

### 2. 正常組織に潜むクローン性病変

京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座

小川 誠司

**Key words** : 正常組織, クローン, がんの起源

#### はじめに

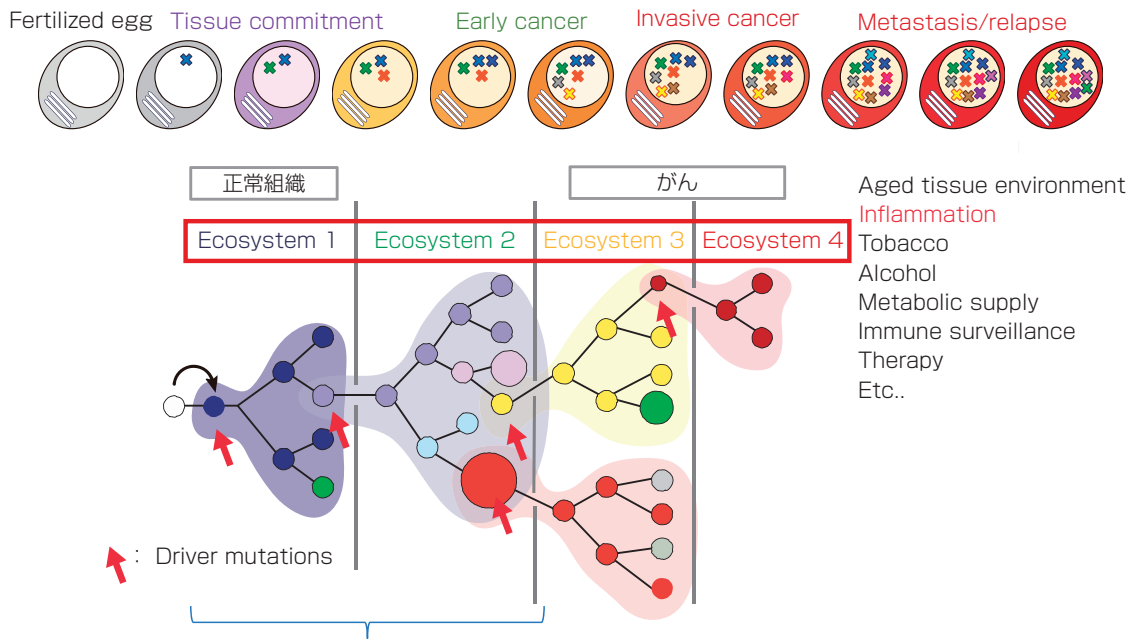
現在広く受け入れられている多段階発がんのモデルによれば, がんの発症は, 遺伝子変異によって生存・増殖の優位性を獲得した細胞が集団で選択され, さらに選択された集団のなかで, 新たな変異を獲得した細胞が選択される, という過程を繰り返すことにより, 数百億から千億個のクローンからなる細胞集団が形成され, がんの診断に至ると考えられる(図 1). 従ってこのような選択を駆動するドライバー変異を同定することは, 発がんの理解のみならず, このような遺伝子変異を標的とする薬剤の開発によって治療成績の向上を目指す上でも重要なことはいうまでもない. 実際, 過去 10 年あまりの間に国際協調研究を通じて, ヒトの主ながんにおいて, 主要なドライバー遺伝子が同定され, 発がんの理解は著しく進んだ. 一方, このような多段階発がんの初期過程で生じている選択についてはほとんど理解が進んでいなかった. 近年, このような初期のクローンの選択に関する知見が次々に報告され, 発がんの初期過程に関する理解に大きな進展が認められつつあり, がんの超早期診断, 予防, あるいは予防的治療の開発という観点からも, 大変注目されつつある<sup>1)</sup>. 本

略歴は 130 頁に記載

講演では, 発がんの初期過程に関する我々の近年の研究成果を紹介する.

#### 1. 加齢にともなう正常食道上皮におけるクローン拡大

最初に紹介するのは, 正常食道上皮における変異の獲得と食道発がんの関連に関する研究である<sup>2)</sup>. 食道がんは本邦において, がん死亡の 8 位をしめる比較的頻度の高いがんである. その治療成績については, 近年著しい進歩が認められたものの, 進展例での長期生存は期待しにくい. 一方, 食道がんの患者の 8~9 割は高度の飲酒や喫煙歴を有しており, これらの生活習慣との強い関連が知られている. また, がんの発症に先立ってはしばしば食道上皮の広範な異形成が認められ, また希ならず, 手複数部位の同時発がんや術後の新たに生じたと考えられる腫瘍の形成を認めることから, 食道がん患者の食道には発がんを促進するいわゆるフィールド効果の存在が提唱されている. そこで我々はこのようなフィールド効果の本態を明らかにすることを目的として, まず, 食道がんを発症した患者の外科切除検体について, 病理学的に正常と考えられる食道上皮から数十カ所の微小試料を採取し, 全エクソンシーケンス解析によって, 試料に生じている体細胞変異の網羅的な同定を行った. その結果, 大変驚いたことに, 全ての解析



Modified from Greaves, M. & Maley, C. C., Nature. 2012 より改編

図 1. 多段階発がんモデルとクローン選択

がんは遺伝子変異によって増殖・生存の有利性を獲得したクローンが逐次新たな変異と増殖生存の有意性を獲得することによって生ずると考えられる。現在おもな癌腫については、次世代シーケンス技術によって主要なドライバーの同定が終了しているが、正常組織におけるクローンの選択のメカニズムについては網羅的な同定が進んでいる。一方、がんの初期過程におけるクローンの選択については多くが不明である。近年、こうしたがん化の初期過程に関する知見が集積されつつある。

試料において、食道がんで頻繁に認められるドライバー変異を含む、多数の体細胞変異が同定された。異なる試料間での変異の重複はなく、これらの体細胞変異で同定されたクローンは遺伝的に全て独立であることが確認された。またしばしば一つの試料に同一遺伝子に生じた多数の独立な変異が観察されることから、それぞれの試料はさらに多数のクローンを含んでいると推定された。さらに多数の正常微小試料の解析の結果、観察される変異の個数と変異リード数から推定されるクローンの平均サイズは年齢に比例して増大することから、これらのクローンは加齢に伴って獲得される変異によって選択され、年齢とともに拡大することが示唆された。さらに、興味深いことに、高度の飲酒・喫煙歴を有する被験者では、年齢に比して変異数の大

きな上昇が認められ、これらの生活習慣と変異の生ずる頻度、クローンの選択との関連が推測され、このことはこれらが食道発がんの強いリスクとなっていることを考えると、食道上皮における変異の獲得速度を加速させることが、これらの因子による発がんリスクの上昇と関連していると推定された。また、多数試料の解析に基づいて、食道上皮で有意に選択される遺伝子変異を解析したところ、当初の観察を裏付ける結果として、正常上皮で選択されるドライバー変異は、*NOTCH1*, *FAT1*, *TP53* など、食道がんの観察から同定されるドライバー変異と広く重複することが確認された(図 2a)。このことは、食道がんの発症と正常食道上皮のクローンの選択には共通するメカニズムが存在することが示唆される。一方、食道がんの 80% 以上で認めら

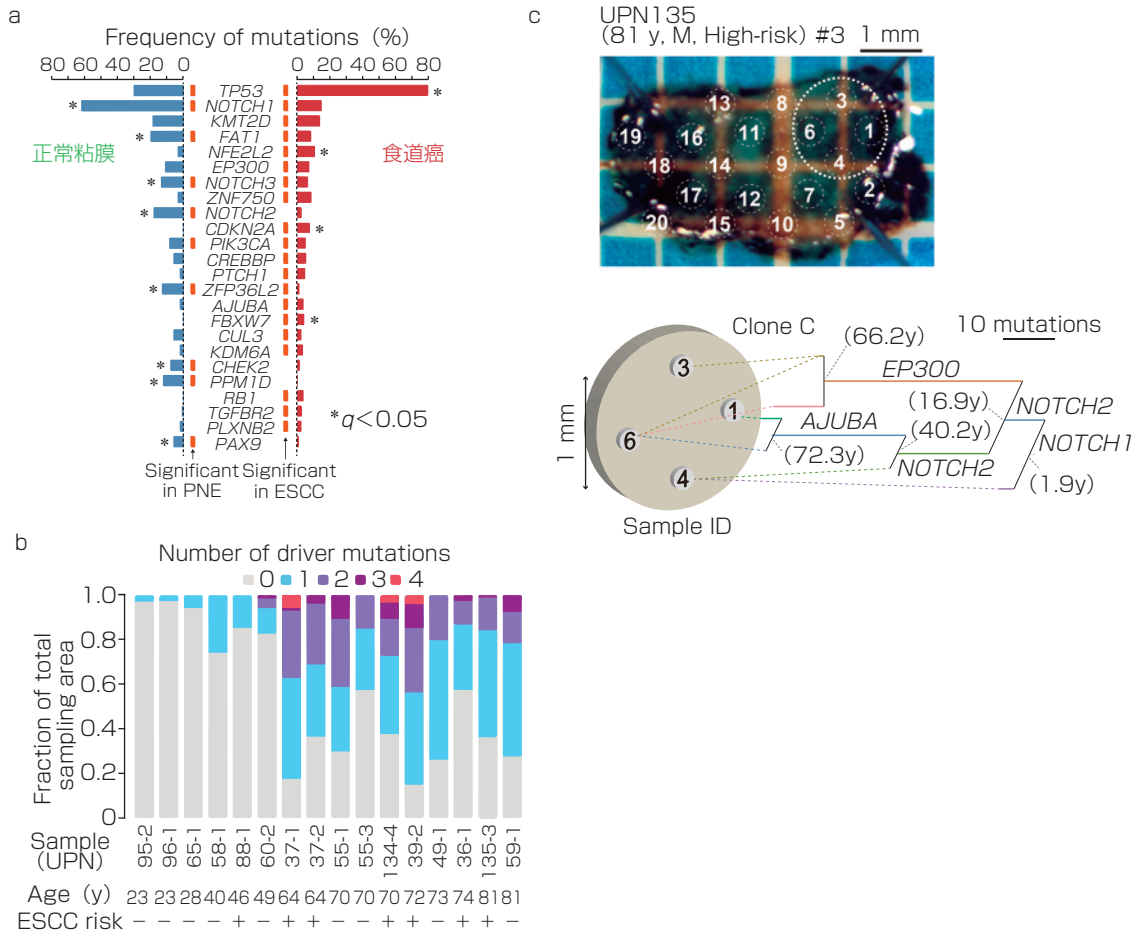


図 2. 食道上皮におけるクローンの拡大

- 正常食道上皮と食道がんで認められるドライバー変異の種類と頻度。
- 年齢の異なる 16 例の患者について多数の資料の解析から食道上皮全体に対する変異クローンが占める割合とクローンが有するドライバー変異の数を推定した。年齢と食道がんの罹患リスク（飲酒・喫煙）の有無を下段に示した。
- 81 歳男性の食道上皮のクローンについて系統樹解析を行い、クローンの履歴を再構成し、変異が獲得された年齢を推定した。

れる *TP53* 変異は正常食道では、30% 程度に認められるのみで、また、正常食道の 60~70% で認められる *NOTCH1* 変異は食道がんでは 20% 内外でしか観察されない。また正常食道ではしばしば観察される *PPM1D* 変異はがん試料ではほとんど観察されない。このように、変異を生ずるドライバー遺伝子の頻度は正常食道上皮とがん組織では大きくことなることから、両者におけるクローンの選択には共通したメカニズムがある一方で、

それぞれに異なるメカニズムも存在すると考えられた。また、数ミリ四方の局所領域について多数の試料を採取してクローンの拡大とそこで生じているドライバー変異を解析したところ、飲酒喫煙歴に乏しい若年者においても、クローンの一定の拡大を認めるものの、飲酒喫煙歴のある高齢者においては、全ての試料において、*NOTCH1* 変異を含む多数のドライバー変異が観察され、また、複数の試料をまたぐ大きな拡大

が観察された。異なる年齢・生活習慣リスクを有する16例における同様の解析結果に基づく推定では、加齢に伴って、食道上皮は、食道がんで頻繁に認められる遺伝子変異を有する多数のクローンによって置換されていき、65歳を過ぎるまでには、食道上皮の60~80%がこのようなクローンによって再構築されることが示唆された(図2b)。また、高度の飲酒・喫煙歴を有する患者では、単位面積あたりの変異数が有意に増加していた。最後に、このようなクローンの起源と進化について、高密度サンプリング試料の解析によって同定されたクローンの系統樹解析を行った。その結果、高齢者の食道上皮におけるクローンの拡大は、最初の変異を獲得した細胞に順次、新たなドライバー変異が生ずることによって、クローンが順次拡大する様子が描出された。この結果は、上述した多段階発がんの仮説を支持する結果であったが、興味深いことに、最初の変異の獲得は、幼少期から思春期にまで遡る例が認められることで、このことから、発がんの過程は人生の非常に早期にすでに始まっている可能性が示唆された(図2c)。

## 2. 慢性炎症に伴うクローンの拡大

次に我々が解析したのは、正常の大腸上皮におけるクローンの拡大である<sup>3)</sup>。食道上皮の解析同様に、健常人から採取した正常大腸上皮の試料の全エクソン解析を行ったところ、食道上皮の解析結果から予測される予想に反して、正常大腸上皮では、加齢に伴うクローンの拡大はほとんど観察されなかった。また、大腸がんの90%以上で観察されるAPC変異や、同様に大腸がんで高頻度に認められるTP53変異やRASシグナル経路の遺伝子変異を含めて、ドライバー変異はほとんど観察されなかった。一方、炎症性腸疾患の代表的な疾患である潰瘍性大腸炎に多年罹患した患者では、大腸上皮に広範にクローンの拡大が認められた。隣接したクローンの系統樹

解析からは、これらのクローンはごく最近になって拡大したことが示唆され、このことは、潰瘍性大腸炎によって上皮の破壊と再生が繰り返される結果、単一のクローンに由来する多数のサブクローンが短期間の間に生じたことを裏付ける結果であった(図3a)。食道上皮と比較して、潰瘍性大腸炎にともなうクローンの拡大は、しばしば数cmの距離にわたる巨視的な範囲におよび、症例によっては直腸のほぼ全体が数個のクローンで再構築されていた(図3b)。また、潰瘍性大腸炎において大腸がんの発症が有意に増加することに関連して、潰瘍性大腸炎に罹患した患者の大腸上皮では、潰瘍性大腸炎関連の大腸がんでしばしば認める遺伝子変異と共通した変異が多数観察され、潰瘍性大腸炎と炎症性大腸炎の関連が示唆された(図3c)。一方、興味深いことに、潰瘍性大腸炎で拡大したクローンでは、*NFKBIZ*、*Regnase*、*PIGR*変異など、大腸がんでは殆ど観察されない、多数の遺伝子変異が同定された。それらの多くは、IL17のシグナル経路の下流に位置する遺伝子に互いに排他的に生じている機能喪失型の変異で、このことから、潰瘍性大腸炎では、IL17シグナル経路活性化が障害された細胞が選択されていることが明らかとなった(図3d)。実際、*NFKBIZ*を大腸上皮で特異的にノックアウトした大腸上皮細胞は、正常大腸上皮細胞と比較して、有意にクローンの拡大が認められる。また、*NFKBIZ*を欠失したマウスの大腸オルガノイドと正常のマウス大腸オルガノイドの*in vitro*での増殖をIL17添加の有無で比較したところ、IL17依存性に、*NFKBIZ*をノックアウトしたオルガノイドでは、*NFKBIZ*が野生型のオルガノイドと比較して有意な増殖が認められた。一方、これらのIL17経路に関する変異が炎症性大腸発がんや散発性大腸がんではほとんど観察されない。このことから、これらの変異を獲得した細胞が発がん過程で有意に陰性選択を受けている可能性が示唆された。実際、*NFKBIZ*を大腸上皮特異的にノックアウトした

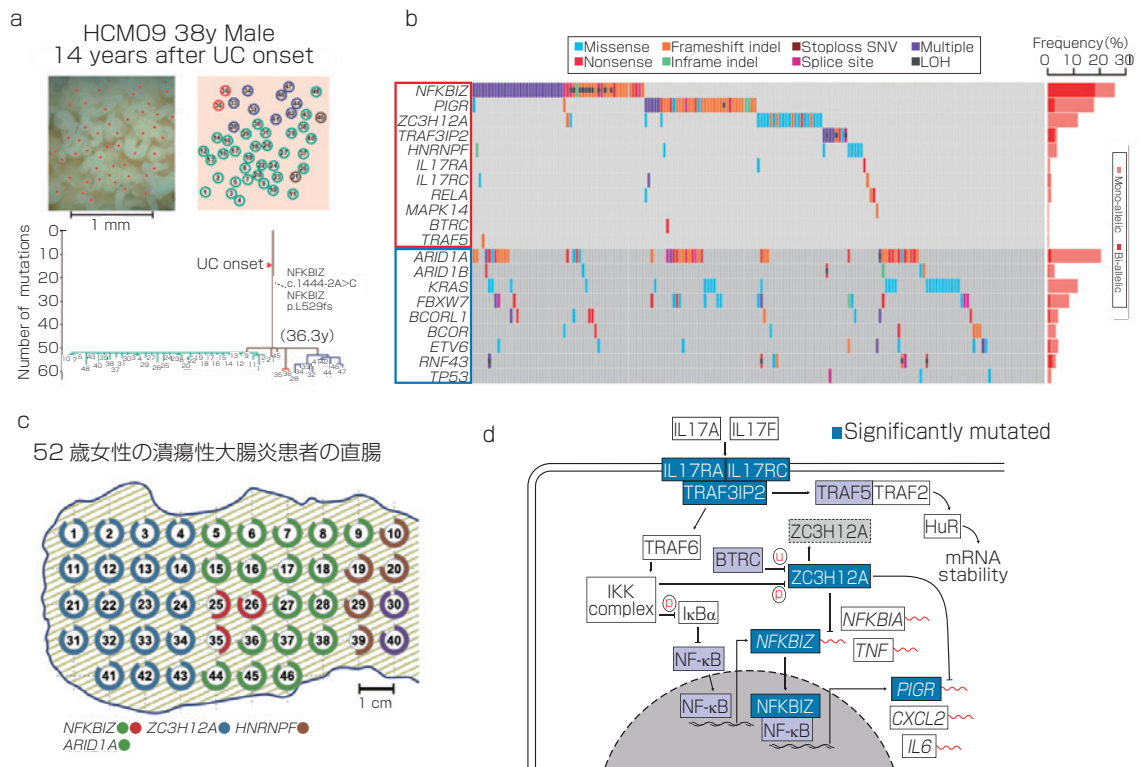


図 3. 潰瘍性大腸炎におけるクローンの選択と拡大

a. 潰瘍性大腸炎罹患患者における系統樹解析。潰瘍性大腸炎患者の大腸粘膜から近接する 48 個の単一陰窩を単離し、全エクソン解析により遺伝子変異を同定したのち、共有変異を考察することによって系統樹解析を行った。系統樹の幹の長さは単一陰窩で共有される変異の数に比例しており、変異の獲得頻度を近似的に一定と仮定すると、各枝の長さは年齢に相関すると考えられる。b. 潰瘍性大腸炎の上皮のクローンから同定されたドライバー変異。炎症関連大腸がんではしばしば観察される遺伝子変異（青）にくわえて、大腸がんでは観察されない一群の変化（赤）が認められる。c. 52 歳女性の潰瘍性大腸炎患者の直腸で認められたクローン拡大。直腸のほぼ全体がNFKB1ZやZC3H12A変異を有するわずか 2～3 個のクローンで再構築されている。d. 潰瘍性大腸炎の大腸上皮で認められた変異とIL17 シグナル経路。

マウスでは、AOSによる大腸発がんモデルにおいて、大腸ポリープ形成が有意に抑制されることが示唆された(図 3b)。また、ヒト大腸がん由来細胞株を用いたCRISPRスクリーニングにおいても、これらの遺伝子をターゲットした細胞が有意に陰性選択されていることが示される。このことは、炎症に罹患した組織では、炎症シグナルを減弱する変異を有する細胞が有意に選択される一方で、それらは発がんの過程においては有意に排除される傾向があることを示している。

### おわりに

以上、正常食道上皮と大腸上皮、また潰瘍性大腸炎に罹患した患者の大腸上皮についてクローンの拡大を検討した。正常組織においてすでにごんと同様のドライバー変異を獲得したクローンが生じていることは、発がんはこれらのクローンの一つから生じている可能性を強く示唆している<sup>1)</sup>。また、臓器によっては、こうした過程が、人生の非常に早期から始まっていることは大変興味深い。しかし、今回の結果から示唆される

多段階発がんモデルでは、ごく少数の希なクローンが逐次変異を獲得してがんに至るというモデルではなく、個体の一生の間にドライバー変異を獲得した多数のクローンが逐次形成され、ドライバー変異を蓄積し続ける過程で、発がんに必要なだけのドライバー変異を獲得した高々1個から数個の細胞のみが最終的ながんの形成に関与するモデルが想定される。また、このようなクローン拡大の過程は飲酒や喫煙といった生活習慣や、慢性炎症といった上皮の置かれた環境要素によって大きな影響をうけることが示されたが、このことはこれらの因子によって発がん頻度が著しく上昇することをよく説明する。一方、正常組織で選択されるドライバー変異と当該組織のがん組織で観察されるドライバー変異の頻度・種類には大きな相違もあり、このことは、異なるドライバー変異を有するクローンが同様に発がんに寄与するわけではなく、場合によってはがん化に対して抑制的に振る舞う可能性が示唆される。すなわち、正常組織におけるクローンの拡大と細胞のがん化については区別して考える必要がある。正常組織で高頻度に関与する遺伝子変異が、発がんにおいては抑制的に作用するとしても、より発がんに関与する変異が共存する場合には、がん遺伝子とし

て同定されることになる点は注意を要する。このように正常組織の解析によって、発がん過程が、従来考えられているほど単純な選択過程でないことが理解される。また、正常組織におけるクローンの解析は、このように発がんメカニズムの理解に寄与するのみならず、加齢によって生ずる組織の変化、すなわち老化の理解にも重要であろう<sup>1)</sup>。高齢者の食道上皮を構成する細胞はほとんどがNOTCH1変異を有して鋳る細胞に置き換われば、当然、その機能は若年者の食道上皮と異なるものと考えるのが適当であろう。正常組織におけるクローン進化は近年になって急速に理解が深まった領域であるが、クローンが選択されるメカニズムや発がんにいたるクローンとそうでないクローンの違いについては多くが不明である。今後の研究の展開が期待される。

#### 文 献

- 1) Kakiuchi N, Ogawa S: Clonal expansion in non-cancer tissues. *Nat Rev Cancer* 2021.
- 2) Yokoyama A, et al: Age-related remodelling of oesophageal epithelia by mutated cancer drivers. *Nature* 565 (7739): 312-317, 2019.
- 3) Kakiuchi N, et al: Frequent mutations that converge on the NFKBIZ pathway in ulcerative colitis. *Nature* 577 (7789): 260-265, 2020.