

オルガノイド培養を用いた子宮内膜症における新規診断および癌化予測マーカーの開発

Identification of novel diagnostic and predictive markers for endometriosis and its carcinogenesis using new organoid model

慶應義塾大学医学部 腫瘍センターゲノム医療ユニット 特任講師 中村 康平

要約

子宮内膜症は女性の生活の質を低下させ、不妊症の原因ともなる疾患で、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。最近の研究では、内膜症性嚢胞から発生する可能性のある卵巣明細胞癌・類内膜癌における発癌機序の解明が進められている。本研究では、次世代シーケンサーを用いた全エクソン解析により、卵巣癌の前駆病変である内膜症上皮細胞において、*PIK3CA*、*KRAS*、*ARID1A*といったがんドライバー遺伝子変異がすでに認められることが確認された。さらに、様々な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成し、*in vitro*内膜症発癌モデルを構築した。これらのオルガノイドに対してCRISPR/Cas9を用いた遺伝子変異導入による細胞機能への影響を評価することで、これらの変異が子宮内膜症のがん化に関与する可能性が示唆された。また、Visiumを用いたトランスクリプトーム解析により、子宮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され、新規マーカー遺伝子候補の同定にも繋がった。本研究は、子宮内膜症のがん化マーカーの探索及び卵巣癌の治療薬開発に貢献するものと期待される。

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の同定し、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も試みたが、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を試みたが、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年、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成し、*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。

Organoid	Mutations (160 genes panel seq.)		
	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

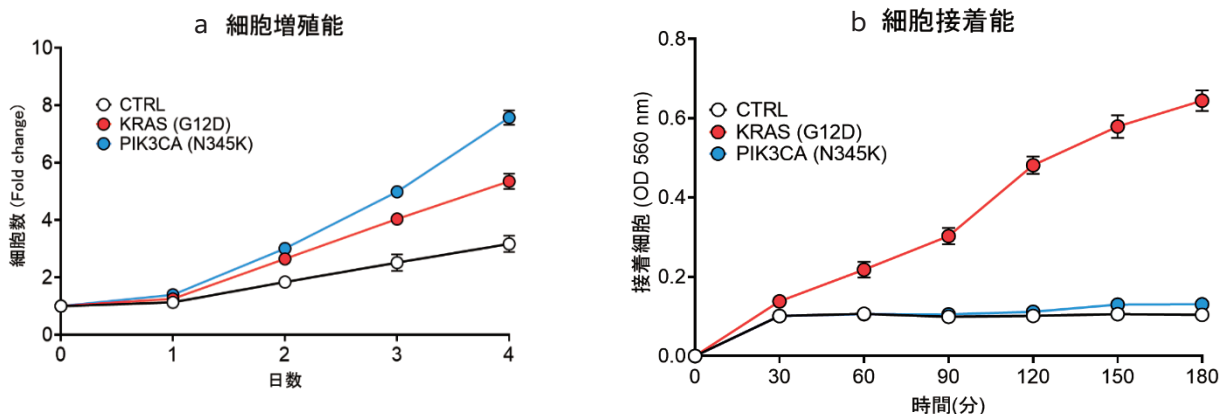


図2. 子宮内膜症オルガノイドへの変異遺伝子導入が細胞増殖能、接着能に及ぼす影響

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。

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、

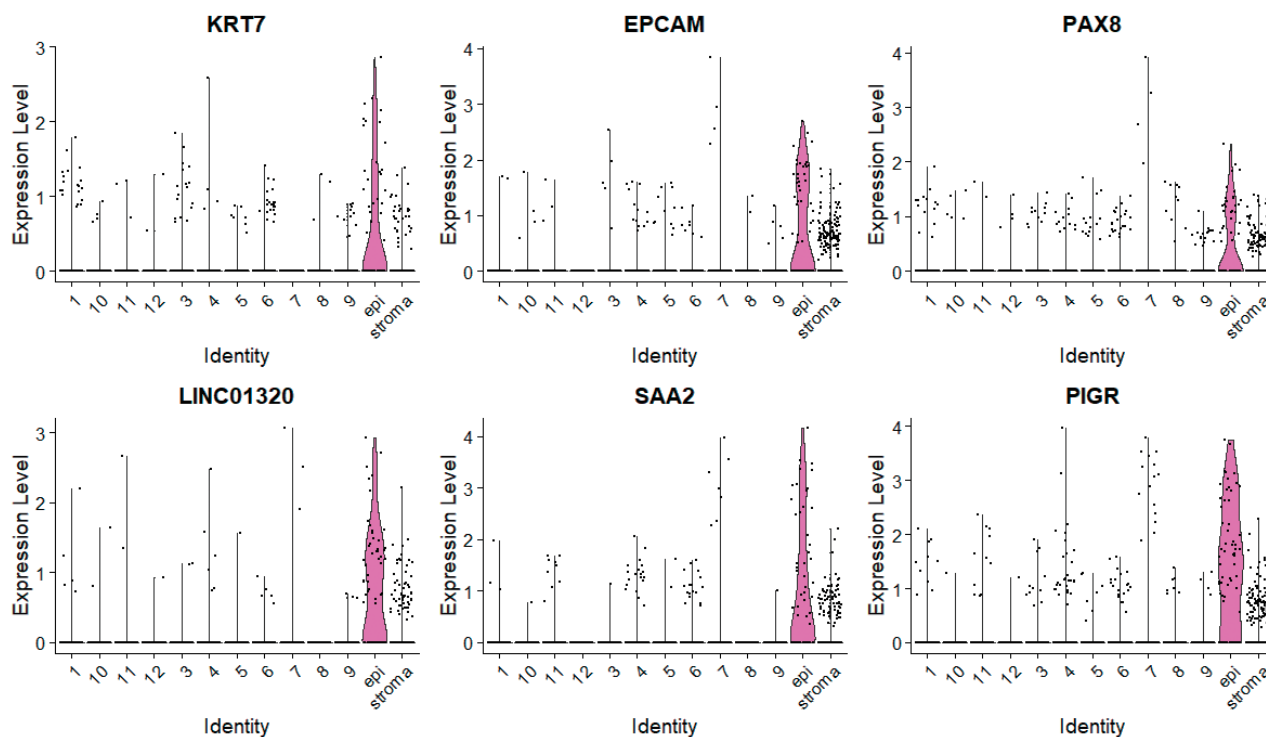


図3. 空間的遺伝子発現解析Visiumにより見出された子宮内膜症上皮特徴的発現遺伝子のスポットごとの発現量のバイオリンプロット

PAX8などの発現が上昇していた（図3上段）。また、その他そのクラスター特徴的な遺伝子として、ノンコーディングRNA 遺伝子LINC01320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。

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。

参考文献

1. The Cancer Genome Atlas Research Network, Integrated genomic analyses of ovarian carcinoma .Nature. 29: 609-615, 2011

Abstract

Endometriosis significantly deteriorates the quality of life for women and is a known cause of infertility, with ovarian endometriomas being precursors to ovarian cancer. Recent studies have been advancing in deciphering the carcinogenic mechanisms potentially leading to ovarian clear cell and endometrioid carcinomas originating from endometriotic cysts. This research utilized whole-exome sequencing through next-generation sequencing technologies to confirm the presence of cancer driver gene mutations such as *PIK3CA*, *KRAS*, and *ARID1A* in the epithelial cells of endometriosis, which are precursors to ovarian cancer. Additionally, patient-derived endometriosis organoids harboring various driver gene mutations were created to construct an *in vitro* model of endometriosis carcinogenesis. Evaluating the impact of these mutations on cell functions through CRISPR/Cas9-mediated gene editing suggested their involvement in the carcinogenesis of endometriosis. Furthermore, transcriptomic analysis using Visium elucidated the gene expression characteristics of endometriosis epithelial and stromal cells, leading to the identification of novel marker gene candidates. This study is anticipated to contribute to the exploration of carcinogenesis markers for endometriosis and the development of therapeutic drugs for ovarian cancer.