

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：13601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16787

研究課題名（和文）分葉状頸管腺過形成から子宮頸部胃型粘液性癌発癌過程の解明

研究課題名（英文）Elucidation of the carcinogenic process of cervical gastric-type mucinous carcinoma from lobular endocervical glandular hyperplasia

研究代表者

井田 耕一（Ida, Koichi）

信州大学・学術研究院医学系（医学部附属病院）・助教

研究者番号：10773442

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：LEGHを伴うGAS症例のLEGH部分、GAS部分それぞれのゲノムDNAの全エクソーム配列解析により体細胞変異比較した。LEGHとGASは、病的変異であるGNAS変異を含む7つの体細胞変異を共有していた。さらに、GASではもう一つのGNAS病的変異が加算されていた。以上から、本例のGASはLEGHから発症したと考えられ、GNAS変異の加算が発癌に寄与したと考えられた。またLEGH/GASの実験モデルが存在しないことから、GASの患者由来オルガノイド（PDO）樹立を試みた。その結果、安定的に長期培養が可能なGAS-PDOを樹立することができ、胃型の性質が保持されていることも確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によりLEGHがGASの前駆病変であることを、次世代シーケンス解析を用い、初めて遺伝学的に証明した。発癌過程の遺伝子変異は一樣ではないが、GNASはGASの一部では発癌に寄与することが示された。また、GAS-PDOは今後の研究に寄与するツールとなり得る。さらにLEGHのPDOが樹立できれば、GAS発癌モデルが作成できる可能性がある。GASはHPV非依存性子宮頸がんの代表的な組織型であり、HPVワクチン普及後には主要なる組織型となり可能性がある。このため本研究は社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：Fresh frozen tissue sections were prepared from the resected uterus of a case of GAS with LEGH, and somatic mutations in LEGH and GAS were compared by whole exome sequencing analysis of genomic DNA from the LEGH and GAS regions. LEGH and GAS shared seven somatic mutations, including a pathogenic GNAS mutation. In addition, another GNAS pathogenic mutation was found only in GAS. Based on the above, GAS, in this case, developed from LEGH, and the addition of the GNAS mutation might contribute to carcinogenesis.

As there is no experimental model of LEGH/GAS, we attempted to establish a patient-derived organoid (PDO) of GAS. As a result, we established GAS-PDOs that could be stably cultured for long periods and confirmed that they retained their gastric characteristics.

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：子宮頸部胃型腺癌 分葉状頸管腺過形成 GNAS HPV非依存性 全エクソーム配列解析 オルガノイド 異種移植腫瘍

1. 研究開始当初の背景

子宮頸部の分葉状頸管腺過形成 (LEGH) と最小偏倚腺癌 (MDA) を含む胃型腺癌 (GAS) は、子宮頸部に多嚢胞性病変を形成し、水様帯下、胃幽門腺型粘液産生といった共通の臨床的特徴を示す上に、組織学的にも類似しているため、生検でも鑑別が困難な場合がある。LEGH は基本的に良性であるが、MDA/GAS は抗癌剤や放射線治療に抵抗性を示す悪性度が高い腫瘍であることも問題である。加えて LEGH は MDA/GAS の前駆病変となる可能性が指摘されており、これらのことから、LEGH に対しては子宮全摘術を勧める施設が多く存在する。

一方、我々は多施設共同研究で症例を集積し、MRI、細胞診、胃型粘液検出による術前鑑別診断法を提案し、その有用性を報告してきた[1]。同法を用いて当科で LEGH と臨床診断し経過観察した 69 例 (平均観察期間 57 カ月) の検討では、癌化例は経過観察開始から 58 か月後に MDA/GAS と診断された僅か 1 例 (1.4%) のみであり、少なくとも数年の経過で悪性化する例は稀と考えられた[1]。このことは、多くの LEGH に対して子宮全摘術は過剰治療である可能性を示唆しており、より適正な治療を提供するためには、LEGH の段階で癌化リスクを推定できることが望まれる。

我々はこれまでに、LEGH のクロナリティー解析から単クローン性 LEGH が MDA/GAS の前駆病変である可能性を報告してきた[2]。一方、MDA/GAS を伴わない LEGH 3 例の全エクソン解析では、全例で癌化に関連する遺伝子変異は認められず[3]、また 28 癌関連遺伝子パネルを用いた GAS 3 例の変異解析では、1 例に KRAS 変異を認めたのみであり[4]、LEGH の癌化リスク推定に必要な LEGH、MDA/GAS の分子生物学的特徴や癌化過程における遺伝子異常の蓄積状況、発現変化を十分に明らかにすることができていない。

2. 研究の目的

がん遺伝子パネルを用いた GAS の遺伝子変異解析は複数の研究グループから報告されており、TP53、CDKN2A、STK11 など GAS で変異頻度の高い遺伝子変異が明らかにされているが、LEGH と比較した研究報告はない。そこで、本研究では LEGH および MDA/GAS 部分の、遺伝子変異解析を行い、LEGH が MDA/GAS の前駆病変であるかどうかを遺伝学的に明らかにする。

また、LEGH、MDA/GAS の研究は進んでいないが、これは、利用可能な培養細胞などの実験ツールが存在しないことが挙げられる。そこで、培養細胞の樹立を目指す。

3. 研究の方法

1) 当科で子宮摘出術を施行された、LEGH を伴う GAS 症例の摘出子宮から、文書で同意を得て、新鮮凍結組織を採取した (図 1)。凍結組織切片を作成し、同一症例の LEGH 部分と GAS 部分の組織を Laser microdissection で別々に採取し、各々からゲノム DNA を抽出した。また対照として同一症例の子宮筋層からも DNA を抽出した。それぞれの DNA を使い、全エクソーム配列解析 (WES) で遺伝子変異を抽出し、対照の子宮筋層 DNA と共通しない LEGH 部分と MDA/GAS 部分の体細胞変異を抽出し、比較を行った。

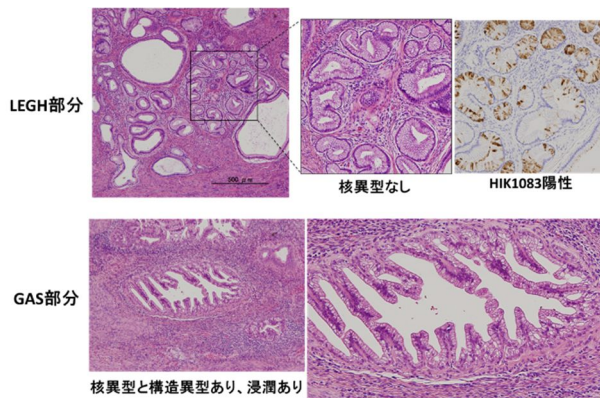


図1: LEGHとGAS部分の病理写真。LEGH部分は胃型ムチンに特徴的な HIK1083陽性を示す。

2) 患者由来研究モデルでは、オルガノイド培養が、樹立効率が良いと報告されていること、体内の性質を保存することから、オルガノイド培養法を試みた。当科で子宮摘出術を施行された GAS 患者の摘出子宮から、文書で同意を得て、GAS 組織を採取し、GAS 組織の患者由来オルガノイド (PDO) 樹立を行った。

なお、これらの研究は施設の倫理委員会、動物実験管理委員会の承認を得て行った。

4. 研究成果

1) 同一症例の LEGH と GAS 部分の WES 解析結果

アミノ産置換を伴う体細胞変異数は、LEGH で 61 か所、GAS で 123 か所であり、両者の共通する変異が 7 か所に認められた (図 2)。このうち、ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) で Pathogenic (病的変異) と判定される変異が LEGH で 1 か所のみ認め (GNAS exon7:c.G557A:p.R186H)、同変異は GAS でも共通していた。さらに GAS のみで認められる Pathogenic な体細胞変異を 1 か所だけ (GNAS exon7:c.C556T:p.R186C) 認めた。一方、GAS で比較的高頻度に観察される TP53 や CDKN2A、STK11 などの病的変異は観察され

なかった。これらのことから、本例では LEGH は GAS の前駆病変であり、GNAS exon7:c.G557A:p.R186H が LEGH 発症に関与したと考えられる。さらに GNAS exon7:c.C556T:p.R186C が加算されることにより GAS へと進展したと考えられた。本結果は、次世代シーケンス解析を用い、LEGH が GAS の前駆病変であることを遺伝学的に証明した初めての成果である。

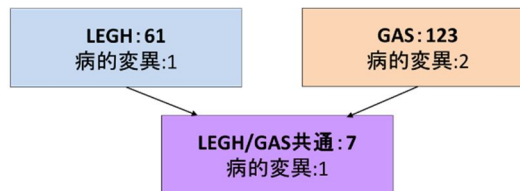


図2：LEGHとGASにおけるアミノ酸置換を伴う体細胞変異数とClinVarでの病的変異数。GASはLEGHと共通の遺伝子変異を有し、病的変異を共有していた。

2) GAS 組織の患者由来オルガノイド (PDO) 樹立

GAS 患者より得られた GAS 組織を細切・酵素処理後、modified MBOC (matrigel bilayer organoid culture)法により、2 患者由来の GAS-PDO (GAS-PDO-1, GAS-PDO-2) を樹立した (図3)。これらは継代による長期培養可能であり、胃に特異的なタンパクである CLDN18 を強発現するなど、胃型の性質を保持していた。GAS-PDO 樹立成功率は 40%以下であり、一般的な癌に比較して成功率が低い。これは、組織中のがん細胞密度が非常に低いことなどが影響していると考えられる。

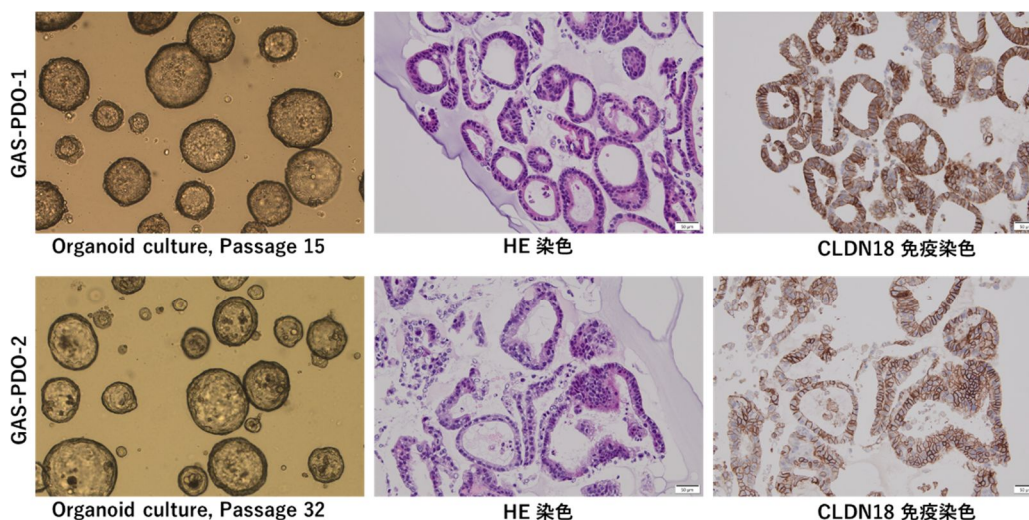


図3：GAS組織の患者由来PDO (GAS-PDO-1および2)。LEGHやGAS同様に胃特異的なtight junctionタンパクであるCLDN18が強発現しており、胃型の特徴を示している。

さらに GAS-PDO を免疫不全の NGS マウスの皮下に移植し、オルガノイド由来異種移植腫瘍 (ODX) を形成させた。GAS-PDO-2 については ODX が形成され、ヌードマウスへの継代も安定的に可能であった。

また、GAS-PDO の遺伝子解析から、遺伝子 A の変異が認められており、発癌過程に関連する因子として注目している。同遺伝子由来のタンパク発現は HPV 関連腺癌 GAS で増強していることを免疫染色で確認した。今後、GAS-PDO を用いて、これらの GAS における遺伝子機能を解明していく予定である。

【引用文献】

1. Kobara H, Miyamoto T, et al. Limited frequency of malignant change in lobular endocervical glandular hyperplasia. *Int J Gynecol Cancer*. 2020; 30: 1480-1487.
2. Takatsu A, Miyamoto T, et al. Clonality analysis suggests that STK11 gene mutations are involved in progression of lobular endocervical glandular hyperplasia (LEGH) to minimal deviation adenocarcinoma (MDA). *Virchows Arch*. 2013; 462: 645-51.
3. Ida K, Miyamoto T, et al. Whole-exome sequencing of lobular endocervical glandular hyperplasia. *Oncol Lett*. 2019; 18: 2592-2597.
4. Ida K, Miyamoto T, et al. Effectiveness of a genetic test panel designed for gynecological cancer: an exploratory study. *Med Oncol*. 2019; 36: 62.
5. Miyamoto T, et al. Whole-exome sequence analysis of gastric-type adenocarcinoma of the uterine cervix and adjacent lobular endocervical glandular hyperplasia in the same case. *Int J Gynecol Pathol*. In Press (May 9/ 2024 accepted)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2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 Tsutomu Miyamoto, Koichi Ida, Yasuhiro Tanaka, Shiho Asaka, Tanri Shiozawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Whole-exome sequence analysis of gastric-type adenocarcinoma of the uterine cervix and adjacent lobular endocervical glandular hyperplasia in the same case	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 International Journal of Gynecologic Pathology	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） なし	査読の有無 有
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 Asaka Shiho, Nakajima Tomoyuki, Ida Koichi, Asaka Ryoichi, Kobayashi Chinatsu, Ito Masayuki, Miyamoto Tsutomu, Uehara Takeshi, Ota Hiroyoshi	4. 巻 480
2. 論文標題 Clinicopathological and prognostic significance of immunophenotypic characterization of endocervical adenocarcinoma using CLDN18, CDH17, and PAX8 in association with HPV status	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 269 ~ 280
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-021-03207-1	査読の有無 有
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮本 強, 田中 泰裕, 井田 耕一, 小原 久典, 山田 靖, 品川 真奈花, 小野 元紀, 浅香 亮一, 塩沢 丹里
2. 発表標題 同一症例の分葉状頸管腺過形成と胃型粘液性癌と全エクソーム配列による解析
3. 学会等名 日本産科婦人科学会学術講演会
4. 発表年 2022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
---------	---------