

日本医療研究開発機構 女性の健康の包括的支援実用化研究事業 事後評価報告書



I. 基本情報

研究開発課題名: (日本語) 子宮内膜ゲノム情報に基づいた子宮内膜症の病態解明と発症予測モデルの開発
(英語) Elucidation of the pathogenesis of endometriosis based on endometrial genome information
leading to development of a predictive model for endometriosis

研究開発実施期間: 令和4年4月1日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 吉原 弘祐
(英語) Kosuke Yoshihara

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人新潟大学 医歯学系(産科婦人科学) 教授
(英語) Professor and Chairperson, Department of Obstetrics and Gynecology, Niigata University Graduate School
of Medical and Dental Sciences・

II. 研究開発の概要

(和文) 2 ページ以上

1. 研究開発の概要

子宮内膜症は、子宮内膜組織が本来の場所から離れた異所に増生して起こる疾患である。その発症機序として、月経時に卵管を通じて逆流した月経血中の内膜組織が、骨盤腹膜や卵巣表面に生着・増殖・進展することで子宮内膜症を引き起こす、という子宮内膜移植説が有力である。しかし、子宮内膜移植説を分子生物学的に証明した報告はなく、また既存の検査では子宮内膜症の発症を予測することは困難で、有効な予防方法も存在しない。子宮腺筋症は、子宮内膜組織が異所である子宮筋層で増生して起こる疾患で、子宮内膜から連続する深部増殖説や骨盤子宮内膜症からの発生などいくつかの機序が報告されている。しかし、子宮内膜症と同様、子宮腺筋症もその発症を予測することは難しく、予防法もないのが現状である。

我々は、子宮内膜症とその発生起源と考えられる子宮内膜に注目し、ゲノム解析による子宮内膜症の病態解明を進めてきた。その中で、子宮内膜症上皮や子宮内膜上皮が *PIK3CA* や *KRAS* などの癌関連遺伝子変異を高頻度に認めること、卵巣子宮内膜症性嚢腫の内部では変異を持った内膜症細胞がクローン性に増殖しているのに対し、子宮内膜では腺管単位で多様な変異を有していることを明らかにしている (Suda *et al. Cell Reports* 2018)。また、1312 本の子宮内膜腺管のシークエンスの結果、子宮内膜における遺伝子変異量は加齢や月経回数に相関しており、子宮内膜の解剖学的位置情報を加味した全ゲノム解析では、変異クローンが子宮内膜の一定領域を占拠していることを同定している (Yamaguchi *et al. Nat Commun* 2022)。さらに独自の組織透明化技術を用いた子宮内膜腺の 3 次元構造解析により、基底層で子宮内膜腺管が地下茎様の網目状構造を呈し、この構造は月経期にも剥離せずに構造が保たれていることを発見し、子宮内膜の組織学的解釈を根底から覆すことになった (Yamaguchi *et al. iScience* 2021)。

この地下茎構造により、月経後でもゲノム異常を持った子宮内膜腺管が維持され、変異クローンが子宮内膜の一定領域を占拠し続けることになる。また、子宮腺筋症においても透明化技術を用いた 3 次元構造解析により、子宮内膜上皮が直接子宮筋層に入り込み、アリの巣状のネットワークを子宮筋層内に形成していることを明らかにしている (Yamaguchi *et al. iScience* 2021)。以上、我々は、これまで分子生物学的アプローチを用いて子宮内膜が子宮内膜症の発生起源である可能性を追求してきた。また、三次元構造解析により子宮腺筋症の新たな病巣の概念を明らかにしている。

本研究では、子宮内膜症・子宮腺筋症症例の異所性内膜上皮および正所性内膜上皮のゲノム情報に注目して、子宮内膜が子宮内膜症・子宮腺筋症の発生起源である分子生物学的エビデンスを創出し、子宮内膜ゲノム情報に基づいて子宮内膜症・子宮腺筋症発症リスクを予測することを目的とした。最終的に、本研究で創出したエビデンスに基づいて子宮内膜症・子宮腺筋症の新規予防法の開発を目指して解析を行った。

本研究期間に子宮内膜症および子宮腺筋症症例に対して臨床検体収集を行い、最終的に子宮内膜症 90 例、子宮腺筋症 40 例を保存することが可能であった。子宮内膜症 90 例のうち、77 例で 1 症例あたり 2 個以上の内膜症上皮を有するブロックを収集・保管できており、子宮内膜症と正常子宮内膜のペアサンプルは 18 例であった。また子宮腺筋症 40 例のうち、全例で正常子宮内膜をペアサンプルとして保管できており、子宮腺筋症部位のマルチサンプリングも実施している。子宮腺筋症+卵巣子宮内膜症+正常子宮内膜の同時採取症例は 7 例であった。

そのうち、子宮腺筋症 23 症例からレーザーマイクロダイセクション法を用いて子宮腺筋症上皮 44 検体、子宮腺筋症間質 13 検体、正常子宮内膜上皮 57 検体を選択的に回収してゲノム解析を実施した。子宮腺筋症では *KRAS* 遺伝子変異が最も高頻度に認められた。子宮腺筋症症例の正常子宮内膜においても *KRAS* 遺伝子変異を高頻度に認めており、子宮腺筋症の発生に *KRAS* 遺伝子に代表される癌関連遺伝子の異常が関与していることが明らかと

なった。現在、論文を投稿している。子宮内膜症症例のレーザーマイクロダイセクションにおいて、プロトコルを改訂し、微量のサンプルからレーザーマイクロダイセクション後に DNA と RNA を同時に抽出することができるようになった。今後、子宮内膜症および子宮腺筋症における癌関連遺伝子の意義を変異アリアル特異的遺伝子発現を検討していく。

子宮内膜 296 サンプルについて組織透明化を行い、シート顕微鏡による撮影を終了し、正常子宮内膜の 3 次元構造解析を進めている。3 次元構造とゲノム情報を統合するために、子宮内膜の透明化後組織から DNA を抽出したが、凍結組織から抽出した DNA に比べ、断片化が進んでいることを確認した。子宮腺筋症の組織透明化後組織についても抽出された DNA は同様の quality であったが、1 分子シーケンス法を応用して、ライブラリ作成に成功した。シーケンスは完了し、全ゲノムシーケンス解析を実施している。子宮内膜から子宮筋層

正常子宮内膜組織から子宮内膜オルガノイド樹立を行い、14 症例で安定培養に成功している。また単一腺管から子宮内膜オルガノイド樹立を行い、5 症例 15 個のオルガノイドを樹立可能であった。単一腺管由来のオルガノイドは、元の腺管と同じ遺伝子変異であることを確認し、継代しても変化がないことを確認した。CRISPR-Cas9 を用いてオルガノイド 2 例に *KRAS*G12V knock-in を実施したがオフターゲットを認めたため、別の方法で *KRAS* 変異陽性オルガノイドの樹立を進めている。

最後に、月経中の腹腔内への逆流月経血、経腔的に排出される月経血内に腺管が存在することを確認、回収することが可能であった。月経血内の腺管は DNA が抽出できたのに対し、逆流月経血内の腺管から DNA 抽出は困難であった。

2. 顕著な成果

(1) 子宮内膜症および子宮腺筋症の分子基盤整備

概要：(200 字程度)

子宮内膜症・子宮腺筋症とペアとなる子宮内膜のゲノム異常（遺伝子変異およびコピー数変化）を整理し、正常子宮内膜から子宮内膜症および子宮腺筋症への連続性を明らかにすることが可能であった。本研究データを基盤として、さらに子宮内膜症・子宮腺筋症とペアとなる子宮内膜のゲノム情報を収集していくことで、子宮内膜ゲノムデータから子宮内膜症および子宮腺筋症の発症予測モデル開発が進んでいくと期待される。

(2) 単一腺管由来のオルガノイド樹立

概要：(200 字程度)

これまで正常子宮内膜オルガノイドについては、Turco ら (*Nat Cell Biol* 2017) をはじめ複数のグループから報告があった。しかし、正常子宮内膜が、腺管毎に異なる遺伝的背景を持った多様な組織であり、正常子宮内膜におけるゲノム異常の意義を検討するには不適であった。また単一細胞由来のオルガノイド樹立は非常に成功率が低く、実用的ではなかった。我々は、先行研究において単一腺管がモノクローナルであることを明らかにしており、本研究において単一腺管由来正常子宮内膜オルガノイド樹立に成功にしており、今後の子宮内膜研究の発展に大きく貢献できる。

(3) 3 次元構造解析とゲノム解析の融合

概要：(200 字程度)

先行研究で同定した子宮内膜地下茎構造とゲノム異常を評価するために、1 分子シーケンス法を応用した新しいゲノム評価方法を開発した。これまで組織透明化後のサンプルから抽出された DNA は分解が進んでおり、ゲノム解析が困難であったが、本手法を用いることでゲノム異常がどの構造上に存在するのか、空間的に評価できるようになり、子宮内膜症・子宮腺筋症だけでなく、さまざまな疾患の病態解明に応用可能である。

(4) 微量サンプルのレーザーマイクロダイセクション後の核酸抽出

概要：(200 字程度)

これまでレーザーマイクロダイセクション後のサンプルから抽出された核酸は、その品質が問題であった。今回、レーザーマイクロダイセクション中のサンプルの温度管理から DNA/RNA 抽出までのプロセスを見直し、ゲノム解析・トランスクリプトーム解析可能な品質の DNA/RNA 抽出が可能になった。同一サンプルよりゲノムおよびトランスクリプトームデータを取得することで、変異アレル特異的遺伝子発現を検証でき、遺伝子変異の病的意義を調べることができるため、ゲノム異常が病態に与える影響を明らかにすることができる。

We focused on the eutopic endometrium, believed to be the origin of both endometriosis and adenomyosis. We integrated genomic and three-dimensional structural analysis to elucidate the mechanisms underlying the development of these disorders. In particular, we aimed to identify molecular signatures in the eutopic and ectopic endometrial epithelium that could provide predictive markers and inform the development of preventive strategies.

To generate molecular evidence supporting the hypothesis that eutopic endometrial tissue is the source of both endometriosis and adenomyosis, we performed comparative genomic analysis on paired eutopic and ectopic endometrial samples. We collected and preserved samples from 90 cases of endometriosis and 40 cases of adenomyosis. Among endometriosis cases, 77 had sufficient epithelial cells for analysis, and 18 provided paired samples of eutopic and ectopic endometrial tissue. For adenomyosis, paired normal endometrium was obtained in all 40 cases, with multi-regional sampling of adenomyotic lesions. Notably, 7 cases yielded simultaneous samples of adenomyosis, ovarian endometriosis, and eutopic endometrium.

From 23 adenomyosis cases, we selectively obtained 44 epithelial, 13 stromal, and 57 eutopic endometrial epithelial samples using laser microdissection. Genomic analysis revealed that *KRAS* mutations were the most frequent alterations in adenomyotic epithelium. Interestingly, *KRAS* mutations were also present in the eutopic endometrial epithelium from the same adenomyosis cases, suggesting a shared mutational origin. These results support the notion that cancer-related genetic alterations, particularly in *KRAS*, are implicated in adenomyosis pathogenesis. Our manuscript describing these findings is currently under peer review.

To enhance analytical depth, we revised our laser microdissection protocol for endometriosis samples to allow concurrent extraction of DNA and RNA from endometrial tissue. This development enables future investigation of allele-specific gene expression profiles in both disorders.

In parallel, we completed tissue clearing of 296 endometrial specimens, followed by high-resolution imaging. We confirmed that DNA extracted from post-clearing tissue was significantly fragmented compared to DNA extracted from frozen tissue. Nevertheless, we successfully generated single-molecule sequencing libraries from these samples. Sequencing of cleared tissues from adenomyosis cases has been completed, and whole-genome analysis is currently underway to map the spatial distribution of mutations from the endometrium to the myometrium.

Additionally, we established organoids from normal endometrial tissue in 14 cases and successfully cultured organoids from single glands in 5 cases. Organoids retained the same mutational profiles as their source glands, and these mutations remained stable through serial passaging. Using CRISPR-Cas9, we introduced *KRAS* G12V mutations into two organoids; however, off-target effects prompted a shift toward alternative genome editing approaches to establish *KRAS*-mutated models more precisely.

Finally, we identified and recovered glandular structures from both retrograde menstrual blood and vaginally discharged menstrual blood. DNA extraction was successfully performed on glands in vaginally expelled blood, but DNA from retrograde flow samples proved challenging to isolate. These findings suggest that retrograde endometrial ducts may represent viable sources for ectopic implantation, yet technical hurdles remain for molecular characterization.

Through a combination of genomic, transcriptomic, and three-dimensional structural analyses, we have generated substantial evidence supporting the hypothesis that the eutopic endometrium is the cellular and molecular origin of both endometriosis and adenomyosis. Our data reveal clonal persistence of mutated glands, the structural basis for lesion formation, and the functional role of *KRAS* mutations in disease development. This study establishes a foundation for developing molecular diagnostics and preventive interventions based on endometrial profiling. Moving forward, integration of allele-specific expression and spatial mutation mapping will provide additional insight into disease pathogenesis and offer new therapeutic targets.