

令和 4 年 5 月 8 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09822

研究課題名(和文)統合オミックスデータ解析による子宮内膜症の病態解明

研究課題名(英文)Elucidation of the pathogenesis of endometriosis based on the integrated OMICS data analyses

研究代表者

吉原 弘祐 (Yoshihara, Kosuke)

新潟大学・医歯学系・研究准教授

研究者番号：40547535

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)：子宮内膜症は、成人女性の約10%が罹患し、月経困難症や不妊症、さらには内膜症関連卵巣癌を引き起こすため、女性のQOLを著しく低下させてしまう疾患である。本研究では、子宮内膜症に対する分子生物学的な解析により、1) 子宮内膜症から卵巣癌が発生するプロセスではARID1Aの機能消失が重要であること、2) 子宮内膜症においても癌関連遺伝子変異を認め、特にKRAS G12VはmRNAレベルでも内膜症上皮で発現し、KRASの下流のパスウェイが活性化している可能性があること、を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

女性のQOLを著しく低下させる子宮内膜症の病態解明の一部、特に癌化メカニズムを分子生物学的に解明した。今後、癌関連遺伝子変異プロファイルを用いて子宮内膜症の癌化リスクを予測できる可能性があり、学術的意義だけでなく、社会的意義も大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Endometriosis affects approximately 10% of adult women and causes dysmenorrhea, infertility, and even endometriosis-related ovarian cancer, thus significantly reducing women's quality of life. In this study, molecular biological analysis of endometriosis revealed that 1) loss of function of ARID1A is essential in the process of ovarian cancer development from endometriosis, and 2) cancer-related gene mutations are also observed in endometriosis, and KRAS G12V mutant allele is expressed in the endometriotic epithelium leading to activation of MAPK pathway.

研究分野：産婦人科

キーワード：子宮内膜症 ゲノム 癌関連遺伝子変異 トランスクリプトーム オルガノイド アリル特異的発現

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

2010年に内膜症関連卵巣癌に対する遺伝子変異解析の結果が同時期に2つ報告され^{1,2}、*ARID1A* や *PIK3CA* などの癌関連遺伝子の体細胞変異が内膜症関連卵巣癌に高頻度に認められることが明らかになった。また、内膜症関連卵巣癌症例の内膜症病変においても癌関連遺伝子の体細胞変異が存在することが報告された^{3,4}。

子宮内膜症に関して、2017年に Anglesio らが深部子宮内膜症病変に対するゲノム解析結果を報告しており⁵、深部子宮内膜症病変の26%に癌関連遺伝子の体細胞変異が存在することを明らかにしている。また同時期に、申請者らは卵巣子宮内膜症に対するゲノム解析を実施しており、*PIK3CA* や *KRAS* などの癌関連遺伝子の体細胞変異が、卵巣子宮内膜症上皮に認められることを明らかにしている⁶。さらに申請者らは、子宮内膜症の発生源と考えられる正常子宮内膜に対してもゲノム解析を行い、*PIK3CA* や *KRAS* などの癌関連遺伝子の体細胞変異が腺管単位で正常子宮内膜に認められることを世界に先駆けて報告している⁶。

癌関連遺伝子変異が、子宮内膜症だけでなく、正常子宮内膜にも一定の割合で認められることから、「子宮内膜症は、*PIK3CA* や *KRAS* などの癌関連遺伝子の体細胞変異をベースにして、その他のゲノム・エピゲノム異常が加わることで発症するのではないか？」というのが、本研究の学術的な問いである。この「問い」に答えるためには、子宮内膜症症例における正常子宮内膜上皮と子宮内膜症上皮におけるゲノム・エピゲノムデータを収集することが必須であると考え、本研究課題を立案した。

2. 研究の目的

子宮内膜症症例内の正常子宮内膜から子宮内膜症病変への連続的 OMICS データの統合解析および正常オルガノイドを用いた機能解析を組み合わせることで、子宮内膜症発症の原因となるゲノム・エピゲノム異常を同定し、発症メカニズムを解明することを目的とする。そして、子宮内膜症の発症メカニズムに基づいた予防法の開発を目指す。

3. 研究の方法

1) 明細胞癌症例の子宮内膜から内膜症、癌部位の連続的シーケンス

卵巣明細胞癌1症例について、明細胞癌上皮、癌近傍の内膜症上皮、癌から離れたところに位置する内膜症上皮、および子宮内膜上皮をレーザーマイクロダイセクションで選択的に切り出し、全エクソンシーケンスを施行した。上記により得られたゲノムデータについて同一の条件で遺伝子変異を抽出し、各サンプルに対する遺伝子変異プロファイルを同定し、各サンプル間でゲノム異常の共通性を検討した。

2) *ARID1A* 変異と *ARID1A* タンパク質発現の関連

ターゲットシーケンスによって *ARID1A* 遺伝子情報が確定している卵巣子宮内膜症78例、明細胞癌86例について、*ARID1A* 免疫組織染色を実施し、*ARID1A* 変異の有無と *ARID1A* 発現との関連性を評価した。免疫組織染色には、抗 *ARID1A* 抗体 (HPA005456, Sigma-Aldrich; 希釈率 1:500) を用いた。

3) RNA *in-situ* hybridization による *KRAS* G12V mutant allele 発現の確認

卵巣子宮内膜症26例の FFPE 切片に対し、BaseScope™ ISH 法を用い *KRAS* p.G12V の変異アリルの発現を検証した。そのうち解析可能な12例の卵巣子宮内膜症上皮の DNA をレーザーマイクロダイセクションで抽出し、*KRAS* の変異状態をターゲットシーケンスで確認した。さらに、同一切片上に *KRAS* 変異アリルの発現に不均一性を認めた2例に対し、リン酸化 ERK (p-ERK) の免疫染色を施行した。

4) 単一腺管シーケンス解析

新潟大学医歯学総合病院産婦人科にて手術を受ける方を対象として、術前に文書による説明後、研究に同意の得られた場合、手術時に子宮内膜生検あるいは摘出された子宮から内膜組織のサンプリングを行った。先行研究で確立した腺管分離法を用いて⁶、子宮内膜組織から単一腺管を分離した。

子宮摘出症例では、センチメートル単位で正常子宮内膜組織を採取し、5x5mm の区域に分割し、各区域より複数の腺管を分離した。

分離された単一腺管から DNA を抽出して112個の遺伝子についてターゲットシーケンスを行った。標的遺伝子は、先行研究に基づいて子宮内膜・子宮内膜症・内膜症関連卵巣癌・子宮体癌で反復して体細胞変異が指摘されている遺伝子を選択した。

4. 研究成果

1) 正常子宮内膜から子宮内膜症、内膜症関連卵巣がんへの連続的シークエンス

内膜症関連卵巣癌症例について、子宮内膜上皮・卵巣子宮内膜症上皮・癌近傍の異型内膜症上皮・明細胞癌上皮に対して全エクソンシークエンス解析を実施した⁷。レーザーマイクロダイセクション法により正常子宮内膜、子宮内膜症上皮、癌近傍の異型子宮内膜症上皮、卵巣明細胞癌を選択的にサンプリングし、DNAを抽出した。遺伝子変異数は子宮内膜から、子宮内膜症、異型子宮内膜症、明細胞癌と疾患が進行するにつれて減少するのに対し、変異アリル頻度は子宮内膜から明細胞癌に進展するにつれて増加していた。興味深いことに子宮内膜から明細胞癌までで *NRAS* 変異・*PIK3CA* 変異を、内膜症から明細胞癌までで *ARID1A* splicing を、異型内膜症から明細胞癌で *ARID1A* フレームシフトを共有していた。*ARID1A* の機能喪失型のフレームシフト変異は、異型内膜症上皮で初めて同定され、明細胞癌で変異アリル頻度が 0.51 を示した。

2) 子宮内膜症における *ARID1A* 発現

子宮内膜症 78 例のうち、70 例が *ARID1A* 野生型、8 例が *ARID1A* 機能喪失型変異陽性であったが、全ての症例で *ARID1A* 発現が確認された⁸。特に卵巣子宮内膜症病変より 4 箇所をサンプリングした症例において、3 箇所は *ARID1A* p. E1733X を有していて、1 箇所が *ARID1A* wildtype であったが、4 箇所すべてで *ARID1A* 発現が確認された。

3) 子宮内膜症上皮における *KRAS* G12V mutant allele 発現

卵巣子宮内膜症 26 例のうち、10 例で *KRAS* p.G12V の陽性シグナルを確認した⁹。変異シグナルは卵巣子宮内膜症病変の上皮細胞のみで陽性であり、間質細胞では野生型シグナルのみを認めた。

ISH 法を施行した卵巣子宮内膜症のうち、解析可能な 12 例に対しターゲットシークエンスで変異状態を確認したところ、ISH 法で変異シグナルを同定した 5 例はすべて *KRAS* p.G12V を認め、野生型シグナルのみ陽性であった 7 例のうち 5 例は *KRAS* 野生型、2 例は *KRAS* p.G12A、*KRAS* p.G12D であり、ISH 法から想定される変異状態はシークエンス結果と一致していることを証明した。

変異シグナルを同定した卵巣子宮内膜症のうち 2 例にシグナルの発現に不均一性を認め、変異シグナルのみ陽性の領域を赤、野生型シグナルのみ陽性の領域を緑、変異シグナルと野生型シグナルの両方が陽性の領域を黄色に区分けした。ISH を施行した連続切片で p-ERK の発現を免疫染色で確認したところ、区分けした領域単位で p-ERK の発現強度は変異シグナルのみ陽性の領域で最も強く、続いて野生型、変異シグナル両方が陽性の領域では中等度、野生型シグナルのみの領域では弱い発現であった。

4) 子宮内膜における癌関連遺伝子変異の意義

20 歳から 60 歳までの年齢を対象として、1 症例あたり 10 本以上の腺管を分離し、単一腺管シークエンスデータを取得した¹⁰。年齢・月経回数・分娩回数・喫煙歴などの臨床情報とゲノム情報との相関を検討した。また、腺管を採取した子宮内膜の位置情報とゲノム情報を紐付けすることで、子宮内腔におけるゲノム異常がどのように広がるのかを検証した。32 症例より 891 本の腺管 (1 症例あたり平均 27.8±14.6 本) を収集し、単一腺管シークエンスを実施したところ、癌遺伝子である *PIK3CA* と *KRAS* の体細胞変異をそれぞれ 15.6% と 10.9% で認めた。次に、遺伝子変異量と臨床病理学的因子で関連解析を行ったところ、遺伝子変異量は年齢 ($r = 0.79, p = 7.5 \times 10^{-8}$) と累積月経回数 ($r = 0.81, p = 2.4 \times 10^{-8}$) と強い正の相関があることを明らかにした。子宮内膜における癌関連遺伝子変異の空間的評価を行うために、摘出子宮から 20x30mm の子宮内膜全層を採取し、5x5mm の区域に分割した。各区域から 5 本ずつ腺管を分離してシークエンスを行った。その結果、隣接した複数の区域で共通する癌関連遺伝子変異を有する腺管を同定した。

< 引用文献 >

- 1 Wiegand, K. C. *et al.* *ARID1A* mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N. Engl. J. Med.* **363**, 1532-1543, doi:10.1056/NEJMoa1008433 (2010).
- 2 Jones, S. *et al.* Frequent mutations of chromatin remodeling gene *ARID1A* in ovarian clear cell carcinoma. *Science* **330**, 228-231, doi:10.1126/science.1196333 (2010).
- 3 Yamamoto, S. *et al.* *PIK3CA* mutation is an early event in the development of endometriosis-associated ovarian clear cell adenocarcinoma. *J. Pathol.* **225**, 189-194, doi:10.1002/path.2940 (2011).
- 4 Anglesio, M. S. *et al.* Multifocal endometriotic lesions associated with cancer are

- clonal and carry a high mutation burden. *J. Pathol.* **236**, 201-209, doi:10.1002/path.4516 (2015).
- 5 Anglesio, M. S. *et al.* Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer. *N. Engl. J. Med.* **376**, 1835-1848, doi:10.1056/NEJMoa1614814 (2017).
- 6 Suda, K. *et al.* Clonal Expansion and Diversification of Cancer-Associated Mutations in Endometriosis and Normal Endometrium. *Cell reports* **24**, 1777-1789, doi:10.1016/j.celrep.2018.07.037 (2018).
- 7 Suda, K. *et al.* Clonal lineage from normal endometrium to ovarian clear cell carcinoma through ovarian endometriosis. *Cancer Sci.*, doi:10.1111/cas.14507 (2020).
- 8 Yachida, N. *et al.* ARID1A protein expression is retained in ovarian endometriosis with ARID1A loss-of-function mutations: implication for the two-hit hypothesis. *Sci. Rep.* **10**, 14260, doi:10.1038/s41598-020-71273-7 (2020).
- 9 Yachida, N. *et al.* Biological significance of KRAS mutant allele expression in ovarian endometriosis. *Cancer Sci.*, doi:10.1111/cas.14871 (2021).
- 10 Yamaguchi, M. *et al.* Spatiotemporal dynamics of clonal selection and diversification in normal endometrial epithelium. *Nature communications* **13**, 943, doi:10.1038/s41467-022-28568-2 (2022).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 7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 Yamaguchi Manako, Yoshihara Kosuke, Suda Kazuaki, Nakaoka Hirofumi, Yachida Nozomi, Ueda Haruka, Sugino Kentaro, Mori Yutaro, Yamawaki Kaoru, Tamura Ryo, Ishiguro Tatsuya, Motoyama Teiichi, Watanabe Yu, Okuda Shujiro, Tainaka Kazuki, Enomoto Takayuki	4. 巻 24
2. 論文標題 Three-dimensional understanding of the morphological complexity of the human uterine endometrium	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102258 ~ 102258
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102258	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 Yachida Nozomi, Yoshihara Kosuke, Suda Kazuaki, Nakaoka Hirofumi, Ueda Haruka, Sugino Kentaro, Yamaguchi Manako, Mori Yutaro, Yamawaki Kaoru, Tamura Ryo, Ishiguro Tatsuya, Kase Hiroaki, Motoyama Teiichi, Enomoto Takayuki	4. 巻 112
2. 論文標題 Biological significance of KRAS mutant allele expression in ovarian endometriosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2020 ~ 2032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14871	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 Yachida Nozomi, Yoshihara Kosuke, Suda Kazuaki, Nakaoka Hirofumi, Ueda Haruka, Sugino Kentaro, Yamaguchi Manako, Mori Yutaro, Yamawaki Kaoru, Tamura Ryo, Ishiguro Tatsuya, Isobe Masanori, Motoyama Teiichi, Inoue Ituro, Enomoto Takayuki	4. 巻 10
2. 論文標題 ARID1A protein expression is retained in ovarian endometriosis with ARID1A loss-of-function mutations: implication for the two-hit hypothesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 14260
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-71273-7	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 Suda Kazuaki, Cruz Diaz Luis Antonio, Yoshihara Kosuke, Nakaoka Hirofumi, Yachida Nozomi, Motoyama Teiichi, Inoue Ituro, Enomoto Takayuki	4. 巻 111
2. 論文標題 Clonal lineage from normal endometrium to ovarian clear cell carcinoma through ovarian endometriosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3000 ~ 3009
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14507	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mandelbaum Rachel S., Adams Crystal L., Yoshihara Kosuke, Nusbaum David J., Matsuzaki Shinya, Matsushima Kazuhide, Klar Maximilian, Paulson Richard J., Roman Lynda D., Wright Jason D., Matsuo Koji	4. 巻 -
2. 論文標題 The rapid adoption of opportunistic salpingectomy at the time of hysterectomy for benign gynecologic disease in the United States	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Obstetrics and Gynecology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajog.2020.04.028	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuo Koji, Mandelbaum Rachel S., Machida Hiroko, Yoshihara Kosuke, Matsuzaki Shinya, Klar Maximilian, Muggia Franco M., Roman Lynda D., Wright Jason D.	4. 巻 301
2. 論文標題 Temporal trends of subsequent breast cancer among women with ovarian cancer: a population-based study	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Gynecology and Obstetrics	6. 最初と最後の頁 1235 ~ 1245
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00404-020-05508-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Adewuyi Emmanuel O, ..., Yoshihara Kosuke, et al.	4. 巻 11
2. 論文標題 Shared Molecular Genetic Mechanisms Underlie Endometriosis and Migraine Comorbidity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 268 ~ 268
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes11030268	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 Tamura Ryo, Yoshihara Kosuke, Nakaoka Hirofumi, Yachida Nozomi, Yamaguchi Manako, Suda Kazuaki, Ishiguro Tatsuya, Nishino Koji, Ichikawa Hiroshi, Homma Keiichi, Kikuchi Akira, Ueda Yutaka, Takei Yuji, Fujiwara Hiroyuki, Motoyama Teiichi, Okuda Shujiro, Wakai Toshifumi, Inoue Ituro, Enomoto Takayuki	4. 巻 39
2. 論文標題 XCL1 expression correlates with CD8-positive T cells infiltration and PD-L1 expression in squamous cell carcinoma arising from mature cystic teratoma of the ovary	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncogene	6. 最初と最後の頁 3541 ~ 3554
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41388-020-1237-0	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 Tuna Musaffe, Ju Zhenlin, Yoshihara Kosuke, Amos Christopher I., Tanyi Janos L., Mills Gordon B.	4. 巻 122
2. 論文標題 Clinical relevance of TP53 hotspot mutations in high-grade serous ovarian cancers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 British Journal of Cancer	6. 最初と最後の頁 405 ~ 412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41416-019-0654-8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Suda Kazuaki, Nakaoka Hirofumi, Yoshihara Kosuke, Ishiguro Tatsuya, Adachi Sosuke, Kase Hiroaki, Motoyama Teiichi, Inoue Ituro, Enomoto Takayuki	4. 巻 34
2. 論文標題 Different mutation profiles between epithelium and stroma in endometriosis and normal endometrium	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Human Reproduction	6. 最初と最後の頁 1899 ~ 1905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/humrep/dez155	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

[学会発表] 計7件 (うち招待講演 7件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 吉原弘祐
2. 発表標題 ゲノムからみた産婦人科学
3. 学会等名 2020年日本バイオインフォマティクス学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉原弘祐
2. 発表標題 卵巣子宮内膜症ゲノム異常からみた癌化予知
3. 学会等名 第42回日本エンドメトリオーシス学会学術講演会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉原弘祐
2. 発表標題 卵巣癌における相同組換え修復異常の意義
3. 学会等名 第25回日本家族性腫瘍学会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kosuke Yoshihara
2. 発表標題 Homologous recombination deficiency (HRD) in Japanese patients with ovarian cancer
3. 学会等名 第17回日本臨床腫瘍学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉原弘祐
2. 発表標題 ゲノムから子宮内膜症を再考する
3. 学会等名 第30回近畿エンドメトリオーシス研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kosuke Yoshihara
2. 発表標題 Cancer-associated gene mutations in ovarian endometriosis and normal uterine endometrium
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉原 弘祐
2. 発表標題 卵巣癌の相同組換え修復異常
3. 学会等名 第5回日本産科婦人科遺伝診療学会学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔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
研究分担者	井ノ上 逸朗 (Inoue Ituro) (00192500)	国立遺伝学研究所・ゲノム・進化研究系・教授 (63801)	
研究分担者	榎本 隆之 (Enomoto Takayuki) (90283754)	新潟大学・医歯学系・教授 (13101)	

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
---------	---------