子変異が増加していた (図 4)。また、喫煙歴のある症例ではそれぞれの細胞における遺伝子変異数のばらつきが大きくなり、非喫煙者でのばらつき (標準偏差) が 290 個と推定されたのに対して、前喫煙者、喫煙者ではそれぞれ 2,350 個、2,100 個と推定された ($P < 10^{-16}$)。

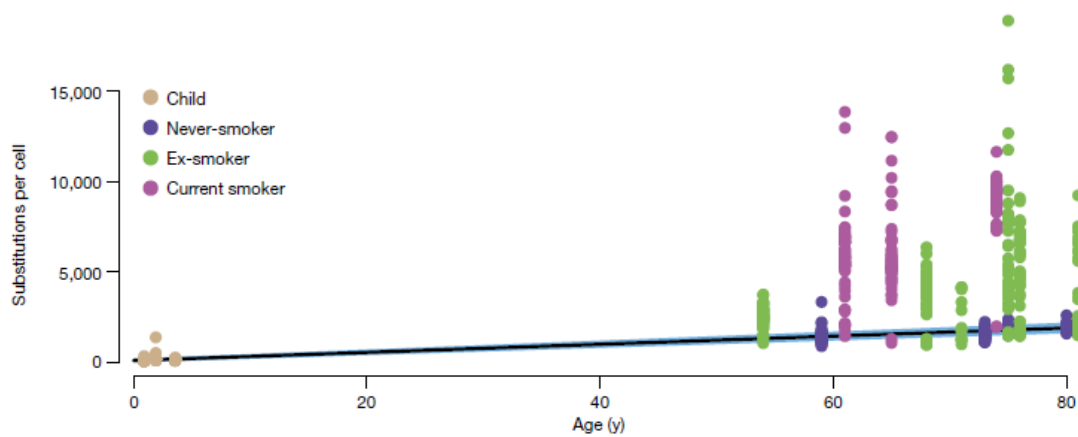


図 4. 全ゲノムシーケンスにより得られたデータの評価

興味深いことに、喫煙歴のある症例においても同じ年齢の非喫煙者と同等と予測される変異数を持つ細胞が観察された (図 4)。さらに、この正常に近い数の遺伝子変異数を持つ細胞は前喫煙者では典型的には 20–40%と喫煙者の症例に比べて 4 倍の頻度で観察された (図 5)。

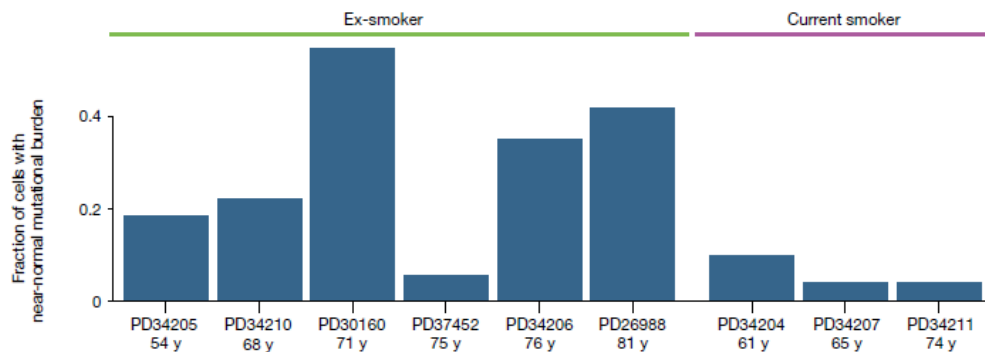


図 5. 前喫煙者、喫煙者にみられた正常に近い数の遺伝子変異を持つ細胞の割合

一方、同一症例で認められた前癌病変や肺癌の病変の遺伝子異常を解析すると¹⁰、変異の数やコピー数異常の見られた領域の割合は前癌病変や肺癌で著明に多い傾向がみられた。

3. 正常肺細胞における変異シグネチャー

遺伝子変異の原因を探索するために、変異シグネチャーの解析を行った。遺伝子変異を C>A, C>G, C>T, T>A, T>C, T>G の 6 つのパターンにわけ、さらに前後塩基のパターンをあわせて 96 種類に分類し、を用いて変異シグネチャーを抽出した。過去に肺がんでは報告のある変異シグネチャー^{11,12}が正常気管支細胞でも同定された(図 6)。加齢に伴って脱アミノ反応により CpG 部位に獲得される C>T 変異 (SBS1)、喫煙により獲得される C>A 変異 (SBS4)、加齢に伴って獲得される T>C 変異 (SBS5)、ウイルス感染などにより活性化されると考えられている cytidine deaminase である APOBEC ファミリーにより起こる T の後の C 部位にみられる C>T あるいは C>G 変異 (SBS2、SBS13) が獲得されていた。また、オルガノイドを樹立する過程で獲得された変異による C>A 変異を特徴とするシグネチャー¹³ (SBS18) も認められた。

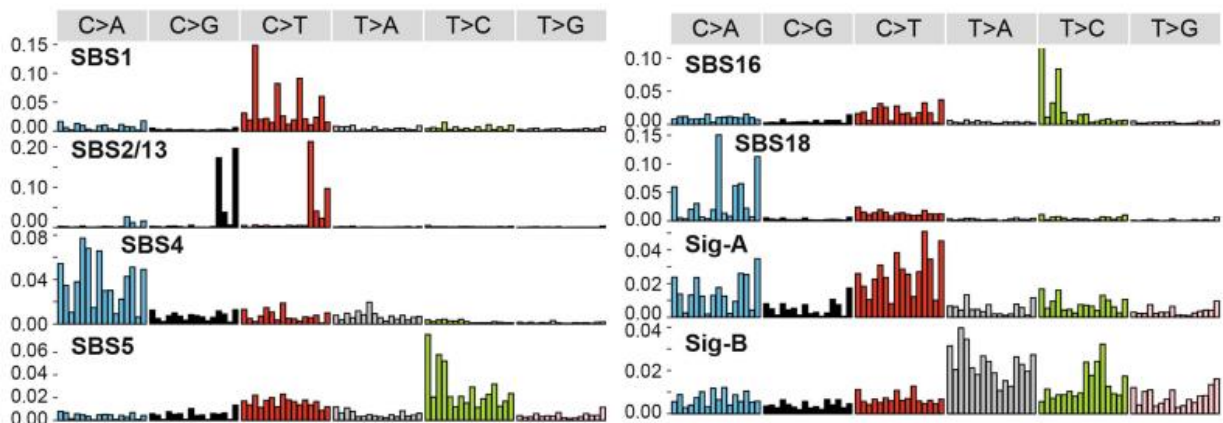


図 6. 正常気管支上皮細胞で検出された変異シグネチャー

SBS1、SBS5 は加齢に伴い変異数の増加がみられ、過去の報告と同様に、喫煙により SBS4、SBS5 の変異が増加していた¹⁴。また、過去に肝臓がんやアルコール摂取歴あるいは喫煙歴により増加すると報告されていた SBS16^{14,15} が同定され、喫煙者に多い傾向がみられた(図 7)。さらに、今回これまでに報告のない新規の変異シグネチャーが 2 つ同定された。このうち、Sig-B は T>A、T>C 変異により特徴づけられ、また喫煙者のみに同定され、喫煙による新規の変異シグネチャーである可能性が考えられた。

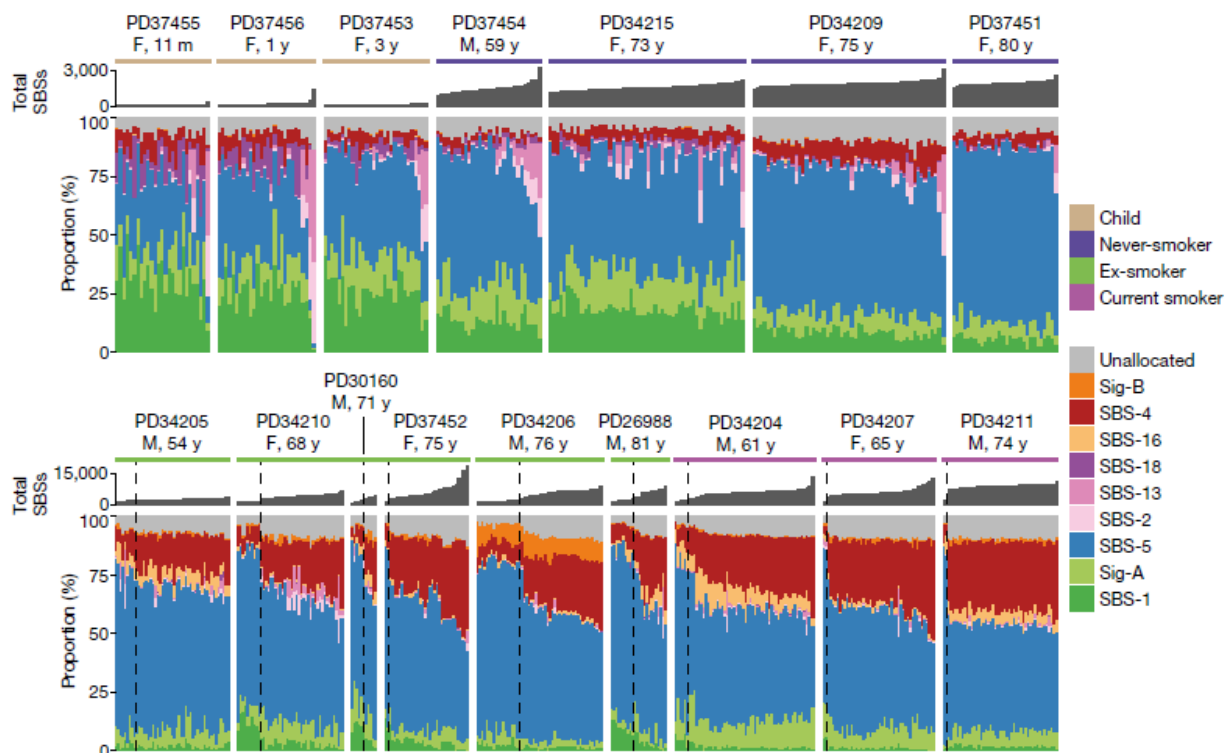


図 7. 正常気管支上皮細胞における変異シグネチャーの分布

4. 正常気管支上皮細胞にみられるドライバー遺伝子変異

正常気管支上皮細胞にみられるドライバー遺伝子変異を dN/dS 法により解析した¹⁶。肺扁平上皮癌や他の組織の正常扁平上皮と同様に、気管支上皮においても、*TP53*、*NOTCH1*、*FAT1* などの遺伝子が選択されていることが明らかになった (図 8a)。*TP53* 変異は複数のコロニーで共有されている変異の割合が高く (図 8a)、早期に獲得されている、あるいは特に強くクローン選択を受けていると考えられた。また、ドライバー遺伝子変異を持った細胞の割合は年齢、喫煙歴と相関がみられ (図 8b)、10 年毎に 1.5 倍増加し、喫煙者では非喫煙者に比べて 2.1 倍多くみられた。また喫煙者では癌細胞と同様に複数のドライバー変異を持つ細胞も観察された。

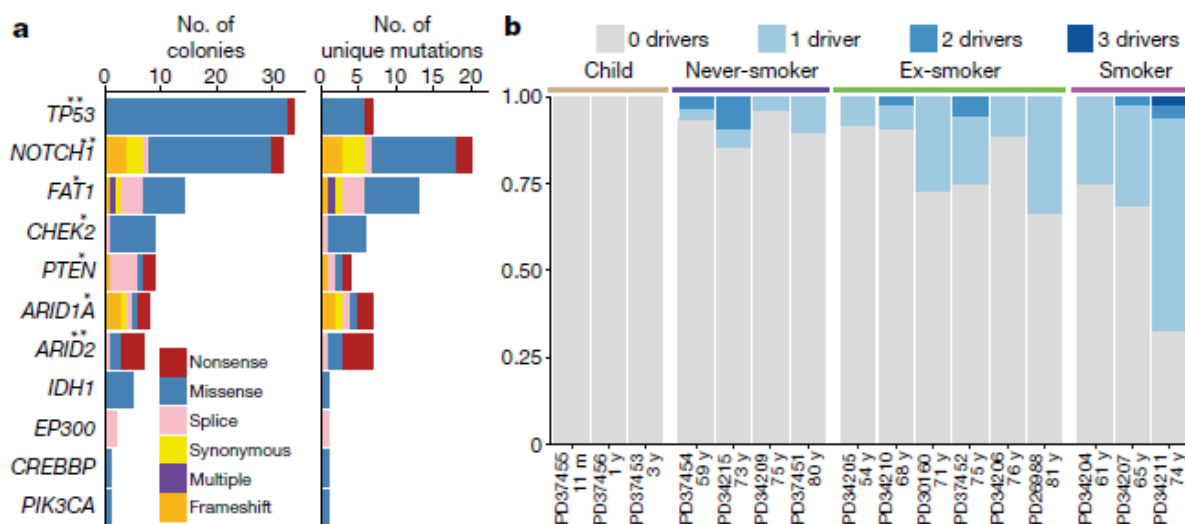


図 8. 正常気管支上皮細胞で検出されたドライバー遺伝子変異

5. 正常気管支上皮細胞のテロメア長

正常気管支上皮細胞の過去の分裂歴を調べるため、全ゲノムシーケンスのデータによりテロメア長を推定した。小児や非喫煙者では変異数とテロメア長との間に大きな相関はみられなかったが、喫煙歴のある症例、特に前喫煙者で変異数とテロメア長の間に強い負の相関関係がみられた (図 9)。前喫煙者における前述の正常に近い数の遺伝子変異を持つ細胞では著明にテロメア長が長い傾向がみられた。

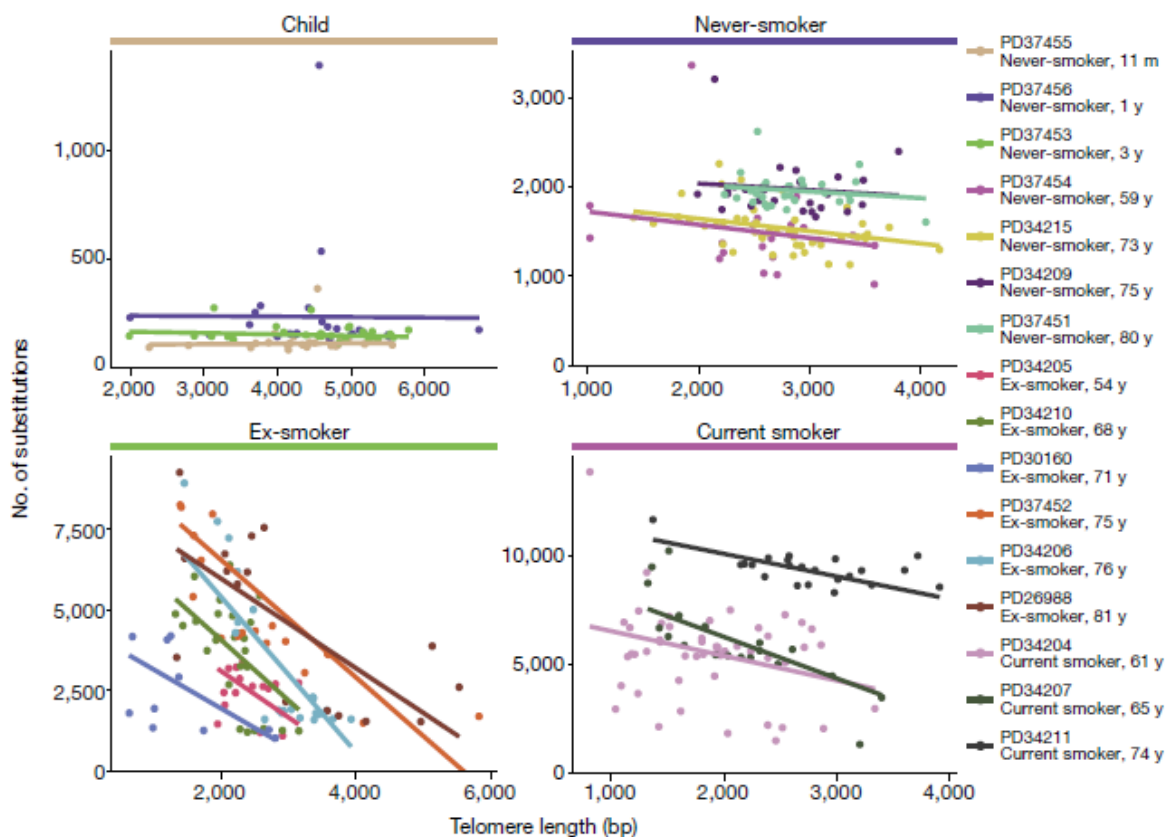


図 9. 正常気管支上皮細胞のテロメア長

6. まとめ

今回の研究により、正常な気管支細胞にも加齢に伴い遺伝子変異が蓄積していること、さらに喫煙により遺伝子変異数が増加し、発がんにつながるドライバー変異の数も増えていることが明らかになった。一方で、喫煙歴がある人にも非喫煙者の細胞に近い数の遺伝子変異を持つ細胞がみられ、特に前喫煙者では喫煙者に比べて高頻度にみられた。禁煙により肺がん発症のリスクが低下することが従来から知られていたが¹⁷、この前喫煙者における正常に近い細胞の増加は禁煙によるがんの発症率の低下に関係している可能性があると考えられた。一方でこの非喫煙者に近い数の遺伝子変異を持つ細胞の起源や遺伝子変異数が少ない理由、禁煙により増加する理由については現時点では不明である。テロメア長が長いことから *quiescent* であった幹細胞を起源としている可能性が考えられるが、物理的なバリアーにより変異の蓄積から守られてきた幹細胞が存在する可能性もある。皮膚など他の組織でも同様に遺伝子変異数が少ない細胞がみられると報告されており、他の組織においても同様の細胞が存在していると考えられる。

文献

- 1 Lee-Six, H. *et al.* Population dynamics of normal human blood inferred from somatic mutations. *Nature* **561**, 473-478, doi:10.1038/s41586-018-0497-0 (2018).
- 2 Osorio, F. G. *et al.* Somatic Mutations Reveal Lineage Relationships and Age-Related Mutagenesis in Human Hematopoiesis. *Cell Rep* **25**, 2308-2316 e2304, doi:10.1016/j.celrep.2018.11.014 (2018).
- 3 Yoshida, K. *et al.* Tobacco smoking and somatic mutations in human bronchial epithelium. *Nature*, doi:10.1038/s41586-020-1961-1 (2020).
- 4 Martincorena, I. & Campbell, P. J. Somatic mutation in cancer and normal cells. *Science*

- 349, 1483-1489, doi:10.1126/science.aab4082 (2015).
- 5 Martincorena, I. *et al.* Somatic mutant clones colonize the human esophagus with age. *Science* **362**, 911-917, doi:10.1126/science.aau3879 (2018).
- 6 Yokoyama, A. *et al.* Age-related remodelling of oesophageal epithelia by mutated cancer drivers. *Nature* **565**, 312-317, doi:10.1038/s41586-018-0811-x (2019).
- 7 Blokzijl, F. *et al.* Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life. *Nature* **538**, 260-264, doi:10.1038/nature19768 (2016).
- 8 Conway, T. *et al.* Xenome--a tool for classifying reads from xenograft samples. *Bioinformatics* **28**, i172-178, doi:10.1093/bioinformatics/bts236 (2012).
- 9 Tomasetti, C. & Vogelstein, B. Cancer etiology. Variation in cancer risk among tissues can be explained by the number of stem cell divisions. *Science* **347**, 78-81, doi:10.1126/science.1260825 (2015).
- 10 Teixeira, V. H. *et al.* Deciphering the genomic, epigenomic, and transcriptomic landscapes of pre-invasive lung cancer lesions. *Nature medicine*, doi:10.1038/s41591-018-0323-0 (2019).
- 11 Alexandrov, L. B. *et al.* Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* **500**, 415-421, doi:10.1038/nature12477 (2013).
- 12 Alexandrov, L. B. *et al.* The repertoire of mutational signatures in human cancer. *Nature* **578**, 94-101, doi:10.1038/s41586-020-1943-3 (2020).
- 13 Zou, X. *et al.* Validating the concept of mutational signatures with isogenic cell models. *Nat Commun* **9**, 1744, doi:10.1038/s41467-018-04052-8 (2018).
- 14 Alexandrov, L. B. *et al.* Mutational signatures associated with tobacco smoking in human cancer. *Science* **354**, 618-622, doi:10.1126/science.aag0299 (2016).
- 15 Letouze, E. *et al.* Mutational signatures reveal the dynamic interplay of risk factors and cellular processes during liver tumorigenesis. *Nat Commun* **8**, 1315, doi:10.1038/s41467-017-01358-x (2017).
- 16 Martincorena, I. *et al.* Universal Patterns of Selection in Cancer and Somatic Tissues. *Cell* **171**, 1029-1041 e1021, doi:10.1016/j.cell.2017.09.042 (2017).
- 17 Peto, R. *et al.* Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ* **321**, 323-329, doi:10.1136/bmj.321.7257.323 (2000).