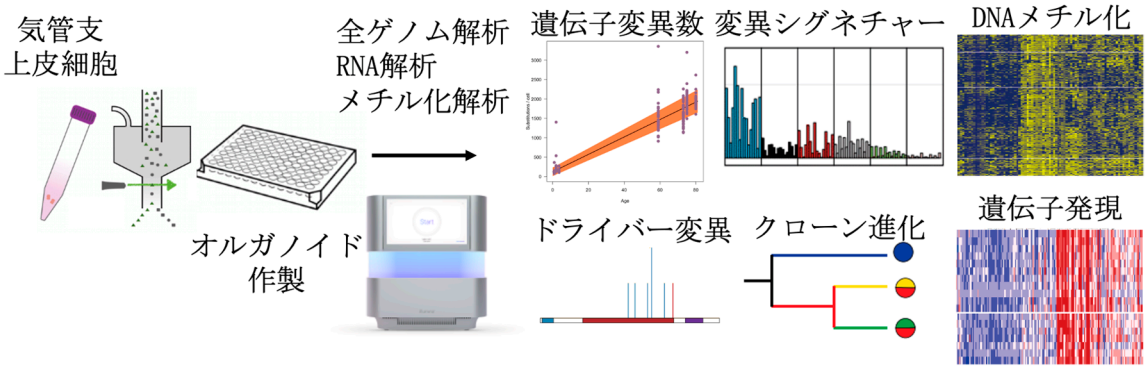
44　正常肺組織のオミックス解析による肺がん発症機序解明	吉田　健一

【目的】日本人で最も多い肺がんは腺がんであり、肺腺がんは末梢気管支に発症することが多いが、正常末梢気管支上皮細胞あるいは肺胞上皮細胞においてどのような遺伝子異常が生じているかは明らかではない。禁煙率の低下により非喫煙者、特に女性の非喫煙者に生じる肺腺がんの占める割合が高くなっているが、非喫煙者の正常末梢気管支上皮細胞で加齢や環境因子などの原因によりどのような遺伝子異常が起こり、肺がん発症につながっているか、その結果なぜ女性に多くがんを発症するのか、がんの発生につながるクローンの拡大が起こっているのかについて理解が不十分である。本研究では、我々がこれまでの研究で取り組んできた肺の正常組織、特に過去の研究で解析されていない肺腺がんの発症する末梢肺の正常組織について、正常細胞に加齢や環境因子により遺伝子異常が蓄積し、さらに獲得された遺伝子異常により多様性の獲得やクローン拡大をきたす過程を明らかにするため、ゲノム解析などのオミックス解析を行い、日本人における肺がん発症の遺伝学的基盤を明らかにすることを目的とする。

【方法】非喫煙者肺がん、多発肺がんおよび間質性肺炎などに合併した肺がん症例の手術検体から正常肺組織を採取し、正常末梢気管支上皮、肺胞上皮における幹細胞である基底細胞および 2 型肺胞上皮細胞由来の単一細胞由来オルガノイドを作製し、ゲノム解析、発現解析、DNA メチル化解析などのオミックス解析を行い、蓄積する遺伝子異常およびそれに伴う表現型の変化を解析する。同定された遺伝子異常から遺伝子変異量やシグネチャーの解析を行い、非喫煙者の肺がんや多発肺がんの原因、炎症とがんの関係を明らかにする（下図）。さらに、正常細胞と肺がん細胞の違い、クローン進化の過程を明らかにするため、同一症例から発症した肺がん検体についても解析を行う。

【結果】これまでに非喫煙者 5 名を含む 13 人の国立がん研究センター中央病院において肺がん疑いで手術を受けた症例から正常な中枢あるいは末梢の気管支上皮細胞由来のオルガノイド作製を行った。その結果、十分な数のオルガノイドが作製できなかった 6 例を除いた 7 例から合計 184 個のオルガノイドが樹立された。7 症例の背景疾患の内訳は肺腺がん（5 例）、肺大細胞がん（1 例）、炎症性病変（1 例）であり、このうち 4 例が非喫煙者、3 例が喫煙者であった。樹立されたオルガノイドのうち 142 検体について全ゲノム解析を行った（症例あたり 10～32 個）。また、オルガノイドを解析可能であった 7 症例のうち、4 症例については同一症例の肺がん検体についても全ゲノム解析を行った。同一症例内では末梢肺では喫煙に起因する遺伝子異常が少なく、肺腺がんでは喫煙との関連が比較的弱いことと関連していると考えられた。また、同一症例でも正常気管支上皮細胞と肺がんでは変異シグネチャーのパターンが異なり、クローン進化の過程で変異蓄積プロセスが変化していることが示唆された。今後、さらにオミックス解析を進めて、肺がん発症におけるクローン進化の過程の解明を目指す。

単一細胞由来検体を用いたオミックス解析



44. 正常肺組織のオミックス解析による肺がん発症機序解明

吉田　健一

国立がん研究センター 研究所 がん進展研究分野

Key words：肺がん，気管支上皮，喫煙，クローン進化

緒　言

がんは遺伝子異常により起こる疾患であるが、正常組織においても加齢や環境因子により遺伝子異常が蓄積しており、発がんの直接の原因として知られているドライバー遺伝子変異を獲得し、その結果クローン拡大を来たすことが報告されている［1］。肺扁平上皮がんの起源である正常中枢気管支上皮細胞のゲノム解析では、喫煙者の気管支上皮細胞では非喫煙者に比べて多くの遺伝子変異が蓄積し、喫煙者には煙草による特徴的な遺伝子変異のパターン（シグネチャー）がみられることが報告されている。また、正常細胞においても *TP53* などの遺伝子に肺がん発症につながると考えられるドライバー遺伝子変異が獲得され、喫煙者における肺扁平上皮がん発症の基盤となっていると考えられている［2］。

日本人で最も多い肺がんは腺がんであるが［3］、肺腺がんは末梢気管支に発症することが多く、正常末梢気管支上皮細胞あるいは肺胞上皮細胞における遺伝子異常については明らかではない。禁煙率の低下により非喫煙者、特に女性の非喫煙者に生じる肺腺がんの占める割合が高くなっているが、非喫煙者の正常末梢気管支上皮細胞で加齢や環境因子などの原因によりどのような遺伝子異常が起こり、肺がん発症につながっているか、その結果なぜ女性に多くがんを発症するのか、がんの発生につながるクローンの拡大が起こっているのか、について理解が不十分である。

方　法

1. 単一細胞由来検体のオミックス解析

肺がんなどの症例の手術検体の非腫瘍部分検体を収集し、中枢気管支上皮細胞あるいは非喫煙者肺がんで頻度が高い腺がんの起源と考えられている 2 型肺胞上皮細胞を含むと考えられる末梢肺胞上皮細胞を単離し、単一細胞由来のオルガノイドを作製し、全ゲノム解析により体細胞性変異を解析した。得られた変異データから過去の研究で用いた手法［2］と同様に体細胞性変異を検出し、遺伝子変異量、変異シグネチャー、ドライバー変異、クローン構造を解析し、同一症例において中枢気管支と末梢気管支における遺伝子異常の違い、非喫煙者において気管支および肺胞上皮細胞に遺伝子異常が蓄積する機序を解析した。さらに、肺がん症例で検体が得られたものについては同様にゲノム解析を行い、同一症例における正常細胞と肺がん細胞におけるゲノム異常の違いを解析し、正常細胞から肺がんへのクローン進化の過程でどのようなゲノム異常が獲得されているのか、変異獲得プロセスが変化しているのかなどを解析した。

2. レーザーマイクロダイセクションによる微小サンプリングによる空間的なゲノム解析や空間的発現解析

正常末梢気管支においてドライバー変異の獲得とともにクローン拡大がみられる様子や、ドライバー変異の獲得に伴う発現パターンの変化を明らかにするため、レーザーマイクロダイセクションによる微小サンプリングにより採取された検体を用いて正常気管支や前がん病変の空間的なゲノム解析を行った。

結　果

1. 正常気管支上皮細胞におけるゲノム異常

これまでに非喫煙者 5 名を含む 13 人の国立がん研究センター中央病院において肺がん疑いで手術を受けた症例から正常な中枢あるいは末梢の気管支上皮細胞由来のオルガノイド作製を行った。その結果、十分な数のオルガノイドが作製できなかった 6 例を除いた 7 例から合計 184 個のオルガノイドが樹立された。7 症例の背景疾患の内訳は肺腺がん（5 例）、肺大細胞がん（1 例）、炎症性病変（1 例）であり、このうち 4 例が非喫煙者、3 例が喫煙者であった。樹立されたオルガノイドのうち 142 検体について全ゲノム解析を行った（症例あたり 10～32 個）。また、オルガノイドを解析可能であった 7 症例のうち、4 症例については同一症例の肺がん検体についても全ゲノム解析を行った。

まず、単一細胞由来検体の全ゲノム解析パイプラインの構築を行った。がんゲノム解析パイプラインである Genomon を用いて変異を同定し、さらにそれぞれの症例で同定された変異を各オルガノイドにおける変異の分布から体細胞性変異、胚細胞性変異あるいはエラーに区別した。また、オルガノイドを樹立する過程でマウス由来のフィーダー細胞を使用しており、検体中にマウスゲノムの混入が見られたため、xenome というソフトウェアを使用してマウス由来の DNA 断片をシーケンスデータから除去した。その結果、マウス由来の DNA の混入が多かった 13 検体を除く 129 検体の解析が可能であった。

末梢気管支の検体からはオルガノイドの樹立効率が低く、5 症例のみで樹立可能であったが、5 症例での比較では末梢気管支から樹立したオルガノイドにおいて遺伝子変異数が少ない傾向があり（Mann-Whitney U test、P＝0.005）、特に喫煙歴のある症例では顕著であり（図 1）、末梢気管支では中枢気管支に比べて喫煙による遺伝子変異の蓄積の影響が少ないと考えられた。

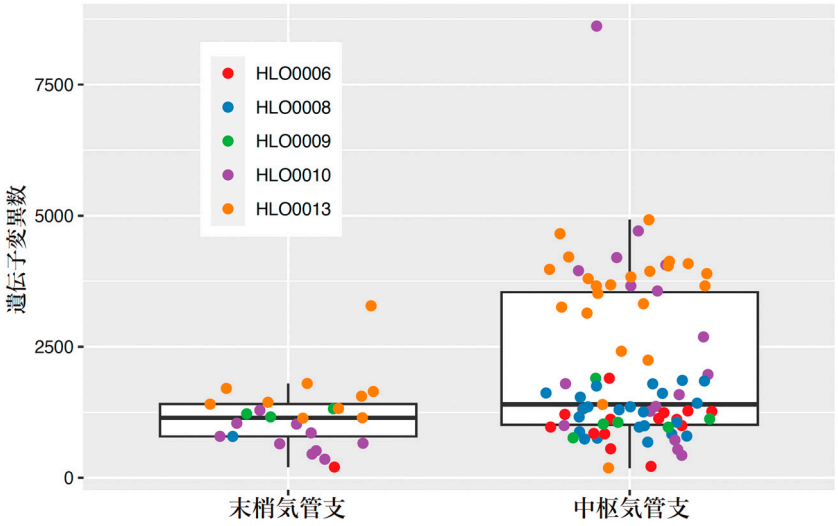


図 1. 末梢および中枢気管支上皮細胞から樹立したオルガノイドにおける遺伝子変異量の比較
一つひとつの点は 1 個のオルガノイドの変異数を示し、色で症例を示している。喫煙歴のある症例（HLO0010、HLO0013）では特に中枢気管支で末梢気管支に比べて変異数が多い傾向が見られた。

さらに、オルガノイドで検出された変異（1 塩基置換）の情報から変異シグネチャー解析を行ったところ、過去に肺がんで報告のある SBS4、SBS5、SBS2、SBS13 に加えて、新たなシグネチャー（Sig.A）が検出され（図 2）、これは我々が過去の研究で報告した SBS16 に近いと考えられた。非喫煙者由来あるいは末梢気管支上皮細胞由来のオルガノイドでは喫煙に関連する変異シグネチャーである SBS4 の変異が少ない傾向が見られた。

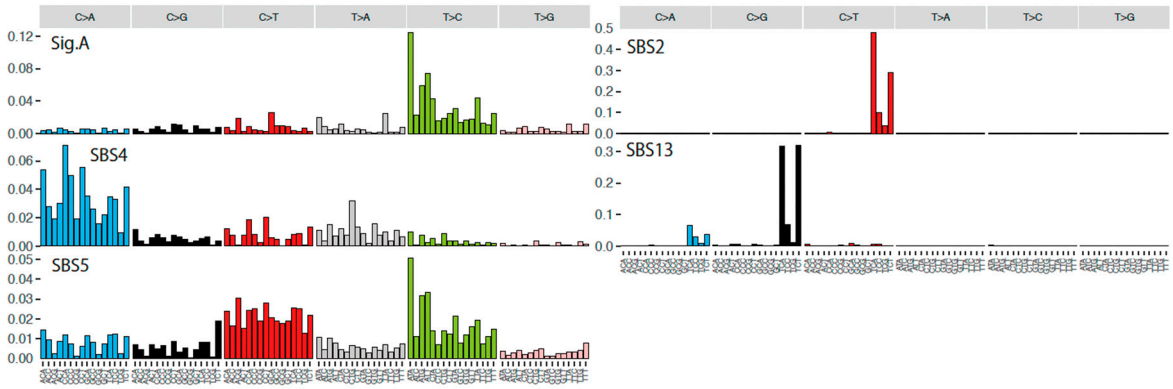


図 2. 気管支上皮細胞由来オルガノイドにおける遺伝子変異から抽出された変異シグネチャー
気管支上皮細胞に見られた一塩基置換変異のパターン（シグネチャー）。SBS2、SBS4、SBS5、SBS13 はがんで検出されたシグネチャーのデータベースである COSMIC に報告されているものと一致した。

2. 正常細胞から肺がんへのクローン進化

4 症例に合併した肺がん検体についても全ゲノム解析を行い、正常細胞におけるゲノム異常と同一症例の肺がんにおけるゲノム異常の比較を行った。まず、遺伝子変異量を比較したところ、肺がん検体では同一症例の正常細胞に比べて遺伝子変異量が著明に増加していた（図 3a）。また、変異シグネチャーの解析を行うと、APOBEC による変異シグネチャーである SBS2、SBS13 の占める割合が高くなっている症例が多いことがわかり、APOBEC による変異の蓄積が肺がんへの進展に重要な役割を持っていることが示唆された（図 3b）[4]。

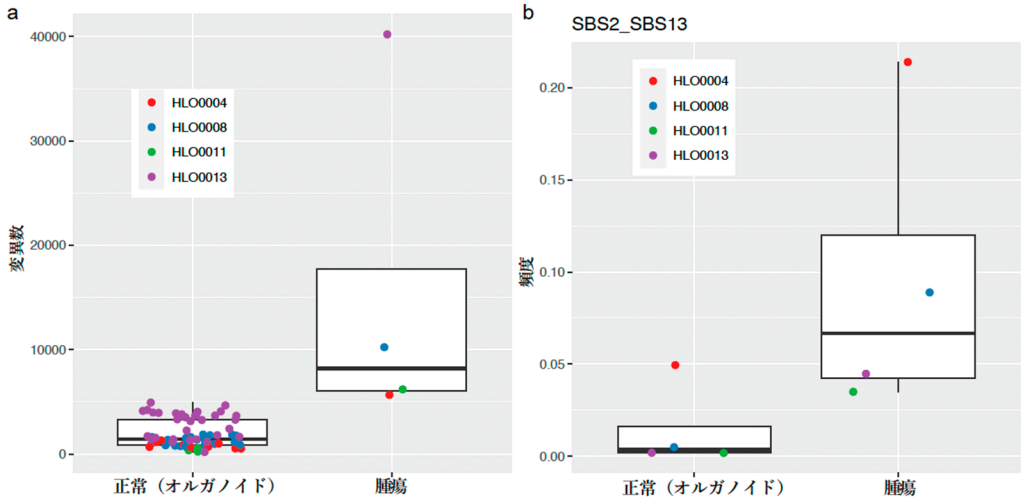


図 3. 正常細胞と腫瘍細胞の変異数の比較
一つひとつの点は 1 個のオルガノイドあるいは腫瘍を示し、色で症例を示している。
a） 全ての変異数。
b） APOBEC による SBS2、SBS13 による変異の頻度。

3. レーザーマイクロダイセクションによる微小サンプリングによる空間的なゲノム解析

レーザーマイクロダイセクション（LMD）により正常気管支上皮細胞を切り出し、ゲノム解析を行うことで正常末梢気管支におけるクローン拡大がみられる様子を明らかにする必要があるが、正常気管支上皮ではクローンのサイズが比較的小さいことが想定されたため［5］、まず前がん病変の解析を行った。肺腺がん前がん病変であ

る異型腺腫様過形成（AAH）の病変を LMD により切り出し、全ゲノム解析を行った。その結果、AAH では染色体コピー数異常や構造異常が正常細胞に比べて増加していることが明らかになった。今後、正常気管支上皮細胞についても解析を行い、さらに解析を進める予定である。

考　察

末梢気管支上皮細胞から樹立したオルガノイドでは喫煙に起因する遺伝子異常の数が少ないという結果は末梢肺に発生する肺腺がんは中枢気管支に発症する肺扁平上皮がんに比べて喫煙との関連が少ないというデータを裏付けるものと考えられた。正常細胞に比べてがん細胞では遺伝子異常の数が著明に増加していたが、その獲得される機序を反映する変異シグネチャーも異なっていることがわかり、がんへのクローン進化の過程で変異を獲得するプロセスが変化していると考えられた。今後はさらに RNA-seq、DNA メチル化解析などのオミックス解析により正常細胞ががん細胞へとクローン進化する機序を明らかにする必要がある。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、国立がん研究センター研究所分子病理分野の谷田部恭、国立がん研究センター研究所がん細胞システム研究ユニットの関根圭輔である。

文　献

1） Kakiuchi, N. and S. Ogawa, Clonal expansion in non-cancer tissues. Nat Rev Cancer, 2021. 21(4): p. 239-256.
PMID: 33627798 DOI: 10.1038/s41568-021-00335-3

2） Yoshida K, Gowers KHC, Lee-Six H, Chandrasekharan DP, Coorens T, Maughan EF, Beal K, Menzies A, Millar FR, Anderson E, Clarke SE, Pennycuick A, Thakrar RM, Butler CR, Kakiuchi N, Hirano T, Hynds RE, Stratton MR, Martincorena I, Janes SM, Campbell PJ. Tobacco smoking and somatic mutations in human bronchial epithelium. Nature, 2020. 578(7794): p. 266-272. PMID: 31996850 PMCID: PMC7021511 DOI: 10.1038/s41586-020-1961-1

3） Horinouchi H, Kusumoto M, Yatabe Y, Aokage K, Watanabe SI, Ishikura S. Lung Cancer in Japan. J Thorac Oncol, 2022. 17(3): p. 353-361. PMID: 35216731 DOI: 10.1016/j.jtho.2021.11.020

4） Caswell DR, Gui P, Mayekar MK, Law EK, Pich O, Bailey C, Boumelha J, Kerr DL, Blakely CM, Manabe T, Martinez-Ruiz C, Bakker B, De Dios Palomino Villcas J, I Vokes N, Dietzen M, Angelova M, Gini B, Tamaki W, Allegakoen P, Wu W, Humpton TJ, Hill W, Tomaschko M, Lu WT, Haderk F, Al Bakir M, Nagano A, Gimeno-Valiente F, de Carné Trécesson S, Vendramin R, Barbè V, Mugabo M, Weeden CE, Rowan A, McCoach CE, Almeida B, Green M, Gomez C, Nanjo S, Barbosa D, Moore C, Przewrocka J, Black JRM, Grönroos E, Suarez-Bonnet A, Priestnall SL, Zverev C, Lighterness S, Cormack J, Olivas V, Cech L, Andrews T, Rule B, Jiao Y, Zhang X, Ashford P, Durfee C, Venkatesan S, Temiz NA, Tan L, Larson LK, Argyris PP, Brown WL, Yu EA, Rotow JK, Guha U, Roper N, Yu J, Vogel RI, Thomas NJ, Marra A, Selenica P, Yu H, Bakhoum SF, Chew SK, Reis-Filho JS, Jamal-Hanjani M, Vousden KH, McGranahan N, Van Allen EM, Kanu N, Harris RS, Downward J, Bivona TG, Swanton C. The role of APOBEC3B in lung tumor evolution and targeted cancer therapy resistance. Nat Genet, 2023. PMID: 38049664 PMCID: PMC10786726 DOI: 10.1038/s41588-023-01592-8

5) Moore L, Cagan A, Coorens THH, Neville MDC, Sanghvi R, Sanders MA, Oliver TRW, Leongamornlert D, Ellis P, Noorani A, Mitchell TJ, Butler TM, Hooks Y, Warren AY, Jorgensen M, Dawson KJ, Menzies A, O'Neill L, Latimer C, Teng M, van Boxtel R, Iacobuzio-Donahue CA, Martincorena I, Heer R, Campbell PJ, Fitzgerald RC, Stratton MR, Rahbari R. The mutational landscape of human somatic and germline cells. Nature, 2021. 597(7876): p. 381-386. PMID: 34433962 DOI: 10.1038/s41586-021-03822-7