

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：32203

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16820

研究課題名(和文) Napsin A発現に関わる転写因子解析結果を基盤とした卵巣明細胞癌発生機序解析

研究課題名(英文) Transcription factor analysis involved in Napsin A expression in ovarian clear cell carcinoma

研究代表者

岩本 雅美 (Iwamoto, Masami)

獨協医科大学・医学部・協力研究員

研究者番号：30826649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Napsin Aは末梢型肺腺癌のマーカーとして知られているが、女性生殖器より発生する明細胞癌においても高発現する。しかし明細胞癌においてNapsin Aが発現する機序は不明である。本研究では、NAPSA遺伝子活性化に関与する転写因子4種類(A, B, C, D)の遺伝子導入が形質変化に及ぼす影響を解析した。結果、候補転写因子D導入株および、転写因子CとDを共発現させた細胞株において、Napsin Aの発現亢進傾向がみられた。これらが卵巣明細胞癌におけるNapsin Aの発現に与える影響は限定的かもしれないが、Napsin A発現に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣明細胞癌は本邦において多く見られ、化学療法に対する感受性が低いことから進行例は予後不良な腫瘍である。卵巣明細胞癌においてNapsin Aが高発現していることは広く知られるところとなったが、その発現機序はいまだ明らかにされておらず、本研究結果はその解明に一步近づいたと言える。卵巣癌において明細胞癌に比較的特異的に発現するNapsin Aの発現機序の一端を明らかにした本研究結果は、腫瘍発生メカニズムの解明に繋がるものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Napsin A is known as a marker for peripheral-type lung adenocarcinoma, but it is also frequently expressed in clear cell carcinoma of the ovary and endometrium. However, the mechanism of Napsin A expression in clear cell carcinoma remains unresolved. In this study, we analyzed transactivators that may be involved in NAPSA gene activation, focusing upon four kinds of transcription factors (A, B, C, and D). As a result, Napsin A expression tended to be increased by transcription factor D and by co-expression of two kinds of transcription factors C and D. This study could provide valuable insights in tumorigenesis of ovarian clear cell carcinoma.

研究分野：病理学、婦人科腫瘍、卵巣腫瘍

キーワード：卵巣癌 明細胞癌 Napsin A 転写因子解析

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌の罹患者数、死亡者数は近年増加傾向にあり、本邦では欧米諸国と比して明細胞癌の占める割合が高い。明細胞癌は高異型度腺癌であり化学療法の感受性が低く、特に進行期症例では予後不良な組織型である。卵巣明細胞癌の発生機序については、その50~70%に子宮内膜症が関連していること、免疫組織学的に HNF-1 陽性を示すこと、分子病理学的には *ARID1A* や *PIK3CA* 変異例が多いことなどが知られているが、いまだ不明な点も多い。研究代表者は、卵巣および子宮内膜から発生する明細胞癌において、Napsin A が高頻度に発現していることを免疫組織学的に明らかにし¹⁾、その後も同様の報告が多数なされ、今日の病理診断において Napsin A は明細胞癌の診断に有用なマーカーとして認知されるに至っている。

Napsin A は、肺胞サーファクタント蛋白の成熟に關与するアスパラギン酸プロテアーゼで、II 型肺胞上皮細胞の細胞質内において肺サーファクタント蛋白 B の前駆体を切断する機能を有しており、末梢型肺腺癌においても高率に発現していることから、肺腺癌の病理診断マーカーの一つとして用いられている。一般に病理診断マーカーとして使用される分子は、腫瘍の発生母地とされる細胞において特異的に発現している。正常組織における Napsin A の局在は、II 型肺胞上皮や腎尿細管に限定されており、末梢気道上皮の形質を有する肺腺癌細胞や、尿細管の形質を有する腎細胞癌における Napsin A の発現は reasonable である。一方、正常卵巣組織や子宮内膜組織には Napsin A を発現する細胞は認めないことから、卵巣・子宮内膜から発生する明細胞癌に Napsin A が発現していることは大きな疑問であり、その意義や発現機序についてはいまだ不明のままである。卵巣明細胞癌における Napsin A の発現機序を明らかにすることは、卵巣腫瘍発生メカニズムの解明にも繋がると考え、本研究を行った。

2. 研究の目的

本研究では、卵巣明細胞癌における Napsin A 発現に關わる転写因子を同定し、Napsin A の発現機序と発現意義を分子病理学的に明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究材料として、卵巣明細胞癌細胞株 8 種 (OVISe, OVTOKO, HAC-2, RMG-1, JHOC-5, JHOC-7, JHOC-8, JHOC-9) 卵巣類内膜癌細胞株 1 種 (OVK18#102) 肺腺癌細胞株 2 種 (H358, H441) を用いた。肺組織および肺腺癌は Napsin A を発現することが知られているため、Napsin A の発現機序を解析する本研究において、肺腺癌細胞株を比較解析に用いることは有用であると考えた。これらの培養細胞から抽出したタンパク質、RNA などを用いて本研究を行った。

(1) 培養細胞株における Napsin A 発現状態の検索

ウェスタンブロッティング法

培養細胞株から抽出したタンパク質を用いて、各培養細胞株における Napsin A の発現状態を確認した。

Real-time PCR 法

培養細胞株から抽出した RNA より合成した cDNA を用いて、各培養細胞株における RNA レベルでの *NAPSA* (Napsin A の DNA および RNA) の発現状態を定量的に確認した。

(2) Napsin A 発現に關与する転写活性部位の検索 (プロモーター解析)

卵巣における *NAPSA* プロモーターの検索を目的とし、以下の手法を用いてプロモーター解析を行った。データベースを用いた検討により、肺、腎臓、卵巣において Napsin A が発現される場合に活性化される *NAPSA* プロモーターは同一であることを確認した上で、肺腺癌細胞株を用いて作製した完全長の *NAPSA* プロモーターを鋳型として、鎖長の異なるプロモーター鎖を作製した。作製したプロモーター鎖を、Napsin A の発現を認める卵巣明細胞癌株 (JHOC-7, JHOC-9, OVISe) に導入し、*NAPSA* プロモーター鎖長の短縮に伴うプロモーター活性の変化を解析 (Luciferase assay) し、Napsin A の転写活性に重要な領域を検索した。

(3) 候補転写因子の検索、および Napsin A 発現に及ぼす影響の解析

候補転写因子の検索

NAPSA プロモーター発現に關与し得る転写因子について、プロモーター解析ソフト (Genomatix) を用いて検索した。その結果とプロモーター解析の結果を合わせ、転写活性に重要と考えられる領域に結合し得る候補転写因子を挙げた。

候補転写因子発現ベクターの作製

上記で明らかとなった候補転写因子 *A*, *B*, *C* を発現する、レトロウイルスベクターを作製した。作製した発現ベクターを、Napsin A の発現がほとんど認められなかった卵巢癌細胞株 (OVTOKO, HAC-2, RMG-1, JHOC-5, OVK18#102) に遺伝子導入し、目的とする遺伝子を安定発現する細胞株を樹立した。各候補転写因子を導入することにより、Napsin A 発現が誘導されるか否か、Real-time PCR 法を用いて解析した。

軽度の Napsin A 発現亢進を認めた転写因子 *C* 導入株については、On-chip SPiS を用いて single cell 化した細胞株も樹立して解析することで、より Napsin A の発現亢進が見られる細胞株を得た。

また、Real-time PCR 法による検索で、すべての卵巢明細胞癌細胞株で発現しているのに対し、卵巢類内膜癌細胞株ではほとんど発現を認めなかった候補転写因子 *D* についても発現ベクターを作製し、卵巢類内膜癌細胞株へ遺伝子導入することで、Napsin A の発現を誘導するかを解析した。さらに、候補転写因子 *C* と *D* をタンデムに配置した発現ベクターの作製および遺伝子導入細胞株も作製し、併せて Napsin A 発現の変化を解析した。

4. 研究成果

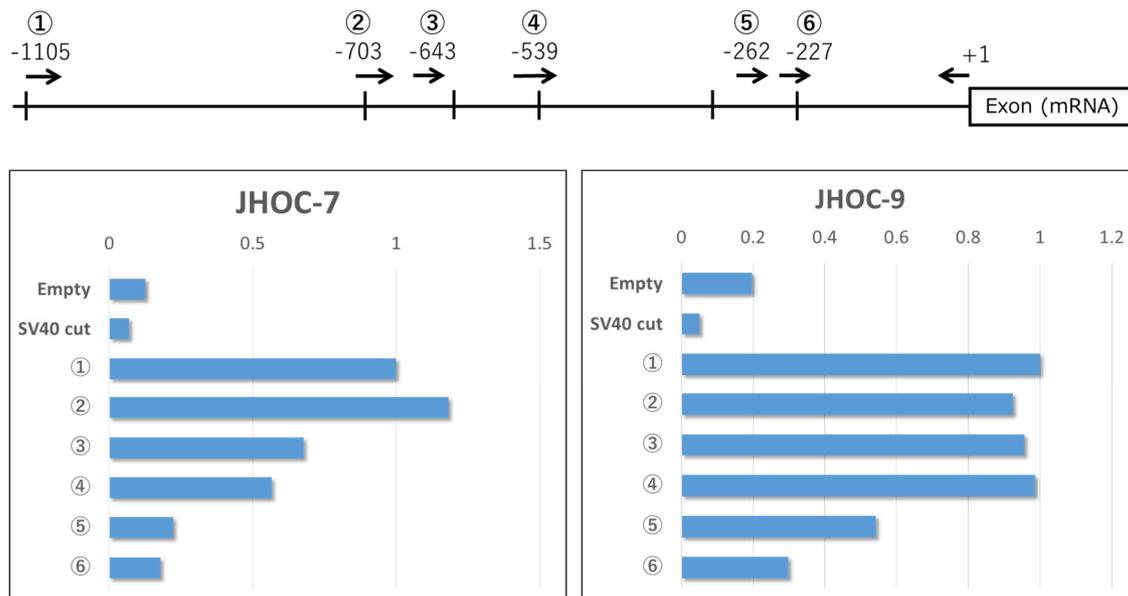
(1) 卵巢明細胞癌細胞株における Napsin A の発現

卵巢明細胞癌細胞株 3 種 (JHOC-7, JHOC-9, OVISe) と肺腺癌細胞株 (H441) において、ウェスタンブロッティング法で Napsin A タンパク質の発現が、Real-time PCR 法で Napsin A の mRNA (*NAPSA*) の発現が確認できた。卵巢明細胞癌細胞株の Napsin A 発現は、肺腺癌細胞株と比して低かった。

(2) プロモーター解析による転写活性部位の検索

肺腺癌細胞株、卵巢明細胞癌細胞株ともに、*NAPSA* プロモーターの上流域に重要な活性化領域の存在が示唆された。中でも大きな変化が見られたプロモーター領域をさらに細分化し、転写活性により重要であると考えられる領域を検索した結果、図 1 に示すと の間に重要な転写活性化領域の存在が示唆された。同部位には、候補転写因子の結合部位が存在することも確認した。

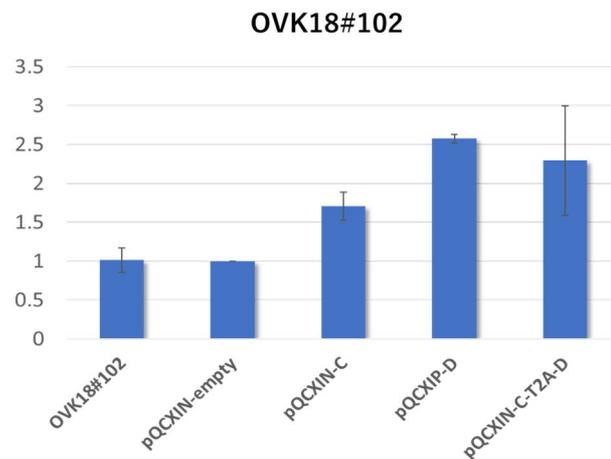
図 1. *NAPSA* プロモーターの鎖長短縮に伴うプロモーター活性の変化 (Luciferase assay)



(3) Napsin A 発現変化に影響し得る候補転写因子の同定

候補転写因子 *A*, *B*, *C* を、Napsin A の発現がほとんど認められなかった卵巢癌細胞株 5 種に遺伝子導入し、Real-time PCR 法にて *NAPSA* 発現の変化を解析した。その結果、候補転写因子 *A* を導入した細胞株のうち数種において、*NAPSA* 発現はわずかに低下していた。候補転写因子 *B* 導入株では、一定の傾向はつかめなかった。一方、候補転写因子 *C* を導入した細胞株のうち数種で、軽度の *NAPSA* 発現亢進を認めた。類内膜癌細胞株 (OVK18#102) を用いて行った、候補転写因子 *D* の導入および、候補転写因子 *C* と *D* の共発現の結果、遺伝子導入前と比して 2~2.5 倍の *NAPSA* 発現亢進が確認できた。以上の結果は、候補転写因子 *A*~*C* 単独導入株よりも高い発現亢進傾向を示すものであった。

図2. 卵巣癌細胞株に対する遺伝子導入による NAPS A 発現の変化 (Real-time PCR 法)



肺腺癌細胞株と同程度となるような強力な転写活性化を引き起こす転写因子の発見には至っていないため、卵巣明細胞癌における Napsin A の発現に与える影響は限定的かもしれないが、これらの転写因子が Napsin A 発現に関与している可能性は示唆された。このことは、卵巣明細胞癌において Napsin A が高発現する機序の解明に一步近づいたと考える。今後は、NAPS A プロモーター領域への当該転写因子の局在および結合の確認、遺伝子導入により惹起される形態学的変化の観察などを行い、研究を継続していく。

<引用文献>

1. Iwamoto M, Nakatani Y, Fugo K et al. Napsin A is frequently expressed in clear cell carcinoma of the ovary and endometrium. *Hum Pathol* 2015; 46: 957-962

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Yanaihara N, Yoshino Y, Noguchi D, Tabata J, Takenaka M, Iida Y, Saito M, Yanagida S, Iwamoto M, Kiyokawa T, Chiba N, Okamoto A | 4. 巻 168 |
| 2. 論文標題 Paclitaxel sensitizes homologous recombination-proficient ovarian cancer cells to PARP inhibitor via the CDK1/BRCA1 pathway | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Gynecol Oncol | 6. 最初と最後の頁 83-91 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygyno.2022.11.006. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Takahashi K, Kobayashi Y, Sato M, Nagae S, Kondo I, Funaki S, Sato T, Konishi A, Ito Y, Kamide T, Hoshina T, Kanuka H, Kobayashi M, Sakurai Y, Iwamoto M, Takahashi H, Samura O, Okamoto A | 4. 巻 42 |
| 2. 論文標題 Clinical outcomes in pregnant women with coronavirus disease 2019 in a perinatal medical center in Japan: a retrospective study of the first 1 year of the pandemic | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 J Obstet Gynecol | 6. 最初と最後の頁 2684-2692 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/01443615.2022.2082277. | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Matsuoka A, Tate S, Nishikimi K, Iwamoto M, Otsuka S, Shozu M | 4. 巻 36 |
| 2. 論文標題 Validity of the 2014 FIGO Stage IIIA1 Subclassification for Ovarian, Fallopian Tube, and Peritoneal Cancers | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 In vivo | 6. 最初と最後の頁 2453-2460 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/invivo.12980 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Ishii J, Yazawa HS, Kashiwagi K, Nakadate K, Iwamoto M, Hiramatsu CM, Masawa M, Onozaki M, Noda S, Miyazawa T, Takagi M, Yazawa T | 4. 巻 53 |
| 2. 論文標題 Endocrine granule production is caused by a lack of REST and intragranular secretory content and accelerated by PROX1 | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Molecular Histology | 6. 最初と最後の頁 437-448 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10735-021-10055-5 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Masawa M, Sato-Yazawa H, Kashiwagi K, Ishii J, Miyata-Hiramatsu C, Iwamoto M, Kohno K, Miyazawa T, Onozaki M, Noda S, Shimizu Y, Niho S, Yazawa T | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 REST Inactivation and Coexpression of ASCL1 and POU3F4 Are Necessary for the Complete Transformation of RB1/TP53-Inactivated Lung Adenocarcinoma into Neuroendocrine Carcinoma | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 The American Journal of Pathology | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ajpath.2022.03.007 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Kawakami F, Yanai H, Teramoto N, Miyama Y, Yasuda M, Minamiguchi S, Iwamoto M, Kiyokawa T, Mikami Y | 4. 巻 - |
| 2. 論文標題 Concordance Between Biopsy and Resection Diagnoses of Uterine Cervical Adenocarcinoma According to the Updated World Health Organization 2020 Classification: A Multi-Institutional Study Elucidating Real-World Practice in Japan | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Archives of Pathology & Laboratory Medicine | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5858/arpa.2023-0360-0A | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Komatsu K, Masuda Y, Iwauchi A, Kubota H, Iida M, Ichihara K, Iwamoto M, Kawai K, Yamamoto N, Shimoda M, Nakano T | 4. 巻 50 |
| 2. 論文標題 Lens capsule pathological characteristics in cases of intraocular lens dislocation with atopic dermatitis | 5. 発行年 2024年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Cataract & Refractive Surgery | 6. 最初と最後の頁 611 ~ 617 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/j.jcrs.0000000000001413 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 鵜飼なつこ, 岩本雅美, 小峯多雅, 上田薫, 鷹橋浩幸, 下田将之 |
| 2. 発表標題 肝原発神経内分泌癌の一部検例 |
| 3. 学会等名 第111回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岩井信之介, 岩本雅美, 坂口涼子, 伊藤聡, 田畑知佳, 川畑絢子, 飯田泰志, 永江世佳, 清川貴子, 岡本愛光 |
| 2. 発表標題 子宮悪性腫瘍の術前診断における細胞診の有用性について |
| 3. 学会等名 第62回日本臨床細胞学会春期大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岩本雅美 |
| 2. 発表標題 これだけは知っておこう卵巣腫瘍の病理：術中迅速診断の実際 |
| 3. 学会等名 第75回日本産科婦人科学会学術集会（招待講演） |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鶴飼なつこ, 岩本雅美, 深澤寧, 本間志功, 佐竹真理, 川畑絢子, 清川貴子 |
| 2. 発表標題 診断に苦慮した子宮頸部胃型HPV非依存性腺癌の1例 |
| 3. 学会等名 第56回日本婦人科病理学会学術集会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 細川清一, 伊藤聡史, 岩本雅美, 鷹橋浩幸, 下田将之, 清川貴子 |
| 2. 発表標題 記述式内膜細胞診報告様式におけるATECの細胞学的特徴および組織診断との比較検討 |
| 3. 学会等名 第64回日本臨床細胞学会春期大会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 川上史, 柳井広之, 南口早智子, 美山優, 安田政実, 寺本典弘, 岩本雅美, 清川貴子, 三上芳喜 |
| 2. 発表標題 子宮頸部腺癌のWHO分類第5版(2020)は生検診断においても有効か |
| 3. 学会等名 第112回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 矢澤華子, 柏木惟人, 石井順, 河野翔, 岩本雅美, 小野崎聖人, 野田修平, 金野晃大, 宮澤公輔, 矢澤卓也 |
| 2. 発表標題 RB1/TP53不活化肺腺癌細胞はREST不活化と神経特異的転写因子共発現により神経内分泌癌に形質転換する |
| 3. 学会等名 第112回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2023年 |

〔図書〕 計3件

| | |
|-------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 岩本雅美 | 4. 発行年 2023年 |
| 2. 出版社 文光堂 | 5. 総ページ数 264 |
| 3. 書名 腫瘍病理鑑別診断アトラス 子宮体癌第2版 | |

| | |
|----------------------|-----------------|
| 1. 著者名 岩本雅美, 清川貴子 | 4. 発行年 2021年 |
| 2. 出版社 文光堂 | 5. 総ページ数 183 |
| 3. 書名 胎盤病理アトラス | |

| | |
|---------------------------------------|-----------------|
| 1. 著者名 岩本雅美 | 4. 発行年 2024年 |
| 2. 出版社 文光堂 | 5. 総ページ数 257 |
| 3. 書名 腫瘍病理鑑別診断アトラス 卵巣腫瘍・卵管癌・腹膜癌第2版 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
| | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |