

単一正常尿路上皮細胞由来オルガノイドのオミックス解析による 尿路上皮がんの病態解明

国立がん研究センター 研究所 がん進展研究分野
分野長 吉田 健一

(共同研究者)

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

独立ユニット長 関根 圭輔

東京大学医学部附属病院泌尿器科

助教 藤井 陽一

はじめに

尿路上皮がんは高齢者、特に男性に多く発症するがんであるが、腎盂から尿管、膀胱、尿道の一部へとつながる尿路内側の尿路上皮（移行上皮）に発生し、腎盂・尿管がん（上部尿路上皮がん）と膀胱がんに分けられ、尿路内に複数発生するなどの特徴を有している。これまでに行われた大規模な遺伝子解析により、上部尿路上皮がんはゲノム異常により異なる生存率を示す5つの分子病型に分類されることが明らかになったが⁽¹⁾、どのような過程で遺伝子変異が蓄積して発がんをきたしているのかなど、早期の発がん過程、多発発がんの機序などについて十分に解明できていない。近年、がんを発症する以前の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、ドライバー遺伝子変異の獲得や多様性や発がんにつながるクローン拡大（前がん病変）を来していることが様々な組織について報告されており、早期の尿路上皮がんの発がんメカニズムの解明やがんの早期診断、発症の予測を目指すにはがんを発症する以前の尿路上皮細胞における遺伝子異常、多様性、クローン進化およびその機序を理解することが重要である（図1）。また、膀胱上皮においても高頻度にドライバー変異の獲得を伴うクローン拡大が見られることが報告されたが、喫煙者において煙草と関連づけられる遺伝子変異のパターンが同定されないなど、

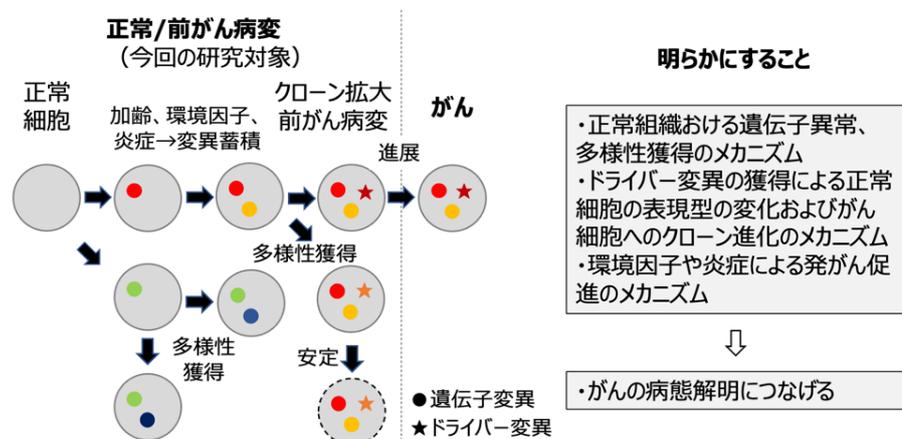


図1 正常細胞における遺伝子異常獲得とクローン進化

尿路上皮における遺伝子異常の蓄積および発がんの機序については十分に理解されたとは言えない。そこで本研究では正常膀胱上皮細胞から樹立した単一細胞由来オルガノイドのオミックス解析により、膀胱がんの起源となる正常膀胱上皮細胞が遺伝子異常の蓄積によって多様性を獲得し、さらに遺伝子発現やエピゲノム状態の変化を通してがん細胞へとクローン進化する過程を理解し、膀胱がんなどの尿路上皮がんの病態解明を目指す。

結果

膀胱がん手術症例においては外観上が正常な膀胱粘膜を上皮内がんの有無の検索のため生検を行うことがあり、本研究ではこれまでに治療歴のない膀胱がんあるいは膀胱がん疑いの症例の生検組織の残余検体を利用して正常膀胱上皮細胞からオルガノイドを作成することとした（東京大学医学部附属病院泌尿器科藤井博士との共同研究）。それぞれの生検検体については二分割した半分を病理検査に提出し、正常粘膜であることが確認した。まず、過去に膀胱上皮細胞からオルガノイドの樹立について報告されている論文の方法⁽²⁾を参考に、膀胱上皮細胞由来のオルガノイドの樹立の条件を検討した（国立がん研究センターがん細胞システム研究ユニット関根圭輔博士との共同研究）（図2）。

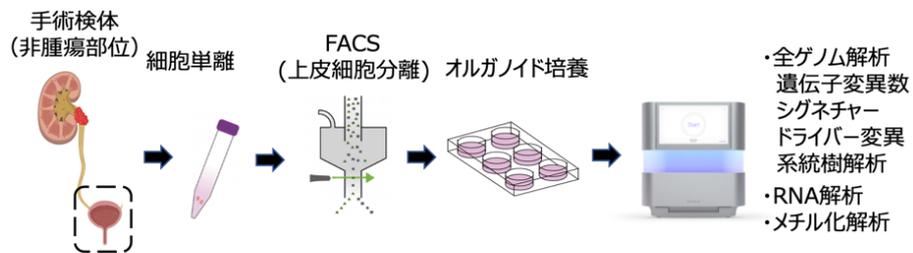


図2 単一細胞由来オルガノイドを用いた正常組織の解析

培養に使用しているマトリゲル（基底膜マトリックス、Corning社）がマウス肉腫由来で、マウス由来のDNAが混入していることがデータの解析中に明らかになり、オルガノイドの回収時に洗浄を追加するなどの工夫をおこなった。現時点で、8症例から樹立した264個のオルガノイドを樹立し、そのうち155検体について全ゲノムシーケンスが終了している。変異は研究所ゲノム解析基盤開発分野で開発されたG-CAT (<https://github.com/ncc-gap/GCATWorkflow>) を使用して同定し、さらに過去に単一細胞由来検体の全ゲノム解析で使用されている方法 (Sequoia)⁽³⁾ を用いて体細胞性変異、胚細胞性変異の同定、系統樹解析を行い、さらにドライバー変異や変異シグネチャーの解析をおこなった。

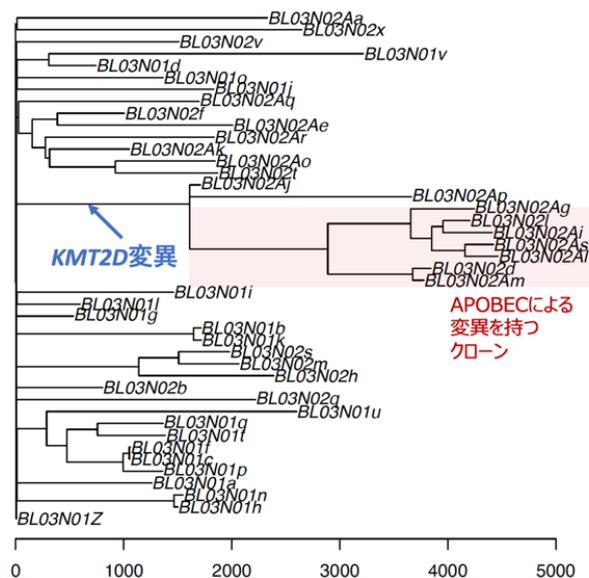


図3 膀胱上皮細胞オルガノイドの系統樹解析

dN/dS法を用いてドライバー遺伝子を同定し、過去に正常膀胱上皮細胞の微小サンプリングによるゲノム解析でも報告されていた*KMT2D*遺伝子の変

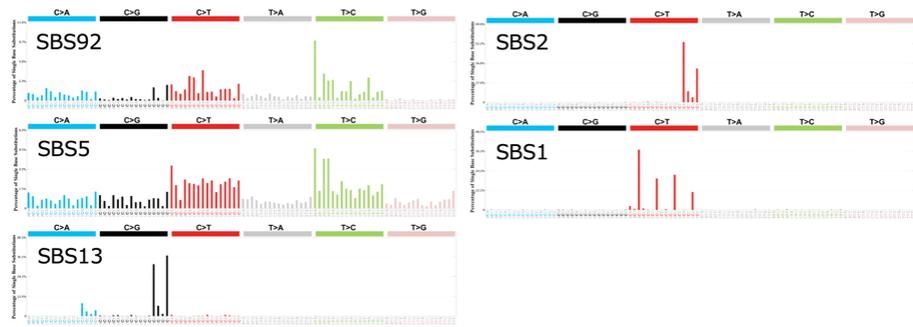


図4 正常膀胱上皮における変異シグネチャー

異が高頻度に同定され、また系統樹解析により早期に獲得されて複数クローンに共通して認められることが明らかになった(図3)。SigProfilerを用いて変異シグネチャーの解析を行い、加齢と共にどの臓器でも変異の蓄積する原因であるSBS1、SBS5の変異に加えて、過去に正常膀胱上皮細胞の微小サンプリングで報告されていたSBS92の変異が喫煙歴のある症例由来のオルガノイドで検出されていた(図4)。また、APOBECによる変異シグネチャーであるSBS2/13の変異が一部のオルガノイドに検出され、細胞間の遺伝子変異量の多様性をきたしていた(図3)。

考 察

本研究により、正常膀胱上皮においては高頻度にドライバー遺伝子変異を獲得したクローンの拡大が認められており、膀胱がん発がんの基盤となっていると考えられた。また、クローン進化のもとであるゲノム異常の蓄積過程としては、他の臓器とも共通する加齢やAPOBECによる変異シグネチャーに加えて、喫煙によるシグネチャーとしてはSBS92が検出された。直接煙草に暴露する肺(気管支)や腎臓ではタバコの煙に含まれる発がん物質の一つであるベンゾ[a]ピレンによると考えられているSBS4が検出されるのに対して、膀胱ではSBS92が検出される原因についてはさらなる研究が必要である。

要 約

単一細胞由来の検体の全ゲノム解析により、正常膀胱上皮細胞における体細胞変異の蓄積の過程やクローン進化が明らかになってきた。今後、さらに膀胱がんの発生の初期段階と考えられる*KMT2D*などの遺伝子の変異を獲得したクローンなどの特徴を明らかにし、また同一症例の膀胱がんの解析を行い、膀胱がんの病態解明につなげる予定である。また、喫煙による膀胱特異的な変異シグネチャーの原因を代謝産物の解析により明らかにしたいと考えている。

文 献

1. Fujii, Y., Sato, Y., Suzuki, H., Kakiuchi, N., Yoshizato, T., Lenis, A. T., Maekawa, S., Yokoyama, A., Takeuchi, Y., Inoue, Y., Ochi, Y., Shiozawa, Y., Aoki, K., Yoshida, K., Kataoka, K., Nakagawa, M. M., Nannya, Y., Makishima, H., Miyakawa, J., Kawai, T., Morikawa, T., Shiraishi, Y., Chiba, K., Tanaka, H., Nagae, G., Sanada, M., Sugihara, E., Sato, T. A., Nakagawa, T., Fukayama, M., Ushiku, T., Aburatani, H., Miyano, S., Coleman, J. A., Homma, Y., Solit, D. B., Kume, H., Ogawa, S.: Molecular classification and diagnostics of upper urinary tract urothelial carcinoma. *Cancer Cell*, 39: 793-809 e798 (2021) .
2. Mullenders, J., de Jongh, E., Brousalı, A., Roosen, M., Blom, J. P. A., Begthel, H., Korving, J., Jonges, T., Kranenburg, O., Meijer, R., Clevers, H. C.: Mouse and human urothelial cancer organoids: A tool for bladder cancer research. *Proc Natl Acad Sci USA*, 116: 4567-4574 (2019) .
3. Coorens, T. H. H., Spencer Chapman, M., Williams, N., Martincorena, I., Stratton, M. R., Nangalia, J., Campbell, P. J.: Reconstructing phylogenetic trees from genome-wide somatic mutations in clonal samples. *Nat Protoc*, 19: 1866-1886 (2024) .