

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21647

研究課題名（和文）位置情報を加味した単一細胞シーケンス解析による卵巣明細胞癌発症機序の解明

研究課題名（英文）Identification of pathogenesis of ovarian clear cell carcinoma by topographic single cell sequencing

研究代表者

榎本 隆之（Enomoto, Takayuki）

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：90283754

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：子宮内膜症から卵巣明細胞癌に移行するにつれて蓄積されるゲノム・エピゲノム異常を明らかにし、卵巣明細胞癌の発症メカニズムを解明することを目的とした。正常子宮内膜、子宮内膜症、明細胞癌をサンプリングし、全エクソンシーケンス解析を行い、子宮内膜から明細胞癌でのゲノム異常の連続性を明らかにした。次に、正常子宮内膜の腺管上皮一本をレーザーマイクロダイセクションで回収し、微量DNAからライブラリー作成を行い、全ゲノムシーケンスシーケンス実験を行った。レーザーマイクロダイセクション後の細胞から微量DNA抽出およびライブラリー作成、シーケンスが可能であることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣明細胞がんは日本で頻度の高い卵巣がんであり、プラチナ併用化学療法に抵抗性を示すことから、発症予防が重要になる。正常子宮内膜から子宮内膜症、明細胞癌に移行するにつれて蓄積されるゲノム異常を同定することができ、今後子宮内膜症や卵巣明細胞癌の発症予防に役立つ情報を得ることができた。

研究成果の概要（英文）：We aimed to identify genomic and epigenomic alterations from endometriosis to ovarian cancers. Single-cell sequencing analysis will reveal the genomic and epigenomic abnormalities that accumulate during the transition from endometriosis to ovarian clear cell carcinoma and elucidate the pathogenic mechanism of ovarian clear cell carcinoma. To this end, we sampled normal endometrium, endometriosis, and ovarian clear cell carcinoma, and performed whole-exome sequencing for normal endometrium, endometriosis, atypical endometriosis, and carcinoma. In addition, we isolated single glands from normal endometrium tissue by laser microdissection, and conducted whole genome sequencing for them. We confirmed that we could extract DNA from cells after laser microdissection and perform whole genome sequencing.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣癌 明細胞癌 子宮内膜症 子宮内膜 ゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

2010年の同時期に卵巣明細胞癌に対する遺伝子変異解析の結果が2報発表され (Jones *et al. Science* 2010; Wiegand *et al. New Engl J Med* 2010) *ARID1A* 遺伝子および *PIK3CA* 遺伝子の体細胞変異が卵巣明細胞癌の40-60%と高頻度に認めることが明らかになった。その後、我々も追試を行い、日本人においても *ARID1A* 遺伝子および *PIK3CA* 遺伝子の体細胞変異が卵巣明細胞癌で高頻度に認められることを明らかにしている (業績 *Br J Cancer* 2017; *Sci Rep* 2019)。2010年以後、*ARID1A* 遺伝子および *PIK3CA* 遺伝子異常が卵巣明細胞癌の原因として考えられるようになっていたが、我々は、卵巣明細胞癌の発生源と考えられる子宮内膜症に対するゲノム解析を行い、

これまで卵巣明細胞癌の原因遺伝子と考えられていた *ARID1A* や *PIK3CA* は子宮内膜症においてすでに遺伝子変異を起こしていること、

特に *PIK3CA* は、子宮内膜症の発生源である正常子宮内膜においてもすでに遺伝子変異を起こしていること、

を世界で初めて明らかにしている (業績 *Cell Reports* 2018)。つまり、我々の結果は、*ARID1A* や *PIK3CA* の体細胞変異だけでは、卵巣明細胞癌が発症しないことを示しており、その他のゲノム・エピゲノム異常が発癌に関与している可能性が高いと考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、卵巣明細胞癌症例の子宮内膜症から卵巣明細胞癌に移行する部位に注目し、同部位のゲノム・エピゲノム異常を単一細胞レベルで同定することを目的とした。移行部位から単一細胞をレーザーマイクロダイセクションで一つずつ切り出し、微量DNAを用いたシーケンス解析を行う。位置情報を反映した単一細胞シーケンス解析により、子宮内膜症から卵巣明細胞癌に移行するにつれて蓄積されるゲノム・エピゲノム異常を明らかにし、卵巣明細胞癌の発症メカニズムを解明する。

## 3. 研究の方法

### 1. 子宮内膜症から卵巣明細胞癌への移行部位からの単一細胞の切り出し

本研究は倫理委員会の承認を得ており、サンプルはすでに保管済みである。まず、子宮内膜症から卵巣明細胞癌へ移行する部位を同定する。同部位よりレーザーマイクロダイセクション法を用いて細胞を一つずつ切り出し、各細胞の腫瘍組織内の位置情報を記録する。

### 2. 単一細胞シーケンス実験および解析

単一細胞の全ゲノム増幅後、Illumina社 HiSeq3000を用いて全ゲノムシーケンスを行う。独自に開発したパイプラインを用いて遺伝子変異・コピー数異常・融合遺伝子などのゲノム異常を同定する。全ゲノムバイサルファイトシーケンスを行い、メチル化プロファイルを取得する。細胞毎に取得されたデータと腫瘍組織内の位置情報を紐付けし、進化論的アプローチにより、内膜症から癌に移行するにつれて蓄積されるゲノム・エピゲノム異常を同定する。さらに SPARIAL GENE EXPRESSION 法を用いて同定されたゲノム・エピゲノム異常に対応する遺伝子発現変化を組織上で可視化し、検証する。

### 3. 子宮内膜症オルガノイドを用いた卵巣明細胞癌の原因遺伝子の同定

子宮内膜症オルガノイド (業績: *Cancer Res* 2016) を作成する。子宮内膜症オルガノイドに原因遺伝子変異を導入し、遺伝子導入前後でオルガノイドの細胞増殖能・浸潤転移能などの表現型の変化を検証する。

## 4. 研究成果

明細胞癌の一例で、正常子宮内膜、子宮内膜症、異型内膜症、明細胞癌の上皮細胞をレーザーマイクロダイセクションで回収し、全エクソンシーケンス解析を行った。その結果、遺伝子変異数は子宮内膜から明細胞癌に進む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。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おり、正常子宮内膜から明細胞癌へのゲノム異常の連続性を明らかにした。

次に、正常子宮内膜の腺管上皮一本をレーザーマイクロダイセクションで回収し、微量 DNA からライブラリー作成を行い、全ゲノムシーケンスシーケンス実験を行った。全ゲノムシーケンスデータを用いて、子宮内膜の腺管上皮の増殖・再生の方向性をトレーシングし、子宮内膜の再生メカニズムおよび内膜の区域性を明らかにすることが可能であった。レーザーマイクロダイセクション後の細胞から微量 DNA 抽出およびライブラリー作成、シーケンスが可能であることが確認された。今後、単一細胞からの全ゲノムシーケンスを開始予定にしている。

さらに、正常子宮内膜における癌関連遺伝子に焦点を当てて解析を行った。32 名の女性から 891 本の単一腺管を収集し、ターゲットシーケンスを行った結果、正常子宮内膜で変異の頻度の高い遺伝子は PIK3CA と KRAS で、それぞれ全体の 15.6%、10.9% で変異を認められた。また、遺伝子変異量は、年齢と累積月経回数との間に強い正の相関を認めることを明らかにした。さらに、年齢で補正後、初経年齢は弱い負の相関を認めたが、分娩回数との相関は認めなかった。加齢の影響よりも累積月経回数の影響の方が強くなっている点は、子宮内膜独自の特徴といえるかもしれない。

また、摘出された子宮から内膜をサンプリングして、2 症例より子宮内膜オルガノイド樹立が可能であった。安定培養が可能になった時点で、遺伝子変異プロファイルを確認し、目的の癌遺伝子変異を CRISPR-Cas9 システムを用いて導入予定にしている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0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 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 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 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 Ueda Haruka, Mori Yutaro, Yamawaki Kaoru, Ishiguro Tatsuya, Ohata Hirokazu, Sato Ai, Sugino Kentaro, Yachida Nozomi, Yamaguchi Manako, Suda Kazuaki, Tamura Ryo, Yoshihara Kosuke, Okamoto Koji, Enomoto Takayuki	4. 巻 2
2. 論文標題 Establishment of in vitro 3D spheroid cell cultivation from human gynecologic cancer tissues	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 STAR Protocols	6. 最初と最後の頁 100354 ~ 100354
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.xpro.2021.100354	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, 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 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 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
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	吉原 弘祐 (Yoshihara Kosuke) (40547535)	新潟大学・医歯学系・研究准教授  (13101)	
研究分担者	安達 聡介 (Adachi Sosuke) (50613147)	新潟大学・医歯学総合病院・助教  (13101)	
研究分担者	田村 亮 (Tamura Ryo) (70650620)	新潟大学・医歯学総合病院・助教  (13101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	石黒 竜也  (Ishiguro Tatsuya)  (80625690)	新潟大学・医歯学総合病院・助教     (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