

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：83901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07708

研究課題名（和文）LCM法による子宮腺筋症凍結検体の高感度遺伝子変異検出法の確立

研究課題名（英文）Establishment of effective and reliable detection system for genomic alterations in uterine adenomyosis

研究代表者

井上 聡（Inoue, Satoshi）

愛知県がんセンター（研究所）・腫瘍免疫応答研究分野・ユニット長

研究者番号：30801930

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：申請者は、良性疾患である子宮腺筋症とその発生母地である正所性子宮内膜のゲノム異常の検出に世界で初めて成功し、Nature Commun誌、Cell Death Disease誌の発表に至った。具体的には、子宮腺筋症という疾患は、KRAS変異が約4割の症例において好発すること、発生母地である正所性子宮内膜においてKRAS変異クローンが高頻度に認められること、プロゲスチン治療抵抗性との相関性を明らかにした。さらに子宮腺筋症の発症リスク因子である経産婦の子宮内膜においてKRAS変異が好発することから、妊娠による物理障害がゲノム異常を介して子宮腺筋症を発症している可能性を示唆することが出来た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、子宮腺筋症のゲノム異常を世界で初めて明らかにした。その結果、子宮腺筋症という疾患は、子宮内膜症と同様に正所性子宮内膜において共通の起源となるクローンを有することが明らかとなり、両疾患が高頻度に併発するという臨床上的特徴を分子レベルで説明することが出来た。さらにKRAS変異クローンは、プロゲステロン受容体発現抑制を起こし、実臨床で用いられているプロゲスチン抵抗性を獲得している可能性を示唆した。本研究は、ゲノム解析というアプローチにより、子宮内膜症と腺筋症との関係を分子レベルで明らかにしただけでなく、個別化医療の対象となりうる疾患であることを明らかにした点が本研究成果の意義と思われる。

研究成果の概要（英文）：Uterine adenomyosis is a benign disorder that often co-occurs with endometriosis and/or leiomyoma and impairs quality-of-life. In contrast to endometriosis and leiomyoma, the genomic features of adenomyosis are unknown. Our NGS analyses of adenomyosis revealed that recurrent oncogenic KRAS mutations were detected in 37% adenomyosis. Multi-regional sequencings showed that adenomyosis is an oligoclonal disease, with some mutations also detected in adjacent normal endometrium and/or co-occurring endometriosis. KRAS mutations were significantly more frequent in adenomyosis with co-occurring endometriosis, who had been pretreated with a progestin, or low PR expression. Our first genetic characterization of adenomyosis suggest a common molecular etiology of adenomyotic and endometriotic clones, potentially explaining the frequent co-occurrence. Our findings may point towards genetically-guided precision therapy and/or relapse risk assessment after uterine sparing surgery.

研究分野：ゲノム解析

キーワード：子宮腺筋症 子宮内膜症 子宮内膜 ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

子宮腺筋症は、着床の場である子宮内膜組織に類似した腺と間質からなる組織が、子宮筋層内で異所性に増殖する疾患であり、月経困難や過多月経、不妊や早流産など生殖年齢女性のQOLを著しく低下させる。根治療法は子宮部分、全摘出が主流であり不妊や早流産の問題が顕在化している。従来、子宮腺筋症は子宮内膜症の一病型と考えられてきたが、病態に相違点もあることから、最近になって異なる疾患単位として認識されるようになった。腺筋症由来の子宮内膜がんの特徴として、アジア人種で頻度が高いことに加え、それ以外の子宮内膜がんと比較して予後の悪いという報告がある。しかしながら分子レベルでの解析が皆無であり悪性化の病因病態は不明である。腺筋症由来の子宮内膜がんの1例の病理組織像を図1に示す。子宮腺筋症が悪性化した場合には、発生母地が筋層内に位置するという特徴のため、不正性器出血などの臨床症状の出現が遅れたり、子宮内膜細胞診・組織診による病理学的診断が困難だったりすることにより、その診断までに癌が進行してしまうことが臨床的に問題となっている。すなわちこれまでの厳密な病理学的な診断に基づく腺筋症由来子宮内膜がんの発症頻度は実態を反映していない可能性が排除できず、分子レベルでの網羅的解析が必要不可欠であるが、これまでほとんどなされていないのが現状である。

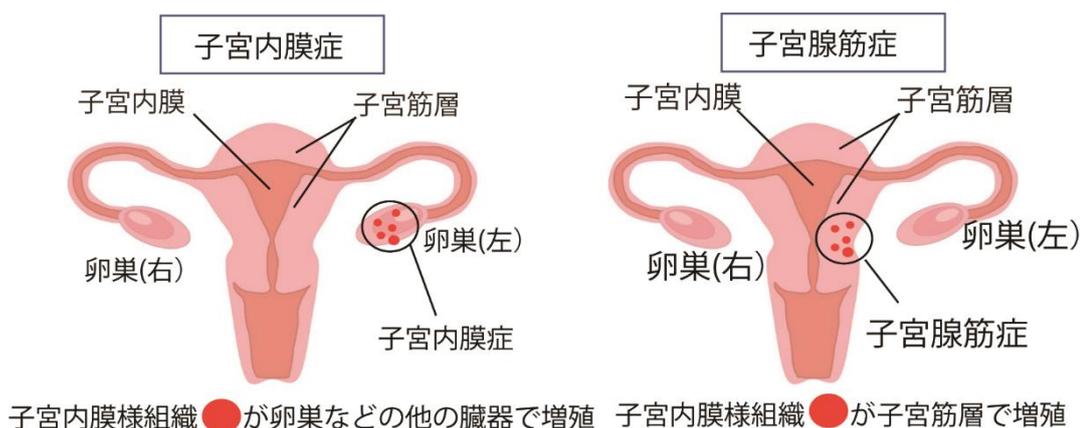


図1 子宮内膜症と子宮腺筋症のモデル図

2. 研究の目的

子宮腺筋症凍結検体を用いた WES 解析の課題は、腺筋症細胞含有率が低いため、変異頻度が～4%と極めて低かった点である。現状の WES 解析技術における体細胞変異を検出限界(約2~3%)に近く、腺筋症細胞における大半の遺伝子変異の検出が困難である。そこで本研究課題では、子宮腺筋症細胞を物理的に純化することで変異頻度を増加させ、大半の体細胞変異を検出する。この効率的変異検出系を、周辺「正常部」を含めた多検体に対して行う。子宮腺筋症モデル細胞培養系を活用した機能解析と組み合わせることで、周辺正常組織に存在する腺筋症の起源クローンを同定し、病変部内におけるクローンの多様性の実態を明らかにし、さらには個別化医療の実現に向けた分子基盤の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 世界最大の子宮腺筋症検体バンクの構築

共同研究者である東京大学医学部附属病院は子宮腺筋症の専門外来を国内唯一有する大学施設であり、多くの子宮腺筋症患者に対してその診断・治療を積極的に行っている。子宮腺筋症に

対する手術件数はいずれも国内最大級である。また順天堂大学医学部婦人科も子宮内膜がん・子宮腺筋症の手術件数は多く、臨床情報と紐づけされた子宮腺筋症検体バンクを構築した。

(2) LCM法と網羅的ゲノム解析を組み合わせたゲノム異常の実態の同定

今回の WES 解析において特徴的なこととして、何れの変異も変異アレル頻度が 3-7%と低く、腺筋症細胞の含有率が低いためなのか、あるいは子宮腺筋症内のクローナル多様性が高いためなのか問題となった。そこで laser capture micro-dissection (LCM) 法により、上皮系の腺筋症細胞を純化し、腺筋症細胞と周囲の正常子宮筋層組織における遺伝子変異の頻度を、次世代シーケンサーにより比較した。

(3) 臨床情報との相関性の解析

上述のゲノム解析により、子宮腺筋症において KRAS 遺伝子変異が高頻度に認められることが明らかとなった。そこで、KRAS 変異症例と臨床病理情報との相関性の解析を行い、層別化バイオマーカーの探索を行った。

4. 研究成果

子宮腺筋症は KRAS 遺伝子変異が高頻度にかかるクローナル増殖疾患である

WES 解析の結果、世界で初めて、子宮腺筋症の半数以上の症例で、何らかの非同義体細胞変異を同定した。中でも約 4 割の症例において、KRAS 遺伝子のがん化変異が認められた (図 2)。子宮内膜症や子宮筋腫のゲノム解析では、KRAS 遺伝子変異に加え、PIK3CA 遺伝子や MED12 遺伝子変異が高頻度に認められることが報告されている。しかし、子宮腺筋症では、PIK3CA 変異は極めて稀であり、MED12 遺伝子変異は全く認められなかった (図 2)。

以上の結果から、子宮腺筋症という疾患は、ゲノム異常を伴う細胞が増殖するクローナル増殖疾患であること、遺伝子変異という視点では子宮筋腫とは異なり、子宮内膜症とは一部、共通していた。

続いて LCM 法により、上皮系の腺筋症細胞を純化し、遺伝子変異の頻度を、次世代シーケンサーにより比較した。その結果、遺伝子変異頻度は、LMD 純化腺筋症細胞は新鮮凍結検体より数倍増加した (図 3)。一方 LCM 法により純化した近傍子宮筋層組織では同変異がほとんど認められないため、体細胞遺伝子変異は腺筋症細胞

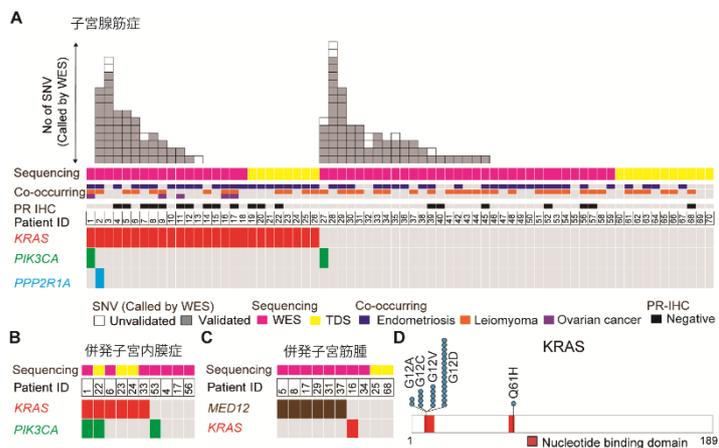


図 2 子宮腺筋症ゲノム解析結果概要
A 子宮腺筋症 70 症例に対するゲノム解析から、体細胞変異 (SNV) が約 6 割の症例で、KRAS 変異が約 4 割の症例で検出された。B 併発子宮内膜症、C 併発子宮筋腫に対するゲノム解析から、既報と類似の遺伝子変異が検出された。D 子宮腺筋症において検出された KRAS 遺伝子変異の大半は p.G12V のがん組織において好発するホットスポット変異であった。

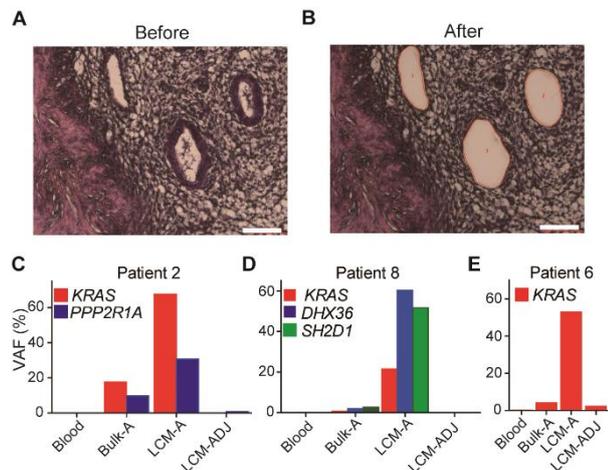


図 3 Laser micro-dissection (LMD) 法による子宮腺筋症細胞濃縮実験
A 子宮筋層中における子宮腺筋症細胞から、(B) 子宮腺筋症細胞を LMD 法により子宮腺筋症細胞を切り出し、遺伝子変異頻度を解析した。(C-E) その結果、濃縮腺筋症サンプル (LCM-A) において、濃縮前 (Bulk-A) と比較して遺伝子変異頻度が数倍、亢進した。

に生じていることが明らかになった。

KRAS変異子宮腺筋症症例は子宮内膜症の併発率が高い

正常子宮内膜組織に存在する *KRAS* などの遺伝子変異を有するクローンが、子宮腺筋症だけでなく子宮内膜症の起源であることが示唆されたため、*KRAS* 変異と子宮腺筋症と内膜症の併発率について検証した。*KRAS* 変異を有する子宮腺筋症の臨床情報との相関性を調べたところ、子宮内膜症の併発率が、*KRAS* 非変異症例と比較して、有意に高かった (表 1)。一方、*KRAS* 変異症例と子宮筋腫併発との相関性は認められなかった。以上の結果から、正常子宮内膜組織における *KRAS* 変異を有するクローンの存在が、子宮腺筋症のみならず子宮内膜症の発症リスク要因であることが示唆された。今後、子宮内膜における *KRAS* 変異の発生メカニズムを明らかにすることが、子宮腺筋症・内膜症の予防法の確立に向けた分子基盤となり得ることが示唆された。また、子宮腺筋症や子宮内膜症の外科的治療法として、従来の子宮全摘法に加え、最近では、患者さんの挙児願望などを考慮し、本邦と中心として、部分摘出による子宮温存出法が選択され始めている。今後、術前の *KRAS* 変異検査などを行うことで、外科的手術法の選択や、温存手術後の再発防止に向けた長期観察の重要性も示唆された。

表1 子宮腺筋症ゲノム解析結果概要

	<i>KRAS</i> 変異なし症例	<i>KRAS</i> 変異あり症例	統計上有意性 (<i>p</i> -value)
子宮内膜症併発率	26/44 (59.1%)	22/26 (84.6%)	0.0339
子宮筋腫併発率	28/44 (63.6%)	13/26 (59%)	

KRAS 遺伝子の変異を有する 26 症例中 22 症例 (84.6%) が、子宮内膜症を併発しており、両疾患が高頻度に併発する機構の一部が明らかとなった。

子宮腺筋症細胞クローンの発生母地は正所性子宮内膜であり、併発子宮内膜症と分子レベルでは、類似した発症機序である

子宮腺筋症症例の子宮腺筋症病変部、周辺子宮正常内膜、さらに併発子宮内膜症病変部のマルチサンプリングを行い、子宮腺筋症病変部で同定された変異が、周辺部子宮内膜や併発子宮内膜症病変部で共有されているか否かを検証した。子宮腺筋症で検出された一部の遺伝子変異 (例：*KRAS* 変異) と同一塩基置換置換が、周辺の子宮正常内膜部においても検出されたため、

子宮腺筋症病変部に存在するクローンの起源は、正常子宮内膜に存在するクローンであることが強く示唆された (図 4)。

また、併発子宮内膜症病変部においても、子宮腺筋症病変部と同一の塩基置換変異が検出されたことから (図 4)、両疾

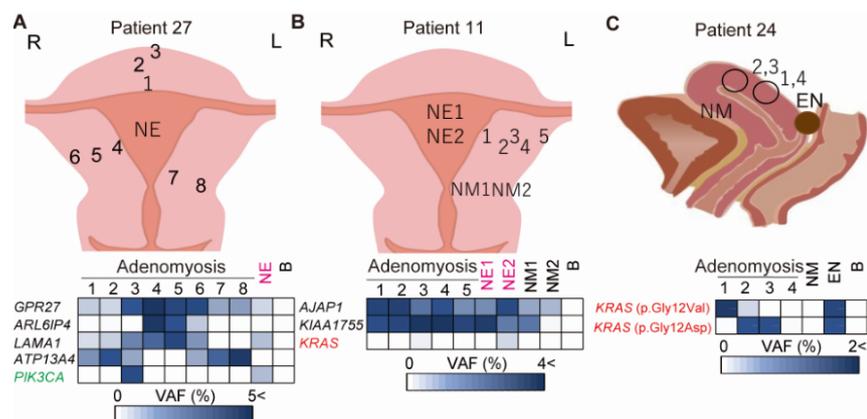


図 4 子宮腺筋症病変部、周辺子宮正常内膜部、併発子宮内膜症病変部マルチサンプリングゲノム解析 A-B 子宮筋層における子宮腺筋症細胞と周辺の子宮正常内膜部 (NE) のゲノム解析を行ったところ、腺筋症と同一の遺伝子変異が子宮内膜部 (NE) においても検出された。C 併発子宮内膜症とのマルチサンプリング解析から、子宮腺筋症病変部と同一の *KRAS* 変異が子宮内膜症病変部 (EN) でも検出された。

患は、正常子宮内膜に存在する同一ないし類似のクローンを起源とすることが強く示唆された。以上の結果から、子宮腺筋症と子宮内膜症は、分子レベルにおいては、発症機序の一部を共有

していることが示唆され、高頻度に併発する原因を説明することが可能となった。

子宮腺筋症症例において、子宮内膜組織における KRAS 変異が顕著に起こる

近年の正常組織に対するゲノム解析から、正常組織におけるゲノム異常の実態が明らかにされつつある。正常子宮内膜においても、ゲノム解析がされつつあり、PIK3CA の KRAS 変異などの遺伝子変異が比較的高頻度に発生していること、加齢などによってこれらのゲノム異常の発生頻度に影響が及ぶことが示唆されている。そこで、子宮腺筋症や子宮内膜症症例に加え、対照群として非子宮腺筋・内膜症（子宮筋腫、子宮頸がん、卵巣がん）症例から正常子宮内膜検体をそれぞれ収集し、PIK3CA の KRAS 遺伝子変異の発生率やアレル頻度を検証した。子宮腺筋症症例は、対照群である非子宮腺筋・内膜症症例と比較して、正常子宮内膜検体における KRAS 変異が高頻度に起こり、アレル頻度も有意に高かった（図 5）。

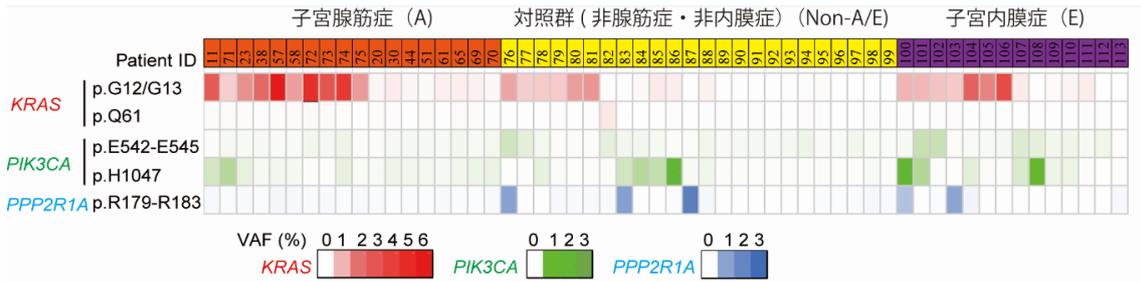


図 5 子宮腺筋症、内膜症症例の子宮正常内膜ゲノム解析結果概要

A 子宮腺筋症や子宮内膜症、対照群として非腺筋症・非内膜症症例の正常子宮内膜検体における KRAS、PIK3CA、PPP2R1A 変異解析。子宮腺筋症症例において、KRAS 変異が高頻度に認められた。

経産婦が正所性子宮内膜における KRAS 変異を誘発する可能性

正所性子宮内膜ゲノム解析結果と臨床情報との相関性を解析したところ、妊娠歴や経産歴と KRAS 変異率との間において、有意な相関性が認められた（表 2）。興味深い点として、帝王切開歴との相関性は認められなかった。以上の結果から、自然分娩時における子宮筋組織の強力な収縮といった物理的なストレスが子宮内膜組織におけるゲノム異常、特に KRAS 変異を誘発し、増殖能を獲得した KRAS 変異子宮内膜クローンが、子宮腺筋症の起源クローンとして発症リスクを亢進している可能性が示唆された。

表 2. 子宮内膜 KRAS 変異と臨床情報の相関性解析結果概要

臨床情報	Value (%)		統計上有意性 (p-value)
	KRAS 変異なし症例 (N=40)	KRAS 変異あり症例 (N=58)	
妊娠歴, no. (%)	12/40 (30.00)	38/58 (65.52)	0.001
出産歴, no. (%)	11/40 (27.50)	33/58 (56.90)	0.007
帝王切開歴, no. (%)	6/40 (15.00)	5/58 (8.62)	n.s.
自然分娩歴, no. (%)	7/40 (17.50)	28/58 (48.28)	0.003

n.s.: 有意性なし (Fisher's exact test)

自然分娩歴のある症例の子宮内膜において KRAS 変異が高頻度に検出された

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Inoue, S., Yoshida, E., Fukui, Y., Ueno, T., Kawazu, M., Takeyama, R., Ikemura, M., Osuga, Y., Terao, Y., Hirota, Y., Mano, H.	4. 巻 11
2. 論文標題 KRAS mutations in uterine endometrium are associated with gravidity and parity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death Disease	6. 最初と最後の頁 347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-2559-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ikegami, M., Kohsaka, S., Ueno, T., Momozawa, Y., Inoue, S., Tamura, K., Shimomura, A., Hosoya, N., Kobayashi, H., Tanaka, S., Mano, H.	4. 巻 11
2. 論文標題 High-throughput functional evaluation of BRCA2 variants of unknown significance.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16141-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inoue S, Hirota Y, Ueno T, Fukui Y, Yoshida E, Hayashi T, Kojima S, Takeyama R, Hashimoto T, Kiyono T, Ikemura M, Taguchi A, Tanaka T, Tanaka Y, Sakata S, Takeuchi K, Muraoka A, Osuka S, Saito T, Oda K, Osuga Y, Terao Y, Kawazu M, Mano H.	4. 巻 10
2. 論文標題 Uterine adenomyosis is an oligoclonal disorder associated with KRAS mutations.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Nature Communication	6. 最初と最後の頁 5785
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-019-13708-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 KRAS mutations in uterine endometrium are associated with gravidity and parity. Inoue S, Yoshida E, Fukui Y, Ueno T, Kawazu M, Takeyama R, Ikemura M, Osuga Y, Terao Y, Hirota Y, Mano H.	4. 巻 11
2. 論文標題 KRAS mutations in uterine endometrium are associated with gravidity and parity.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Death and Disease	6. 最初と最後の頁 347
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41419-020-2559-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Namba S, Sato K, Kojima S, Ueno T, Yamamoto Y, Tanaka Y, Inoue S, Nagae G, Iinuma H, Hazama S, Ishihara S, Aburatani H, Mano H, Kawazu M.	4. 巻 110
2. 論文標題 Differential regulation of CpG island methylation within divergent and unidirectional promoters in colorectal cancer.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 1096-1104
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13937	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------