

■受領No.1404

## ゲノム解析に基づく子宮腺筋症・内膜症の個別化治療法の開発に向けた分子基盤の構築

代表研究者

井上 聡

国立がん研究センター研究所 細胞情報学分野 特任研究員



### 1. 研究目的

子宮腺筋症と子宮内膜症は子宮筋腫と並んで婦人科 3 大良性疾患であり、生殖年齢女性に好発する。子宮腺筋症は、着床の場である子宮内膜組織に類似した腺と間質からなる組織が、子宮筋層内で異所性に増殖する疾患であり、月経困難や過多月経、不妊や早流産など生殖年齢女性の QOL を著しく低下させる。近年は妊娠年齢の高年化などの影響からか、挙児希望を有する症例が増加しており、不妊や早流産の問題が顕在化している。一方、子宮内膜症は、子宮内膜類似組織が子宮以外の場所にできる疾患であり、月経困難や不妊の原因になるばかりか、最近では卵巣チョコレート嚢胞が悪性化することが明らかになっている。以前は、子宮腺筋症は子宮内膜症の一病型と考えられてきたが、現在はその病態に類似点とともに相違点もあることが明らかになっている(図1)。子宮内膜症については、最近、網羅的ゲノム解析の結

果が報告され、子宮内膜がんに好発する遺伝子変異プロファイル (ARID1A, PIK3CA, KRAS, PPP2R1A体細胞変異) と似ていることが特徴的である。子宮腺筋症は、その多い患者数にも関わらず、これまで全くゲノム解析がなされておらず、子宮内膜症・子宮筋腫と同様な細胞のクローン性増殖に起因する疾患かも未だ不明なままであった。申請者は子宮腺筋症に豊富な臨床及び研究の実績のある施設が子宮腺筋症検体バンクのネットワークを作り、大規模な網羅的ゲノム解析を行って、子宮腺筋症の本態に迫った。本研究成果として、変異KRAS腺筋症は、ホルモン治療法の一つであるプロゲステロン製剤感受性に影響が出ること、経産婦における発症リスク機序が示唆され、個別化医療の端緒となり得る結果が得られた。

### 2. 研究内容

#### 1章 子宮腺筋症・内膜症ゲノム解析

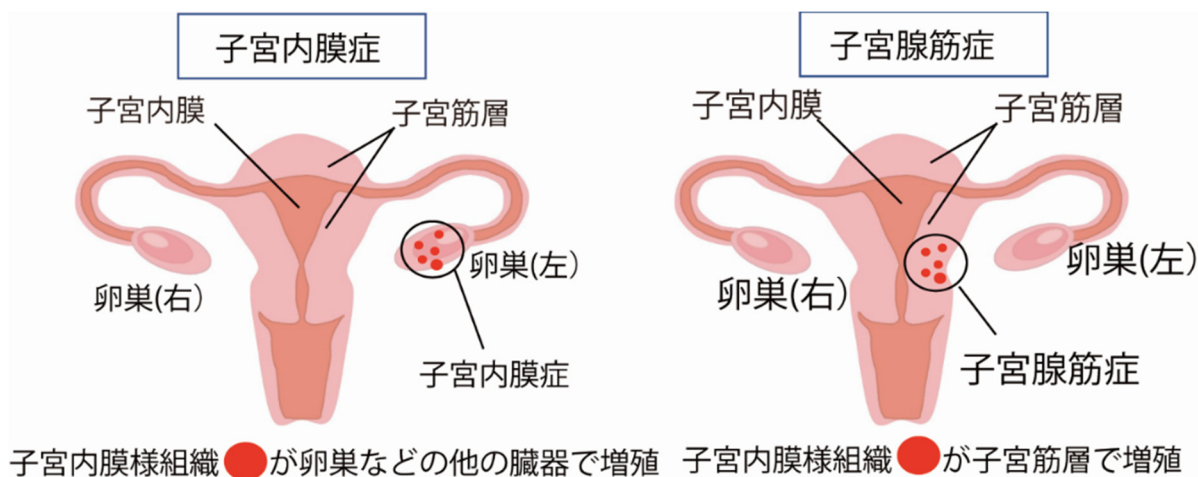


図1 子宮内膜症と子宮腺筋症のモデル図

### 1.1 子宮腺筋症は KRAS 遺伝子変異が高頻度に起こる

WES 解析の結果、子宮腺筋症の約4割の症例において、KRAS 遺伝子のがん化変異が認められた(図2)。子宮内膜症や子宮筋腫のゲノム解析では、KRAS 遺伝子変異に加え、PIK3CA 遺伝子や MED12 遺伝子変異が高頻度に認められることが報告されている。しかし、子宮腺筋症では、PIK3CA 変異は極めて稀であり、MED12 遺伝子変異は全く認められなかった(図2)。以上の結果から、子宮腺筋症という疾患は、ゲノム異常を伴う細胞が増殖するクローン性増殖疾患であること、遺伝子変異という視点では子宮筋腫とは異なり、子宮内膜症とは一部、共通していることが示された。

### 1.2 子宮腺筋症は多クローン性増殖疾患であり、併発子宮筋腫とは独立したクローン性疾患である

我々は、病変部より、マルチサンプリングを行い、同定された変異が、子宮腺筋症全体で共有されているか否かを検証した。子宮腺筋症病変部の広範囲において認められる遺伝子変異(trunk型変異)と特定の領域においてのみ認められる複数の遺伝子変異(private型変異)が認められたため、子宮腺筋症という疾患は、分子レベルでは多クローン性増殖疾患であることが示された(図3)。子宮腺筋症は、子宮筋腫を高頻度に併発するが、それぞれの病変部で検出された遺伝子変異は、相互排他性を示し、両疾患は分子レベルで独立した疾患単位であることが示された(図3)。以上のゲノ

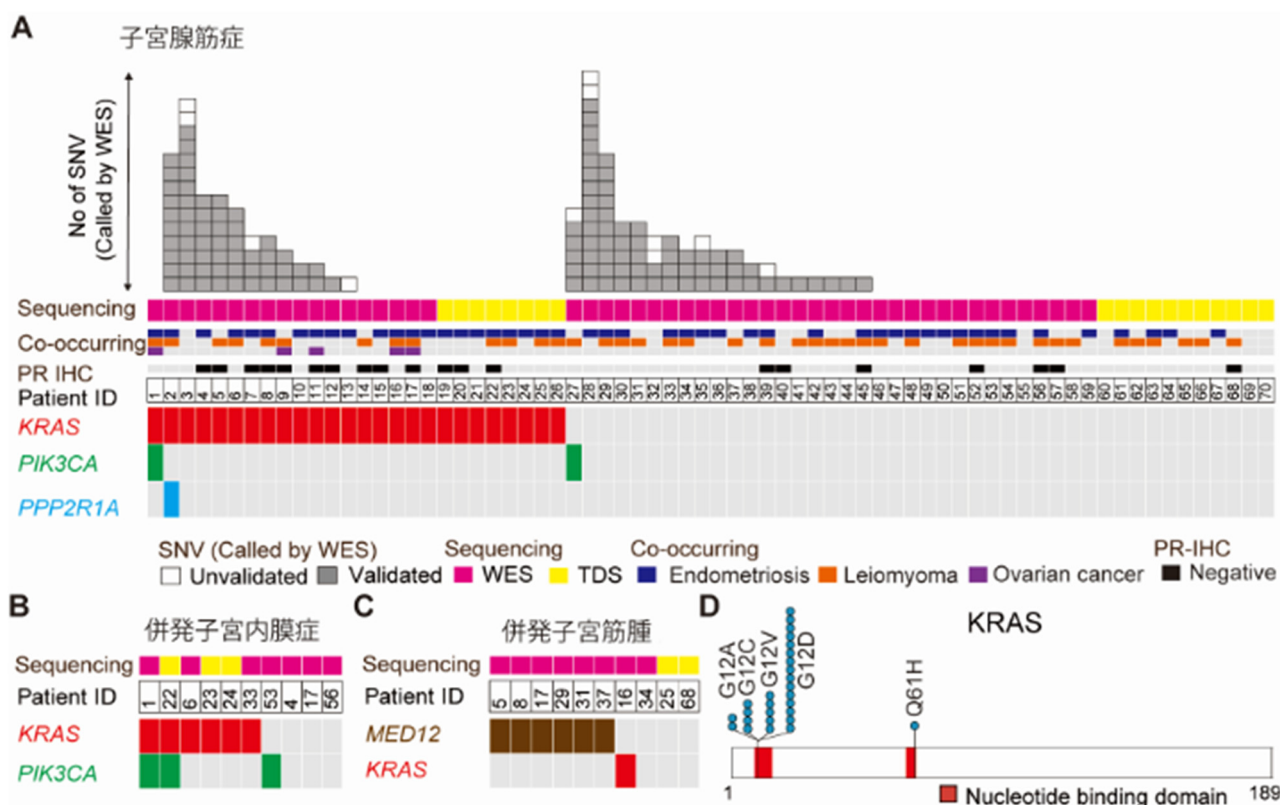


図2 子宮腺筋症ゲノム解析結果概要

A 子宮腺筋症70症例に対するゲノム解析から、体細胞変異(SNV)が約6割の症例で、KRAS 変異が約4割の症例で検出された。B 併発子宮内膜症、C 併発子宮筋腫に対するゲノム解析から、既報と類似の遺伝子変異が検出された。D 子宮腺筋症において検出された KRAS 遺伝子変異の大半は p.G12 のがん組織において好発するホットスポット変異であった。

ム解析の結果からは、なぜ子宮腺筋症と子宮筋腫が高頻度に併発するのか、という問いに答える知見を得ることが出来なかった。

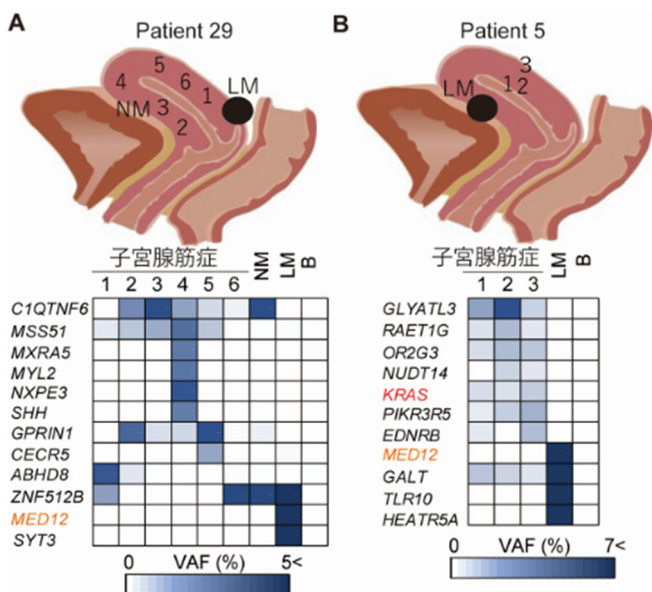


図3 子宮腺筋症・併発子宮筋腫マルチサンプリングゲノム解析  
A-B 子宮筋層中における子宮腺筋症病変部と併発子宮筋腫 (LM) から、マルチサンプリングを行い、下図左側に記した遺伝子の変異頻度を解析した。子宮腺筋症病変部におけるクローン多様性、子宮筋腫とは独立したクローン由来の疾患であった。

### 1.3 子宮腺筋症細胞クローンの発生母地は正所性子宮内膜であり、併発子宮内膜症と分子レベルでは、類似した発症機序である

子宮腺筋症症例の子宮腺筋症病変部、周辺子宮

正常内膜、さらに併発子宮内膜症病変部のマルチサンプリングを行い、子宮腺筋症病変部で同定された変異が、周辺部子宮内膜や併発子宮内膜症病変部で共有されているか否かを検証した。子宮腺筋症で検出された一部の遺伝子変異(例: KRAS 変異)と同一塩基置換置換が、周辺の子宮正常内膜部においても検出されたため、子宮腺筋症病変部に存在するクローンの起源は、正常子宮内膜に存在するクローンであることが強く示唆された(図4)。また、併発子宮内膜症病変部においても、子宮腺筋症病変部と同一の塩基置換変異が検出されたことから(図4)、両疾患は、正常子宮内膜に存在する同一ないし類似のクローンを起源とすることが強く示唆された。以上の結果から、子宮腺筋症と子宮内膜症は、分子レベルにおいては、発症機序の一部を共有していることが示唆され、高頻度に併発する原因を説明することが可能となった。

### 1.4 子宮腺筋症症例において、正所性子宮内膜組織における KRAS 変異が顕著に起こる

我々は、子宮腺筋症や子宮内膜症症例に加え、対照群として非子宮腺筋・内膜症(子宮筋腫、子宮頸がん、卵巣がん)症例から正常子宮内膜検体をそれぞれ収集し、PIK3CAのKRAS遺伝子変異の

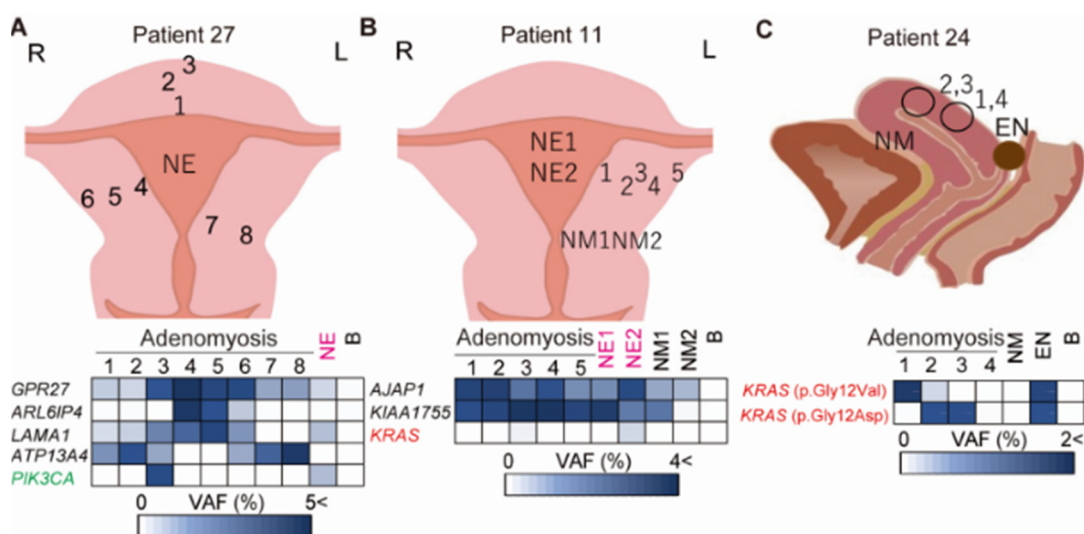


図4 子宮腺筋症病変部、周辺正常子宮内膜部、併発子宮内膜症病変部マルチサンプリングゲノム解析  
A-B 子宮筋層中における子宮腺筋症細胞と周辺の子宮正常内膜部 (NE) のゲノム解析を行ったところ、腺筋症と同一の遺伝子変異が子宮内膜部 (NE) においても検出された。C 併発子宮内膜症とのマルチサンプリング解析から、子宮腺筋症病変部と同一の KRAS 変異が子宮内膜症病変部 (EN) でも検出された。



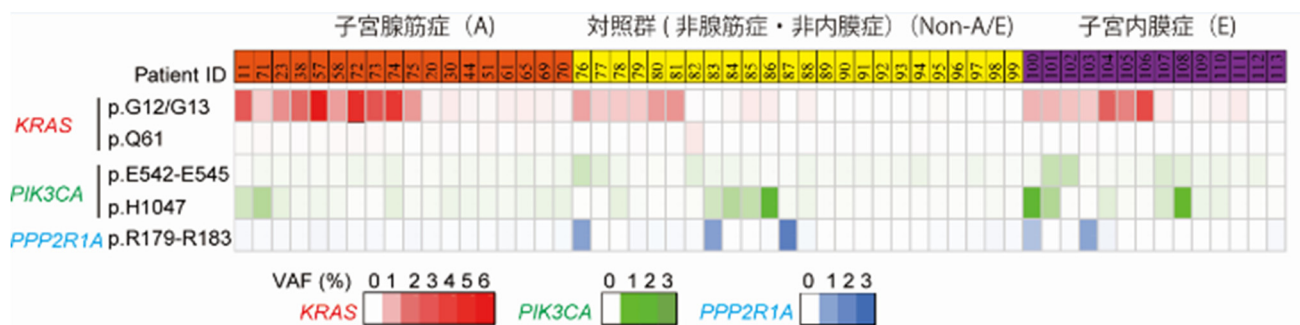


図5 子宮腺筋症、内膜症症例の子宮正常内膜ゲノム解析結果概要

A 子宮腺筋症や子宮内膜症、対照群として非腺筋症・非内膜症症例の正常子宮内膜検体における *KRAS*、*PIK3CA*、*PPP2R1A* 変異解析。子宮腺筋症症例において、*KRAS* 変異が高頻度に認められた。

発生率やアレル頻度を検証した。子宮腺筋症症例は、対照群である非子宮腺筋・内膜症症例と比較して、正常子宮内膜検体における*KRAS*変異が高頻度に起こり、アレル頻度も有意に高かった(図5)。子宮内膜症においても同様の傾向が認められたが、統計上の有意性は認められなかった。*PIK3CA*遺伝子変異については、発生頻度並びにアレル頻度に影響が認められなかった。以上の結果から、何らかの要因で、子宮内膜組織中に*KRAS*遺伝子変異クローンが発生、増殖した症例において、子宮腺筋症の発症リスクが高まることが明らかとなった。

## 2章 ゲノム解析結果と臨床病理情報の統合解析

### 2.1 *KRAS* 変異子宮腺筋症症例は子宮内膜症の併発率が高い

正常子宮内膜組織に存在する*KRAS*などの遺伝子変異を有するクローンが、子宮腺筋症だけでなく子宮内膜症の起源であることが示唆されたため、*KRAS*変異と子宮腺筋症と内膜症の併発率について検証した。*KRAS*変異を有する子宮腺筋症の臨床情報との相関性を調べたところ、子宮内膜症の併発率が、*KRAS*非変異症例と比較して、有意に高かった(表1)。今後、子宮内膜における*KRAS*変異

の発生メカニズムを明らかにすることが、子宮腺筋症・内膜症の予防法の確立に向けた分子基盤となり得ることが示唆された。また、子宮腺筋症や子宮内膜症の外科的治療法として、従来の子宮全摘法に加え、最近では、患者さんの挙児願望などを考慮し、本邦と中心として、部分摘出による子宮温存出法が選択され始めている。今後、術前の*KRAS*変異検査などを行うことで、外科的手術法の選択や、温存手術後の再発防止に向けた長期観察の重要性も示唆された。

### 2.2 変異 *KRAS* 発現細胞株ではプロゲステロン受容体発現抑制によるホルモン治療感受性に影響が及ぶ可能性

子宮腺筋症の病変部におけるプロゲステロン受容体(PR)に対する免疫染色解析を行ったところ、*KRAS*遺伝子変異症例の子宮腺筋症病変部における上皮系細胞において特異的にPR発現量の低下を認めた(図6)。PR発現抑制は*PIK3CA*遺伝子を発現細胞株においては認められなかった。変異型*KRAS*によるPR発現抑制のメカニズムを解析するためにDNAメチル化の関与を検証した。*KRAS*変異症例において、PRのCpG islandにおけるDNA

表1 子宮腺筋症ゲノム解析結果概要

	<i>KRAS</i> 変異なし症例	<i>KRAS</i> 変異あり症例	統計上有意性 ( <i>p</i> -value)
子宮内膜症併発率	26/44 (59.1%)	22/26 (84.6%)	0.0339
子宮筋腫併発率	28/44 (63.6%)	13/26 (59%)	

*KRAS* 遺伝子の変異を有する 26 症例中 22 症例 (84.6%) が、子宮内膜症を併発しており、両疾患が高頻度に併発する機構の一部が明らかとなった。

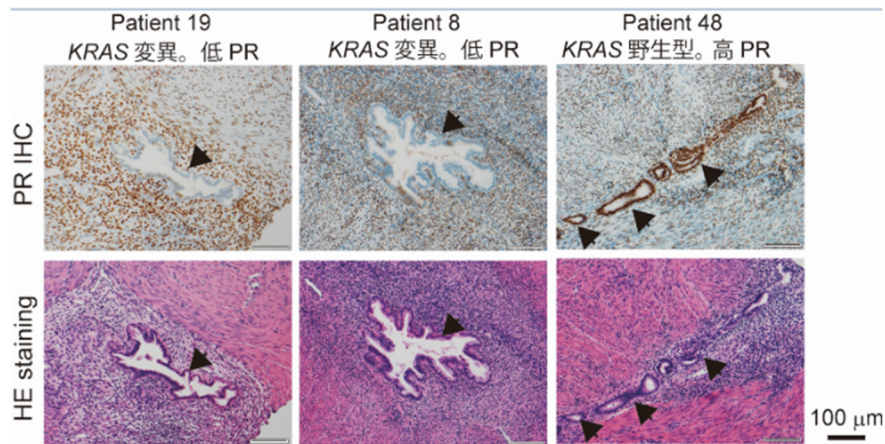


図6 子宮腺筋症病変部におけるプロゲステロン受容体免疫染色解析  
子宮筋層における子宮腺筋症病変部におけるプロゲステロン受容体 (PR) に対する免疫組織化学的解析。矢印で示した上皮系の腺筋症細胞において、PRの発現量低下が特異的に検出された。この現象は、KRAS 変異症例において高頻度に観察された。

メチル化の上昇が検出された。以上の結果から、KRAS変異タンパク質は、子宮腺筋症細胞において、エピジェネティックにPR発現抑制させることが示唆された。さらに、子宮腺筋症において高頻度に認められるKRAS遺伝子変異が、治療標的の一つであるPR発現量を変化させることが示唆され、個別化医療の重要性が示唆された。

### 2.3 経産婦が正所性子宮内膜における KRAS 変異を誘発する可能性

正所性子宮内膜ゲノム解析結果と臨床情報との相関性を解析したところ、妊娠歴や経産出産歴とKRAS変異率との間において、有意な相関性が認め

られた (表2)。興味深い点として、帝王切開歴との相関性は認められなかった。以上の結果から、自然分娩時における子宮筋組織の強力な収縮といった物理的なストレスが子宮内膜組織におけるゲノム異常、特にKRAS変異を誘発し、増殖能を獲得したKRAS変異子宮内膜クローンが、子宮腺筋症の起源クローンとして発症リスクを亢進している可能性が示唆された。

### 3. 研究のまとめ、謝辞

本研究では、子宮腺筋症・内膜症のゲノム解析結果と臨床病理情報との相関性解析の結果、経産婦において子宮腺筋症の起源クローン (KRAS変異)

表2. 子宮内膜KRAS 変異と臨床情報の相関性解析結果概要

臨床情報	Value (%)		統計上有意性 (p-value)
	KRAS 変異なし症例 (N=40)	KRAS 変異あり症例 (N=58)	
妊娠歴, no. (%)	12/40 (30.00)	38/58 (65.52)	0.001
出産歴, no. (%)	11/40 (27.50)	33/58 (56.90)	0.007
帝王切開歴, no. (%)	6/40 (15.00)	5/58 (8.62)	n.s.
自然分娩歴, no. (%)	7/40 (17.50)	28/58 (48.28)	0.003

n.s.: 有意性なし (Fisher`s exact test)

自然分娩歴のある症例の子宮内膜においてKRAS 変異が高頻度に検出された

の発生率が亢進すること、KRAS変異子宮腺筋症がPRを標的としたホルモン治療に対して感受性が低下する可能性を示唆した。今回の結果を基盤として、KRAS変異を対象とした予防法の確立、個別化医療実現に向けたエビデンスを蓄積されるべく、研究を進展させる計画である。

本研究は、国立開発法人 国立がん研究センター研究所 細胞情報学分野(間野博行研究室)において行われた。また国立大学法人東京大学医学部附属病院女性外科、学校法人順天堂医学部産婦人科学講座との共同研究であり、国立大学法人東京大学医学部附属病院 廣田泰講師、福井大和大学院生、織田克利准教授、大須賀穰教授、田口歩博士、学校法人順天堂医学部産婦人科学講座 寺尾泰久先任准教授、吉田恵美子非常勤助教、同大学病理病態学講座 林大久生准教授、齋藤剛准教授に深く御礼申し上げます。本ゲノム解析に対し、貴重な検体の提供に同意して頂きました、婦人科疾患を罹患された患者の皆様に深謝申し上げます。最後に、我々の子宮腺筋症ゲノム解析に対し、研究助成を賜りました公益財団法人 日立財団に深く御礼申し上げます。研究助成金を活用した本研究成果は、Cell Death Disease (2020) (発表リスト3)に発表され、貴財団の助成なくして、本研究成果の実現を成し得ることは不可能であり、貴研究財団による研究助成を発表論文の謝辞に記させて頂きました。

#### 4. 発表(研究成果の発表)

1. Inoue, S., Yoshida, E., Fukui, Y., Ueno, T., Kawazu, M., Takeyama, R., Ikemura, M., Osuga, Y., Terao, Y., Hirota, Y., Mano, H. KRAS mutations in uterine endometrium are associated with gravidity and parity. Cell Death Dis 2020 11: 347.

2. Ikegami, M., Kohsaka, S., Ueno, T., Momozawa, Y., Inoue, S., Tamura, K., Shimomura, A., Hosoya, N., Kobayashi, H., Tanaka, S., Mano, H.

High-throughput functional evaluation of BRCA2 variants of unknown significance. Nat Commun 2020 11: 2573.

3. Inoue, S., Hirota, Y., Ueno, T., Fukui, Y., Yoshida, E., Hayashi, T., Kojima, S., Takeyama, R., Hashimoto, T., Kiyono, T., Ikemura, M., Taguchi, A., Tanaka, T., Tanaka, Y., Sakata, S., Takeuchi, K., Muraoka, A., Osuka, S., Saito, T., Oda, K., Osuga, Y., Terao, Y., Kawazu, M., Mano, H. Uterine adenomyosis is an oligoclonal disorder associated with KRAS mutations. Nat Commun 2019 10: 5785.

4. 子宮腺筋症の妊孕性温存を考える会 第2回学術講演会 2020年2月 東京 「子宮腺筋症ゲノム解析」

5. 第2回婦人科がんゲノム研究会 2020年10月 京都 「子宮腺筋症ゲノム解析」