博士論文の要旨及び審査結果の要旨	
氏名	須田　一暁
学位	博士（医学）
学位記番号	新大院博（医）第 841 号
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
博士論文名	Clonal Expansion and Diversification of Cancer-Associated Mutations in Endometriosis and Normal Endometrium （子宮内膜症と正常子宮内膜における癌関連遺伝子変異のクローン性増殖と多様性）
論文審査委員	主査　教授　味岡　洋一 副査　教授　近藤　英作 副査　教授　榎本　隆之

博士論文の要旨

【背景と目的】

子宮内膜症は組織学的に子宮外で子宮内膜上組織が存在する疾患であり、生殖年齢女性の約10%が罹患しているとされる。月経困難症、慢性骨盤痛、不妊症、性交時痛など引き起こし、生活の質を低下させる原因となる。子宮内膜症の発生に関わる仮説として月経血逆流説、体腔上皮仮性説、ミュラー管遺残説が提唱されているが、いずれもその発生機序を結論付けるには至っていない。そこで本研究では、子宮内膜症の分子生物学的特徴を解明し、その発生機序を明らかにし、分子生物学的特徴に対応した新規治療法の開発に寄与することを目的とした。

【方法】

新潟大学遺伝子倫理委員会の承認のもと、研究同意の得られた患者の手術検体から組織を採取した。まず子宮内膜症 13 症例から子宮内膜症組織を 13 サンプル、婦人科良性疾患 11 症例における摘出子宮から子宮内膜組織を 11 サンプル採取した。両組織とも凍結切片からレーザーマイクロダイセクションを用いて上皮のみを選択的に採取し、DNA を抽出した。コントロールとして同一患者の血液から得た DNA を用いて全エクソンシークエンスを行い、体細胞変異を同定した。次に同一症例内におけるマルチサンプリングも行い、子宮内膜症 43 例から子宮内膜症組織を 94 サンプル、また婦人科良性疾患 27 例の摘出子宮から正常子宮内膜を 71 サンプル採取した。全エクソンシーケンスと同様、両組織の上皮と血液由来の DNA を用いてターゲットシーケンスを行い、体細胞変異を同定した。ターゲットシーケンスでは全エクソンシーケンスの結果と、過去に行われた子宮内膜症関連卵巣癌や子宮内膜癌の遺伝子解析研究を参考にして作成した遺伝子パネル（84 遺伝子）を用いた。最後に病理学的に子宮内膜病変を認めない婦人科疾患 3 症例の摘出子宮から 109 本の腺管を分離採取し、各腺管から抽出した DNA に対しターゲットシーケンスを行った。

【結果】

全エクソンシーケンスの結果、子宮内膜症と正常子宮内膜の両組織において *KRAS*、*PIK3CA*、*FBXW7*、*PPP2R1A*、*PIK3R1* といった癌関連遺伝子で高頻度に体細胞変異を認めた。特に、*KRAS* と *PIK3CA* における遺伝子変異の頻度が高く、子宮内膜症上皮で *KRAS* 変異が 62%（8/13）、子

宮内膜上皮で *PIK3CA* 変異が 64%（7/11）という結果であった。子宮内膜症上皮と正常子宮内膜で認められた遺伝子変異には類似性を認めたが、変異アリル頻度（mutant allele frequency: MAF）は有意に子宮内膜症上皮で高い結果であった。また子宮内膜症上皮における癌関連遺伝子変異の MAF は、同一サンプル内の他の遺伝子変異の MAF と比較し上位に位置しており、癌関連遺伝子変異がクローナルな細胞増殖に寄与していることが示唆された。一方正常子宮内膜上皮においても複数の癌関連遺伝子変異を認めたが、それぞれの MAF は低く、サブクローナル変異であった。子宮内膜症上皮で特に MAF が高かったサンプルでは、*KRAS* が位置する 12 番染色体短腕で正常アリルの大規模な欠失が起きている（loss of heterozygosity: LOH）ことを明らかにした。独立した両組織のサンプルセットを用いてターゲットシーケンスを行った結果、*KRAS* と *PIK3CA* に高頻度で変異を認めた。全エクソンシーケンス結果と同様、遺伝子変異の MAF は有意に子宮内膜症上皮で高く、癌遺伝子における遺伝子変異が子宮内膜症上皮の増殖におけるドライバー因子であることが示唆された。同一症例内におけるマルチサンプリングによる解析の結果、子宮内膜症ではサンプル間で共通する MAF の高い遺伝子変異の存在から空間的なクローン性増殖が示唆されたが、正常子宮内膜のサンプル間で遺伝子変異プロファイルに共通性を認めなかった。次に、正常子宮内膜ゲノムの不均一性に注目し、新鮮子宮内膜より単離採取した個々の腺管に対しターゲットシーケンスを行った。その結果、各腺管はそれぞれ異なった遺伝子変異を有し、多くの MAF は 0.5 に近い値であった。正常子宮内膜上皮ゲノムの不均一性は、モノクローナルな腺管が多様性を持って集合体として子宮内膜上皮を形成していることに起因していた。

【考察】

申請者らは良性疾患である子宮内膜症と正常子宮内膜に高頻度で癌関連遺伝子の体細胞変異が存在することを明らかにした。両組織における遺伝子変異の類似性は、月経血の逆流によって子宮内膜組織が子宮外に正着し、子宮内膜症病変が形成されるという月経逆流説を支持する結果であった。また子宮内膜症における癌遺伝子変異は高い MAF を保持しており、異所における子宮内膜の生着・生存に寄与しているものと考えられた。

審査結果の要旨

子宮内膜症の発生機序は確定されていない。本研究では、子宮内膜症の分子生物学的特徴を解明し、その発生機序を明らかにし、分子生物学的特徴に対応した新規治療法の開発に寄与することを目的とした。子宮内膜症組織正常子宮内膜組織の全エクソンシークエンスとターゲットシーケンスにを行い体細胞変異を同定した。ターゲットシーケンスには過去に行われた子宮内膜症関連卵巣癌や子宮内膜癌の遺伝子解析研究を参考にして作成した遺伝子パネル（84 遺伝子）を用いた。子宮内膜症と正常子宮内膜の両組織において KRAS、PIK3CA、FBXW7、PPP2R1A、PIK3R1 等の癌関連遺伝子で高頻度に体細胞変異を認めた。子宮内膜症上皮と正常子宮内膜で認められた遺伝子変異には類似性を認めたが、変異アリル頻度（mutant allele frequency: MAF）は子宮内膜症上皮が有意に高頻度であった。子宮内膜症上皮における癌関連遺伝子変異の MAF は、同一サンプル内の他の遺伝子変異の MAF と比較し上位に位置しており、癌関連遺伝子変異がクローナルな細胞増殖に寄与していることが示唆された。一方正常子宮内膜上皮においても複数の癌関連遺伝子変異を認めたが、それぞれの MAF は低く、サブクローナル変異であった。子宮内膜症上皮で特に MAF が高かったサンプルでは、KRAS が

位置する 12 番染色体短腕で正常アリルの大規模な欠失が起きていた（loss of heterozygosity: LOH）。これらのことから、遺伝子変異の MAF は有意に子宮内膜症上皮で高く、癌遺伝子における遺伝子変異が子宮内膜症上皮の増殖におけるドライバー因子であることが示唆された。同一症例内におけるマルチサンプリング解析の結果、子宮内膜症ではサンプル間で共通する MAF の高い遺伝子変異の存在から空間的なクローン性増殖が示唆されたが、正常子宮内膜のサンプル間で遺伝子変異プロファイルに共通性を認めなかった。

以上のことから、本研究は、子宮内膜症と正常子宮内膜に高頻度で癌関連遺伝子の体細胞変異が存在することを明らかにし、子宮内膜症の月経逆流説を支持する結果を得た事、また子宮内膜症における癌遺伝子変異は高い MAF を保持しており、異所における子宮内膜の生着・生存に寄与していることを明らかにした点で学位論文としての価値を認める。