156　子宮内膜症の新規診断および癌化予測マーカーの開発	中村　康平

【目的】子宮内膜症は女性の生活の質を低下させ、不妊症の原因となる疾患である。特に卵巣にできる内膜症性嚢胞は卵巣癌の前駆病変とされている。本研究の目的は、内膜症性嚢胞から発生する卵巣明細胞癌および類内膜癌における発癌機序の解明である。次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析およびオルガノイドモデルを活用し、子宮内膜症のがん化に関与する遺伝子変異とその機能的影響を評価する。

【方法】次世代シーケンサーによる全エクソン解析を用いて、卵巣癌の前駆病変である内膜症上皮細胞におけるがんドライバー遺伝子変異（PIK3CA、KRAS、ARID1A など）を特定した。ドライバー遺伝子変異を有する患者由来の内膜症オルガノイドを作製し、これを用いて *in vitro* 内膜症発癌モデルを構築した。さらに、CRISPR/Cas9 技術を用いてこれらのオルガノイドに遺伝子変異を導入し、細胞機能への影響を評価した。Visium を用いたトランスクリプトーム解析により、内膜症上皮細胞と間質細胞の遺伝子発現特性を明らかにし、新規マーカー遺伝子候補を同定した。

【結果】全エクソン解析により、内膜症上皮細胞において既にがんドライバー遺伝子変異（PIK3CA、KRAS、ARID1A など）が認められることが確認された。患者由来の内膜症オルガノイドモデルでは、CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子変異導入により、これらの変異が子宮内膜症のがん化に寄与する可能性が示唆された。Visium によるトランスクリプトーム解析の結果、内膜症上皮細胞と間質細胞の遺伝子発現特性が明らかになり、新規マーカー遺伝子候補が同定された。本研究は、子宮内膜症のがん化マーカーの探索および卵巣癌の治療薬開発に貢献するものである。

子宮内膜症性嚢胞の癌化メカニズム解明



156. 子宮内膜症の新規診断および癌化予測マーカーの開発

中村　康平

熊谷総合病院 産婦人科

Key words：子宮内膜症，卵巣癌，オルガノイド，発癌機構，ゲノム解析

緒　言

子宮内膜症は月経痛、月経時以外の下腹部痛、性交痛、排便痛などの症状で女性の Quality of life を低下させ、不妊の原因ともなる疾患であり、女性の 1 割に存在しているとされる。卵巣にできる子宮内膜症（内膜症性嚢胞）は、前述の症状に加え、卵巣癌（類内膜癌（Endometrioid carcinoma：EC）と明細胞癌（Clear cell carcinoma：CCC））の前駆病変とされている。良性腫瘍である内膜症性嚢胞の時点で既に KRAS、PIK3CA、ARID1A などの遺伝子変異が認められているとの報告があるが、発癌機序は未だ不明である。また、EC、CCC は同病変から発癌するとしても、化学療法の感受性や予後は大きく異なるが、どの発癌ステップの段階で EC と CCC への分化が異なってくるのかも解明されていない。また、内膜症性嚢胞は若年女性に頻度が高く、妊孕性の点からも容易に手術を行えない実情があり、EC と CCC における発癌機序の解明は卵巣癌の治療薬開発のみならず、若年女性における内膜症性嚢胞の治療方針の決定においても今後必要不可欠である。

次世代シーケンサーを中心とする技術を用いた網羅的なゲノム解析が行われるようになり、卵巣癌においても、The Cancer Genome Atlas によって、卵巣癌のゲノム多様性、RAS-ERK、PI3K-AKT 経路等の signal transduction 異常の頻度が明らかとなった［1］。

これまでに、子宮内膜症への遺伝子変異蓄積のがん化リスク変異を同定し、バイオマーカー候補を見出すことを目的とし、変異蓄積変化の解明を試みてきた。2020 年度はマイクロダイセクションやビーズやフローサイトメーターによる病変部位の細胞の単離を試みたが、いずれの方法も変異解析に十分な DNA 量を得ることができなかった。また、培養面から変異細胞を増やすことを試み、病変部を浸透することで剥離しやすい単層部の細胞を得ることなども試みたが、子宮内膜症由来の細胞を培養することはできなかった。一方、内膜症組織を単細胞化し、オルガノイド化を試みたところ、内膜症由来の上皮マーカー陽性オルガノイドの樹立に成功した。この結果を受け、2021 年度より、患者 20 症例の遺伝子変異解析を目標とし、患者由来オルガノイド樹立を行った。また蓄積する変異によるがん化リスクを明らかにすることを目的とし、遺伝子変異解析で子宮内膜症に確認された変異型を導入したオルガノイドを作製し、*in vitro*、*in vivo* での評価系構築を試みた。さらに、オルガノイドを用いた変異解析に加え、Visium による組織切片上の位置情報も維持されたトランスクリプトーム解析から、子宮内膜症上皮細胞の遺伝子特性の理解を試みた。これらの研究から、オルガノイド作製、オルガノイドを用いた評価技術構築、また Visium による解析手技の導入を行い、それらを用いた子宮内膜症のがん化リスクマーカーの探索を試みた。

方法および結果

19 症例の子宮内膜症患者からオルガノイドを樹立した。パネルシーケンスによる遺伝子変異解析から、10 症例のオルガノイドで著名ながんドライバー遺伝子である *PIK3CA*、*KRAS*、*ARID1A* のいずれかまたは複数の変異が確認された（図 1）。今回、確認された変異は、他のがん種でもその蓄積が確認できる変異であった。これらの遺伝子変異とがん化リスクとの関連性を調べるため、オルガノイドへの遺伝子導入系を構築し、変異を持た

ない野生型の子宮内膜症オルガノイドに対して、変異遺伝子を過剰発現した際の細胞機能への影響を評価した。まず初めに、細胞増殖能を確認したところ、*KRAS*、*PIK3CA* 変異導入株において、野生型と比較して増殖能が増加していた（図 2a）。次に、細胞接着能の評価から、*KRAS* 変異を過剰発現した細胞において細胞接着能の亢進も認められた（図 2b）。現在、再現性を確認するとともに、浸潤能や遊走能などがん細胞に特徴的な表現型についても評価している。今後は、2022 年度に導入した *in vivo* イメージャーを用いて、マウスへ皮下移植したオルガノイドの造腫瘍能や転移などを *in vivo* で評価していく予定である。

	Mutations (160 genes panel seq.)		
Organoid	**KRAS**	**PIK3CA**	**ARID1A**
KNP-002	G12A	N345K	
KNP-005			G89R
KNP-012	G12D		
KNP-015	G12D	E545Q	
KNP-018			
KNP-019			
KNP-020			
KNP-022			
KNP-025	G12C		
KNP-026			
KNP-027			
KNP-028	G12A		
KNP-029	G12A	C420R	G206V
KNP-030			
KNP-032		E542K	
KNP-034			
KNP-037	G12V	N1044H	
KNP-038	G12D	T1025S	
KNP-039			
Mut. rate	**42%**	**32%**	**11%**

図 1. 子宮内膜症オルガノイドの変異解析結果
19 例の子宮内膜症オルガノイドから抽出された 10 例において、*PIK3CA*、*KRAS*、*ARID1A* といった主要ながんドライバー遺伝子の変異が確認された。

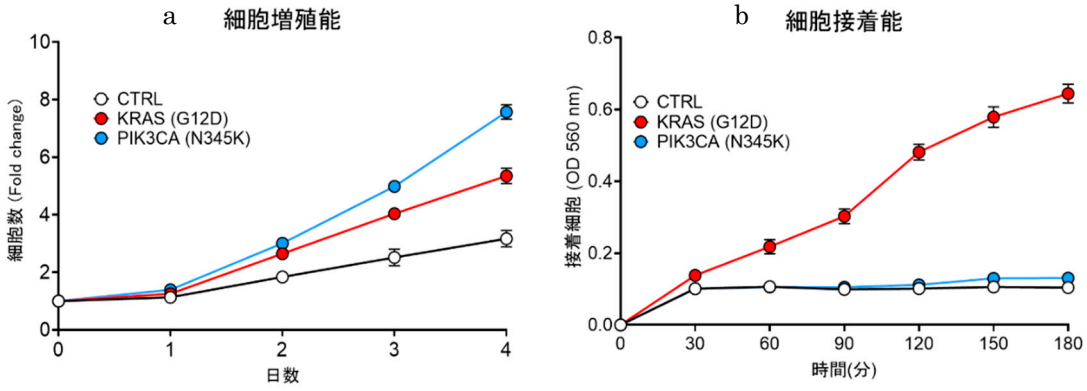


図 2. 子宮内膜症オルガノイドへの変異遺伝子導入が細胞増殖能、接着能に及ぼす影響
野生型の子宮内膜症オルガノイドに *KRAS* および *PIK3CA* の変異を導入した結果、細胞の増殖能と接着能が増加していることが示された。

次に、子宮内膜症上皮の遺伝子発現特性を明らかにするために、Visium を用いた位置情報が維持されたトランスクリプトーム解析を行った。今回、4 症例内膜症組織を用いて解析を実施し、子宮内膜症上皮、間質細胞を含むスポットを検出した。スポットを遺伝子発現でクラスタリングし、それぞれの遺伝子発現特性を確認した。子宮内膜症上皮を含むスポットで形成されるクラスターでは、既報にある子宮内膜症上皮のマーカー遺伝子 KRT7、EPCAM、PAX8 などの発現が上昇していた（図 3 上段）。また、その他のクラスターの特徴的な遺伝子として、ノンコーディング RNA 遺伝子 LINK01320 や、炎症・免疫に関係する遺伝子 SAA2、PIGR などが見出された（図 3 下段）。子宮内膜症間質を含むスポットで形成されるクラスターでは、既報のマーカー遺伝子 MME の発現量が低く、mRNA レベルではマーカーとして不適であった。一方、既報にはない遺伝子 ELK1、NR4A3 において高発現なスポットの割合が高かった。これら既報にない遺伝子は新規の子宮内膜症のマーカー遺伝子となる可能性が考えられる。

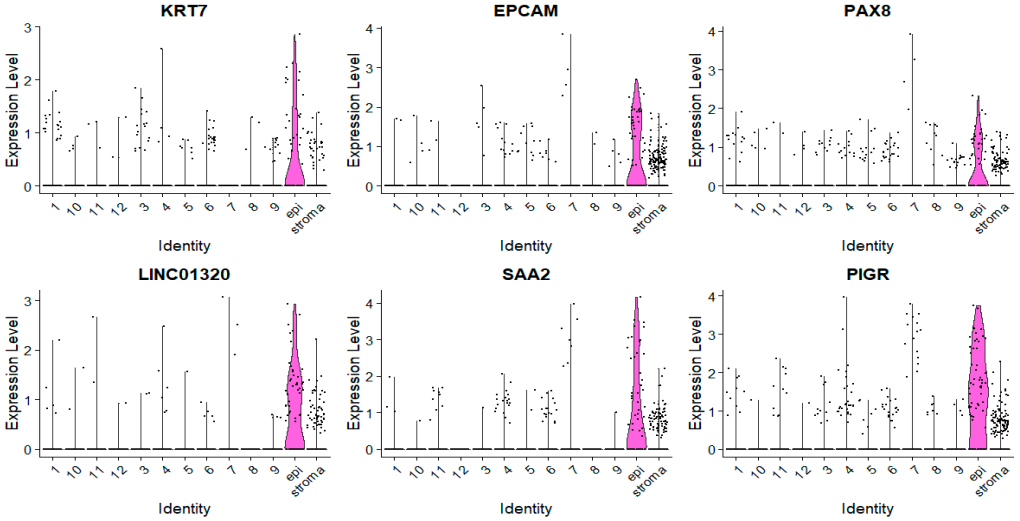


図 3. 空間的遺伝子発現解析 Visium により見出された
子宮内膜症上皮特徴的発現遺伝子のスポットごとの発現量のバイオリンプロット。
空間的遺伝子発現解析により、子宮内膜症上皮の特徴的な発現遺伝子（KRT7、EPCAM、PAX8 など）の発現を確認した。また、新規のマーカー遺伝子候補（LINC01320、SAA2、PIGR）も同定された。

考　察

我々は、様々な遺伝子変異の組み合わせを有する内膜症オルガノイドの樹立に成功し、全エクソン解析による遺伝子プロファイルの同定に施行した。また、*KRAS* や *PIK3CA* などの内膜症に見られるがん遺伝子を遺伝子導入することにより、細胞増殖能や接着能に変化が生じることを証明した。これは遺伝子変異のパターンによって、子宮内膜症の症状や発癌に何かしらの影響がある可能性がある。現在、さらなる *in vitro* 解析で内膜症における遺伝子変異の生物学的意義について研究を行っている。これらの患者由来オルガノイドは、実際の疾患の遺伝型と表現型を忠実に反映するため、ゼノグラフト等で見られた基礎研究と実臨床とのギャップを埋める実験モデルとなりうる。また、内膜症オルガノイドを用いてマウスで腫瘍形成が可能であることをすでに実証し、多段階発癌モデルの探索に必要な *in vivo* モデルの構築に成功している。上記研究により、内膜症性嚢胞発生の癌化機序の解明、さらには EC、CCC の化学療法感受性の差異のメカニズム等の解明につながり、個別化医療の発展に大きくつながると期待される。

文　献

1）　Cancer Genome Atlas Research Network. Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma. Nature. 2011 Jun 29;474(7353):609-15. doi: 10.1038/nature10166.