

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 6 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16810

研究課題名（和文）組織選択的統合オミックス解析による子宮内膜症関連卵巣癌の病態解明と新規治療開発

研究課題名（英文）Elucidation of the pathogenesis of endometriosis-related ovarian cancer and development of new treatments by tissue-selective integrated omics analysis

研究代表者

須田 一暁（Suda, Kazuaki）

新潟大学・医歯学総合研究科・特任講師

研究者番号：80650621

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、子宮内膜症関連卵巣癌症例における同一個体内で正常子宮内膜、子宮内膜症内膜組織および卵巣癌組織をLMDで選択的に採取し、統合オミックス解析を行うことで、正常子宮内膜から子宮内膜症を経て内膜症関連卵巣癌にいたる癌化メカニズムを解明し、治療対象となる標的分子を究明することである。本研究では子宮内膜症関連卵巣癌12症例（卵巣明細胞癌7例、卵巣類内膜癌5例）のマルチサンプリング検体よりレーザーマイクロダイセクション法を用いて癌上皮、癌間質、癌と連続した内膜症上皮、癌から離れた内膜症上皮、正常子宮内膜上皮の組織選択的採取を施行し、現在解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

正常子宮内膜、子宮内膜症、内膜症関連卵巣癌のいずれにおいても上皮と間質では遺伝学的背景が異なっているため、これらの遺伝子解析にはLMDによる組織選択的サンプリングが不可欠である。これまでのゲノム/トランスクリプトーム研究は多くがバルク検体を用いたものであり、正常・間質細胞の影響のために組織特異的な結果が純粋に反映されたものではなかった。また過去にLMDサンプルからDNAとRNAを同時抽出して行われたゲノム解析研究は存在せず、今回の研究の独自性・創造性は極めて高いものである。本研究の手法は様々な臓器に対しても応用できるものであり、今後は婦人科領域以外のゲノム解析においても貢献できるであろう。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to perform integrated omics analysis in endometriosis related ovarian cancer through tissue-selective sampling normal endometrium, endometriosis tissue, and ovarian cancer tissue by using laser-microdissection. Following the process, we aim to elucidate the mechanism of the genesis of endometriosis-related ovarian cancer derived from normal endometrium and endometriosis, to identify target molecules for treatment. In this study, we used laser-microdissection to isolate cancer epithelium, cancer stroma, and cancer from multi-sampled specimens from 12 cases of endometriosis-related ovarian cancer (7 cases of ovarian clear cell carcinoma, 5 cases of ovarian endometrioid carcinoma). We performed selective tissue sampling of continuous endometriotic epithelium, endometriotic epithelium distant from cancer, and normal endometrial epithelium, and are currently analyzing the results.

研究分野：婦人科ゲノム

キーワード：レーザーマイクロダイセクション 子宮内膜症関連卵巣癌 子宮内膜症 正常子宮内膜 全エクソンシークエンス RNAシークエンス

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報告され (Jones *et al. Science* 2010; Wiegand *et al. New Engl J Med* 2010)、*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存在することが明らかになった。また、子宮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変異が存在することが報告された (Yamamoto *et al. J Pathol* 2011; Anglesio *et al. J Pathol* 2015)。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してのゲノム解析を報告しているが (*New Engl J Med* 2017)、同時期に申請者らにより卵巣子宮内膜症に加え正常子宮内膜に対するゲノム解析から、*PIK3CA* や *KRAS* などの癌関連遺伝子の体細胞変異が、両組織の上皮に認められることが明らかとなった (業績1)。さらに卵巣子宮内膜症と正常子宮内膜における上皮と間質では体細胞変異が全く異なり、癌関連遺伝子変異は上皮に存在することが明らかになっている (業績2)。また、申請者らは内膜症関連卵巣癌の同一症例内において正常子宮内膜、癌から離れた子宮内膜症、癌と連続した子宮内膜症、卵巣癌の連続的ゲノム解析を行い、卵巣癌組織が遺伝学的に正常子宮内膜組織に由来することを示唆する結果を報告した (業績3)。最近では正常子宮内膜についてゲノムワイドな解析研究が報告され、先行研究と同様な癌関連遺伝子の存在や加齢に伴う遺伝子変異の蓄積が報告されている (Moore *et al. nature* 2020)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、子宮内膜症関連卵巣癌症例における同一個体内で正常子宮内膜、子宮内膜症内膜症組織および卵巣癌組織をLMDで選択的に採取し、DNA/RNAを同時抽出したのちに全エクソン/RNAシーケンスを行い、統合オミックス解析を行うことで、正常子宮内膜から子宮内膜症を経て内膜症関連卵巣癌にいたる癌化メカニズムを解明し、治療対象となる標的分子を究明することである (図1)。

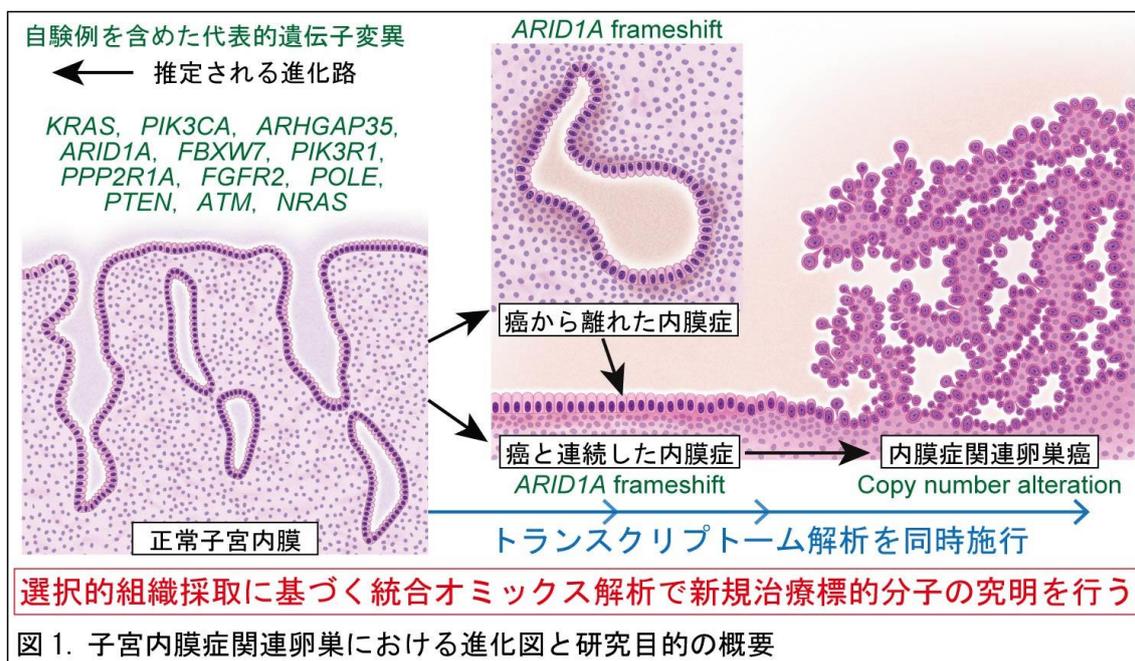


図1. 子宮内膜症関連卵巣における進化図と研究目的の概要

### 3. 研究の方法

#### ①子宮内膜症関連卵巣癌症例での癌・内膜症・子宮内膜のサンプリング

術前に同意の得られた子宮内膜症関連卵巣癌症例の手術検体から癌組織、癌と同側の付属器に存在する内膜症病変、摘出子宮の正常子宮内膜を採取し、凍結検体 (OCT コンパウンドで包埋) を作成する。ホルマリン固定検体では核酸が修飾/分解を受けており、解析結果に大きく影響するため、本研究に用いる検体は全て凍結検体とする。組織内不均一性の評価を行うため、同一病変・組織から複数箇所の採取 (マルチサンプリング) を行う。

#### ②凍結検体を用いた LMD と核酸 (DNA/RNA) の同時抽出

マルチサンプリング検体から凍結切片を作成し、HE 染色で組織像確認後 (図 2)、連続凍結切片を用いて LMD を行い、癌上皮、癌間質、癌と連続した内膜症上皮、癌から離れた内膜症上皮、正常子宮内膜上皮を採取する。LMD サンプルより、DNA と RNA の同時抽出を行う。

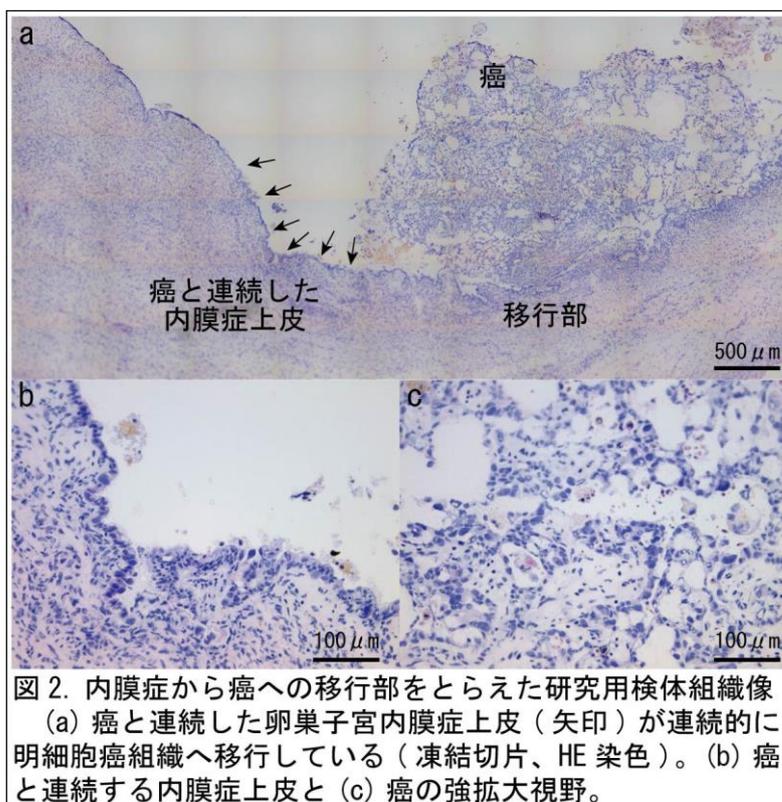


図 2. 内膜症から癌への移行部をとらえた研究用検体組織像 (a) 癌と連続した卵巣子宮内膜症上皮 (矢印) が連続的に明細胞癌組織へ移行している (凍結切片、HE 染色)。 (b) 癌と連続する内膜症上皮と (c) 癌の強拡大視野。

#### ③全エクソンシーケンスによる網羅的遺伝子変異の検索とコピー数解析

LMD サンプルより抽出した DNA を用いてシーケンスライブラリーを作成後、エクソン領域のエンリッチメントを行い、次世代シーケンサーで全エクソンシーケンスを行うことで塩基配列を決定する。同一症例の血液細胞由来の DNA もシーケンスを行い、これを正常リファレンスとして体細胞変異を同定する。また得られたシーケンスリード情報より、先行研究と同様のアルゴリズムを用いてコピー数解析を行う。同一組織のマルチサンプリングによって得られた検体のシーケンス情報よりクローナリティを評価する。

#### ④RNA シークエンスによる網羅的遺伝子発現解析

DNA と同時抽出した RNA は、シーケンスライブラリー作成後、次世代シーケンサーでペアエンド RNA シークエンス (100bp) を行う。エクソームシーケンス結果と比較することで各組織における野生型/変異型アレルの発現について評価する。また GO (Gene Ontology) 解析や ssGSEA (single sample Gene Score Enrichment Analysis) 解析を用いて機能的遺伝子変化を確認する。未閉経症例では月経周期 (増殖期、分泌期) を考慮する。RNA シークエンスの検証実験としてリアルタイム PCR を行う。遺伝子変異情報と遺伝子発現情報を統合したネットワーク解析を行うことにより、子宮内膜症関連卵巣癌発生において重要な遺伝子異常を同定し、ウェスタンブロット法・免疫組織化学染色法でタンパク質レベルでの発現・細胞内局在の評価を行う。

#### ⑤統合オミックス解析による正常子宮内膜から内膜症、癌への進展プロセスの推定

サンプリングの位置情報、全エクソンシーケンスによる遺伝子変異・コピー数変化情報、RNA シーケンスによる遺伝子発現情報を統合して、進化論的系統樹を作成し、正常子宮内膜から内膜症、癌への進展プロセスを空間的かつ機能的に評価する。特に癌関連遺伝子の変異アレル発現を考慮したパスウェイ解析を行うことで、癌化過程における癌関連遺伝子変異の意義づけを行う。

#### 4. 研究成果

術前に同意の得られた子宮内膜症関連卵巣癌症例（明細胞癌 7 例、類内膜癌 5 例）の手術検体から癌組織、癌と同側の付属器に存在する内膜症病変、摘出子宮の正常子宮内膜を採取し、凍結検体（OCT コンパウンドで包埋）を作成した。組織内不均一性の評価を行うため、同一病変・組織から複数箇所の採取（マルチサンプリング）を行った（図 2）。マルチサンプリング検体から凍結切片を作成し、HE 染色で組織像確認後、連続凍結切片を用いて LMD を行い、癌上皮、癌間質、癌と連続した内膜症上皮、癌から離れた内膜症上皮、正常子宮内膜上皮を採取した（図 3）。



図 2. 卵巣明細胞癌検体におけるマルチサンプリングの例

本検体では右卵巣に明細胞癌を認めており、右卵巣から 5 か所、正常子宮内膜から 3 か所でサンプリングを行っている。

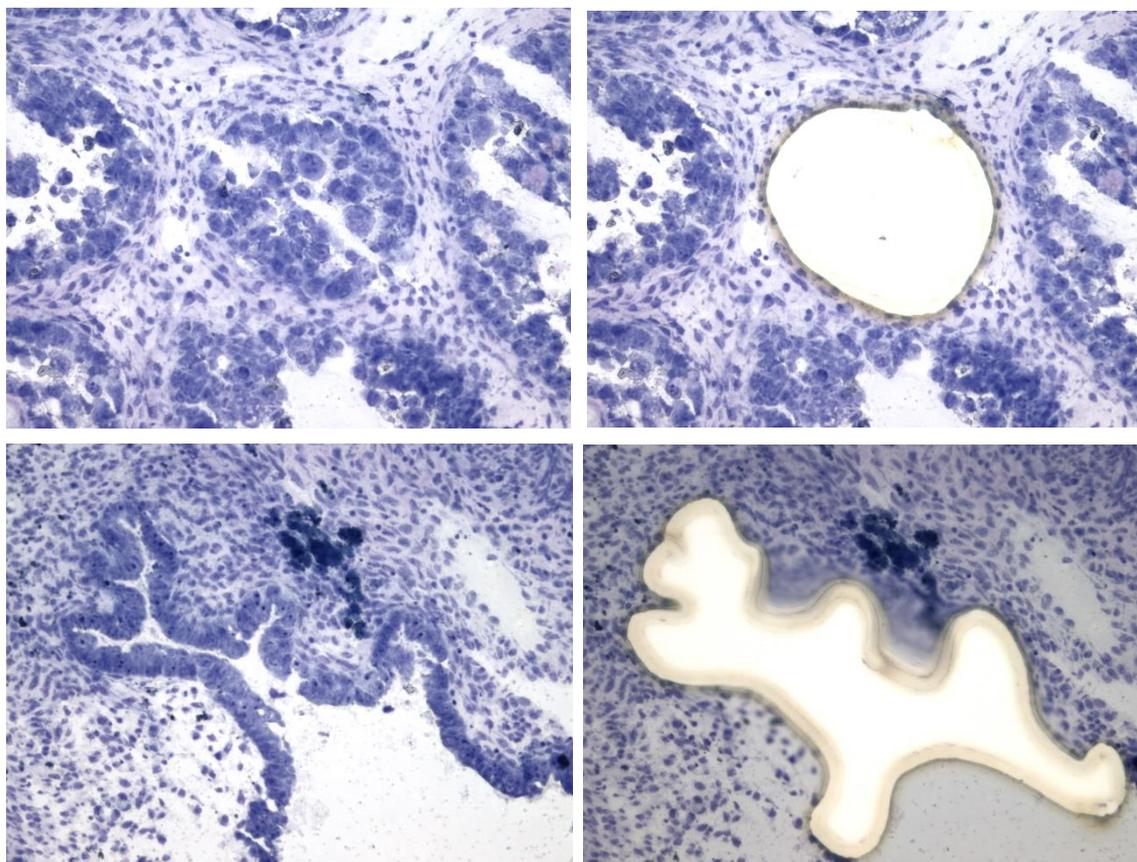


図 3. 卵巣明細胞癌におけるレーザーマイクロダイセクション  
癌上皮の組織選択的サンプリング (左上、右上) と、癌から離れた子宮内膜症上皮の組織選択的サンプリング (左下、右下)。トルイジンブルー染色。

LMD サンプルより、DNA と RNA の同時抽出を行い、全エクソンシーケンスならびに RNA シーケンスを行った (表 1)。

症例	卵巣癌組織型	癌上皮		癌間質		癌と連続した内膜症上皮		癌から離れた内膜症上皮		正常子宮内膜上皮	
		DNA	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA	DNA	RNA
1	明細胞癌	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
2	明細胞癌	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○
3	明細胞癌	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
4	明細胞癌	○	○	×	×	○	×	○	×	○	○
5	明細胞癌	○	○	○	×	×	×	○	○	○	○
6	明細胞癌	○	○	×	×	×	×	○	×	○	○
7	明細胞癌	○	○	○	○	×	×	○	○	○	○
8	類内膜癌	○	○	○	○	○	○	○	×	○	○
9	類内膜癌	○	○	○	○	×	×	○	○	○	○
10	類内膜癌	○	○	○	○	○	○	×	×	○	○
11	類内膜癌	○	○	○	×	○	×	○	×	○	○
12	類内膜癌	○	○	×	×	○	×	○	×	○	○

表 1. 各症例におけるシーケンスライブラリー調整の可否

○: ライブラリー調整ができたサンプル、×: 組織量が少ないためライブラリー調整ができなかったサンプル

全ての症例で DNA と RNA 両方を同時採取することはできなかったが、ライブラリー調整が可能であったサンプルについては、現在ゲノム・トランスクリプトーム解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------