

令和5年度 TR 事業研究奨励助成金

# 研究成果報告書

2024年4月15日 提出

公益財団法人 がん研究振興財団  
理事長 堀田 知光 殿

報告者氏名： 森下 真由

研究課題：A. がんの本態解明に関する研究  
(テーマ) 正常血液細胞における体細胞性変異とクローン進化の解析

研究期間： 自 2023 年 4 月 1 日  
至 2024 年 3 月 31 日

研究指導者：氏名 吉田 健一

公益財団法人 がん研究振興財団

## (1) 期間中の研究について

### 1) 要旨

本研究では正常血液細胞の全ゲノム解析により、日本の健常人の血液細胞に蓄積する遺伝子異常を解析し、環境因子の影響や欧米の症例との人種差について明らかにすることを目的として研究を行なった。14 症例から樹立した単一細胞由来の血液細胞コロニー174 個を作製して全ゲノム解析を行うことにより、正常な血液細胞に獲得される遺伝子異常（変異、挿入欠失、構造異常、染色体コピー数異常）の蓄積量や、塩基置換などのパターン（変異シグネチャー）を解析した。正常血液細胞では加齢とともに変異量が直線的に増加しており、年間 14.3 個の変異が蓄積していた。変異シグネチャーの解析では過去に報告のある SBS1、SBS5 という加齢とともに臓器に蓄積する内因性的変異過程により変異が蓄積していた。今後、飲酒、喫煙などの環境因子とゲノム異常の関連を明らかにする必要があるが、本研究により造血器腫瘍発症の初期過程の理解が進むことが期待される。

## 2) 序

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遺伝子異常が加齢や環境因子により蓄積しており、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も獲得されていることが様々な組織について報告されている。従って、早期の発がんメカニズムの解明には腫瘍を発生する以前の正常組織における遺伝子異常を理解することが重要である。正常組織ではクローンのサイズが小さいことからゲノム異常の検出はがんに比べて困難であるが、近年は単一細胞由来のオルガノイド（コロニー）やレーザーマイクロダイセクションなど方法による微小サンプリングによって得られた検体をゲノム解析が可能となってきた。正常血液細胞における遺伝子異常についても解析が行われているが(Osorio et al., *Cell Rep.* 2018; Lee-Six et al., *Nature.* 2018; Mitchell et al., *Nature.* 2022)、症例数は少なく、環境因子との関係についてはまだ解析されていない。さらに、同じがんでも頻度の高い遺伝子異常などが人種によって異なることも知られており、遺伝学的背景や生活習慣などが原因であると考えられている。血液を含めて、多くの正常組織においてはこれまでの解析は欧米のみで行われており、日本人などアジア人の検体を解析することは必要があると考えられる。本研究では正常血液細胞について、単一細胞由来造血コロニーを作成して採取したDNA検体を用いて全ゲノム解析を行うことで正常血液細胞にみられる遺伝子異常を単一細胞レベルで解析し、正常血液細胞に蓄積するゲノム異常と環境因子との関係や人種による特徴を明らかにする。

### 3) 実験方法

本研究への参加に同意が得られた喫煙歴や飲酒歴など異なった背景を持ったがん検診受診者（健常人）100人から末梢血検体を収集した。正常血液細胞における遺伝子異常の解析を目的に末梢血単核球から Methocult (STEMCELL Technologies 社) を用いて単一造血前駆細胞コロニーを作成して全ゲノム解析を行った。報告書作成時点で健常人13症例および臍帯血1検体から樹立した174コロニーの解析を行なった。全ゲノム解析により、造血前駆細胞に獲得される遺伝子異常（変異、挿入欠失、構造異常、染色体コピー数異常）の蓄積量の比較検討や、塩基置換のパターン（シグネチャー）から変異が獲得される原因を解析した。同一症例から多数のコロニーを作成して解析することにより、各コロニーで同定された遺伝子異常を基に解析した造血細胞の系統樹を作成し、系統樹の枝の単位で遺伝子異常を解析することにより、クローン構造についても解析した(図1)。

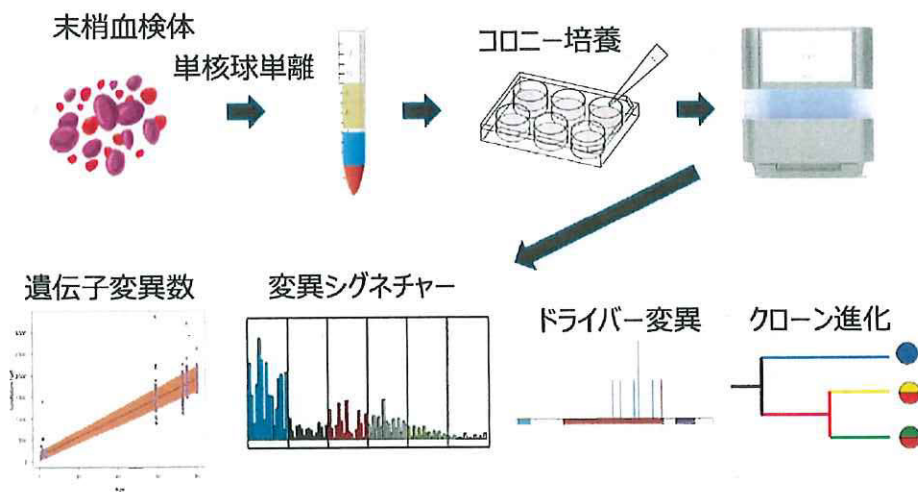


図1 単一造血細胞由来造血コロニーの全ゲノム解析

#### 4) 結果

まず2症例から造血コロニーの作製およびコロニーから抽出した微量DNAからの全ゲノムシーケンスのためのライブラリー作製を行う実験を行った。2症例とも30個程度と解析に十分な数のコロニーが作製でき、回収したコロニーの大部分からライブラリー作製に必要な量のDNA(10-100ng)が抽出可能であり、実際にライブラリー作製および全ゲノムシーケンスが可能であった。得られたデータをがんのゲノム解析に使用されているパイプライン(genomon2)を使用して解析した。bulkの末梢血検体をコントロールとして体細胞性変異を同定し、同定されたヘテロ接合性変異のアレル頻度が0.5程度であったことから、作製した造血コロニーが単一細胞由来であることを確認し、さらに解析を進めた(図2)。

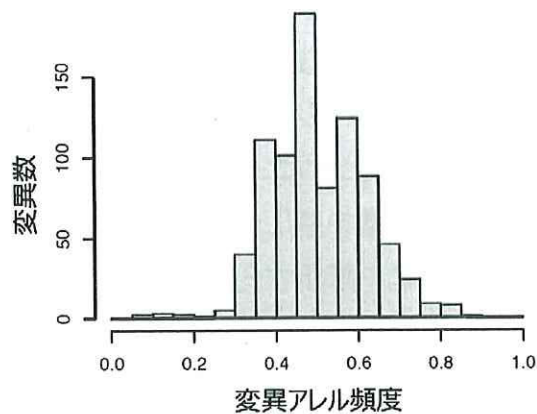


図2 造血コロニーで同定された変異のアレル頻度の分布

##### 1. 正常血液細胞における変異量

健常人13症例および臍帯血1検体から樹立した174コロニーの解析を行なった結果、遺伝子変異量は加齢とともに直線的に増加しており、正常血液細胞においては年間に14.3個の変異が蓄積していると推定された(図3)。過去の報告(Osorio et al., *Cell Rep.* 2018)での推定と同等の値であった。

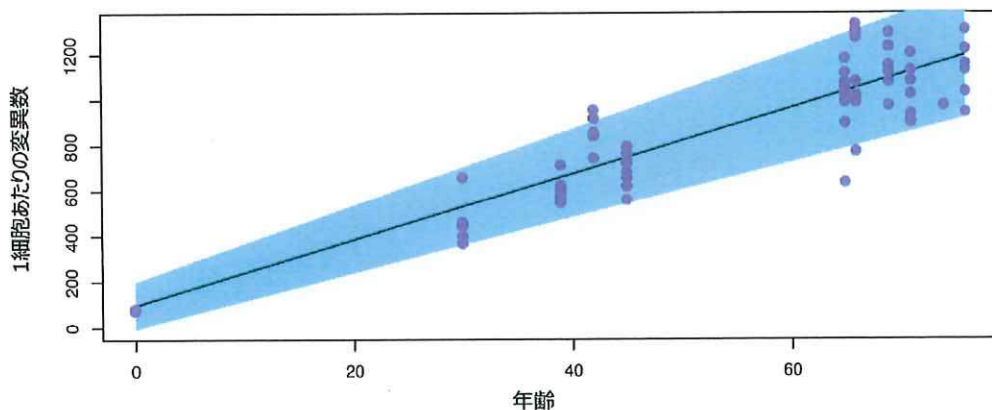


図3 正常血液細胞における変異の蓄積

## 2. 正常血液細胞における変異シグネチャー

同定された体細胞変異から変異シグネチャーの解析を行なった。がんにおける変異シグネチャーのデータベースである COSMIC のシグネチャーを参照し、3つのシグネチャーが同定された(図4)。SBSbloodは過去に正常造血幹前駆細胞において加齢とともに蓄積する内因性的変異シグネチャーで(Machado et al., *Nature*. 2022)、SBS1も加齢とともにどの臓器の細胞においても蓄積することが知られている内因性的変異シグネチャーの変異で、これら2つのシグネチャーによる変異が変異の大部分を占めていた。またSBS18は造血コロニーの培養中に獲得される遺伝子変異のシグネチャーであると考えられた。これらのシグネチャーは過去の正常血液細胞や骨髄性腫瘍において同定された変異シグネチャー(Williams et al., *Nature*. 2022)とも一致しており、日本人の血液細胞に特徴的な変異シグネチャーは現時点では検出されていない。

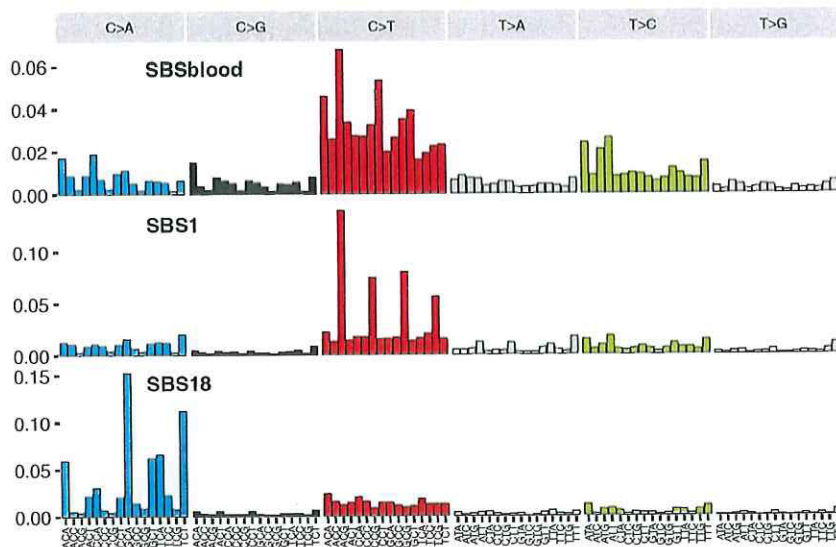


図4 正常血液細胞で検出された変異シグネチャー

## 5) 考察

本研究により過去の報告と同様に正常血液細胞における遺伝子変異量は加齢とともに直線的に増加していることが明らかになった。一方、症例により遺伝子変異量は不均一性もあり、喫煙や飲酒などの生活習慣、あるいはそれらと個人の遺伝学的背景との関連については今後さらに詳細な解析が必要である。また、変異シグネチャーについては日本人の血液細胞に特徴的な変異シグネチャーは同定されていないが、さらに症例数、サンプル数を増やして解析する必要がある。また、より大多数の症例における遺伝子変異量、シグネチャーの解析のためには、duplex sequencingなどの方法による解析も必要であると考えられた (Abascal et al., *Nature*. 2021)。

(2) 今回の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

本研究で得られた日本人の正常血液細胞における遺伝子異常の蓄積や、変異獲得のプロセスのデータは今後の日本人におけるクローン性造血や造血器腫瘍の研究においても重要な基礎データとなると考えられる。今後、本研究で解析したそれぞれの症例の臨床情報を集めて、飲酒や喫煙との関連や、それらの生活習慣と遺伝学的背景とゲノム異常の蓄積との関係を明らかにしていきたい。また、クローン性造血や急性骨髄性白血病などの解析を行い、正常血液細胞がゲノム異常を蓄積し、さらに造血器腫瘍へと進展する過程についても明らかにしていきたいと考えている。