

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09638

研究課題名(和文) 単一細胞シーケンスを用いた卵巣類内膜癌の発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the pathogenesis of ovarian endometrioid carcinoma using single cell sequencing

研究代表者

安達 聡介 (Adachi, Sosuke)

新潟大学・医歯学総合研究科・特任准教授

研究者番号：50613147

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)：子宮内膜から子宮内膜症、類内膜癌への進展を検討するために、正常子宮内膜の癌関連遺伝子変異に注目した。32名の女性からサンプリングを行い、891本の腺管を単離し、単一腺管シーケンスを実施した。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%で変異を認めた。各変異アリル頻度は0.5付近に中央値を認め、多くの腺管がモノクローナルな癌関連遺伝子変異を有していた。また、摘出子宮から採取した子宮内膜の位置情報を記録した上で、単一腺管全ゲノムシーケンスを実施し、がん関連遺伝子変異を有する正常子宮内膜腺管は空間的に広がりを持ってい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

今回の対象疾患は女性の命に関わる疾患であるが、治療が奏効してもQOLを低下させてしまうため、予防が重要になる。本研究成果は、子宮内膜症や卵巣類内膜癌の発症予防に貢献でき、女性のQOL向上につながるポテンシャルのある研究である。

研究成果の概要(英文)：To investigate the progression from endometrium to endometrioid carcinoma via endometriosis, we focused on cancer-related gene mutations in normal endometrium. 32 women were sampled, 891 gland ducts were isolated, and single gland duct sequencing was performed. The most frequently mutated genes in normal endometrium were PIK3CA and KRAS, which were mutated in 15.6% and 10.9% of all cases, respectively. The median of mutation allele frequency of each endometrial gland was around 0.5, and almost all glands were monoclonal. Whole genome sequencing of single endometrial gland was also performed after recording the location of endometrial glands collected from the endometrium tissue and revealed that normal endometrial glands with cancer-associated gene mutations were spatially spread out in the endometrium tissue.

研究分野：婦人科腫瘍

キーワード：卵巣類内膜癌 単一細胞シーケンス 子宮内膜症 子宮内膜

1. 研究開始当初の背景

成人女性の約 10%に認める子宮内膜症は、月経困難症・不妊症などを引き起こし、女性の QOL を著しく低下させることから、研究代表者らは以前より子宮内膜症の病態解明を目指し研究を進めてきた (J Hum Genet 2010 as a first author; Nature Genetics 2012, J Human Genet 2013, Nat Commun 2017 as a co-author)。

2010 年に内膜症関連卵巣癌および癌近傍の内膜症病変に ARID1A 遺伝子変異が存在することが報告され (Wiegand et al. New Engl J Med 2010) 研究代表者らは子宮内膜症にもすでに遺伝子変異が生じているという研究仮説をたて、2012 年より子宮内膜症のゲノム解析を開始した。しかし、子宮内膜症は、癌とは異なり、手術摘出標本内に子宮内膜症性病変の含有率は極めて低く、通常のサンプリングでは内膜症性病変を正確かつ十分に採取することが困難であった。そこで研究代表者らは、子宮内膜症で最も頻度の高い卵巣子宮内膜症を対象とし、レーザーマイクロディセクション法を用いて内膜症上皮を選択的に採取し、DNA/RNA を抽出することに成功した。その結果、内膜症関連卵巣癌の原因遺伝子と考えられていた ARID1A, PIK3CA や KRAS 子宮内膜症の段階ですでに高頻度に遺伝子変異を起こしていることを明らかにしている (Cell Reports 2018 as a co-author)。

一方、先行研究の課題として、子宮内膜症で同定される癌関連遺伝子の体細胞変異が内膜症関連卵巣癌の発症にどのように関与するのかを明らかにする必要がある。さらに卵巣類内膜癌発症には、遺伝子変異に加えて他のゲノム・エピゲノム異常も関与している可能性があり、本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、子宮内膜症から卵巣類内膜癌への移行部位に注目して、単一細胞シーケンスを行うことで、内膜症から癌に移行するにつれて蓄積されるゲノム・エピゲノム異常を細胞レベルで明らかにし、卵巣類内膜癌の発症メカニズムを解明することである (図 1)。

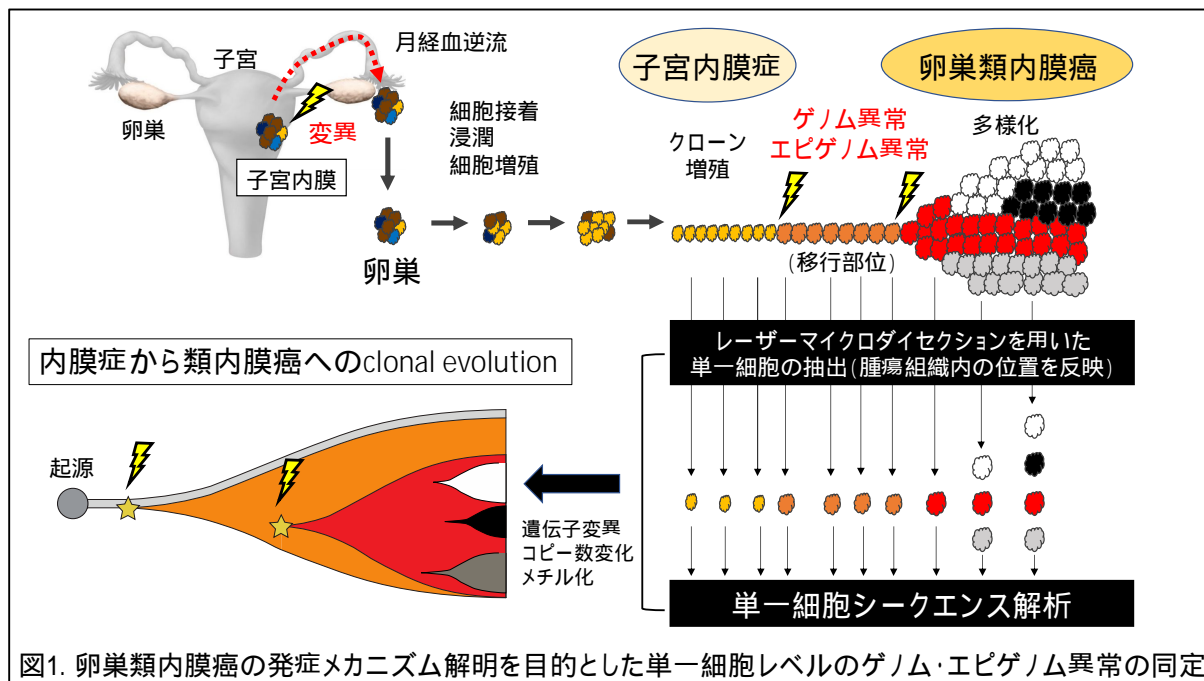


図1. 卵巣類内膜癌の発症メカニズム解明を目的とした単一細胞レベルのゲノム・エピゲノム異常の同定

### 3. 研究の方法

まず、卵巣類内膜癌症例において、内膜症上皮・異型内膜症上皮・癌上皮から単一細胞を選択後、核酸抽出を行い、OMICS データを取得し、内膜症から癌に至るまでに蓄積するゲノム・エピゲノム異常を明らかにする。次に、研究代表者らが樹立した子宮内膜症オルガノイドに、子宮内膜症から癌への進展に伴って蓄積されるゲノム・エピゲノム異常を導入し、癌化するかどうか確認する(図1)。

#### (1) 子宮内膜症から卵巣類内膜癌への移行部位からの単一細胞の切り出し

本研究は遺伝子倫理委員会の承認を得ている。研究代表者らはすでに、卵巣類内膜癌 30 例で子宮内膜症病変と類内膜癌病変が確認できる凍結サンプルを保管している。まず、各組織について、婦人科病理学の大家である山形大学 病理学教室 本山悌一名誉教授に診断していただく。まず、子宮内膜症から卵巣類内膜癌へ移行する部位を同定する(図2)。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後、DNA を抽出する。

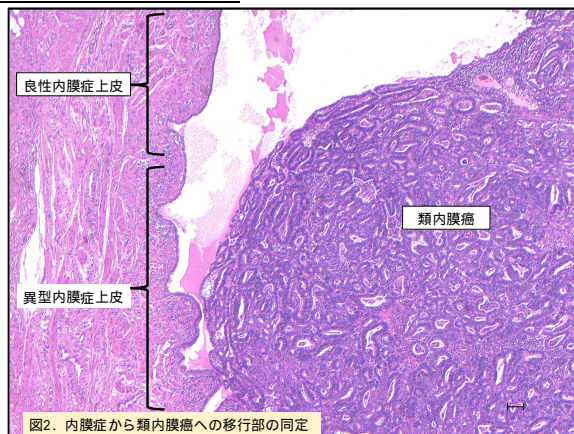


図2. 内膜症から類内膜癌への移行部の同定

#### (2) OMICS データ取得

《全ゲノムシーケンス・メチル化アレイ》レーザーマイクロダイセクション法で得られた子宮内膜症上皮・類内膜癌上皮由来の微量 DNA の全ゲノム増幅後ライブラリーを作成し、Illumina 社 HiSeq3000 を用いてシーケンス(100bp paired end)を行う。得られた Fastq ファイルから全ゲノムシーケンスデータパイプラインを用いてコピー数異常・体細胞変異・融合遺伝子を抽出する。同様に、子宮内膜症上皮・類内膜癌上皮の微量 DNA を用いて Illumina 社 MethylationEPIC BeadChip kit を用いてアレイ実験を行う。正確なメチル化プロファイルの同定のために SeSami software (Zhou *et al. Nucleic Acids Res* 2018) を用いる。

#### (3) OMICS データ解析

《進化論モデル解析》細胞毎に取得された遺伝子変異・コピー数・メチル化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(clonal evolution analysis)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(図1)。遺伝子変異プロファイルについては、共同研究を行っている Alexandrov 博士とデータ共有し、Mutational Signature 解析(Alexandrov *et al. Nature* 2013)を行い、遺伝子変異の原因を調査する。

#### (4) 内膜症オルガノイドを用いた類内膜癌発症の原因遺伝子の同定

子宮内膜症から癌が発生することを検討するのに適したリソースがないことから、当科で開発した婦人科癌スフェロイド培養法を改良して子宮内膜症オルガノイドを作成する。まず子宮内膜症オルガノイドに対して全ゲノムシーケンスを行い、オルガノイドのゲノム異常を確認しておく。

単一細胞シーケンスで同定された原因遺伝子候補が、子宮内膜症オルガノイドで異常を認めないことを確認したのち、原因遺伝子変異を子宮内膜症オルガノイドに導入する。

遺伝子異常導入前後でオルガノイドの形態変化・細胞増殖能・浸潤転移能・生存能・細胞周期変化・遺伝子発現などの表現型の変化を検証する。次に異常遺伝子の発現調節により、形態、細胞増殖、細胞浸潤能、アポトーシスに与える影響を MTS アッセイ、スフィアアッセイ、マトリゲルアッセイ、フローサイトメトリー等で *in vitro* で検討する



図3. 子宮内膜症オルガノイド

### 4. 研究成果

初年度より、症例を収集し、子宮内膜症から卵巣類内膜癌へ移行する部位の同定・単一細胞の切り出しを実施した。しかし、移行部位の同定は可能であったが、単一細胞を回収し、DNA を抽出したところ、DNA 量は極めて微量で、分解してしまっており、ゲノム解析に持ち込むことが困難

であった。そこで、子宮内膜症の発生源である子宮内膜に注目した。子宮内膜腺管は一本一本がモノクローナルであることが明らかにされており、単一腺管シーケンスで代用することとした。

32名の女性からサンプリングを行い、891本の腺管を単離し、単一腺管シーケンスを実施した。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%で変異を認めた。各変異アリル頻度は0.5付近に中央値を認め、多くの腺管がモノクローナルな癌関連遺伝子変異を有していた。

摘出子宮から子宮内膜を1-2cm角で採取し、内膜の位置情報を記録した上で、子宮腺管を一本一本抽出し、全ゲノム・全エクソームシーケンスを実施した。その結果、がん関連遺伝子変異を有する正常子宮内膜腺管は空間的に広がりを持って子宮内膜組織内に存在していることを明らかにし、この現象が子宮内膜症および類内膜癌への進展の第一歩である可能性を示した。

オルガノイドについては、卵巣類内膜癌オルガノイド樹立は可能であったが、子宮内膜症からオルガノイド樹立は、摘出組織内に子宮内膜症上皮が微量であることから困難であった。そのため、子宮内膜症の発生源の正常子宮内膜よりオルガノイドを樹立することになり、3つの正常子宮内膜オルガノイドを樹立することができた。

今後、正常子宮内膜から子宮内膜症、卵巣類内膜癌への進展メカニズムの解明のために、オルガノイドを用いた実験系で研究を進める予定にしている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6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 Kurosawa Megumi, Sekine Masayuki, Yamaguchi Manako, Kudo Risa, Hanley Sharon J. B., Hara Megumi, Adachi Sosuke, Ueda Yutaka, Miyagi Etsuko, Ikeda Sayaka, Yagi Asami, Enomoto Takayuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Long-Term Effects of Human Papillomavirus Vaccination in Clinical Trials and Real-World Data: A Systematic Review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 256 ~ 256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vaccines10020256	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 Kurosawa Megumi, Sekine Masayuki, Yamaguchi Manako, Kudo Risa, Hanley Sharon J. B., Hara Megumi, Adachi Sosuke, Ueda Yutaka, Miyagi Etsuko, Ikeda Sayaka, Yagi Asami, Enomoto Takayuki	4. 巻 113
2. 論文標題 Long term effectiveness of HPV vaccination against HPV infection in young Japanese women: Real world data	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1435 ~ 1440
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15282	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 Sekine Masayuki, Yamaguchi Manako, Kudo Risa, Hanley Sharon J.B., Ueda Yutaka, Adachi Sosuke, Kurosawa Megumi, Miyagi Etsuko, Hara Megumi, Enomoto Takayuki	4. 巻 16
2. 論文標題 Suspension of proactive recommendations for HPV vaccination has led to a significant increase in HPV infection rates in young Japanese women: real-world data	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Lancet Regional Health - Western Pacific	6. 最初と最後の頁 100300 ~ 100300
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.lanwpc.2021.100300	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 Yagi Asami, Ueda Yutaka, Kakuda Mamoru, Nakagawa Satoshi, Hiramatsu Kosuke, Miyoshi Ai, Kobayashi Eiji, Kimura Toshihiro, Kurosawa Megumi, Yamaguchi Manako, Adachi Sosuke, Kudo Risa, Sekine Masayuki, Suzuki Yukio, Sukegawa Akiko, Ikeda Sayaka, Miyagi Etsuko, Enomoto Takayuki, Kimura Tadashi	4. 巻 9
2. 論文標題 Cervical Cancer Protection in Japan: Where Are We?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Vaccines	6. 最初と最後の頁 1263 ~ 1263
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/vaccines9111263	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 Ishiguro Tatsuya, Nishikawa Nobumichi, Ishii Shiro, Yoshihara Kosuke, Haino Kazufumi, Yamaguchi Masayuki, Adachi Sosuke, Watanabe Takafumi, Soeda Shu, Enomoto Takayuki	4. 巻 21
2. 論文標題 PET/MR imaging for the evaluation of cervical cancer during pregnancy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BMC Pregnancy and Childbirth	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) 10.1186/s12884-021-03766-w	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 Yamaguchi Manako, Sekine Masayuki, Hanley Sharon J. B., Kudo Risa, Hara Megumi, Adachi Sosuke, Ueda Yutaka, Miyagi Etsuko, Enomoto Takayuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Risk factors for HPV infection and high-grade cervical disease in sexually active Japanese women	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-021-82354-6	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	吉原 弘祐 (Yoshihara Kosuke) (40547535)	新潟大学・医歯学系・教授  (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)	

#### 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
---------	---------