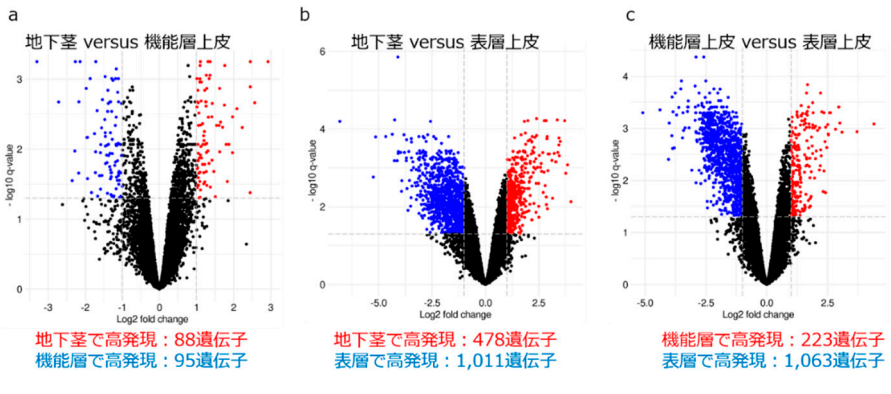
34　子宮内膜における変異クローンの空間的増殖誘導因子	中岡　博史

【目的】我々は、正常子宮内膜において、がん関連遺伝子変異を有する細胞クローンが組織という三次元空間において蓄積・増殖するメカニズムの解明に取り組んできた。子宮内膜組織における最小の機能単位である腺管を単離し、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を行い、同一の変異クローンに由来する上皮細胞が子宮内膜の広範な領域を占有していることを明らかにした。また、子宮内膜における変異クローンの増殖メカニズムを明らかにするため、三次元イメージング解析を行い、子宮内膜基底層付近に網目状構造（地下茎構造）が存在することを明らかにした。さらに、地下茎構造を共有する腺管が同一祖先の細胞クローンに由来することを示し、子宮内膜組織における上皮細胞の空間的増殖メカニズムに地下茎構造が関与していることを実証した。地下茎構造は月経時に維持され、地下茎構造を起点として機能層が再生されるため、子宮内膜上皮の幹細胞・前駆細胞のニッチとして組織の機能維持に重要な役割を果たしていると考えられる。一方、がん関連遺伝子に変異を有するクローンが地下茎構造を介して異常に増殖すると子宮内膜関連疾患の発症リスクにつながる。地下茎構造の存在は諸刃の剣と言える。地下茎構造は発見から間もなく、研究は黎明期にある。今後、地下茎構造の形成や進展に関するメカニズムについて理解を進める必要がある。本研究では、地下茎構造を介した変異クローン増殖にはホルモン-上皮-間質の相互作用によって特殊な微小環境の形成が関与しているという仮説に基づき、正常子宮内膜における変異クローンの増殖を誘導する上皮-間質相互作用同定を試みる。

【方法】地下茎構造を介した変異クローンの増殖を誘導する上皮 - 間質の相互作用を同定するための第一歩として、正常子宮内膜における層別トランスクリプトーム解析を行い、地下茎構造を構成する上皮細胞の機能的特徴を精査した。生殖年齢にある 10 例の女性から提供を受けた子宮内膜について、組織形態的に病変が認められないことを確認した上で研究に用いた。子宮全摘手術によって採取した子宮内膜組織を基底層（地下茎構造）、子宮内腔を被覆する表層、その中間に位置する機能層に層別化し、上皮細胞および間質細胞を選択的に採取し、RNA シーケンシングによるトランスクリプトーム解析を行った。

【結果】遺伝子発現プロファイルに対して主成分分析を行ったところ、同じ上皮細胞でも採取した層に応じて遺伝子発現パターンが異なることが分かった。まず、表層上皮は機能層上皮および基底層の地下茎構造を構成する上皮とは異なるクラスターを形成し、遺伝子発現パターンに顕著な差異があることが分かった。一方、機能層と基底層は連続した上皮組織であるため全体的に類似した遺伝子発現パターンを示すものの、両者の間で発現量に統計学的に有意な差異が認められる遺伝子群が検出された。興味深いことに、子宮内膜上皮の幹細胞／前駆細胞マーカーと考えられている SOX9 や AXIN2 が基底層の地下茎構造を構成する上皮において高発現していた。さらに、他の組織において上皮幹細胞／前駆細胞マーカーとして報告されている複数の遺伝子が高発現しており、新たな子宮内膜上皮の幹細胞／前駆細胞マーカーの候補となる遺伝子を同定することができた。また、Wnt シグナル伝達経路に属する遺伝子群についても基底層上皮において発現量が有意に高かった。この結果から、子宮内膜基底層に存在する地下茎構造が幹細胞や前駆細胞のニッチとして機能しており、月経周期に応じた子宮内膜の組織再生に寄与していることが示唆された。

子宮内膜層別トランスクリプトーム解析



34. 子宮内膜における変異クローンの空間的増殖誘導因子

中岡　博史

佐々木研究所附属佐々木研究所 腫瘍ゲノム研究部

Key words：子宮内膜，ゲノミクス，がん関連遺伝子，クローン性増殖，上皮 - 間質相互作用

緒　言

我々は、子宮内膜を起源とした子宮内膜症や卵巣がんの発症メカニズム解明に向けて、ゲノム変化の連続性に着目した研究を進めるなかで、疾患発症の根源となる正常子宮内膜におけるゲノム変化について理解することが重要だと考えるようになった［1，2］。そこで、正常子宮内膜において、がん関連遺伝子変異を有する細胞クローンが組織という三次元空間において蓄積・増殖するメカニズムの解明に取り組んだ。子宮内膜組織における最小の機能単位である腺管を単離し、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析を行った。その結果、同一の変異クローンに由来する上皮細胞が子宮内膜の広範な領域を占有していることが分かった。また、子宮内膜における変異クローンの増殖メカニズムを明らかにするため、三次元イメージング解析を行い、子宮内膜基底層付近に網目状構造が存在することを明らかにした［3］。その形態が植物の地下茎を想起させることから、地下茎構造と名付けた。さらに、地下茎構造を共有する腺管が同一祖先の細胞クローンに由来することを示し、子宮内膜組織における上皮細胞の空間的増殖メカニズムに地下茎構造が関与していることを実証した［4］。

子宮内膜の地下茎構造がマウスに認められないことから［5，6］、地下茎構造は霊長類等の月経周期を有する動物に特有の現象であり、月経周期に応じて組織の脱落・再生を繰り返す過程で形成されると考えられる。地下茎構造は月経時に維持され、地下茎構造を起点として機能層が再生されるため、子宮内膜上皮の幹細胞・前駆細胞のニッチとして組織の機能維持に重要な役割を果たしていると考えられる。一方、がん関連遺伝子に変異を有するクローンが地下茎構造を介して異常に増殖すると子宮内膜関連疾患の発症リスクにつながる。地下茎構造の存在は諸刃の剣と言える。地下茎構造は発見から間もなく［3，7］、研究は黎明期にある。今後、地下茎構造の形成や進展に関するメカニズムについて理解を進める必要がある。

地下茎構造の進展には、卵巣から分泌されるホルモン（エストロゲン、プロゲステロン）や上皮細胞を取り巻く間質細胞から分泌される増殖因子（IGF1 等）との相互作用が極めて重要な役割を果たしていると考えられる。ホルモンや増殖因子は子宮内膜上皮・間質細胞にエピジェネティックな変化をもたらし、遺伝子発現調節機構に影響を与える［8］。地下茎構造を介した変異クローン増殖には、ホルモン - 上皮 - 間質の相互作用によって特殊な微小環境が醸成されることが重要なのではないかという仮説を着想した。本研究では、正常子宮内膜における変異クローンの増殖を誘導する上皮 - 間質相互作用を同定することで、子宮内膜関連疾患の field effect を特徴づけることを目的とする。子宮内膜関連疾患の根源となる子宮内膜の空間的リモデリングを誘導する因子を明らかにすることによって、疾患発症機序の解明や予防・早期発見、治療法開発につなげる。

方　法

1. 子宮内膜の層別トランスクリプトーム解析

本研究では、地下茎構造を介した変異クローンの増殖を誘導する上皮 - 間質の相互作用を同定するための第一歩として、正常子宮内膜における層別トランスクリプトーム解析を行い、地下茎構造を構成する上皮細胞の機能的特徴を精査した。具体的には、生殖年齢にある 10 例の女性から提供を受けた子宮内膜について、組織形態的に病変が認められな

いことを確認した上で研究に用いた。子宮全摘手術によって採取した子宮内膜組織を筋層との境界から 400 μ m までを地下茎構造を含む基底層、子宮内腔を被覆する表層、その中間に位置する機能層に層別化した。各層における上皮細胞および間質細胞をレーザーマイクロダイセクション法で選択的に採取し、Qiagen AllPrep Micro Kits を用いて、DNA と RNA を同時に抽出した。RNA のクオリティを Agilent Bioanalyzer 2100 の RNA 6000 Pico Kit によって測定し、RIN 値（RNA integrity number）が 8 以上の検体をトランスクリプトーム解析に用いた。次世代シーケンサーの鋳型調製には Clontech SMARTer Stranded RNA-Seq Kit を用い、Illumina NovaSeq 6000 を用いた 150 bp×2 のペアエンドシーケンスを行った。各サンプルあたり 5,000 万ペアエンド以上の超高深度シーケンシングデータを得た。レーザーマイクロダイセクション法で採取した微量検体から高質な RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析を行うための実験系が確立できた。子宮内膜の各層における上皮細胞および間質細胞の遺伝子発現レベルを測定し、分子表現型を特徴づけるためのバイオインフォマティクス解析を行った。

結果および考察

1. 子宮内膜の層別トランスクリプトーム解析

子宮内膜各層の上皮細胞および間質細胞における細胞種特異的なマーカー遺伝子発現が認められたことから、標的とした細胞種をレーザーマイクロダイセクションで的確に採取できており、微量 RNA からの遺伝子発現レベル測定が適切に実施できていることを確認した。遺伝子発現プロファイルに対して主成分分析を行ったところ、同じ上皮細胞でも採取した層に応じて遺伝子発現パターンが異なることが分かった（図 1）。まず、表層上皮は機能層上皮および基底層の地下茎構造を構成する上皮とは異なるクラスターを形成し、遺伝子発現パターンに顕著な差異があることが分かった。表層上皮において線毛細胞形成に関わる遺伝子が高発現していた。一方、機能層と基底層は連続した上皮組織であるため全体的に類似した遺伝子発現パターンを示すものの、両者の間で発現量に統計学的に有意な差異が認められる遺伝子群が検出された（図 2）。興味深いことに、子宮内膜上皮の幹細胞／前駆細胞マーカーと考えられている SOX9 や AXIN2 が基底層の地下茎構造を構成する上皮において高発現していた。さらに、他の組織において上皮幹細胞／前駆細胞マーカーとして報告されている複数の遺伝子が高発現しており、新たな子宮内膜上皮の幹細胞／前駆細胞マーカーの候補となる遺伝子を同定することができた。また、エストロゲンレセプターや Wnt シグナル伝達経路に属する遺伝子群についても基底層上皮において発現量が有意に高かった。この結果から、子宮内膜基底層に存在する地下茎構造が幹細胞や前駆細胞のニッチとして機能しており、月経周期に応じた子宮内膜の組織再生に寄与していることが示唆された。表層、機能層、基底層の間質細胞においても各層を特徴づける遺伝子発現パターンが認められ、上皮細胞を取り巻く微小環境の差異を反映しているものと考えられる。同時に、各層の間質成分を構成する細胞種（線維芽細胞、免疫細胞、血管内皮細胞など）の存在比の差異を反映している可能性も考えられるため、より詳細な検討を進める必要がある。また、正常な子宮内膜において、がん関連遺伝子に変異を有する細胞クローンの空間的に増殖を誘導する要因を明らかにするためには、子宮内膜の空間的位置情報を保持した状態で、*in situ* sequencing 技術を用いて変異を有する上皮細胞や周辺の間質細胞の遺伝子発現パターンを視覚的に捉えるアプローチが有用だと考え、実験系の確立に取り組んだ。

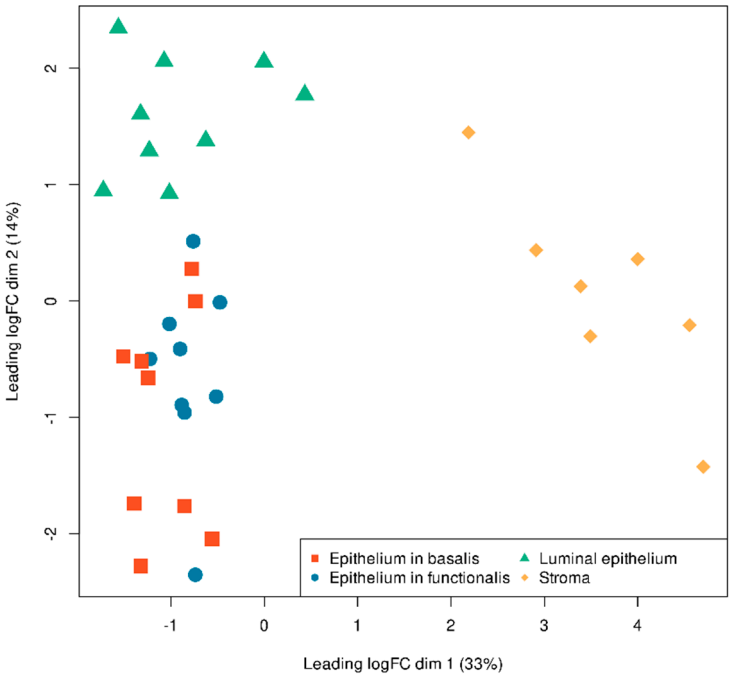


図 1. 子宮内膜層別トランスクリプトーム解析の主成分分析

レーザーマイクロダイセクション法で選択的に採取した基底層の地下茎構造を構成する上皮細胞のサンプル（□）、機能層上皮のサンプル（○）、表層上皮のサンプル（△）、間質細胞のサンプル（◇）。

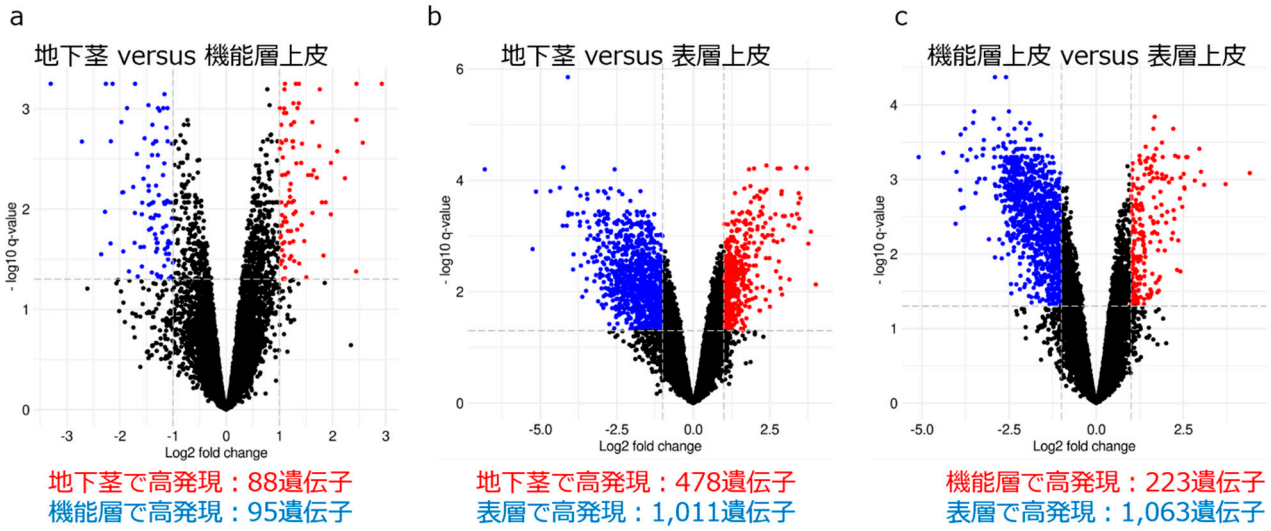


図 2. 子宮内膜の各層に位置する上皮細胞間の遺伝子発現プロファイルの比較

a） 基底層の地下茎構造を構成する上皮細胞と機能層の上皮細胞の比較。

b） 基底層の地下茎構造を構成する上皮細胞と表層の上皮細胞の比較。

c） 機能層の上皮細胞と表層の上皮細胞の比較。

X 軸は対比する両群間の遺伝子発現レベルの fold change を表し、Y 軸は 10 を底とする対数表記で統計処理の有意差である false discovery rate（q-value）を表す。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、新潟大学大学院医歯学総合研究科産婦人科学分野の吉原弘祐教授、須田一暁特任講師である。本研究の遂行にご支援いただきました、公益財団法人上原記念生命科学財団と関係者の皆様に深く感謝申し上げます。

文　献

1） Suda K, Nakaoka H, Yoshihara K, et al. Clonal Expansion and Diversification of Cancer-Associated Mutations in Endometriosis and Normal Endometrium. Cell Rep. 2018; 24(7): 1777-1789. PMID: 30110635 DOI: 10.1016/j.celrep.2018.07.037

2） Suda K, Cruz Diaz LA, Yoshihara K, et al. Clonal lineage from normal endometrium to ovarian clear cell carcinoma through ovarian endometriosis. Cancer Sci. 2020; 111(8): 3000-3009. PMID: 32473611 DOI: 10.1111/cas.14507

3） Yamaguchi M, Yoshihara K, Suda K, et al. Three-dimensional understanding of the morphological complexity of the human uterine endometrium. iScience. 2021; 24(4): 102258. PMID: 33796844 DOI: 10.1016/j.isci.2021.102258

4） Yamaguchi M, Nakaoka H, Suda K, et al. Spatiotemporal dynamics of clonal selection and diversification in normal endometrial epithelium. Nat Commun. 2022; 13(1): 943. PMID: 35177608 DOI: 10.1038/s41467-022-28568-2

5） Arora R, Fries A, Oelerich K, et al. Insights from imaging the implanting embryo and the uterine environment in three dimensions. Development. 2016; 143(24): 4749-4754. PMID: 27836961 DOI: 10.1242/dev.144386

6） Vue Z, Gonzalez G, Stewart CA, et al. Volumetric imaging of the developing prepubertal mouse uterine epithelium using light sheet microscopy. Mol Reprod Dev. 2018; 85(5): 397-405. PMID: 29543367 DOI: 10.1002/mrd.22973

7） Tempest N, Jansen M, Baker AM, et al. Histological 3D reconstruction and in vivo lineage tracing of the human endometrium. J Pathol. 2020; 251(4): 440-451. PMID: 32476144 DOI: 10.1002/path.5478

8） Houshdaran S, Oke AB, Fung JC, et al. Steroid hormones regulate genome-wide epigenetic programming and gene transcription in human endometrial cells with marked aberrancies in endometriosis. PLoS Genet. 2020; 16(6): e1008601. PMID: 32555663 DOI: 10.1371/journal.pgen.1008601