

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09533

研究課題名（和文）卵巣腫瘍の浸潤転移における核の剛性維持蛋白ラミンの役割の解明

研究課題名（英文）Significance of Lamins as nuclear stiffness maintenance protein on ovarian cancer invasion and metastasis

研究代表者

齊尾 征直（SAIO, MASANAO）

群馬大学・大学院保健学研究科・教授

研究者番号：40242721

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：悪性腫瘍において核膜蛋白Laminの発現量の変化について複数の研究が行われているが、対象の臓器毎にその結果は異なっている。初年度には卵巣の4大上皮性腫瘍の検討を原発巣について行い、次年度は卵巣漿液性腺癌において3種類のLaminの発現量の評価を原発巣と転移巣について比較検討し、最終年度は明細胞癌について、次年度と同様の方法でEmerinも加えて検討を行った。各癌でLaminやEmerinの発現パターンは異なり、漿液性癌で原発巣とリンパ節転移巣の発現パターンの違いがあることも分かり、期間内英文2本が発表できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、核内の蛋白の研究が病理学的にはなかなか進んでいない所を卵巣の4大癌（漿液性癌、明細胞癌、類内膜癌、粘液癌）について、主に核膜の裏打ちをして核の剛性を維持しているLaminやLaminと結合している核膜蛋白の一つで核形状の維持に関与しているEmerinについて検討し、4つの腫瘍で発現パターンが異なり、核形状との関係性もさまざまであることが理解できた。また2年目の研究では核の形態の維持だけではなく、Laminの発現が漿液性癌の形態の変化にも寄与していることを示すことができた。すなわち病理形態学的な腫瘍構造の特徴に核ラミナ及び核膜蛋白が寄与することを示唆しており、意義深い。

研究成果の概要（英文）：Several studies have been conducted on changes in the expression of the nuclear membrane protein Lamin in malignant tumors, but the results vary depending on the organ being studied. In the first year, we examined the four major epithelial tumors of the ovary in the primary lesions. In the second year, we compared the expression levels of three types of Lamin in ovarian serous adenocarcinoma in the primary lesions and metastatic lesions, and in the final year, we examined clear cell carcinoma for Lamins and Emerin using the same method as in the second year. We found that the expression patterns of Lamin and Emerin differed in each cancer, and that there were differences in the expression patterns between the primary lesions and lymph node metastases in serous carcinoma, and two English papers were published during the period.

研究分野：病理学

キーワード：Lamin Emerin 卵巣癌 コンピュータ支援画像解析

1. 研究開始当初の背景

核は細胞の中央に位置し、真核生物では核膜に覆われている。核膜はその直下に「核ラミナ」という構造をもち、核膜に発現する蛋白と核内の蛋白や核酸の橋渡しをするメッシュワークのような構造で、核の構造維持に関わる。この核ラミナの主体は「ラミン」という核のみに局在する中間径フィラメントであり、肺の小細胞癌ではラミン A が欠損することで核が大きさを維持できないことが知られている (Broers, JL et. al. Am J Pathol 1993; 143: 211-220.)。他方核は細胞内でもっとも剛性の高い構造であり、近年ラミンを欠損させた細胞では浸潤能を測る in vitro の細胞遊走アッセイで、浸潤能が高まることが知られている (Wang, Y et. al. Gynecol Oncol 2019; 152: 166-176.)。しかし、未だ臨床検体で核の剛性に寄与するラミンの発現の有無と浸潤転移能との関連性の検討はされず、卵巣癌でも未だ検討されていない。

2. 研究の目的

本研究では特に核ラミナ蛋白の主成分であるラミン A,B,C 分子とそれに結合するエメリンの欠如の有無を卵巣癌原発巣と 3 大転移様式「腹膜播種 (播種性) リンパ節転移 (リンパ行性) 遠隔転移巣 (血行性)」との間で比較検討することで卵巣癌のどの転移様式と核の剛性の欠如が関連するのかを明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

本研究では卵巣癌の原発巣と転移巣 (リンパ節転移、遠隔転移、腹膜播種) におけるラミンとその関連分子の発現パターンの違いを比較検討することで、どの転移様式で最も核の剛性の低下が転移形成に寄与しているかを卵巣の 4 大癌別に明らかにし、その上で、ラミン欠損が与える分子発現の影響を卵巣がん細胞株を用いて解析することで特定し、ラミン欠損と浸潤転移の機序に関する卵巣癌での新規分子候補を探索する。具体的には以下の 4 つに絞って検討したが、については培養株での Transwell assay まで施行できたが、次世代シーケンサ解析までには至らなかった。

卵巣癌原発巣の検討：ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を用いて、卵巣の 4 大癌の原発巣におけるラミン A,B,C やラミンと結合する核膜蛋白であるエメリンの発現の違いを明らかにする。

転移巣の検討：卵巣癌の FFPE 組織を用いて、リンパ節転移巣、遠隔臓器転移巣、腹膜播種結節ラミン A,B,C やエメリンの発現パターンを検討する。

の結果を比較検討し転移様式特異的なラミンやその関連分子の欠損パターンを特定する。

～ と平行して卵巣癌細胞株を用いてラミンやエメリンのノックダウン時と非ノックダウン時での mRNA 発現の違いを次世代シーケンサで検討し、ラミン欠損によって影響を受ける分子を特定し、今後の研究のターゲット分子の特定を試みる。

4. 研究成果

2021 年度

本年度は、群馬大学医学部附属病院で外科的に切除された卵巣癌 140 症例を解析した。概略は、まず HE 標本と WT-1, HNF1-, estrogen 受容体, Cytokeratin20, Vimentin 染色標本を作製し各腫瘍の組織型の確定を行った。(高異型度漿液性癌 (HGSCa): 38 例, 明細胞癌 (CCCa): 63 例, 類内膜癌 (EMCa): 25 例, 粘液癌, (MUCa): 14 例。)次に Feulgen 染色および Lamin A と emerin の免疫組織化学染色を行った。各標本の任意の 5 か所を撮影し、その画像を画像解析ソフトで解析した。その結果、腫瘍細胞の核の形状因子 (面積・核周囲長・真円度) は、EMCa は、CCCa に比べて有意に小さく、EMCa では CCCa に比べて腫瘍細胞の核は有意に小さかった。他方、Lamin A 陽性の核の比率と核の形状因子との相関は、CCCa と EMCa では核の面積と相関があり、CCCa、EMCa、MUCa では核周囲長と相関があった。他方、HGSCa と EMCa では核の真円度と負の相関があった。Emerin の陽性率と核形状の諸因子との相関は、HGSCa では真円度と相関があり、CCCa では核面積と正の相関があったが、他の因子との相関はなかった。本研究の結果から、4 組織型間で核の形状を比較した場合には、EMCa は最も核が小さく、核の大小不同が軽度であり、CCCa では大型の核や核の大小不同性も目立つことが明らかとなった。HGSCa が教科書的には核異型が強

いといわれていたが、本研究では CCCa が 4 組織型中では最も核の変化が目立つ腫瘍である可能性が示唆され、新しい知見であった。また、核膜タンパク発現の解析では、核形状維持には Emerin の発現よりも Lamin A の発現が強く寄与していることが示唆され、新規の知見であった。これらのデータをもとに英文作成し、論文掲載に至った。

2022 年度

前年度には卵巣の 4 大上皮性腫瘍の検討を原発巣について行ったが、本年度は卵巣漿液性腺癌において 3 種類の Lamin の発現量の評価を原発巣と転移巣について比較検討した。方法としては、漿液性腺癌と診断された卵巣の手術検体を用いて Lamin A、Lamin B1、Lamin B2 の免疫組織化学染色を行った。その標本を顕微鏡下で観察し、腫瘍部の染色強度を同一症例の正常卵管と比較して低下、増加、不変の 3 つに分類した。その結果、Lamin A では腫瘍部で発現が低下しているものが最も多く、不変が次となり、増加している症例はなかった。Lamin B1 は不変が最多で、低下、増加の順であった。Lamin B2 は低下、不変、増加 3 の順であった。

その後も解析を継続し、症例数を増やしてゆき、標本データをバーチャルスライドスキャナで画像データ化した後に、コンピュータ支援画像解析を行うことで、最終的にリンパ節転移部と原発部の比較検討をするに至り、Lamin A がリンパ節転移巣で原発巣と比較して高い事が分かったとともに、Lamin A、B1、B2 の発現を順位としてそれぞれ順位付けし、その合計で順位和として検討したところ、漿液性癌としての樹脂状構造が保たれているのは Lamin A、B1、B2 の発現が保たれている症例であり、3 つの蛋白の発現が保たれていない症例は充実性の増殖形態を呈することが分かった。

2023 年度

今年度は明細胞癌について、前年度と類似の検討を行った。すなわち、明細胞癌と診断された卵巣の手術検体を用いて Lamin A、Lamin B1、Lamin B2、Emerin の免疫組織化学染色を行った。その標本をに対して、腫瘍部の染色陽性率をコンピュータ支援画像解析で分類した。その結果、3 種類の Lamin や Emerin の陽性率の高い症例と低い症例で、核形態の歪み方が異なることが示唆される結果などを得て、英文投稿中となっている。

なお、核の剛性と Lamin 発現との関係性を検討するために、細胞株を用いた Transwell assay も行い、卵巣の明細胞癌株、大腸がん株でのアッセイを順次遂行したが、大腸癌株では Lamin A、B1、B2、Emerin の発現の多寡に関係なくほとんど Transwell assay で培養皿の穴を抜けて行くことは少なかったが、明細胞癌の細胞株においては 8 μ m の穴と 3 μ m の穴で通り抜けられる程度が Lamin や Emerin の発現量と関係性があるかもしれないデータを得たので、さらなる検討を実施中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watabe, S. Kobayashi, S. Hatori, M. Nishijima, Y. Inoue, N. Ikota, H. Iwase, A. Yokoo, H. Saio, M.	4. 巻 23
2. 論文標題 Role of Lamin A and emerin in maintaining nuclear morphology in different subtypes of ovarian epithelial cancer	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncol Lett	6. 最初と最後の頁 9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/ol.2021.13127	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 Ouchi Miduki, Kobayashi Sayaka, Nishijima Yoshimi, Inoue Naoki, Ikota Hayato, Iwase Akira, Yokoo Hideaki, Saio Masanao	4. 巻 247
2. 論文標題 Decreased lamin A and B1 expression results in nuclear enlargement in serous ovarian carcinoma, whereas lamin A-expressing tumor cells metastasize to lymph nodes	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice	6. 最初と最後の頁 154560 - 154560
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.prp.2023.154560	査読の有無 無
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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大内美月, 小林さやか, 西島良美, 齊尾征直
2. 発表標題 卵巣漿液性腺癌原発巣におけるLamin A, Lamin B1, Lamin B2の卵管との発現比較
3. 学会等名 第68回日本病理学会秋期特別総会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔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
研究分担者	西島 良美 (NISHIJIMA YOSHIMI) (10710733)	群馬大学・大学院保健学研究科・講師 (12301)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	小林 さやか (KOBAYASHI SAYAKA) (80765694)	群馬大学・大学院保健学研究科・助教 (12301)	

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