

令和 3 年 6 月 17 日現在

機関番号：13101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18633

研究課題名（和文）選択的組織採取と統合ゲノム解析による子宮腺筋症の病態解明と新規治療法の開発

研究課題名（英文）The elucidation of pathophysiology and the development of adenomyosis by selective tissue sampling and integrated genomic analysis

研究代表者

須田 一暁（Suda, Kazuaki）

新潟大学・医歯学総合研究科・客員研究員

研究者番号：80650621

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：計23症例の摘出子宮よりマルチサンプリングを行い、子宮腺筋症上皮組織44サンプル、子宮腺筋症間質組織13サンプル、正常子宮内膜組織57サンプルに対しレーザーマイクロダイセクション（LMD）による組織特異的サンプリングを行い、76遺伝子のターゲットプローブを用いてターゲットシーケンスを施行した。子宮腺筋症組織で変異を認めた代表的な遺伝子は頻度の高いものからKRAS、ARID1A、ARHGAP35、PIK3CAであった。3症例で子宮腺筋症と子宮内膜間でKRAS変異が共有されていた。先行研究のデータも合わせると子宮腺筋症共存子宮内膜でKRAS、PIK3CA変異を多く認められるという結果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮腺筋症組織に対しターゲットシーケンスを行い、遺伝子プロファイルを明らかにした。徹底した組織選択的採取により腺筋症上皮はモノクローナルであり、腺筋症間質は不均一な細胞集団であることを解明し、両者の発生源は異なる可能性を示唆した。また腺筋症と共存する正常子宮内膜上皮は、KRASやPIK3CAといった子宮内膜癌でも認められる癌遺伝子変異の存在頻度が高いことを明らかにし、これは子宮内膜関連疾患の病態解明にも寄与する結果であるといえる。

研究成果の概要（英文）：Multi-sampling was performed from surgically removed uteruses of a total of 23 patients with gynecological disease. Tissue-specific sampling by laser microdissection was performed on 44 samples of adenomyotic epithelial tissue, 13 samples of adenomyotic stromal tissue, and 57 samples of normal endometrial tissue. The target sequence was performed using a target probe of 76 genes. The most common genes with mutations in adenomyotic epithelial tissue were KRAS, ARID1A, ARHGAP35, and PIK3CA. KRAS mutations were shared between adenomyosis and the normal endometrium in 3 cases. Combined with the data from the previous study, the results showed that KRAS and PIK3CA mutations were found more frequently in the endometrium coexisting with adenomyosis than that without adenomyosis.

研究分野：産婦人科ゲノム

キーワード：子宮腺筋症 ゲノム レーザーマイクロダイセクション

1. 研究開始当初の背景

子宮腺筋症は子宮内膜組織が子宮筋層内で異所性に増殖する良性婦人科疾患である。日本産科婦人科学会生殖内分泌委員会の H27 のデータによると、子宮内膜症受療患者が 22.2 万人、子宮筋腫受療患者が 55.2 万人であるのに対し子宮腺筋症受療患者は 13.2 万人である。しかし子宮腺筋症は、病理学的に摘出子宮の 20~60% で認められるとの報告もあり、受療患者数でみるより頻度の高い婦人科疾患といえる。子宮腺筋症は月経困難症、過多月経や不妊症などの原因となり、特に生殖年齢女性の生活の質を大きく低下させる。現時点で子宮腺筋症の治療には対症療法、ホルモン療法や手術療法(子宮摘出術、腺筋症核出術)があるが、根治と妊孕性温存を両立させることは困難な状況である。したがって子宮腺筋症には腺筋症病変の根治と妊孕性温存を両立させる新規治療法の開発が望まれる。近年全世界でさまざまな疾患領域において病態解明のための遺伝子解析が行われているが、これまで子宮腺筋症組織におけるゲノム・トランスクリプトーム解析の報告は存在しない。その理由の一つとして、子宮腺筋症組織は正常子宮筋層内に不均一に存在しており、肉眼的な採取では腺筋症組織を正確に採取できないことが挙げられる。申請者は先行研究において、子宮内膜症組織と正常子宮内膜組織についてレーザーマイクロダイセクション(LMD)を用いて正確に採取し、良性・正常組織の両方に高頻度で癌関連遺伝子に遺伝子異常が存在していることを報告している(Suda K, et al. *CellRep*. 2018)。同研究において申請者は正常子宮内膜には多様性に富んだ多くの癌関連遺伝子変異が存在し、子宮内膜症には正常子宮内膜に発生起源をもつと示唆する癌関連遺伝子変異が存在することを見出している。前述のように子宮腺筋症は正常子宮内膜と密接に関係していると予想されるため、子宮腺筋症組織においても特徴的な遺伝学的背景が存在する可能性が極めて高いと考えられる。本研究を進めることにより、子宮腺筋症の発症メカニズムを解明し、新規治療の開発につなげることができると考えられた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、遺伝子変異解析・遺伝子発現解析を統合することで、子宮腺筋症および共存子宮内膜のゲノム異常を明らかにし、治療標的を同定することであった。

3. 研究の方法

(1) 子宮腺筋症および正常子宮内膜のマルチサンプリング

術前に同意の得られた子宮腺筋症 23 症例に由来する摘出子宮より子宮腺筋症病変および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。同一症例内の子宮腺筋症組織および正常子宮内膜から複数箇所の採取を行った。選択的組織採取のため OCT 検体から凍結切片を作成し組織確認を行った後、対象とする組織に対し LMD を行い、腺筋症上皮・間質および子宮内膜組織の選択的採取を行った。子宮腺筋症上皮組織 44 サンプル、子宮腺筋症間質組織 13 サンプル、正常子宮内膜上皮組織 57 サンプル採取し、これら LMD サンプルより DNA を採取した。

(2) ターゲットシーケンス

先行研究(Suda K, et al. *CellRep* 2018)にて設計した 76 遺伝子のターゲットプローブを用いて上記 DNA に対しターゲットシーケンスを施行した。各症例の血液サンプルから得た DNA も同様にターゲットシーケンスを行い、これを正常リファレンスとして体細胞遺伝子変異解析を施行した。

4. 研究成果

(1) 子宮腺筋症組織における変異アリル頻度

ターゲットシーケンスにおける平均デプスは 254(±45.2)リード、シーケンス領域における 20 リード以上のカバー率は 99.8% であった。腺筋症上皮、腺筋症間質、子宮内膜上皮で認められた遺伝子変異の変異アリル頻度を比較すると、腺筋症上皮で最も変異アリル頻度が高く、腺筋症間質で最も低い結果となった(図 1)。本結果から、腺筋症上皮細胞は起源が同一であるクローナルな集団であることが示唆された。対照的に腺筋症間質細胞は不均一な細胞集団であることから、発生起源である細胞も多様性に富んだものであることが示唆された。正常子宮内膜上皮は腺筋症上皮よりも変異アリル頻度が低かった。先行研究(Suda K, et al. *CellRep* 2018)では子宮内膜上皮は多様性をもつクローナルな腺管が集合して構成されることを明らかにしていた。本研究における正常子宮内膜上皮も複数の腺管をまとめて採取したことが、変異アリル頻度の低下の原因と考えられた。

(2) 子宮腺筋症上皮の遺伝子プロファイル

子宮腺筋症組織で変異を認めた代表的な遺伝子(サンプルにおける頻度、症例あたりの頻度、平均変異アリル頻度)は *KRAS*(34%、35%、0.38)、*ARID1A*(20%、30%、0.24)、*ARHGAP35*(16%、22%、0.19)、*PIK3CA*(11%、13%、0.37)であった(図 2)。*KRAS* 変異は 12 番と 13 番のホットス

ポットに起きており、腺筋症上皮細胞の増殖、生存に寄与していると考察される。また、*ARID1A*にも複数症例で変異を認めており、機能喪失型のナンセンス変異を認めた。

(3) 子宮腺筋症共存正常子宮内膜上皮の遺伝子プロファイル

正常子宮内膜組織で変異を認めた代表的な遺伝子は *PIK3CA*(68%、91%、0.10)、*ARHGAP35*(60%、91%、0.09)、*KRAS*(53%、74%、0.17)、*PPP2R1A*(28%、48%、0.07)であった。23 症例のうち 3 症例で子宮腺筋症上皮と共存子宮内膜上皮の間で同一の *KRAS* 変異が共有されていた。先行研究のデータも合わせると子宮腺筋症病変を認めない子宮における正常子宮内膜上皮より、子宮腺筋症と共存する子宮内膜上皮で *KRAS*、*PIK3CA* 変異が高頻度に認められるという結果であった。

(4) 子宮腺筋症組織における上皮、間質組織の遺伝子プロファイルの比較

同一の腺筋症組織において上皮と間質の遺伝子プロファイルと比較すると、多くのサンプルで両者に共通する遺伝子変異が存在しないという結果であった(表 1)。本結果より、子宮腺筋症組織の上皮細胞と間質細胞の起源となる細胞は異なる可能性が示唆された。

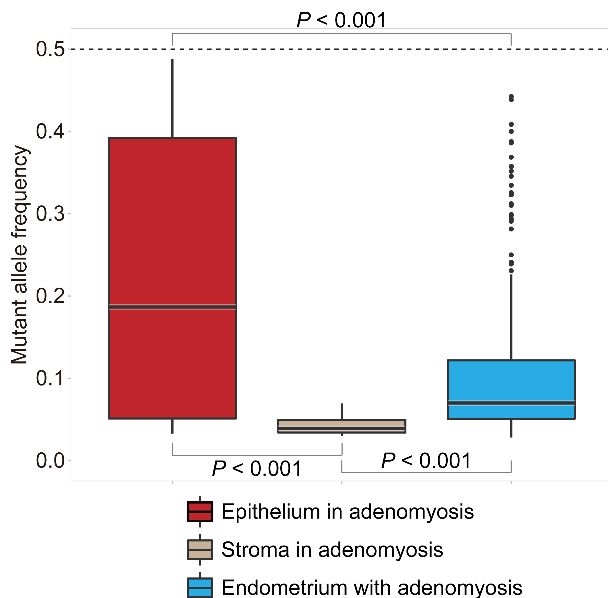


図 1 . 子宮腺筋症上皮、子宮腺筋症間質、正常子宮内膜上皮の変異アリル頻度。3 つの組織で認められた遺伝子変異のアリル頻度は子宮腺筋症上皮、正常子宮内膜上皮、子宮腺筋症間質の順に高かった。

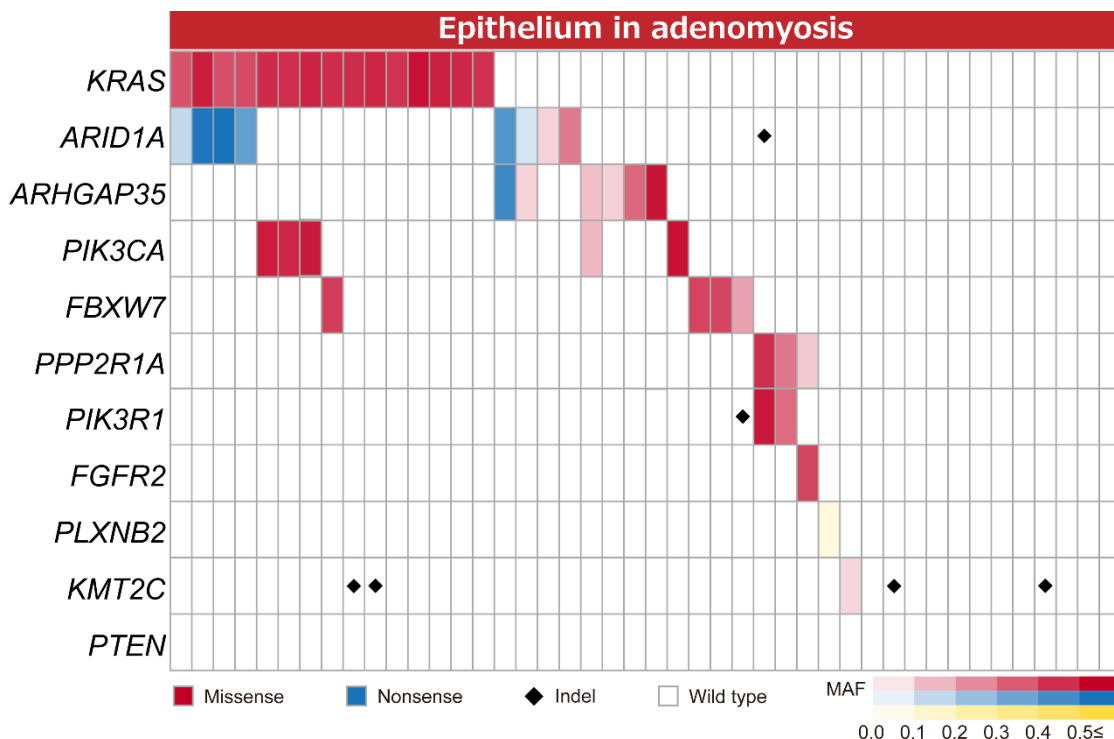


図 2 . 子宮腺筋症上皮における遺伝子プロファイル。

縦の列が個々のサンプル、横の行が各遺伝子を示し、該当する遺伝子に変異を認めたサンプルでは遺伝子変異のタイプによって色や印がついている。また色の濃さは変異アリル頻度を示している。症例間において *KRAS* 変異の頻度が最も高く、変異アリル頻度も高い結果であった。

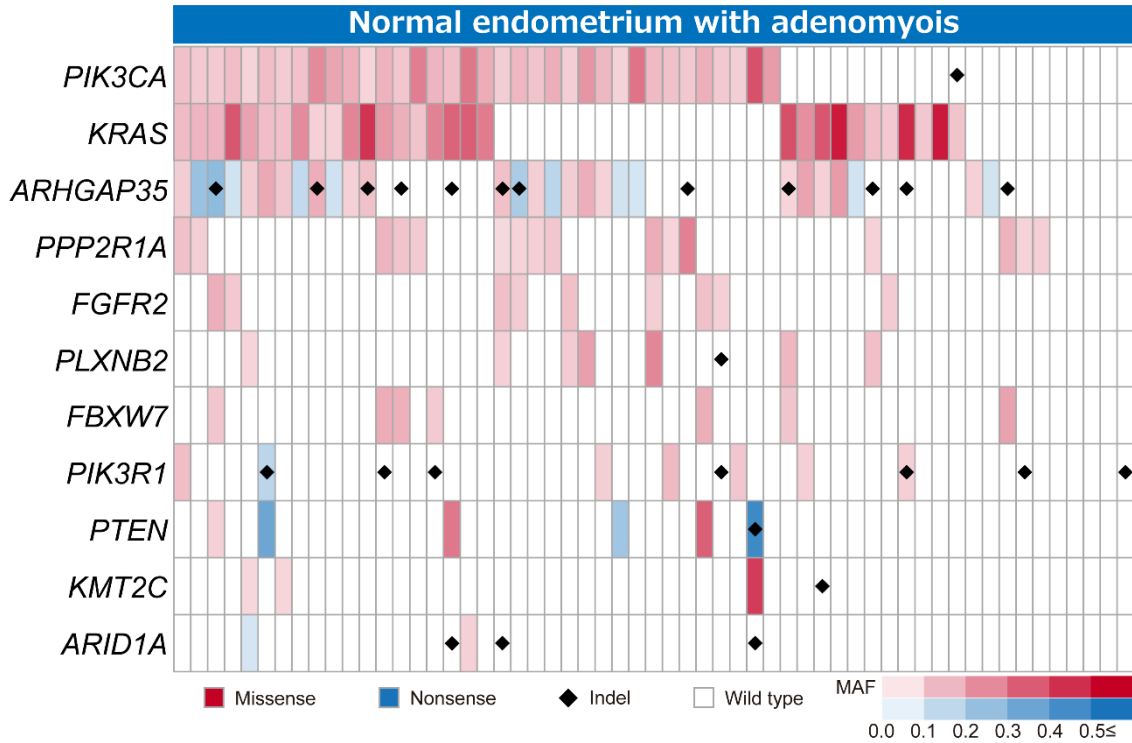


図 3 . 子宮腺筋症症例の正常子宮内膜上皮における遺伝子プロファイル
 図 2 と同様に縦の列が個々のサンプル、横の行が各遺伝子を示し、該当する遺伝子に変異を認め
 たサンプルでは遺伝子変異のタイプによって色や印がついている。また色の濃さは変異アレル
 頻度を示している。PIK3CA 変異と KRAS 変異の頻度が高かった。

Patient	Age	Mutated genes (coding amino acid substitutions or converting nucleotides, MAF)	
		Epithelium in adenomyosis	Stroma in adenomyosis
1431	56	ATM (R1822X, 0.20), ARHGAP35 (Q483K, 0.05), KIAA1109 (T339K, 0.05)	None
1433	38	DYNC2H1 (M1991L, 0.03), KRAS (G12V, 0.39), ZC3H13 (D1365fs, 0.02)	FAT3 (Y3536X, 0.05)
1458	54	ARHGAP35 (K1227X, 0.41), ARID1A (S614X, 0.36), CAMTA1 (Y1558X, 0.05), FAT3 (D3107D, 0.04), LAMA2 (R1029X, 0.08)	None
1460	47	KRAS (G12V, 0.46)	PIK3CA (F261L, 0.07), POLR3B (R581L, 0.05)
1461	49	ARHGAP35 (G721D, 0.27)	None
1516	45	ARID1A (p.312_322del, 0.03), PIK3R1 (N564K, 0.45), PPP2R1A (R183Q, 0.40)	None
1530	41	CHD4 (A227A, 0.04), FBXW7 (R505C, 0.15), PIK3R1 (p.575_576del, 0.31), PIK3R1 (H669fs, 0.29), ZFHX4 (G981G, 0.08)	None
1558	38	FAT1 (T4422T, 0.03), FRG1 (N153D, 0.07), TAF1 (c.296-1G>A, 0.28), ZFHX3 (L224L, 0.03), ZNF276 (T528I, 0.04), ZNF276 (T528A, 0.04)	ARID1A (P1518S, 0.03), FRG1 (N153D, 0.07), ZFHX4 (S691G, 0.04)
1656	44	ARID1A (E602X, 0.49), FAM65C (R535P, 0.05), KRAS (G12D, 0.43), TNC (G385G, 0.48)	KMT2C (P2193A, 0.03), TAF2 (S1188T, 0.03), ZFHX3 (L224L, 0.04)
1671	46	PLXNB2 (c.2817-2A>G, 0.04)	PLXNB2 (c.2817-2A>G, 0.03)
1739	44	KRAS (G12D, 0.40), PIK3CA (E726K, 0.44), SPEG (R1840Q, 0.06)	PLXND1 (G203G, 0.04)
1788	41	KMT2C (Q3309fs, 0.41), LRP1B (C1025W, 0.06)	None
1800	36	CHD4 (L1062R, 0.16), LAMA2 (Q132H, 0.08), SLC19A (G555G, 0.05)	PLXND1 (A761P, 0.03)

表 1 . 子宮腺筋症組織における上皮と間質の遺伝子プロファイルの比較
 それぞれ変異を認めた遺伝子と()内にはアミノ酸置換と変異アレル頻度を記載している。

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 Suda Kazuaki, Cruz Diaz Luis Antonio, Yoshihara Kosuke, Nakaoka Hirofumi, Yachida Nozomi, Motoyama Teiichi, Inoue Ituro, Enomoto Takayuki	4. 巻 -
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 -
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 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
---------	---------