

加齢に伴う正常組織の遺伝子異常とがん化のメカニズムを解明 —食道上皮は加齢に伴いがん遺伝子の変異を獲得した細胞で再構築される—

概要

がんは多くの先進諸国で死因の第一位を占める深刻な病気ですが、その70%は65歳以上の高齢者に発症します。しかし、「がんがなぜ高齢者に好発するのか」については未だ十分解明が進んでいません。また、喫煙や飲酒といった生活習慣ががんの発症に関係することはよく知られていますが、これらの因子が加齢と関連してどのようにがんの発症に関わるかについても、未だ十分な解明が進んでいません。

今回、京都大学大学院医学研究科・腫瘍生物学講座 小川誠司 教授、横山顕礼 同特定助教、垣内伸之 同研究員、吉里哲一 同助教、同腫瘍薬物治療学講座 武藤学 教授および東京大学医科学研究所附属ヒトゲノム解析センター 宮野悟 教授らを中心とする研究チームは、食道がんが高度の飲酒歴と喫煙歴を有する人に好発することに着目し、“一見正常”な食道に生じている遺伝子変異を、最新の遺伝子解析技術で詳細に解析することにより、がんが高齢者で発症するメカニズムの一端を解明することに成功しました。

解析の結果、驚くべきことに、我々の食道上皮は、加齢にともなって、食道がんで頻繁に認められる遺伝子の変異を獲得した細胞が徐々に増えていき、70歳を超える高齢者では全食道面積の40~80%がこうしたがん遺伝子の変異をもった細胞で置き換わることがわかりました。こうした食道上皮の異常な細胞による「再構築」は、すでに乳児の時期から始まっており、全ての健常人で例外なく認められましたが、高度の飲酒と喫煙歴のある人では、この過程が強く促進され、しかも、がんで最も高頻度に異常が認められる *TP53* 遺伝子や染色体に異常を有する細胞の割合が顕著に増加することが明らかになりました。これらの結果は、なぜがんが高齢者に好発するのか、また、それがどのようにして飲酒や喫煙といったリスクによって促進されるのかについて、重要な手がかりを与える知見です。

本研究成果は、2019年1月2日に国際科学誌「Nature」にオンライン掲載されました。

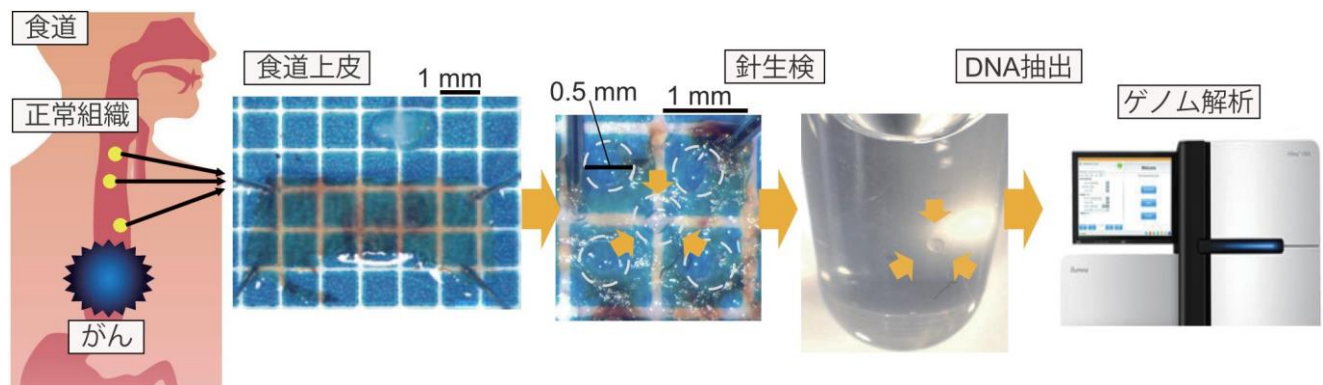


図1：研究の概要

1. 研究の背景

我々のからだは約 30 兆個もの細胞から作られています。がんという病気は、この中の一つの細胞が異常な細胞分裂を繰り返して際限なく増殖することによって発症する病気です。がんの発症時には、こうした異常な細胞は数千億個にも達すると考えられますが、それらは、もとをただせば、30 兆個の中のたった一つの細胞が異常に増殖した結果だということになります。こうした一つの細胞に由来する細胞集団のことを「クローン」、また、一つの細胞に由来する細胞の増殖を「クローン性増殖（拡大）」と呼びますが、そうしたクローン性増殖が生ずる原因は、これらの細胞がその生存や増殖に有利に働く「ゲノム」の異常（ドライバー変異）を獲得することにあると考えられています。このことは、近年の、次世代シーケンサーを用いた大規模なゲノム解析研究によって繰り返し確かめられており、がんの発症にいたるまでには、しばしば複数のドライバー変異が生じていることも明らかにされています。すなわち、このような複数のドライバー変異の獲得によって生存上の有利性を獲得した細胞が、やがて正常の制御を逸脱して増殖し、異常な振る舞いをする病気が「がん」ということになります。がんが「ゲノムの病気」といわれるゆえんです。

一方、がんの原因となるドライバー変異が、いつ、どのような細胞に獲得され、どのような経過で、クローン性拡大が進行して、最終的には数千億個にも達するがん細胞のクローンの集団が形成されるのか、また、そうした過程が、様々な「発がんリスク」によってどのように影響されるのかについては未だ十分に明らかにされていません。これは、がんが発症する以前にがん化が進行する過程を詳細に解析することが難しいことが大きな要因になっています。

今回、我々は、こうした発がんリスクとの関連がよく知られている食道がんに注目し、一見正常に見える食道上皮に、発がんに先立って生ずる遺伝子の異常を詳細に解析することにより、がんがなぜ高齢者に好発するのか、また、それがどのようにして飲酒や喫煙といったよく知られた食道がんの危険因子によって促進されるのかについて、そのメカニズムを理解する重要な手がかりを得ることに成功しました。

2. 研究の概要

正常組織における遺伝子変異の解析

正常組織において発がんに先だって生ずるクローンの拡大を解析する目的で、様々な年齢、喫煙歴・飲酒歴を有する被験者から内視鏡下で食道の上皮を採取し、次世代シーケンサーを用いて解析することにより、クローン拡大の証拠となる遺伝子変異の検出を試みました。正常組織ではクローン拡大の大きさが、がん組織と比較して極端に小さいことが予測されたため、内視鏡生検によって得られた食道上皮の生検検体から、最小で直径 0.5 mm という非常に小さな生検針を用いて微小な食道上皮試料を採取して検討を行いました（**図 1**）。

その結果、大変興味深いことに、食道がんを有する患者では、がんでない、一見正常に見える食道上皮においても、解析した全ての試料で、遺伝子の変異、すなわちクローンの拡大が認められることがわかりました。さらに驚くべきことに、こうした遺伝子変異は、食道がん罹患していない健常人の食道上皮においても高頻度に観察されることが明らかになりました。検出される遺伝子変異の数は、被験者の年齢とともに増加し、また、それぞれの試料の中で変異を有する細胞の割合も加齢とともに増加傾向を示し、さらに、高度の飲酒・喫煙歴のある被験者から採取された試料では、有意に変異数が増加していました（**図 2**）。

これらの解析結果により、一見正常に見える食道の上皮においても、遺伝子変異を獲得したクローンが生じ、加齢とともに拡大すること、また、クローン拡大が高度の飲酒や喫煙によって促進されることが示唆されました。

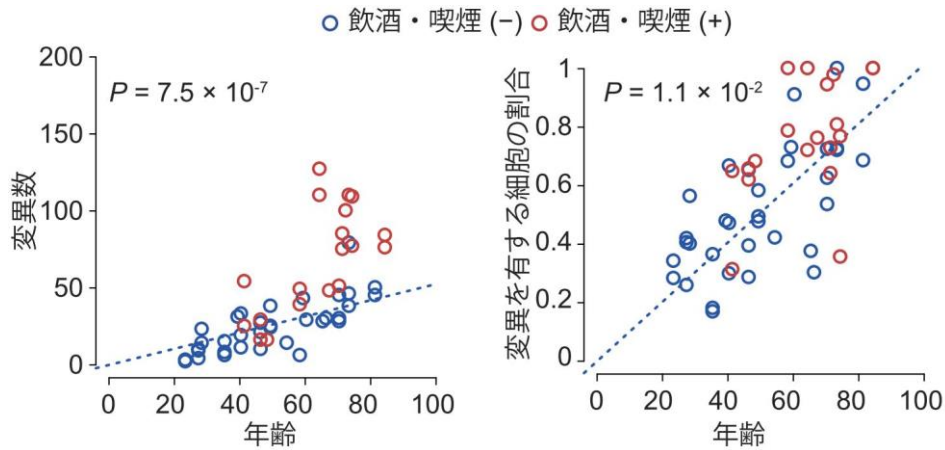


図2：正常食道上皮における年齢と遺伝子変異の数や変異をもつ細胞の割合の関係

変異の起源の解析

次に我々は正常食道における遺伝子変異がどのような要因によって生ずるかについて、正常食道上皮で検出された変異の特性を詳細に調べることで検討しました。遺伝子変異はその原因によって特徴的な変異のパターンを示すことが知られており、特徴的なパターンを同定することで変異がどのような要因によって生じているかを推測することができます。正常食道上皮 157 試料と食道がん 519 試料で認められた変異の解析の結果、正常食道および食道がんで認められる変異は、主として Sig. A-D の 4 つのパターンの変異様式に分類されることがわかりました。このうち、Sig. A は APOBEC と呼ばれる酵素の作用によって生じている変異で、がんの試料にはほぼ特異的に認められることからがん化との密接な関連が示唆されました (図3左)。一方、Sig. D はこれまで飲酒との関連が指摘されてきた変異様式で、高度の飲酒歴を有する被験者の正常食道上皮で有意に増加していること (図3右)、また飲酒と Sig. D 変異の関連は単一細胞レベルでも確認されることから、アルコールの摂取によって食道上皮の変異が誘発されていることが示唆されました。

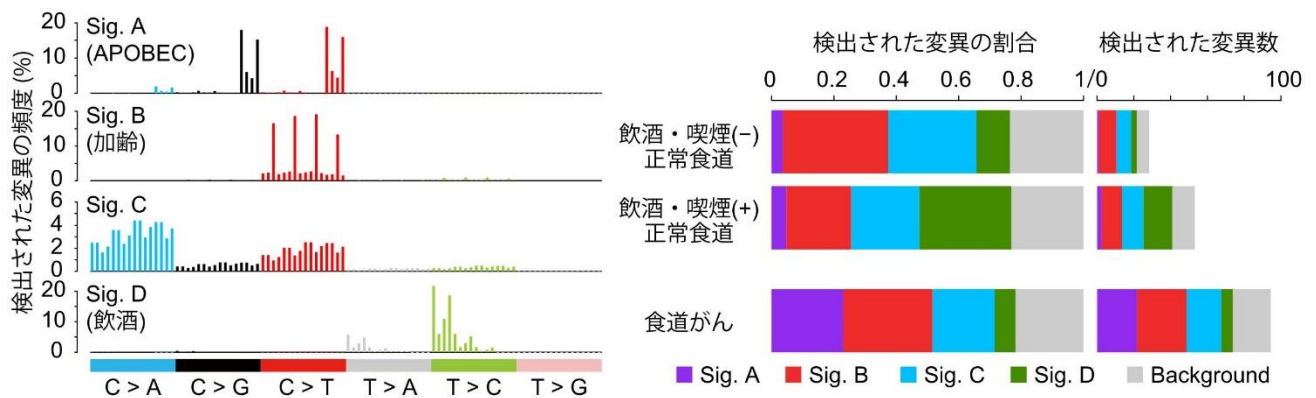


図3：食道上皮から検出された4つの変異パターンと正常食道・食道がんとの関係

ドライバー変異の解析

正常食道上皮 157 試料の全エクソン解析 (全ゲノムのうち機能的に重要なエクソン配列のみを網羅的に解析する手法) では、計 5770 個の遺伝子変異が検出されましたが、これらの変異のうち、異なる試料で繰り返し認められる変異を解析することにより、正常食道上皮のクローンの拡大の原因となっているドライバー変異の標的となっている遺伝子(ドライバー遺伝子)の同定を行いました。その結果、正常食道上皮では 10 個のド

ライバーが同定されました。これらのドライバー遺伝子は、食道がん 519 試料で同定されたドライバー変異と一部重複しますが、いくつかのドライバー変異については、正常食道上皮と食道がん試料では、変異の頻度が大きく異なっていました。食道がんのほとんどの試料で認められる *TP53* 変異の頻度は、正常食道上皮では 31%にとどまる一方、正常食道上皮では *NOTCH1* 遺伝子変異が突出した頻度で観察され、食道がんとの間に大きな変異頻度の差異が認められました。*TP53* 変異、*NOTCH1* 変異の他、*NFE2L2*, *CDKN2A*, *FBXW7* 変異（食道がん > 正常食道上皮）および *FAT1*, *NOTCH2*, *NOTCH3*, *ZFP36L2*, *PPM1D*, *CHEK2*, *PAX9* 変異（食道がん < 正常食道上皮）においても、食道がんと正常食道上皮の間で有意な変異頻度の差異が観察されました(図 4 左)。

このことから、正常食道上皮と食道がんのクローン性増殖では共通したメカニズムが存在する一方で、両者におけるクローン性増殖のメカニズムは完全に同一ではなく、それぞれに固有のメカニズムの存在も示唆されました。観察される変異の総数と同様に、正常食道上皮で検出されるドライバー変異の数も、加齢および食道がんリスクとの強い相関が認められ(図 4 右)、また、食道がんリスクを有する被験者では、*NOTCH1* 変異や *TP53* 変異がより高い頻度で観察されました。

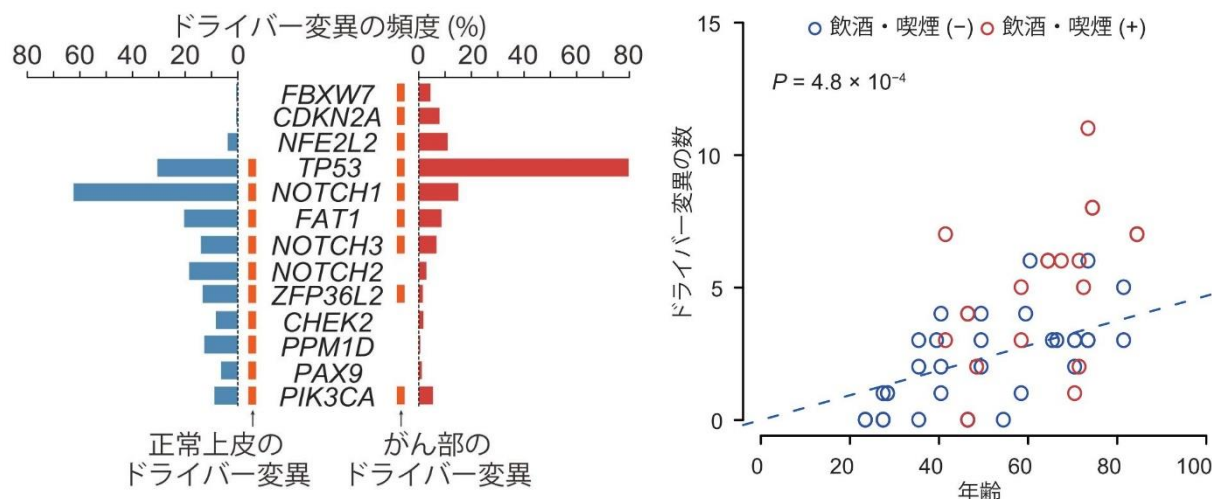


図 4：正常食道上皮と食道がんのドライバー変異の頻度 / 正常上皮におけるドライバー変異と年齢の関係

正常食道上皮におけるクローン構造の解析

以上の解析の結果から、正常食道上皮では、加齢に伴って、ドライバー変異を獲得した多数のクローン拡大が生じていること、またそれらは、高度の飲酒や喫煙によって促進されること、クローン拡大には、食道がんでは認められるのと同様のドライバー変異が関与している一方、正常食道上皮と食道がんのクローンの拡大には異なるメカニズムも存在することが示唆されました。

そこで次に、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目的で、 $13\text{mm}^2 \sim 25\text{mm}^2$ のサイズの内視鏡生検組織から、多数の近接した微小試料(0.2mm^2)を採取し、全エクソン解析により、これらの点を検討しました。その結果、飲酒歴や喫煙歴のない 20 歳代の若年者においても、すでにドライバー変異によるクローンの拡大が認められるものの、それらは食道上皮の 4%にとどまる一方、高齢者においては、飲酒歴や喫煙歴のない被験者においても、多数の独立した *NOTCH1* 変異やその他の変異によるクローンの拡大が食道上皮の 40%~80%に及ぶ領域に拡大しており、食道の上皮が広範囲にわたってこうしたドライバー変異を有するクローンによって再構築されていました(図 5 左)。さらに、

飲酒や喫煙歴を有する高齢者においては、*NOTCH1* 変異に加えて多数の *TP53* 変異を有するクローンが広範囲にわたって観察されました(図 5 右)。

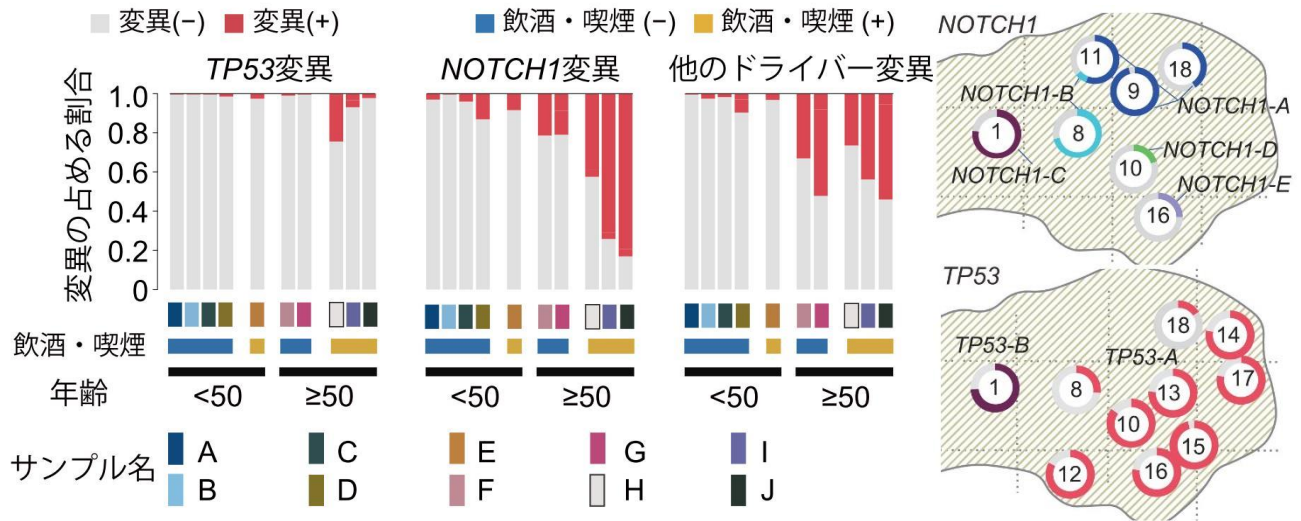


図 5：正常食道上皮におけるドライバー変異の拡大した領域 / クローンの拡がり 64 才 飲酒・喫煙例

正常食道上皮におけるクローン拡大の履歴の解析

多数の近接して採取された微小食道上皮試料の解析では、近接した試料間で共有されている遺伝子変異を解析することにより、観察されたクローンの進化の履歴を、ドライバー変異が獲得された年代とともに推定することが可能となります。高度の飲酒・喫煙歴を有する 81 歳男性の正常食道上皮では、*NOTCH1* 変異が 2 歳前後の乳児期にすでに獲得されており、これに引き続いて *NOTCH2* 変異、*EP300* 変異、*AJUBA* 変異を獲得したクローンが次々に拡大することにより、複数のサブクローンが拡大していく過程を確認することができます(図 6)。このような解析を 29 個のクローンについて行った結果、*NOTCH1* に代表される最初のドライバー変異の多くが思春期の後期までに獲得されており、これに引き続いて複数のドライバー変異を獲得したクローンの拡大が生じていることが明らかとなりました。高度の飲酒・喫煙歴を有する被験者の食道上皮におけるクローンでは、それらを有さない被験者の上皮のクローンと比較して、ドライバー変異を含むより多数の変異が進化の過程で獲得されており、また、20 歳以降の進化の過程では、アルコール摂取に関連した変異パターンが有意に増加しており、飲酒や喫煙によってクローンの進化がより促進されていることが明らかとなりました。

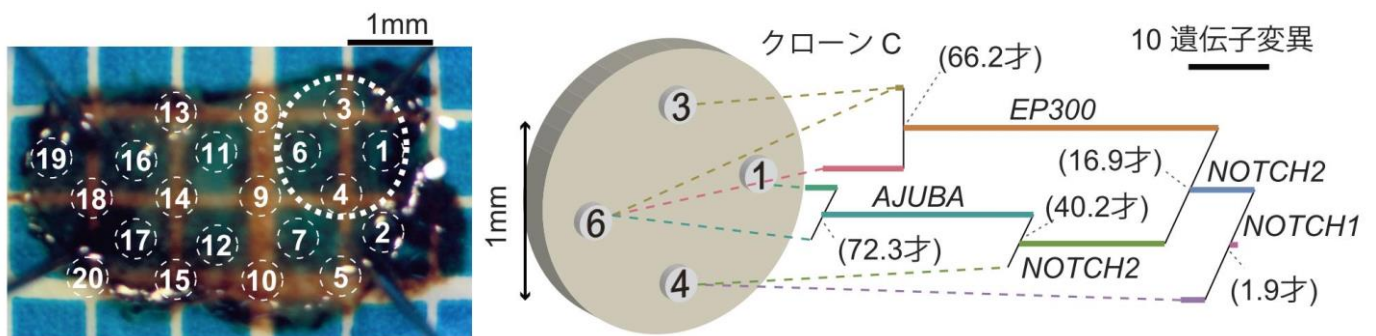


図 6：系統樹解析 81 才 男性 飲酒・喫煙例

3. 波及効果、今後の予定

冒頭に述べたとおり、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すが、今回の研究の結果、このようなクローン性増殖は生後間もない時期からすでに正常の食道上皮で生じていることがわかりました。このようなクローンの拡大は、若年者では極めて限定的ですが、加齢とともに食道上皮全体に拡大し、70歳以上の高齢者では、食道全体の40～80%が、食道がんで頻繁に認められるドライバー変異を獲得して増殖した1万個にも達する様々なクローンによって再構築されます。このクローン拡大の過程は高度の喫煙や飲酒といった生活習慣リスクによって大きく影響され、こうした生活習慣リスクを持つ人では、クローンの数が増大するとともに、TP53変異など、リスクのない人の食道上皮とは異なるドライバー変異を有するクローンの拡大が生じます。

今回の研究成果は、がんの初期発生過程に関する新たな知見を提供するとともに、がんが高齢者で多発し、高度の喫煙や飲酒といった発がんリスクによって加速するメカニズムを理解する上での重要な手がかりが得られました。近年、一見正常に見える皮膚や血液においても、このようなクローンの拡大が生じていることが報告されていますが、加齢に伴う遺伝子変異を獲得したクローンの拡大は、多細胞生物では頻繁に生じており、がんのみならず、老化や炎症といった、加齢に伴う様々な人の病態に関与している可能性が示唆されます。

4. 研究プロジェクトについて

本研究プロジェクトは、下記の補助金による支援を受けて行われました。

- 科学研究費補助金・新学術領域研究
- 科学研究費補助金・基盤研究（S）
- 日本医療研究開発機構研究費・次世代がん医療創生研究事業
- 日本医療研究開発機構研究費・革新的がん医療実用化研究事業
- 日本医療研究開発機構研究費・オーダーメイド医療実現プログラム・発症メカニズム研究領域
- 文部科学省ポスト「京」で重点的に取り組むべき社会的・科学的課題に関するアプリケーション開発・研究開発

<研究者のコメント>

近年の研究によって、がんはゲノムに傷が生じた細胞が増殖することによって疾患であるということがわかってきましたが、今回の研究によって、そのようなゲノムに傷をもった細胞が一体どのようにして生じてくるのかということを知り明かす大きな手がかりが得られました。がんは国民の生命を脅かす深刻な疾患ですが、今回の研究成果を突破口として、がんが生ずる初期のメカニズムの解明に取り組んでいます。私たちの研究が、がんの早期診断や予防に貢献し、がんの死亡率の低減に資することができればと考えています。（京都大学医学研究科 腫瘍生物学講座・教授 小川誠司）



<論文タイトルと著者>

タイトル：Age-related remodelling of oesophageal epithelia by mutated cancer drivers

著者：Akira Yokoyama^{*1,2}, Nobuyuki Kakiuchi^{*1,3}, Tetsuichi Yoshizato^{*1}, Yasuhito Nannya¹, Hiromichi Suzuki¹, Yasuhide Takeuchi^{1,4}, Yusuke Shiozawa¹, Yusuke Sato¹, Kosuke Aoki¹, Soo Ki Kim¹, Yoichi Fujii¹, Kenichi Yoshida¹, Keisuke Kataoka¹, Masahiro M. Nakagawa¹, Yoshikage Inoue^{1,8},

Tomonori Hirano^{1,3}, Yuichi Shiraishi⁵, Kenichi Chiba⁵, Hiroko Tanaka⁶, Masashi Sanada⁷, Yoshitaka Nishikawa², Yusuke Amanuma², Shinya Ohashi², Ikuo Aoyama², Takahiro Horimatsu², Shin'ichi Miyamoto³, Shigeru Tsunoda⁸, Yoshiharu Sakai⁸, Maiko Narahara⁹, J.B. Brown¹⁰, Yoshitaka Sato¹¹, Genta Sawada¹², Koshi Mimori¹², Sachiko Minamiguchi⁴, Hironori Haga⁴, Hiroshi Seno³, Satoru Miyano^{5,6}, Hideki Makishima¹, Manabu Muto^{2†}, and Seishi Ogawa^{1,13}

所属機関：¹Department of Pathology and Tumor Biology, Kyoto University, Kyoto, Japan, ²Department of Clinical Oncology, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan, ³Department of Gastroenterology and Hepatology, Kyoto University, Kyoto, Japan, ⁴Department of Diagnostic Pathology, Kyoto University, Kyoto, Japan, ⁵Laboratory of DNA information Analysis, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, ⁶Laboratory of Sequence Analysis, Human Genome Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan, ⁷Department of Advanced Diagnosis, Clinical Research Center, Nagoya Medical Center, Nagoya, Japan, ⁸Department of Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan, ⁹Department of Human Genetics, McGill University, Montreal, Canada, ¹⁰Laboratory of Molecular Biosciences, Life Science Informatics Research Unit, Kyoto University, Kyoto, Japan, ¹¹Sato Clinic, Okayama, Japan, ¹²Department of Surgery, Kyushu University Beppu Hospital, Beppu, Japan, ¹³Department of Medicine, Center for Hematology and Regenerative Medicine, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden

掲載誌：Nature DOI：https://doi.org/10.1038/s41586-018-0811-x

<用語解説>

ゲノム：ある生物のもつ全ての遺伝情報、あるいはこれを保持する DNA の全塩基配列である。全ゲノムの約 1~1.5%に過ぎないタンパク質のアミノ酸配列に変換されるコード（エクソン）領域とそれ以外の非コード領域に大別される。

シーケンス：DNA を構成するヌクレオチドの塩基配列を決定すること。次世代シーケンサーは、従来の蛍光キャピラリーシーケンサーと対比させて用いられる用語。次世代シーケンサーの登場により、大量の塩基配列を短時間で決定することが可能となり、がんおける遺伝子変異の知見が飛躍的に進歩した。

<お問い合わせ先>

小川 誠司（おがわ せいし）

京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座 教授

TEL：075-753-9285

FAX：075-753-9282

E-mail：sogawa-tky@umin.ac.jp

横山 顕礼（よこやま あきら）

京都大学大学院医学研究科腫瘍薬物治療学講座 特定助教

TEL：075-753-4592

FAX：075-753-4594

E-mail : yokoaki@kuhp.kyoto-u.ac.jp

垣内 伸之 (かきうち のぶゆき)

京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座 研究員

TEL : 075-753-9285

FAX : 075-753-9282

E-mail : kakiuchi@kuhp.kyoto-u.ac.jp

吉里 哲一 (よしざと てついち)

京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座 助教

TEL : 075-753-9285

FAX : 075-753-9282

E-mail : yoshizato-tky@umin.ac.jp

宮野 悟 (みやの さとる)

東京大学医科学研究所附属ヒトゲノム解析センター 教授

TEL : 03-5449-5615

FAX : 03-5449-5442

e-mail : miyanolab-jimu@edelweiss.hgc.jp