

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03077

研究課題名（和文）正常子宮内膜に認められる癌遺伝子変異は内膜再生・癌化のドライバーとなり得るか？

研究課題名（英文）Can oncogenic mutations detected in normal endometrial epithelium be drivers for endometrial regeneration or cancer development?

研究代表者

京 哲（Kyo, Satoru）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：50272969

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：正常子宮内膜に存在する癌遺伝子変異の生物学的な意義を明らかにするために、良性疾患で摘出した子宮から正常子宮内膜を採取し、個々の単一腺管を単離し、単一腺管をシーケンスにより癌遺伝子の変異を解析した。また単一腺管をspheroid培養に供し、径2mm以上に成育したspheroidを回収して癌遺伝子変異を解析した。腺管9.3%にPIK3CAまたはKRAS遺伝子変異を認めた。33個のspheroidの解析では、22個に変異を認め、認められた遺伝子変異の全てはPIK3CAであった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常子宮内膜にも一定の頻度で癌遺伝子変異が入っていること、PIK3CAがspheroid形成に重要な役割を担っていることが明らかとなった。spheroidはstem-richな集団と考えられるため、正常内膜では、内膜stem cellへのPIK3CA遺伝子変異が入っている可能性が示唆され、閉経期までに渡り旺盛な再生増殖を示す内膜のbiologyや癌化過程の一翼を担っている可能性がある。これらの結果は、臨床的には月経や着床という子宮内膜の生理的な異常や疾患との関連性を探求する研究に応用したり、変異と内膜癌化の関連性を探究することで、発がんリスクのスクリーニングに役立てる研究にも繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In order to clarify the biological significance of cancer gene mutations present in normal endometrium, we collected normal endometrium from uterus removed due to benign disease, and cancer gene mutations were analyzed by sequencing of isolated single glandular ducts. In addition, single gland ducts were subjected to spheroid culture, followed by sequencing of spheroids that grew to a diameter of 2 mm or more. PIK3CA or KRAS gene mutations were found in 9.3% of the glandular ducts. Analysis of 33 spheroids revealed mutations in 22 spheroids, and all of the gene mutations observed were in PIK3CA.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：正常子宮内膜 癌遺伝子 KRAS PIK3CA

## 1. 研究開始当初の背景

子宮内膜は増殖期にはほぼ 14 日で月経による剥脱から完全再生する。その再生能は生体のどの組織よりも高く、根底に幹細胞を起点とした再生機構が推測される。我々はこの機構を解き明かす手掛かりとして、内膜腺管のクローナリティー解析を行ってきた。X 染色体上にあるアンドロゲン受容体 (AR) 遺伝子の不活化パターンの解析から、個々の腺管はモノクローナルな細胞集団からなることを明らかにした。(Tanaka et al. *Am J Pathol* 2003;163:295-301)。これは内膜腺管のクローナル特性を世界で初めて証明したものであり、これを機に個々の腺管の起原となる幹細胞の存在が認知されるようになった。

2020 年に正常子宮内膜腺上皮細胞の NGS 解析の結果が公表され (*Nature* 2020;580:640-646)、癌化に関わる遺伝子変異が 9 割近くの正常内膜に認められることがわかり、世界中の研究者を驚かせた。その内容として、個々の腺管内で変異を有する細胞の割合 (VAF: Variant Allele Frequency) が極めて高く、変異細胞がモノクローナルに腺管を占有している可能性が示唆された。しかしながらその生物学的意義は明らかにされていない。

我々は単一腺管を鏡視下に単離する方法を開発し、先行研究として単一腺管ごとの変異の有無を検討した。*KRAS* 変異を例に挙げると、興味深いことに変異腺管の密集する内膜領域が認められる。これは変異を有する腺管が優先的に増殖し、コロニーを形成している可能性を示唆する。このような結果から申請者は、変異腺管は、内膜の再生増殖や癌化に何らかの意義を有するのではないかと考えた。

## 2. 研究の目的

以上の背景から、本研究では正常子宮内膜に値揉められる癌遺伝子変異の実態を明らかにし、その上で認められる癌関連遺伝子変異の生物学的意義を明らかにする。この際、変異が幹細胞に入っているかどうかは重要なポイントであるが、幹細胞の single cell 解析は技術的に困難である。そこで本研究では申請者が開発した腺管単離技術を用い、単一腺管を spheroid 培養に供し、腺管内の幹細胞を選択的に増やした上で遺伝子変異解析を行う。

## 3. 研究の方法

臨床で採取される内膜検体の Sanger シーケンス解析を行う。我々の検出系の優位点は、単一腺管を鏡視下に単離し、腺管単位で変異検出ができる技術を確認していることである。本法は間質などの夾雑物を排除し、純粋な上皮細胞の変異が調べられる利点があり、また腺管ごとの変異を明らかにする上で重要な技術である。

さらに単一腺管を回収し、spheroid 培養に供する 径 2mm 以上に発育した spheroid を回収し、癌遺伝子変異検索を行う。また spheroid を免疫染色に供し、その幹細胞性格を明らかにする。

## 4. 研究成果

単離した腺管のサンガーシーケンスでは、腺管270のうち、25個(9.3%)にPIK3CAまた

はKRAS遺伝子変異を認めた。領域別では、特定の領域への集積の傾向が認められた。単一腺管のdroplet-PCR解析ではKRAS遺伝子変異のMAFは1.1%であったのに対し、PIK3CAでは16.4%とclonalな存在様式を認めた。すなわち、同じ癌遺伝子変異でも、PIK3CAは腺管内でclonalにヒットが入っていることが明らかとなった。

一方、33個のspheroidの解析では、22個に変異を認め、認められた遺伝子変異の全てはPIK3CAであった。これらのspheroidの免疫染色ではALDH1A1, Axin2, SOX9 などのstem cell markerが全て陽性であった。以上の結果から、PIK3CAがspheroid形成に重要な役割を担っていることが明らかとなった。免疫染色の結果から、spheroidはstem-richな集団と考えられるため、正常内膜では、内膜stem cellへのPIK3CA遺伝子変異が一定の頻度で入っている可能性が示唆され、閉経期までに渡り旺盛な再生増殖を示す内膜のbiologyや癌化過程の一翼を担っている可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato S, Nakayama K, Kanno K, Sultana R, Ishikawa M, Ishibashi T, Yamashita H, Kyo S	4. 巻 0
2. 論文標題 Frequent PIK3CA mutation in normal endometrial gland drives spheroid formation and may be involved in stem cell propagation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Sci	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15767	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 佐藤誠也 京哲 他
2. 発表標題 正常子宮内膜上皮におけるKRAS/PIK3CA変異解析
3. 学会等名 第20回日本婦人科癌分子標的研究会
4. 発表年 2021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
---------------------------	-----------------------	----

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