

令和元年6月24日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11132

研究課題名(和文) 進化論モデルを用いた内膜症から卵巣類内膜癌への進展メカニズムの解明

研究課題名(英文) Identification of genomic linkage from ovarian endometriosis to endometrioid carcinoma based on sequential OMICS data analysis

研究代表者

加嶋 克則 (Kashima, Katsunori)

新潟大学・医歯学総合病院・特任教授

研究者番号：50345500

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣類内膜癌は子宮内膜症を発生起源とするとされるが、その発症メカニズムは依然として不明である。我々はオミックスデータ解析を行うことで、そのメカニズムの解明することを目的とした。卵巣類内膜癌39症例に対する網羅的遺伝子変異解析により、KRAS遺伝子変異18例(46.2%)、PIK3CA遺伝子変異が16例(41.0%)とほとんどの症例で癌関連遺伝子が変異を起こしていることを確認した。子宮内膜症上皮58症例に対する遺伝子変異解析でも、40%の症例で少なくともPIK3CA遺伝子・KRAS遺伝子変異を認めることを明らかにした。これらの陽性細胞のクローナル性増殖が卵巣類内膜癌の発がんに重要であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣類内膜癌が子宮内膜症から発生するメカニズムを解明することは、日本人成人女性の10-20%が罹患している子宮内膜症を外来管理する上で非常に有用な情報になる。さらに、類内膜癌の遺伝子異常に基づいた治療戦略の開発につながるため、本研究の学術的・社会的意義は大きい。

研究成果の概要(英文)：It is well known that ovarian endometrioid carcinoma occurs from endometriosis. Our aim of this study is to clarify the genomic linkage from endometriosis to ovarian endometrioid carcinoma based on sequential genomic analysis. Exome and target-gene sequencing demonstrated that 46.2% and 41.0% of ovarian endometrioid carcinoma harbored KRAS and PIK3CA mutations. On the other hand, around 40% of ovarian endometriosis had KRAS and PIK3CA mutations which were so-called "hot-spot" mutations in cancer. These results suggested that clonal expansion of endometriotic cells with cancer-associated gene mutations might lead to development of ovarian endometrioid carcinoma.

研究分野：産婦人科

キーワード：卵巣癌 類内膜癌 子宮内膜症 癌遺伝子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜と同様の組織が本来の場所から離れた異所に増生して発症する子宮内膜症は、欧米人に比し、日本人で多い疾患で、その頻度は成人女性の 10-20%にも達する。また子宮内膜症は、数%の症例で卵巣癌を発症するため、癌化メカニズムの解明は、喫緊の課題である。子宮内膜症を発生母地とする卵巣癌として、主に明細胞癌、類内膜癌が挙げられるが、2つの組織型では、癌化メカニズムが異なる可能性が報告されている (Kajihara *et al. Int J Gynecol Pathol* 2012)。

そのうち明細胞癌については、網羅的ゲノム・トランスクリプトーム解析が行われ、*ARID1A* や *PIK3CA* の体細胞性変異を高頻度に認めることが同定されている (Jones *et al. Science* 2010; Wiegand *et al. NEJM* 2010)。さらに、近年 *ARID1A* タンパク質欠乏や *ARID1A/PIK3CA* 変異が明細胞癌組織周囲の子宮内膜症病変にも存在することが示されており (Yamamoto *et al. Mod Pathol* 2012; Anglesio *et al. J Pathol* 2015)、子宮内膜症から明細胞癌への進展メカニズムが解明されつつある。一方、類内膜癌については、網羅的ゲノム解析が行われておらず、*ARID1A*、*PIK3CA*、*CTNNB1*、*PTEN* などの遺伝子変異の頻度が報告されているのみで、内膜症の癌化という視点では解析が進んでいない。

申請者らは、これまでに子宮内膜症における疾患感受性遺伝子同定を目的とし、日本人子宮内膜症 696 症例とコントロール 825 症例の SNP アレイデータを用いたゲノムワイド関連解析を行い、疾患感受性遺伝子として *IL1A* を同定している (Adachi *et al. J Hum Genet* 2010; Hata *et al. J Hum Genet* 2013)。最近上皮性卵巣癌に対する大規模 SNP 関連解析において、*IL1A* と内膜症関連卵巣癌発症との関連性が報告されており (White *et al. Cancer Res* 2012; Charbonneau *et al. Cancer Res* 2014)、*IL1A* は子宮内膜症発症のみならず、内膜症癌化 (特に明細胞癌) においても重要な役割を果たしている可能性がある。また申請者らは、国際ゲノムワイド関連メタ解析にも参加し、人種・民族によらない子宮内膜症疾患感受性遺伝子を複数報告している (Nyholt *et al. Nat Genet* 2012)。

## 2. 研究の目的

本研究では、同一症例内の正常子宮内膜、子宮内膜症、卵巣癌組織内子宮内膜症・異型子宮内膜症、卵巣癌細胞を対象とし、レーザーマイクロダイセクション法を用いることで、純度の高いサンプルを回収後に核酸を抽出し、全エクソン及び RNA シークエンスを行うことで、信頼性・再現性の高い遺伝子変異・コピー数変化及び遺伝子発現・long non-coding RNA (lncRNA) プロファイルを作成し、統合解析を行うことで子宮内膜症から卵巣類内膜癌への進展メカニズムを解明することを目的とする。

## 3. 研究の方法

新潟大学産婦人科において同意の得られ、凍結保存されている卵巣類内膜癌 39 症例、子宮内膜症 58 症例、正常子宮内膜 40 症例を対象として、全エクソンシークエンスおよびターゲットシークエンスを実施した。

レーザーマイクロダイセクション用検体は、OCT コンパウンドで包埋後液体窒素にて凍結した。凍結組織をクリオスタットで薄切し、100%メタノールで固定後、トルイジンブルー染色を行った後、NIKON 社の Arcturus® LCM システムを用いて、正常子宮内膜上皮、内膜症上皮、癌上皮を選択的に採取した。選択された各試料は微量 DNA・RNA 抽出用キットを用いて、DNA・RNA を抽出し、Agilent 社 BioAnalyzer を用いて Quality check を行った。

Agilent 社 SureSelect Human All Exon V6 を用いて Exon 濃縮を行い、ライブラリー作成後 Illumina HiSeq2500 シークエンス(100bp paired end)を行った。得られた Fastq ファイルからエクソームシークエンスデータパイプラインを用いて体細胞変異を抽出し、各体細胞性変異に対して ANNOVAR algorithm (Kai *et al. Nucleic Acids Res* 2010) を用いて機能的注釈付けを行った。

Illumina 社の TruSeq RNA サンプル調整キットを用い、ライブラリー作成後 Illumina HiSeq 2500 でペアエンド RNA シークエンス (100bp) を行った。得られた Fastq ファイルから Pipeline for RNA sequence Data Analysis (PRADA)を用いて Quality Check を行い、遺伝子発現データを取得した。

## 4. 研究成果

当科に保存されている卵巣原発類内膜癌 39 症例を対象として行った網羅的遺伝子変異解析では、*KRAS* 遺伝子変異 18 例 (46.2%)、*ARID1A* 遺伝子変異が 18 例 (46.2%)、*PIK3CA* 遺伝子変異が 16 例 (41.0%)、*PTEN* 遺伝子変異 13 例 (33.3%)、*TP53* 遺伝子変異 9 例 (23.1%) であった。上記 5 つの遺伝子の体細胞変異を持たない症例はわずか 2 症例 (5.1%) のみであった。

次に、当科に保存されている子宮内膜症 58 症例についてレーザーマイクロダイセクション後 DNA を抽出し、網羅的遺伝子変異解析を行った。40%の卵巣子宮内膜症症例で *PIK3CA* 遺伝子・*KRAS* 遺伝子変異を認めた。さらに正常子宮内膜上皮 40 例に対する網羅的遺伝子変異解析により、*PIK3CA* 遺伝子・*KRAS* 遺伝子変異がそれぞれ 30%、10% 同定された。ただし、*PIK3CA* 遺伝子・*KRAS* 遺伝子変異の変異アリル頻度は、正常子宮内膜に比較し、子宮内膜症・卵巣類内膜癌で有意に高値であった ( $p < 0.001$ )。以上の結果から卵巣類内膜癌の癌関連遺伝子変異は、すでに正常子宮内膜や子宮内膜症で存在し、癌関連遺伝子変異を持った内膜細胞のクローン性増殖が卵巣類内膜癌の癌化に関連している可能性が示唆された。

遺伝子変異が起こるメカニズムとして DNA 修復機構に注目し、正常子宮内膜・子宮内膜症・卵巣類内膜癌における DNA 修復関連遺伝子異常の有無を検証した。卵巣類内膜癌において、*BRCA1/2* に代表される相同組換え修復関連遺伝子の体細胞変異を 23% で認めた。さらに相同組換え修復関連遺伝子の生殖細胞系列変異も 2% で認めた。一方、子宮内膜症や正常子宮内膜では、相同組換え修復遺伝子をはじめとする DNA 修復に関わる遺伝子の病的意義のある変異を認めなかった。

また、卵巣類内膜癌と子宮内膜症の分子生物学的特徴の比較を行うために、網羅的遺伝子発現データ解析を行った。サンプル間のさまざまなバイアスを補正後、single sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) を行い、卵巣類内膜癌と子宮内膜症との間で共通して活性化・不活化しているパスウェイと、各疾患で独自に活性化・不活化しているパスウェイを同定した。現在、独立したデータセットを取得し、再現性の確認を行なっている。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. Kentaro Sugino, Kosuke Yoshihara, Nozomi Yachida, Manako Yamaguchi, Yutaro Mori, Risa Kudo, Ryo Tamura, Kazuaki Suda, Tatsuya Ishiguro, Sosuke Adachi, Masayuki Sekine, and Takayuki Enomoto. Germline and somatic mutations of homologous recombination associated genes in ovarian cancer. 第 71 回日本産科婦人科学会学術講演会 2019
2. Kazuaki Suda, Kosuke Yoshihara, Tatsuya Ishiguro, Ryo Tamura, Kaoru Yamawaki, Yutaro Mori, Hiroaki Kase, Ituro Inoue and Takayuki Enomoto. Exome sequencing of endometriosis identifies recurrent somatic mutations in MAPK pathway. 第 70 回日本産科婦人科学会学術講演会 2018
3. Kentaro Sugino, Kosuke Yoshihara, Hirofumi Nakaoka, Nozomi Yachida, Manako Yamaguchi, Yutaro Mori, Risa Kudo, Ryo Tamura, Kazuaki Suda, Tatsuya Ishiguro, Sosuke Adachi, Masanori Isobe, Masayuki Yamaguchi, Masayuki Sekine, Katsunori Kashima, Teiichi Motoyama, Ituro Inoue, and Takayuki Enomoto. Germline and somatic mutations of homologous recombination associated genes in non-serous ovarian cancer. European Society of Gynecological Oncology 2018.
4. 杉野健太郎、吉原弘祐、山口真奈子、谷地田希、森裕太郎、山脇芳、須田一暁、田村亮、石黒竜也、安達聡介、磯部真倫、山口雅幸、関根正幸、榎本隆之、中岡博史、井ノ上逸郎、本山悌一 卵巣癌組織型別の相同組み替え修復異常の評価 第 17 回日本婦人科がん分子標的研究会 2018

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

## 6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：榎本 隆之

ローマ字氏名：Takayuki Enomoto

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：教授

研究者番号（8桁）：90283754

研究分担者氏名：吉原 弘祐

ローマ字氏名：Kosuke Yoshihara

所属研究機関名：新潟大学

部局名：医歯学系

職名：研究准教授

研究者番号（8桁）：40547535

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。