

# 乳がん発生の進化の歴史を解明

## —ゲノム解析による発がんメカニズムの探索—

### 概要

がんは我が国を含む多くの先進諸国で死因の第一位を占め、我々の健康に重大な影響を及ぼす疾患です。近年、その発症は増加の一途をたどっており、我が国においては、男性の3人に一人、女性においても2人に一人が一生のうちにがんと診断されると推定されています。これまでの研究から、がんは細胞のゲノムに異常が生ずることによって惹起される疾患であることが明らかとなっており、近年のゲノム解析技術の革新を背景として、過去10年間に、ヒトの主要ながんについては、その発症に関わるゲノムの異常(ドライバー変異)が明らかにされています。しかし、その病態については、なお多くが解明されていません。がんは、ドライバー変異を獲得した一つの起源の細胞にはじまり、その子孫の細胞が次々に新たなドライバー変異を獲得することによって、数百億から数千億個からなる集団、いわゆる「がん」を発症すると考えられています。しかし、この最初の変異がいつ獲得されるのか、また、その最初の変異を獲得した細胞が、いつ、どのような変異を獲得して、最終的に「がん」と診断されにいたるのか、というがんの発症経過の全体像についてはよくわかっていませんでした。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、同・乳腺外科 戸井雅和教授(現:都立駒込病院長)、同・次世代臨床ゲノム医療講座 西村友美特定助教、および京都大学白眉センター 垣内伸之特定准教授らを中心とする研究チームは、近年増加の一途を辿っている乳がんについて、思春期前後に生じた最初の変異の獲得から数十年後の発症にいたるまでの全経過を、最先端のゲノム解析技術を駆使することによって、世界で初めて明らかにすることに成功しました。

本研究チームは、まず、加齢にともなって単一乳腺細胞に変異が蓄積していく過程を解析することにより、全ての乳腺細胞には閉経にいたるまでに毎年約20個の変異が蓄積すること、また、閉経後には、蓄積速度が約1/3に低下すること、さらに、一回の妊娠出産で約50個変異が減少することを見だし、変異の蓄積が女性ホルモン(エストロゲン)に依存していること、妊娠出産後には、それまで休眠状態にあった細胞から新たに乳腺組織が再構築される可能性があることが示唆されました。続いて、本研究チームは、このようにして決定された変異の獲得速度に基づいて、乳がんとその周りの良性の増殖性病変や正常上皮との遺伝学的な関係性を調べることで、乳がんの初期の変異の獲得からその発症にいたる経時的な経過を推定しました。その結果、(1)乳がん全体の約20%を占める「*der(1;16)*転座陽性の乳がん」の起源は、思春期前後に当該転座を獲得した単一の細胞に由来すること、(2)同細胞は分裂増殖を繰り返して、数十年後に乳がんを発症するころまでには、乳腺内の広い領域にわたって拡大するに至ること、(3)こうした拡大の過程を通じて、30歳前後までには、その後乳がんを発症することになる複数の起源の細胞が生じ、これらの細胞から多中心性に発がんが生じたこと、が推定されました。今回の研究結果は、人生の極めて早期に変異を獲得した細胞からがんが発症するまでの全体像を初めて明らかにしたものであり、今後、乳がんの発症予防や早期発見、早期治療の開発に貢献すると期待されます。東京医科歯科大学・M&D データ科学センター 宮野悟特任教授および慶應義塾大学医学部坂口光洋記念講座(オルガノイド医学) 佐藤俊朗教授(現:同・医化学教室教授)らとの共同研究により得られた成果で、本成果は、現地時間2023年7月26日16:00に英国の国際学術誌「*Nature*」にオンライン掲載されました。

## 1. 背景

乳がんは日本人女性において最も頻度の高いがんであり、2019年の罹患者数は109,000人以上にも及びます。罹患者数、死亡数ともに年々増加傾向にあり、40～50代と若年での発症が多いことから、社会的重要性の高い疾患です。近年、乳がんを含む様々ながんについてがんが発生するメカニズムを遺伝学的な観点から解明しようとする試みが盛んに行われていますが、発がん過程のごく初期にどのような変化が起こるのかはよく分かっていませんでした。

がんの多くは生存・増殖に有利なゲノムの変化（ドライバー変異）を獲得した細胞が異常に増殖することで発症すると考えられています。しかし、がんそのもののゲノム解析からだけでは、ドライバー変異がいつ、どの順番で獲得され、進化のどの段階で細胞ががん化するのかを知ることはできませんでした。近年、発がん過程のごく早期に生ずるゲノムの変化を調べるために正常組織のゲノム解析が行われるようになると、一見正常に見える組織にもすでにかんて認められるのと同様な遺伝子変異が生じていることが分かってきました。すなわち、様々な組織・臓器において、一見正常に見えても、すでにかん遺伝子の変異を獲得した細胞の集団（クローン）が多数生じていることが明らかになってきました。また、こうした遺伝子の変異は人生の極めて早期から獲得されることも分かってきました。これらの遺伝子変異の多くはがんで認められる変異と同じであるため、そうした多数のクローンの中からがんが発生するのではないかと考えられるわけですが、では、一体なぜ、ヒトが生涯に発症するがんは高々一つか二つで、他の大多数のクローンはがんにならないのか、また、変異を持った細胞が人生の早期に現れるとすれば、どういう経過でそれらががんにまで進展するのでしょうか。これらの疑問に答えるためには、がんとがんに進展しなかった細胞を同時に解析することが必要となります。今回、本研究チームは、がんと周囲の一見正常に見える組織を最新の技術を用いて詳細に解析することによって、がんの進化の歴史を詳細に辿ることで、正常な乳腺上皮がいつ、どのような順番でドライバー変異を獲得し、どのような遺伝学的・形態学的変化を経て乳がんが発生するに至ったかを世界で初めて明らかにすることに成功しました。

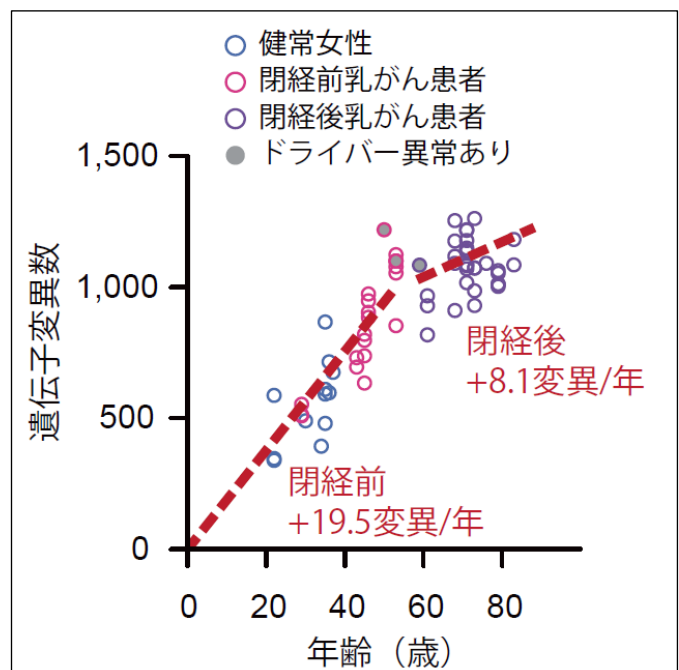
## 2. 研究手法・成果

### ● 正常乳腺における遺伝子変異の蓄積

私たちはまず、加齢に伴って正常な乳腺の細胞にどのように遺伝子変異が蓄積するのかを知るために、様々な年齢の乳がん患者の乳腺組織や授乳中の女性の乳汁から乳腺の細胞を集めて培養し、次世代シーケンサーを用いて一つの細胞に蓄積した遺伝子変異を調べました。その結果、

- 1) 乳腺の細胞にも加齢に従って遺伝子変異が蓄積すること
- 2) 遺伝子変異が蓄積する速度は閉経を契機に緩やかになること（閉経前は1年ごとに+19.5変異、閉経後は1年ごとに+8.1変異）（図1）
- 3) 出産を経験した女性では遺伝子変異の数は減少すること（1回出産するごとに-54.8変異）

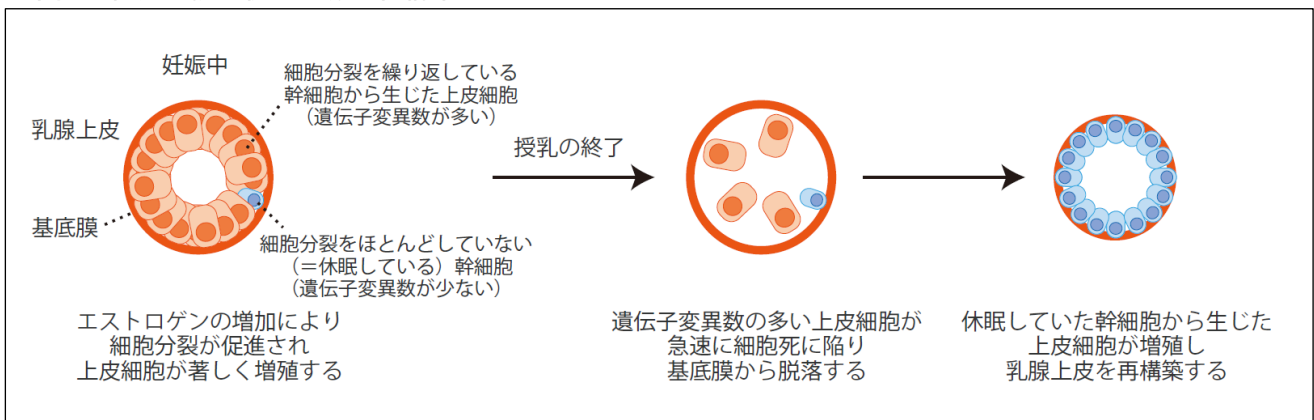
図1：乳腺における遺伝子変異の蓄積



4) ドライバー変異を獲得した細胞では遺伝子変異の数は増加すること (+210.4 変異) が明らかになりました。

女性ホルモンの一つであるエストロゲンは細胞のゲノムに傷をつけたり、細胞の分裂を促進したりすることによって遺伝子変異の蓄積に関与する可能性が示唆されていましたが、エストロゲンの量が低下する閉経にもなって、乳腺における遺伝子変異の蓄積速度が大きく減少するという今回の観察結果は、そうした従来の実験結果を支持する結果でした。一方、出産を経験することで遺伝子変異の数が見かけ上大きく減少することは、予想に反する結果でした。細胞にいったん生じた数十個もの変異が元に戻ることはありませんし、妊娠期間の10ヶ月の間はエストロゲンの量はむしろ顕著に上昇しますから、この観察結果は出産後の授乳期間のエストロゲンの量の低下では説明できません。むしろ、妊娠・出産に伴う変異数の低下は、乳腺の細胞が変異を蓄積していない細胞に置き換わる可能性を示唆しています。妊娠・出産・授乳期間を通じて、乳腺は授乳の要求を満たすために著しい増殖をしめしますが、この期間が終わると急速に縮小します。この際に、増殖した細胞はプロラクチンなどのホルモンの支持を失って急速に細胞死に陥ると考えられますが、その後乳腺の再構築には、それまで細胞の分裂を繰り返すことなく休眠していた幹細胞によって新たに再構築されると推測されました(図2)。このように、乳腺における遺伝子変異の蓄積には、加齢だけではなく、エストロゲンの増減を伴う女性特有のライフイベントが影響を与えていることが明らかになりました。初経、妊娠、出産、授乳、閉経などのライフイベントが乳がんの発症リスクに影響を与えることは以前から知られており、今回の研究結果はエストロゲンに関連した発がんメカニズムを紐解く一助となることが期待されます。

図2：出産・授乳後の乳腺の再構築



### ● 乳がんが発生するまでの進化の歴史

次に、乳がんの進化の歴史を解明するために、周囲に良性の増殖性病変を複数伴っている乳がんを選び、手術で切除された乳腺組織から乳がんと増殖性病変や正常な乳腺上皮を顕微鏡下に細かく分けて採取し、次世代シーケンサーを用いてそれぞれのゲノムの異常を調べました。エストロゲンにより増殖が促進されるホルモン感受性乳がんをもつ閉経前の患者5人の乳腺組織を調べたところ、ほとんどの増殖性病変と正常な乳腺上皮の一部にも近傍のがんと同じドライバー変異が確認され、これらの非がん上皮とがんは同一のドライバー獲得非がんクローンから発生したことが分かりました。同じクローンから発生した非がん上皮とがん、両者のゲノム異常の類似点・相違点を探して進化の系統樹を再構築し、個々の上皮におけるドライバー変異の有無を詳細に調べることで、この非がんクローンがどのような遺伝学的・形態学的変化を経て乳がんの発生に至ったかを調べました(図3)。

この結果、

- 1) がんではないクローンにおいても、がんでは認められるのと同じ染色体異常  $der(1;16)$  転座 (1 番染色体と 16 番染色体の間の異常な再構成で形成された派生染色体) がしばしば認められること (6/7 クローン) (図 4)、
- 2) この染色体異常は、がんとは異なるクローンの共通の祖先の細胞に思春期前後に生じたと推定されること (図 5)
- 3) 最初に  $der(1;16)$  を獲得してから乳がんの発症に至るまでには数十年の年月を要すること、
- 4) その間に、この染色体異常を獲得した非がんクローンは、周囲の上皮を置き換えるようにして乳腺組織の中を数 2.5cm から 8.5cm にわたって増殖・拡大する一方、乳腺の各所で独自の進化を遂げ、様々なドライバー変異を追加で獲得しながら、正常な上皮から増殖性病変、がんに至るまで多彩な形態の上皮を形成したこと (図 4)
- 5)  $der(1;16)$  を獲得して拡大したクローンの中から、複数のがんが様々な時間経過で生じていること (図 4)、

図 3 : 乳がんの進化の歴史を解明するための系統樹解析

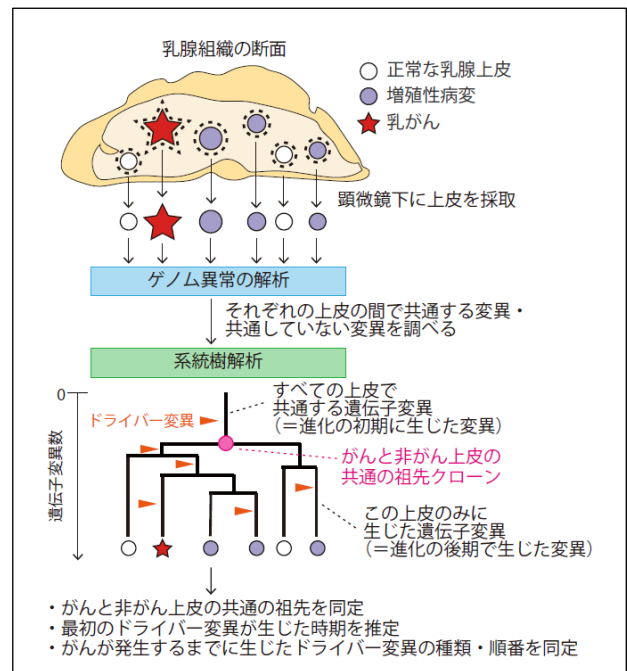
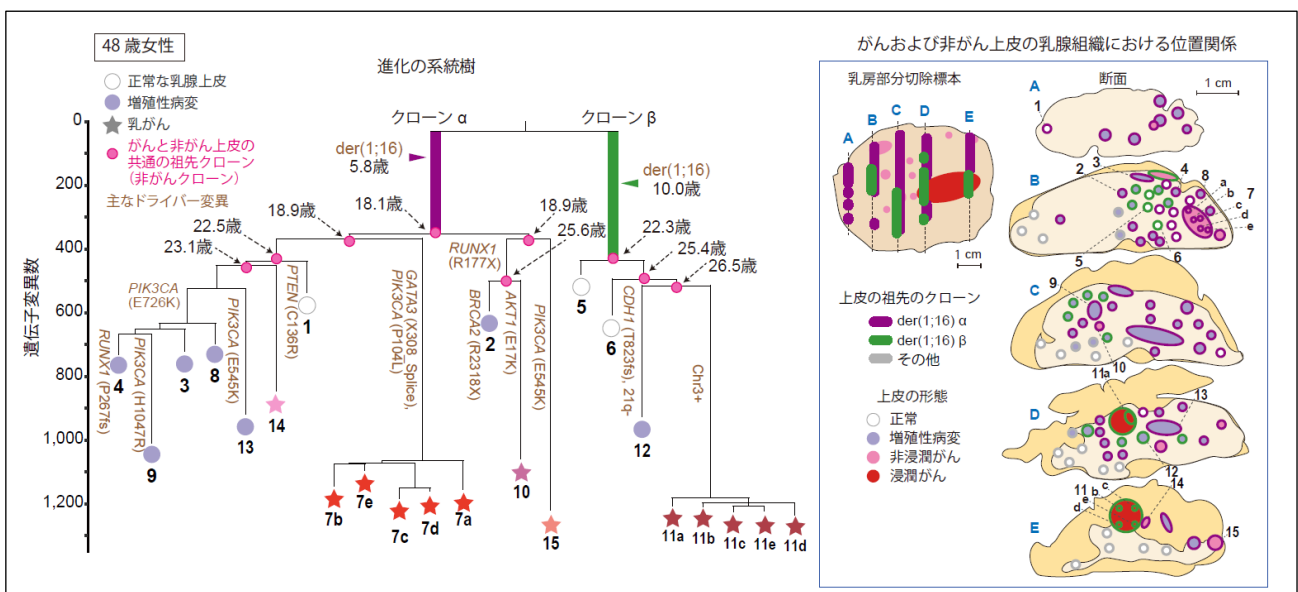


図 4 :  $der(1;16)$  陽性乳がんの進化の歴史を辿る系統樹解析の一例



$der(1;16)$  転座は乳がん全体の約 20%に認められる頻度の高い異常ですが、上記の変化は、この  $der(1;16)$  転座を有する乳がんでは共通に認められる特徴であると考えられました (図 6)。Der(1;16)陽性乳がんの 90%以上はホルモン感受性であること、閉経後に発症した  $der(1;16)$  陽性乳がんでは周囲に非がんクローンの拡大を

ほとんど伴っていないことから、der(1;16)獲得非がんクローンの増殖・拡大・進化はエストロゲンにより促進され、閉経時にがん化に至っていなかった上皮はその後のエストロゲンの急激な減少によって消退するものと考えられました。このように、乳がんの発生に至るまでの進化の歴史を最初のドライバー変異獲得から順を追

図 5 : der(1;16)獲得時期の推定

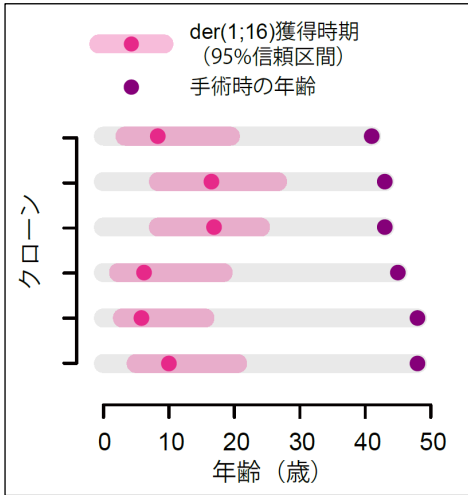
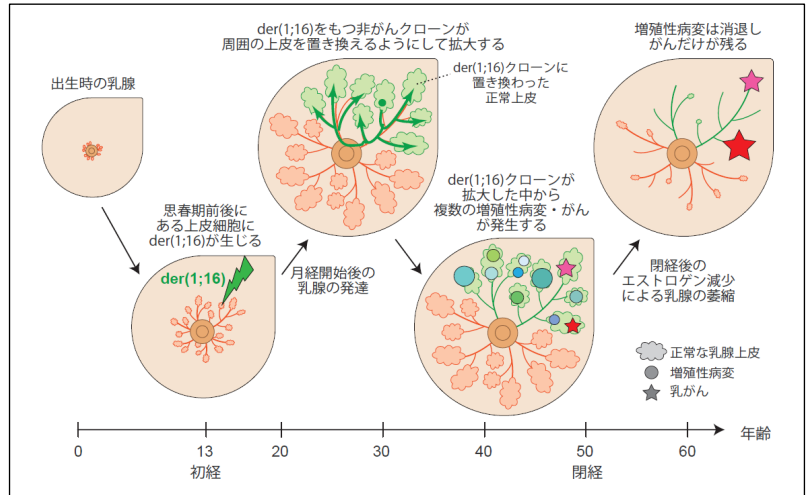


図 6 : der(1;16)陽性乳がんが発生するまでの進化の歴史



って解明できたことにより、der(1;16)陽性乳がんの特徴的な発がんメカニズムの一端を明らかにすることができました。

### 3. 波及効果、今後の予定

乳がんの約70%はホルモン感受性であり、初経、妊娠、出産、授乳、閉経などエストロゲンの増減を伴う女性特有のライフイベントが乳がんの発症リスクに影響を与えることは広く知られていますが、そのメカニズムについてはまだよく分かっていません。今回の研究では、乳腺の上皮における遺伝子変異の蓄積にエストロゲンが影響を与えることが明らかになり、発がんの初期段階でエストロゲンが果たす役割を解明する一助となることが期待されます。また、今回、乳がんの約20%を占めるder(1;16)陽性乳がんについて、発がんの初期段階からの遺伝学的・形態学的な進化の歴史が明らかになり、der(1;16)が生じた細胞からの発がんに関与するエストロゲンの重要な役割を果たす可能性が示唆されました。思春期にder(1;16)を獲得しながらも、閉経を契機にクローンが消退し発がんには至らない女性が一定数存在している可能性があり、がんに進展するクローンと消退するクローンの違いを規定する因子の探索が今後の課題となります。これが明らかになれば、der(1;16)獲得非がんクローンの拡大が認められた女性における発がんリスク予測や効率的な検診、発がん予防のためのよりよい方策の開発につながることが期待されます。

また、今回の研究ではがんとがんの周りの良性の上皮を丹念に調べることで、今まで明らかになってこなかった発がんの初期段階の変化を捉えることができました。この手法を他のタイプの乳がんにも応用することで、残り80%の乳がんの発がんメカニズムの解明も試みていきます。

### 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）
- 科学研究費補助金・基盤研究（B）



- 科学研究費補助金・基盤研究（C）
- 日本医療研究開発機構研究費・革新的先端研究開発支援事業
- 日本医療研究開発機構研究費・ムーンショット型研究開発事業
- 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
- 文部科学省・スーパーコンピュータ「富岳」成果創出加速プログラム
- 国立研究開発法人科学技術振興機構・創発的研究支援事業
- 国立研究開発法人科学技術振興機構・ムーンショット型研究開発事業
- アストラゼネカ・Externally Sponsored Research プログラム

### <研究者のコメント>

今回の研究によって、乳腺の細胞がいつどのような遺伝子異常を獲得し、どのような変化を経て乳がんの発症に至るのか、という発がんの詳細な歴史が明らかになりました。乳がんは多くの日本人女性の健康・生命を脅かす重要な疾患ですが、今回の研究成果を手がかりとして乳がんが発生するメカニズムの解明に取り組んでいます。私たちの研究が乳がんの予防や治療の向上に貢献し、乳がんで亡くなる女性を減らすため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：Evolutionary histories of breast cancer and related clones

（乳癌とその関連クローンの進化の歴史）

著者：Tomomi Nishimura<sup>1,2,3</sup>, Nobuyuki Kakiuchi<sup>1,4,5</sup>, Kenichi Yoshida<sup>1,6</sup>, Takaki Sakurai<sup>7,8</sup>, Tatsuki R. Kataoka<sup>7,9</sup>, Eiji Kondoh<sup>10,11</sup>, Yoshitsugu Chigusa<sup>10</sup>, Masahiko Kawai<sup>12</sup>, Morio Sawada<sup>13</sup>, Takuya Inoue<sup>13</sup>, Yasuhide Takeuchi<sup>1,7</sup>, Hirona Maeda<sup>1,7</sup>, Satoko Baba<sup>14,15,16</sup>, Yusuke Shiozawa<sup>1</sup>, Ryunosuke Saiki<sup>1</sup>, Masahiro M. Nakagawa<sup>1,2</sup>, Yasuhito Nannya<sup>1,17</sup>, Yotaro Ochi<sup>1</sup>, Tomonori Hirano<sup>1,5,18</sup>, Tomoe Nakagawa<sup>1,18</sup>, Yukiko Inagaki-Kawata<sup>1,3</sup>, Kosuke Aoki<sup>1</sup>, Masahiro Hirata<sup>7</sup>, Kosaku Nanki<sup>19</sup>, Mami Matano<sup>19</sup>, Megumu Saito<sup>19,20</sup>, Eiji Suzuki<sup>3,21</sup>, Masahiro Takada<sup>3</sup>, Masahiro Kawashima<sup>3</sup>, Kosuke Kawaguchi<sup>3</sup>, Kenichi Chiba<sup>22</sup>, Yuichi Shiraishi<sup>22</sup>, Junko Takita<sup>12</sup>, Satoru Miyano<sup>23,24</sup>, Masaki Mandai<sup>10</sup>, Toshiro Sato<sup>19</sup>, Kengo Takeuchi<sup>14,15,16</sup>, Hironori Haga<sup>7</sup>, Masakazu Toi<sup>3</sup> & Seishi Ogawa<sup>1,18,25</sup>

所属機関：<sup>1</sup>Department of Pathology and Tumour Biology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan. <sup>2</sup>Department of Next-generation Clinical Genomic Medicine, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan. <sup>3</sup>Department of Breast Surgery, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan. <sup>4</sup>The Hakubi Center for Advanced Research, Kyoto University, Kyoto, Japan. <sup>5</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan. <sup>6</sup>Division of Cancer Evolution, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan. <sup>7</sup>Department of

Diagnostic Pathology, Kyoto University Hospital, Kyoto, Japan. <sup>8</sup>Department of Diagnostic Pathology, Osaka Red Cross Hospital, Osaka, Japan. <sup>9</sup>Department of Pathology, Iwate Medical University, Iwate, Japan. <sup>10</sup>Department of Gynecology and Obstetrics, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan. <sup>11</sup>Department of Obstetrics and Gynecology Faculty of Life Sciences, Kumamoto University, Kumamoto, Japan. <sup>12</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Kyoto University, Kyoto, Japan. <sup>13</sup>Adachi Hospital, Kyoto, Japan. <sup>14</sup>Pathology Project for Molecular Targets, Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan. <sup>15</sup>Division of Pathology, Cancer Institute, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan. <sup>16</sup>Department of Pathology, Cancer Institute Hospital, Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan. <sup>17</sup>Division of Hematopoietic Disease Control, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. <sup>18</sup>Institute for the Advanced Study of Human Biology (WPI-ASHBi), Kyoto University, Kyoto, Japan. <sup>19</sup>Department of Organoid Medicine, Sakaguchi Laboratory, Keio University School of Medicine, Tokyo, Japan. <sup>20</sup>Osaka Research Center for Drug Discovery, Otsuka Pharmaceutical Company, Limited, Osaka, Japan. <sup>21</sup>Breast Surgery Department, Kobe City Medical Center General Hospital, Hyogo, Japan. <sup>22</sup>Division of Genome Analysis Platform Development, National Cancer Center Research Institute, Tokyo, Japan. <sup>23</sup>Department of Integrated Analytics, M&D Data Science Center, Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan. <sup>24</sup>Human Genome Center, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan. <sup>25</sup>Department of Medicine, Centre for Haematology and Regenerative Medicine, Karolinska Institute, Stockholm, Sweden.