

## 博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 谷地田 希  
学位 博士 (医学)  
学位記番号 新大院博 (医) 第 1017 号  
学位授与の日付 令和3年9月21日  
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当  
博士論文名 Biological significance of KRAS mutant allele expression in ovarian endometriosis.  
(卵巣子宮内膜症における KRAS 変異アレル発現の生物学的意義)

論文審査委員 主査 教授 近藤 英作  
副査 教授 味岡 洋一  
副査 准教授 齋藤 憲

### 博士論文の要旨

#### 【背景】

子宮内膜症は生殖可能年齢女性の 10%~15%の女性に認められる慢性骨盤痛、月経痛、不妊症の原因となる疾患で、病理学的には子宮内膜類似組織が子宮外に認められる良性病変である。子宮内膜症では、炎症がその発生や進展に関与し、疼痛などの症状の原因となる。また、子宮内膜症は一定の割合で癌化することが知られており、卵巣子宮内膜症は卵巣明細胞癌や卵巣類内膜癌の前癌病変と考えられている。

申請者らは先行研究において、癌遺伝子 KRAS の点突然変異が 42.6% (23/54) の卵巣子宮内膜症上皮に同定されること、子宮内膜間質には同遺伝子変異をみとめないことを報告している。また、同定された KRAS 変異は、癌で高頻度に変異がみられるコドン 12、13、61 に位置しており、良性疾患である卵巣子宮内膜症においても KRAS 変異が何らかの生物学的意義を有している可能性が示唆された。しかし、手術摘出標本の子宮内膜症上皮はわずかであり、その限られた子宮内膜上皮からマルチオミックス解析に十分な核酸を抽出することが困難なため、卵巣子宮内膜症において実際に KRAS 変異アレルが発現し、その発生や進展、癌化に関与するかどうか不明であった。

そこで申請者らは卵巣子宮内膜症における KRAS 変異の意義を解明するために、in situ ハイブリダイゼーション (ISH) 法 (BaseScope™) を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片上で KRAS 変異アレルの発現を RNA レベルで可視化することを計画した。

#### 【目的】

卵巣子宮内膜症における KRAS 変異アレルの発現を、ISH 法を用いて FFPE 切片上で可視化し、卵巣子宮内膜症における KRAS 変異の発現の有無並びにその意義を明らかにすることを目的とした。

#### 【対象と方法】

1. ISH 法として BaseScope™ を用い、KRAS の変異状態が既知の卵巣癌細胞株 (OVCAR5、SW626、SKOV3) と大腸癌細胞株 (SW620、HT29) の計 5 つの細胞株と卵巣癌臨床検体 9 例で BaseScope™ 実験系の精度を検証した。

2. 卵巣子宮内膜症 26 例の FFPE 切片に対し、BaseScope™ ISH 法を用い KRAS p. G12V の変異アリの発現を検証した。

3. 2 のうち解析可能な 12 例の卵巣子宮内膜症上皮の DNA をレーザーマイクロダイセクションで抽出し、KRAS の変異状態をターゲットシーケンスで確認した。

4. 2 で同一切片上に KRAS 変異アリの発現に不均一性を認めた 2 例に対し、リン酸化 ERK (p-ERK) の免疫染色を施行した。

5. KRAS p. G12V の変異アリの発現が陽性の卵巣子宮内膜症 10 例と、KRAS 野生型 5 例の卵巣子宮内膜症患者の術前血液検査における炎症性マーカーの値、骨盤内感染や破裂などの炎症反応を惹起する事象の有無、術中の内膜症病巣の程度を点数化した rASRM (The revised American Society for Reproductive Medicine) スコアを統計学的に比較した。

#### 【結果】

1. KRAS p. G12V をホモ接合性に有する OVCAR5 と SW620 の変異プローブの陽性率は 30.2%及び 37.2%であり、野生型プローブ陽性の細胞は認めなかった。KRAS p. G12V をヘテロ接合性に有する SW626 の変異プローブと野生型プローブの陽性率は 22.3%及び 72.6%であった。一方、KRAS 野生型の SKOV3 と HT29 において変異プローブ陽性細胞は認めず、特異性が高い実験であることを証明した。変異状態既知の卵巣癌症例のうち KRAS p. G12V を有する 7 例中 6 例は変異シグナルと野生型シグナルの両方が陽性を呈し、これらの卵巣上皮の変異状態はヘテロ接合性であった。7 例中 1 例はターゲットシーケンスでアリル不均衡を認めた卵巣癌で、変異シグナルは野生型シグナルに比べ優位であり変異シグナル陽性率は 34.6%であった。KRAS p. G12V プローブの特異性を確認するために、KRAS p. G12D のアリル不均衡を呈する卵巣癌症例で BaseScope™ 実験を行い、KRAS p. G12V プローブ陽性細胞は同定されないことを確認した。

2. 卵巣子宮内膜症 26 例のうち、10 例で KRAS p. G12V の陽性シグナルを確認した。変異シグナルは卵巣子宮内膜症病変の上皮細胞のみで陽性であり、間質細胞では野生型シグナルのみを認めた。

3. 2 で ISH 法を施行した卵巣子宮内膜症のうち、解析可能な 12 例に対しターゲットシーケンスで変異状態を確認したところ、ISH 法で変異シグナルを同定した 5 例はすべて KRAS p. G12V を認め、野生型シグナルのみ陽性であった 7 例のうち 5 例は KRAS 野生型、2 例は KRAS p. G12A、KRAS p. G12D であり、ISH 法から想定される変異状態はシーケンス結果と一致していることを証明した。

4. 2 で変異シグナルを同定した卵巣子宮内膜症のうち 2 例にシグナルの発現に不均一性を認め、変異シグナルのみ陽性の領域を赤、野生型シグナルのみ陽性の領域を緑、変異シグナルと野生型シグナルの両方が陽性の領域を黄色に区分けした。ISH を施行した連続切片で p-ERK の発現を免疫染色で確認したところ、区分けした領域単位で p-ERK の発現強度は変異シグナルのみ陽性の領域で最も強く、続いて野生型、変異シグナル両方が陽性の領域では中等度、野生型シグナルのみの領域では弱い発現であった。

5. KRAS p. G12V 群の 10 例中 4 例で骨盤内炎症性疾患、1 例で卵巣子宮内膜症の破裂の事象が術前に発生したが、KRAS 野生型群で炎症を伴う事象の発生はなかった。CRP は KRAS 野生型群の卵巣子宮内膜症に比べ KRAS p. G12V 群で有意に高値であった ( $P = 0.024$ )。

#### 【考察】

申請者らは、BaseScope™ を用いて卵巣子宮内膜症において KRAS 変異の変異アリル特異的 mRNA 発現を可視化することに成功した。KRAS p. G12V の変異アリの発現に不均一性を同定した卵巣子宮内膜症において、MAPK シグナル経路の下流のエフェクターである p-ERK の発現強度が変異シグナルの発現状態によって異なり、KRAS 変異は卵巣内膜症上皮において RAS/MAPK シグナル伝達経路がコントロールする細胞の増殖・分化・細胞死等に影響を与えている可能性がある。膵臓癌、肺癌そして白血病において KRAS 変異が炎症性サイトカインを誘導し腫瘍形成や増殖を促進することが知られている。申請者らが今回検討した卵巣

子宮内膜症においても、KRAS p. G12V 変異アリル陽性の卵巣子宮内膜症は CRP や好中球・リンパ球数比などの血液の炎症マーカーが高い傾向にあり、腹腔内の病巣範囲や癒着の程度が強い傾向にあった。今後、卵巣子宮内膜症にける KRAS 変異と病変の進展、局所炎症との相関について症例数を増やして検討する必要がある。

#### 審査結果の要旨

申請者らは先行研究において、癌遺伝子 KRAS の点突然変異が 42.6% (23/54) の卵巣子宮内膜症上皮に同定されること、子宮内膜間質には同遺伝子変異をみとめないことを報告していた。しかし、卵巣子宮内膜症において実際に KRAS 変異アリルが発現し、その発生や進展、癌化に関与するかどうか不明であった。そこで申請者らは卵巣子宮内膜症における KRAS 変異の意義を解明するために、in situ ハイブリダイゼーション (ISH) 法 (BaseScope™) を用いて、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 切片上で KRAS 変異アリルの発現を RNA レベルで主に ISH 法により可視化することを計画した。Materials and Methods は主に以下のとおり。

1. ISH 法として BaseScope™ を用い、KRAS の変異状態が既知の卵巣癌細胞株 (OVCAR5、SW626、SKOV3) と大腸癌細胞株 (SW620、HT29) の計 5 つの細胞株と卵巣癌臨床検体 9 例で BaseScope™ 実験系の精度を検証した。

2. 卵巣子宮内膜症 26 例の FFPE 切片に対し、BaseScope™ ISH 法を用い KRAS p. G12V の変異アリルの発現を検証した。

2 のうち解析可能な 12 例の卵巣子宮内膜症上皮の DNA をレーザーマイクロダイセクションで抽出し、KRAS の変異状態をターゲットシーケンスで確認した。

結果、BaseScope™ を用いて卵巣子宮内膜症において KRAS 変異の変異アリル特異的 mRNA 発現を可視化することに成功し、子宮内膜症においても、KRAS p. G12V 変異アリル陽性の卵巣子宮内膜症は CRP や好中球・リンパ球数比などの血液の炎症マーカーが高い傾向にあり、腹腔内の病巣範囲や癒着の程度が強い傾向にあることを明らかにした。