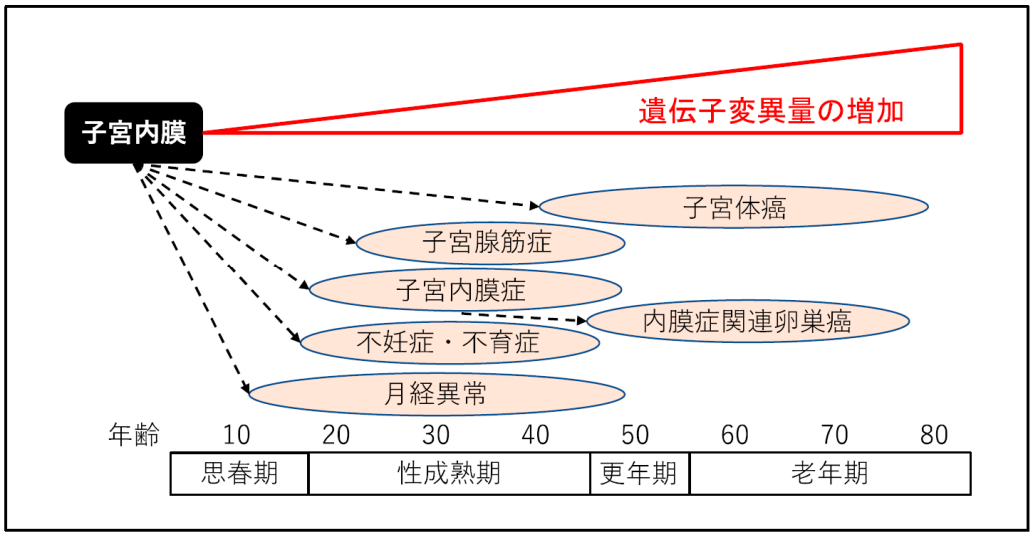
70　正常子宮内膜の癌遺伝子変異は疾患予防に役立つか？	吉原　弘祐

【目的】先行研究において、卵巣子宮内膜症・正常子宮内膜に対するゲノム解析を実施しており、癌関連遺伝子の体細胞変異が子宮内膜症上皮や正常子宮内膜に認められることを世界に先駆けて報告している。しかし、正常子宮内膜組織における癌関連遺伝子変異の意義については依然として不明なままである。そこで本研究では、正常子宮内膜における癌関連遺伝子変異の生物学的意義を検証することを目的とした。

【方法】20 歳から 60 歳までの年齢を対象として、1 症例あたり 10 本以上の腺管を分離し、単一腺管シークエンスデータを取得した。年齢・月経回数・分娩回数・喫煙歴などの臨床情報とゲノム情報との相関を検討した。また、腺管を採取した子宮内膜の位置情報とゲノム情報を紐付けすることで、子宮内腔におけるゲノム異常がどのように広がるのかを検証した。ゲノム異常の空間的広がりを 3 次元で解釈するために、子宮内膜に対する 3 次元構造解析を行い、ゲノムデータと 3 次元構造データを結合させることで、正常子宮内膜のゲノム異常の生物学的意義を検討した。

【結果】32 症例より 891 本の腺管（1 症例あたり平均 27.8±14.6 本）を収集し、単一腺管シークエンスを実施したところ、癌遺伝子である *PIK3CA* と *KRAS* の体細胞変異をそれぞれ 15.6%と 10.9%で認めた。次に、遺伝子変異量と臨床病理学的因子で関連解析を行ったところ、遺伝子変異量は年齢（$r=0.79$、$p=7.5\times10^{-8}$）と累積月経回数（$r=0.81$、$p=2.4\times10^{-8}$）と強い正の相関があることを明らかにした。子宮内膜における癌関連遺伝子変異の空間的評価を行うために、摘出子宮から 20×30 mm の子宮内膜全層を採取し、5×5 mm の区域に分割した。各区域から 5 本ずつ腺管を分離してシークエンスを行った。その結果、隣接した複数の区域で共通する癌関連遺伝子変異を有する腺管を同定した。3 次元位置情報を加味した単一腺管全ゲノムシークエンスを行い、地下茎構造でつながりのある腺管は共通の遺伝子変異を有し、同一発生起源であることを明らかにした。

子宮内膜におけるゲノム異常と疾患



70. 正常子宮内膜の癌遺伝子変異は疾患予防に役立つか？

吉原　弘祐

新潟大学 大学院医歯学総合研究科 産科婦人科学分野

Key words：正常子宮内膜，癌遺伝子変異，地下茎構造，月経，子宮内膜関連疾患

緒　言

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同時期に 2 つ報告され［1，2］、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認めることが明らかになった。また、内膜症関連卵巣癌症例の異型内膜症病変においても癌関連遺伝子の体細胞変異が存在することが報告された［2］。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するゲノム解析結果を報告しており、深部子宮内膜病変の 26%に癌関連遺伝子の体細胞変異が存在することを明らかにしている［3］。同時期に、我々は卵巣子宮内膜症・正常子宮内膜に対するゲノム解析を実施しており、1）PIK3CA や KRAS 等の癌関連遺伝子の体細胞変異が子宮内膜症上皮や正常子宮内膜に認められること、2）癌関連遺伝子変異は内膜症病変全体に均一に存在しているが、正常子宮内膜組織内では不均一に存在すること、3）癌関連遺伝子変異は正常子宮内膜の腺管単位でクローナルに存在することを世界に先駆けて報告している［4］。また、我々は、レーザーマイクロダイセクション法で子宮内膜症・正常子宮内膜組織から上皮細胞と間質細胞をそれぞれ分けて回収してゲノム解析を行い、PIK3CA や KRAS などの癌関連遺伝子の体細胞変異は子宮内膜症上皮・正常子宮内膜上皮にのみ認め、内膜症間質・正常子宮内膜間質には認めないことを明らかにしている［5］。正常子宮内膜における癌関連遺伝子変異の存在については、2 つの海外研究グループにより、著者らの追試が行われ、正常子宮内膜に PIK3CA・KRAS などの癌関連遺伝子変異が存在することは間違いのない事実である［6, 7］。しかし、正常子宮内膜組織における癌関連遺伝子変異の意義については不明なままであった。そこで本研究では、大規模ゲノム解析を行うことで、正常子宮内膜上皮における癌関連遺伝子変異の生物学的意義を検証することを目的とした。

本研究の成果として、891 サンプルの子宮内膜腺管（32 症例）に対する単一腺管シークエンス解析と 41 サンプルの全ゲノム／エキソーム解析（5 症例）を行い、子宮内膜における遺伝子変異量は加齢や月経回数に比例すること、地下茎構造でつながりのある腺管は共通の遺伝子変異を有し、同一発生起源であることを明らかにした［8］。

方　法

1. 臨床検体収集

本研究は、新潟大学遺伝子倫理委員会の承認を得て実施された。新潟大学医歯学総合病院産婦人科にて、手術を受ける方より、術前に文書による説明後、研究に同意の得られた場合、手術時に摘出された子宮あるいは内膜生検組織より一部研究用に子宮内膜を収集した。先行研究で確立した腺管分離法を用いて［4，9］、子宮内膜組織から単一腺管を分離した。また、子宮摘出症例において、20×30 mm の正常子宮内膜組織を採取し、5×5 mm の区域に分割し、各区域より 5 本の単一腺管を分離した。

2. シークエンス

単一腺管から DNA を抽出してターゲットシークエンスを行った。標的遺伝子は、先行研究に基づいて子宮内膜・子宮内膜症・内膜症関連卵巣癌・子宮体癌で体細胞変異が指摘されている 112 遺伝子を選択した。また、位置情報とゲノム情報を紐づけるために、連続切片の 2D データをデジタルデータに変換し、Imaris software（Oxford Instruments）で結合させて 3D データを構築した。腺管の 3 次元構造を確認し、連続切片からレーザーマイクロダイセクションで腺

管を１本１本採取して DNA 抽出、全ゲノムシークエンスを行った。

結　果

1. 正常子宮内膜における癌関連遺伝子変異

正常子宮内膜における癌関連遺伝子変異の意義を検討するために、幅広い年齢の女性から正常子宮内膜を収集することとした。20 歳代 10 名、30 歳代 8 名、40 歳代 12 名、50 歳代 2 名、合計 32 名の方に研究に参加いただき、891 本（1 症例あたり平均 27.8±14.6 本）の腺管を単離し、単一腺管シークエンスを実施した。遺伝子変異を heatmap で示す（図 1）。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%で変異を同定した。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。

次に、遺伝子変異量と各症例の臨床情報（年齢、累積月経回数、初経年齢、分娩回数、喫煙歴、BMI）との相関を検討した。遺伝子変異量は、年齢（r=0.79、p=7.5×10^{-8}）と累積月経回数（r=0.81、p=2.4×10^{-8}）と強い正の相関を認めた。年齢で補正後、初経年齢は弱い負の相関（r=—0.30、p=0.09）を認めたが、分娩回数は関連を認めなかった（r=0.01、p=0.971）。BMI（r=0.18、p=0.317）や喫煙歴（r=—0.05、p=0.802）についても遺伝子変異量との相関を認めなかった。

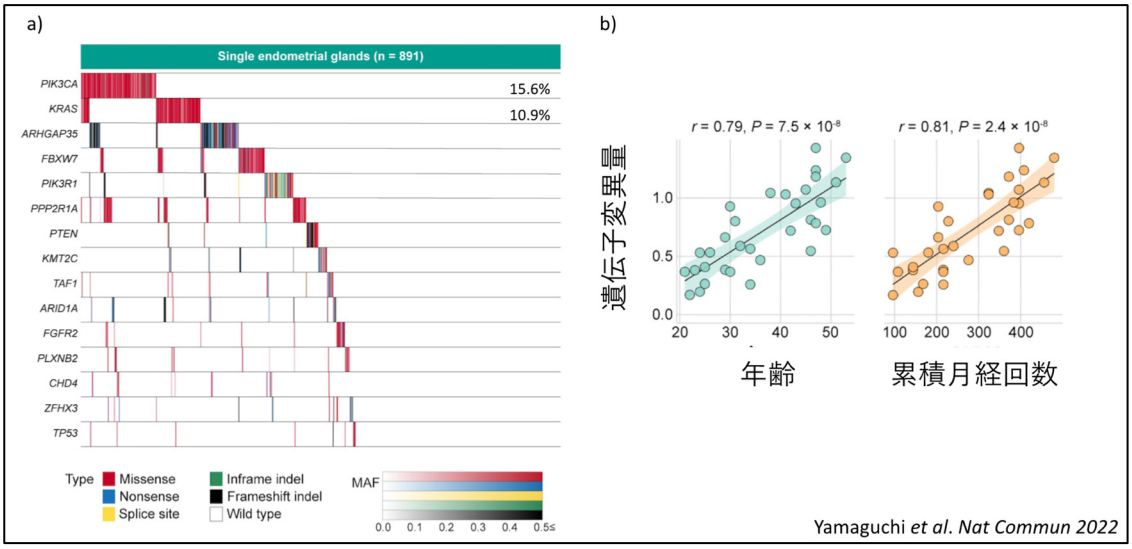


図 1. 正常子宮内膜におけるゲノム異常

a) 正常子宮内膜腺管 891 本の遺伝子変異。変異の種類を色で、変異アリル頻度を色の濃淡で示す。

b) 遺伝子変異量と臨床情報（年齢、累積月経回数）との相関。

2. 正常子宮内膜における遺伝子変異の空間的広がり

子宮摘出症例において、20×30 mm の正常子宮内膜組織を採取し、5×5 mm の区域に 24 分割し、各区域より 5 本の単一腺管を分離し、単一腺管シークエンスを実施した（図 2）。その結果、24 区域の中で、共通する遺伝子変異を持つ腺管が複数の区域にわたって存在していることが明らかになった。先行研究において、子宮内膜の基底層では内膜腺管が水平方向に進展してネットワーク（地下茎構造）を形成していることを明らかにしており［10］、遺伝子変異を有した腺管が空間的に広がるメカニズムとして、この地下茎構造に注目した。

OCT 包埋された凍結子宮内膜組織から連続切片を作製し、2D データをデジタル化して Imaris software で 3 次元構造解析を行った。各腺管の位置関係を確認しながら、地下茎構造を同定した。地下茎構造とそこから垂直に進展してい

る腺管を一つの単位と考え、互いに独立した 2 つの地下茎構造単位と一本の独立した腺管の計 13 本の腺管を用いて全ゲノムシークエンス解析を行った（図 3）。その結果、共通する地下茎構造を持つ腺管は同じ遺伝子変異を共有しており、また地下茎構造に連続性がない場合には、共有する遺伝子変異はなく、遺伝子変異プロファイルが大きく異なっていた。

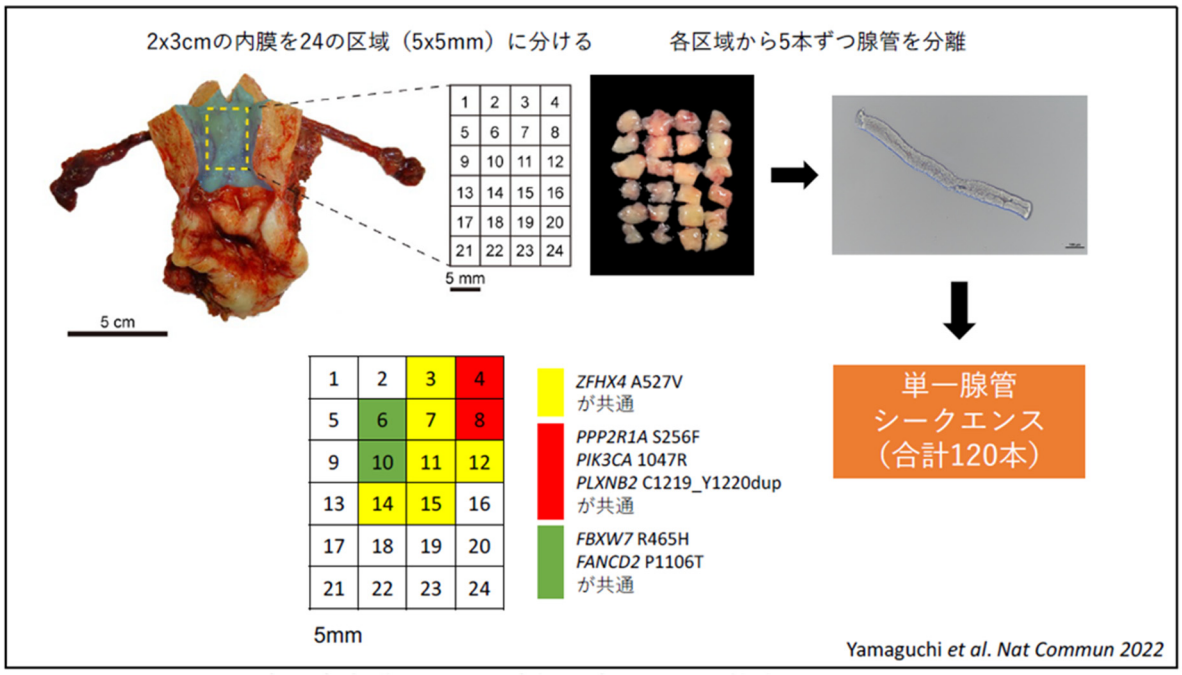


図 2. 正常子宮内膜における遺伝子変異の空間的広がり

子宮内膜を 24 区画に分割し、遺伝子変異を有する腺管が共通して存在する区画を色で表現した。

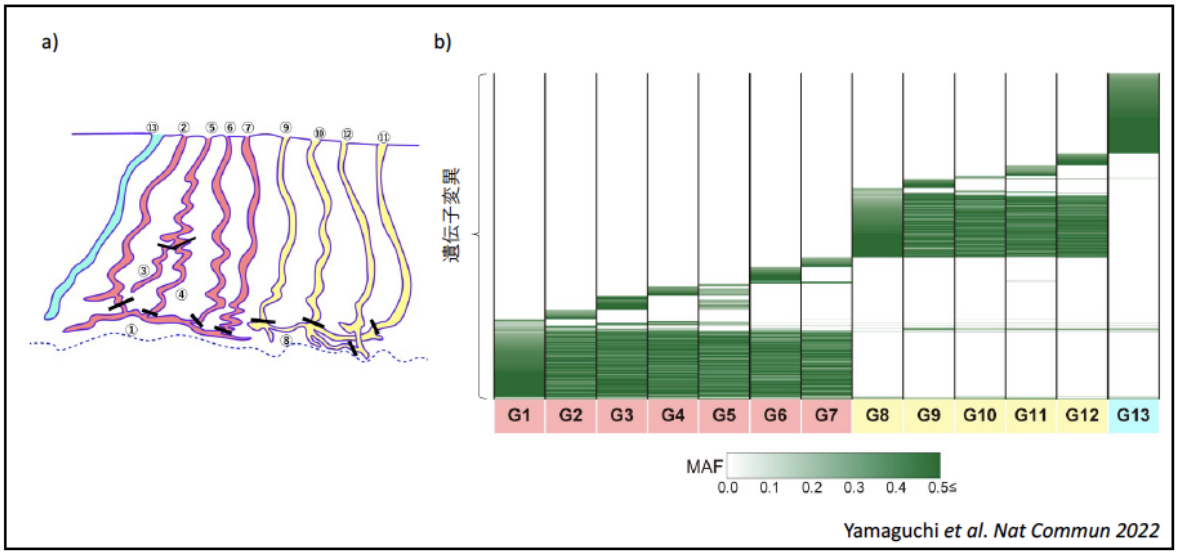


図 3. 地下茎構造を考慮した単一腺管ゲノム解析

a）単一腺管全ゲノムシークエンスを実施した 13 本の腺管の位置関係。

b）遺伝子変異に基づいた各腺管の類似性の評価。

考　察

正常子宮内膜腺管上皮の遺伝子変異は、年齢や月経回数に伴って増加することが明らかになったが、本結果はMooreらの報告［6］とも一致している。子宮内膜が月経周期に合わせて剥奪と再生を繰り返す組織であることから、ターンオーバーの早い皮膚や消化管粘膜と同様、遺伝子変異が蓄積しやすい可能性がある。また、内膜症関連卵巣癌や子宮体癌など婦人科癌との関連が強い遺伝子で変異が多く同定されており、遺伝子変異情報から将来的な癌化リスクを予測することも今後の課題である。

地下茎構造に注目したゲノム解析の結果、子宮内膜腺管は子宮内膜基底層の地下茎構造を構成する細胞が発生起源となり、垂直方向に腺管が再生していくことが明らかになった。地下茎構造の占有面積は様々であり、地下茎構造が水平方向に進展することで、遺伝子変異を有する子宮内膜腺管の空間的広がりとして捉えられるようになると考えられた。今後、地下茎構造同士が融合する可能性や地下茎構造拡大における癌関連遺伝子変異の役割などを明らかにする必要がある。

共同研究者

本研究の共同研究者は、佐々木研究所腫瘍ゲノム研究部の中岡博史先生である。

文　献

1) Jones S, Wang TL, Shih Ie M, Mao TL, Nakayama K, Roden R *et al.* Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma. *Science* 2010; 330: 228-231. PMID: 20826764. DOI: 10.1126/science.1196333

2) Wiegand KC, Shah SP, Al-Agha OM, Zhao Y, Tse K, Zeng T *et al.* ARID1A mutations in endometriosis-associated ovarian carcinomas. *N Engl J Med* 2010; 363: 1532-1543. PMID: 20942669. DOI: 10.1056/NEJMoa1008433

3) Anglesio MS, Papadopoulos N, Ayhan A, Nazeran TM, Noe M, Horlings HM *et al.* Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer. *N Engl J Med* 2017; 376: 1835-1848. PMID: 28489996. DOI: 10.1056/NEJMoa1614814

4) Suda K, Nakaoka H, Yoshihara K, Ishiguro T, Tamura R, Mori Y *et al.* Clonal Expansion and Diversification of Cancer-Associated Mutations in Endometriosis and Normal Endometrium. *Cell Rep* 2018; 24: 1777-1789. PMID: 30110635. DOI: 10.1016/j.celrep.2018.07.037

5) Suda K, Nakaoka H, Yoshihara K, Ishiguro T, Adachi S, Kase H *et al.* Different mutation profiles between epithelium and stroma in endometriosis and normal endometrium. *Hum Reprod* 2019; 34: 1899-1905. PMID: 31621846　DOI: 10.1093/humrep/dez155

6) Moore L, Leongamornlert D, Coorens THH, Sanders MA, Ellis P, Dentro SC *et al.* The mutational landscape of normal human endometrial epithelium. *Nature* 2020; 580: 640-646. PMID: 32350471. DOI: 10.1038/s41586-020-2214-z.

7) Lac V, Nazeran TM, Tessier-Cloutier B, Aguirre-Hernandez R, Albert A, Lum A *et al.* Oncogenic mutations in histologically normal endometrium: the new normal? *J Pathol* 2019; 249: 173-181. PMID: 31187483. DOI: 10.1002/path.5314.

8) Yamaguchi M, Nakaoka H, Suda K, Yoshihara K, Ishiguro T, Yachida N *et al.* Spatiotemporal dynamics of clonal selection and diversification in normal endometrial epithelium. *Nat Commun* 2022; 13: 943. PMID: 35177608. DOI: 10.1038/s41467-022-28568-2.

9) Tanaka M, Kyo S, Kanaya T, Yatabe N, Nakamura M, Maida Y *et al.* Evidence of the monoclonal composition of human endometrial epithelial glands and mosaic pattern of clonal distribution in luminal epithelium. *Am J Pathol* 2003; 163: 295-301. PMID: 12819034. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63653-X.

10) Yamaguchi M, Yoshihara K, Suda K, Nakaoka H, Yachida N, Ueda H *et al.* Three-dimensional understanding of the morphological complexity of the human uterine endometrium. *iScience* 2021; 24: 102258. PMID: 33796844. DOI: 10.1016/j.isci.2021.102258.