

平成 21 年 4 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007 年 ～ 2008 年

課題番号：19590341

研究課題名（和文） 肝細胞核内因子（HNF-4 α ）の生物学的解析と病理応用研究課題名（英文） Biological analysis and pathological application of HNF-4 α

研究代表者 梅津 哉

新潟大学・医歯学総合病院・准教授

研究者番号：50251799

研究成果の概要：

核内受容体 HNF-4 α の P1 および P2 プロモーター由来アイソフォーム（P1, P2-HNF4 α ）は臓器によって発現が異なる。胃癌や粘液産生性卵巣癌に特徴的 HNF-4 α アイソフォームの発現が観察され、粘液形質との関連が明らかにされた。腓ランゲルハンス島では P2-HNF4 α が α 細胞に発現することを確認し、HNF4 α の糖代謝への関与について新たな知見を得た。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理

キーワード：核内受容体、HNF-4 α 、組織発現、卵巣癌、胃癌、粘液関連遺伝子

1. 研究開始当初の背景

核内受容体は標的遺伝子の発現を転写レベルで制御し、個体発生・生体維持から代謝調節まで幅広い生命活動に深く関与している。核内受容体の一つである HNF-4 α (hepatocyte nuclear factor-4 α) は内胚葉形成、ことに肝細胞の分化に重要であり、若年型糖尿病 (MODY-1) の責任遺伝子でもある。しかし、免疫染色に使用可能な核内受容体の抗体がほとんどないことから、組織・細胞での発現の詳細は不明であった。

2. 研究の目的

HNF-4 α には P1 および P2 プロモーター由来のアイソフォーム (P1, P2-HNF-4 α) がある。われわれはヒトをはじめ、哺乳類に広範かつ良好に反応し、異なったアイソフォームを認識する抗体を得た。本抗体はパラフィン切片でも良好な染色が得られるため (Jiang S et al. Nucl Recept 2003)、多くの病理組織を含めて検索可能であり、個体発生、腫瘍、脂質代謝などの病理組織を十分に活用することが可能である。本研究では新規抗体を用いて正常組織や病態における HNF-4 α アイソフォームの発現の違いを検討し、病理診断への応用を目的とした。

3. 研究の方法

(1) 分子病理学的手法を用いた HNF-4 α の発現解析：マウスおよびヒトにおける正常成熟組織や各種ヒト病理組織の免疫組織学的検討、および RT-PCR および western blot による HNF-4 α の発現について検討を行った。

(2) HNF-4 α 発現と粘液形質、接着因子および化生との関連の検討：胃癌、卵巣癌での HNF-4 α アイソフォームの発現を免疫組織学的に検討し、胃型粘液形質および腸型粘液形質遺伝子の発現と比較した。

(3) HNF-4 α の核内局在の検討：各種細胞株を用いて共焦点レーザー顕微鏡による観察を行い、他の核内蛋白と比較した。

(4) 正常組織における核内受容体の発現：特に肝と膵について、細胞同定を詳細に行い、HNF-4 α アイソフォームの発現を検討した。

4. 研究成果

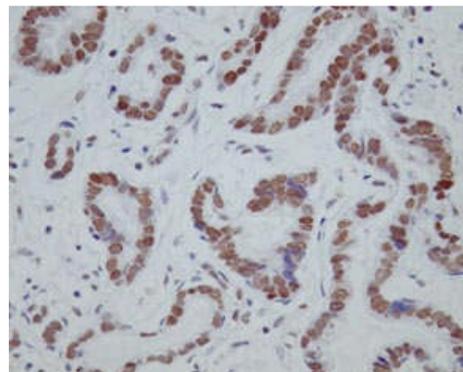
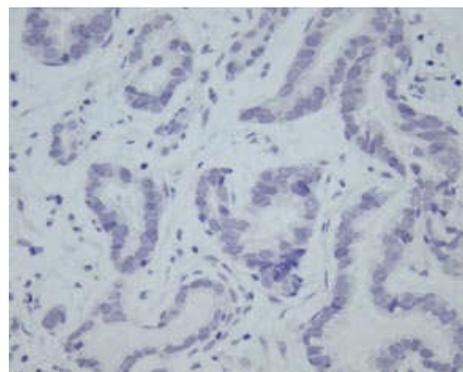
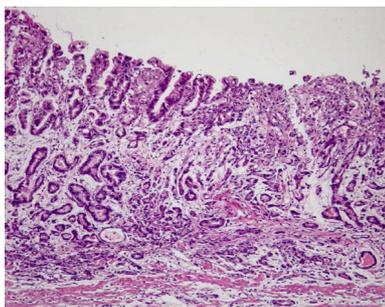
(1) 胃癌における HNF-4 α

正常胃粘膜には P2-HNF-4 α が発現し、腸粘膜には P1 および P2-HNF-4 α が発現した。腸上皮化生胃粘膜上皮には両アイソフォームが発現した。HNF-4 α と粘液形質の比較から、胃癌には胃型と腸型があり、P2-HNF-4 α は両型に発現するが、胃型では P1-HNF-4 α が発現しないことが判明した (Takano et al, 投稿中。下表および下図)。

	P1-HNF4 α positive (%)	P2-HNF4 α positive (%)
gastric-type (n = 13)	1 (7.7)	13 (100)
intestinal-type (n = 11)	9 (81.8)	11 (100)
mixed-type (n = 12)	10 (83.3)	12 (100)

表 高分化早期胃癌の粘液形質からみた胃型と腸型の分類と P1-HNF-4 α および P2-HNF-4 α の発現。

胃型胃癌 (HE)



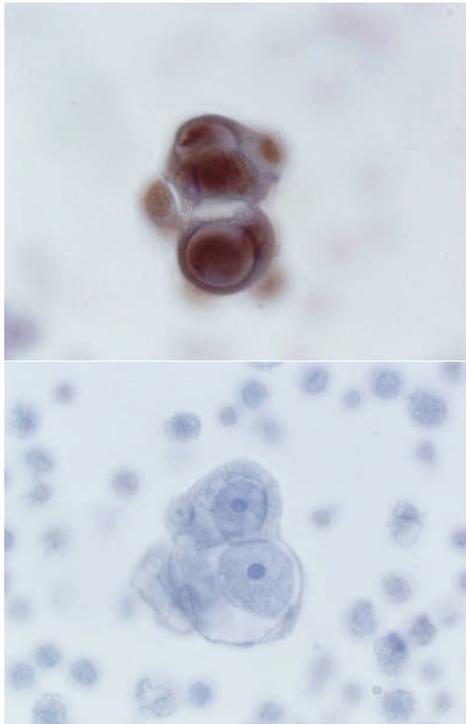
P1-HNF-4 α 陰性 P2-HNF-4 α 陽性
(前組織の免疫染色強拡大)

(2) 卵巣癌における HNF-4 α

HNF4 α は正常卵巣においては発現を認めない。しかし、われわれはたまたま腹水細胞診中の卵巣癌由来の細胞に HNF4 α 陽性細胞を確認した。そこで、卵巣腫瘍 108 例について抗 HNF4 α 抗体 (Clone; K9218=P1 検出、H6939=P2 検出、H1415=P1+P2 検出) を用いて免疫染色を行った。

漿液性腫瘍群、粘液性腫瘍群、類内膜型腺癌、明細胞腺癌の 4 群に分類して検討した。HNF4 α :P1+P2 の発現は漿液性腫瘍群；0/37 例 (0%)、粘液性腫瘍群；41/44 例 (93%)、類内膜型腺癌；0/15 例 (0%)、明細胞腺癌；1/12 例 (8%) で、粘液性腫瘍群における HNF4 α の発現が他群に比し有意に高率であった。また、粘液性腫瘍群における HNF4 α :P1 の発現については、腺腫；8/26 例 (45%)、境界悪性；3/7 例 (43%)、腺癌；9/11 例 (82%) と悪性度が高度になるに従い、HNF4 α :P1 の発現が高率に確認された。

以上、免疫組織学的 HNF4 α アイソフォームの検討は卵巣腫瘍の組織診断に有用である可能性が示唆された。これらの成果は細胞診にも応用可能である (Sugai et al, Pathol Int 2008)。



卵巣癌腹水の細胞診

上:Mucinous adenocarcinoma は HNF-4 α (+)。
下:Serous papillary adenocarcinoma は HNF-4 α (-)である。

なお、現在検討中であるが、肺癌でも粘液産生タイプは TTF-1 陰性で、HNF4 α 陽性であることを見出した。

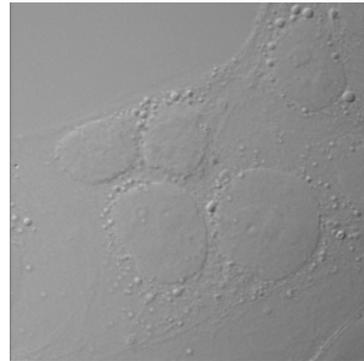
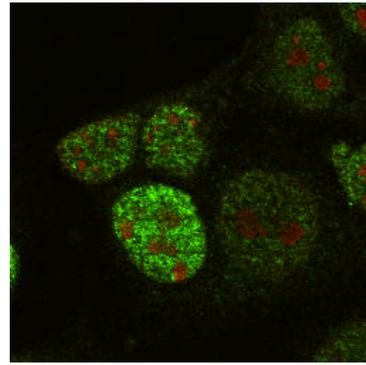
このように、HNF4 α アイソフォームの免疫組織学的検討は胃癌や卵巣腫瘍の組織診断に有用であることが示唆された。特に粘液形質との相関が高いことは HNF4 α と粘液関連遺伝子との関連を示唆し、興味深い。

(3) HNF-4 α の核内局在

HNF-4 α をはじめ、29 受容体 36 種類の核内受容体抗体を用いてヒト大腸がん細胞株 Caco 2 細胞およびヒト肝がん細胞株 HepG2 細胞における発現及び細胞内局在を免疫蛍光染色と共焦点レーザー顕微鏡によって系統的に検索を行った。また、核内受容体抗体の特異性についてウェスタンブロットによる検討を行った。その結果、1) 核質+核小体領域 2) 核質+核内に点状 3) 核質 4) 核質+細胞質・細胞全体 5) 染色されない(negative) の 5 パターンに分類された。HNF-4 α はクロマチン領域に存在した。

さらに、核内受容体抗体の Western blot を行い、9 受容体 12 種類の抗体 (EAR2 H9929A、EAR2 N2025、COUP-TFII、GR、HNF4 α P1、HNF4 α C(P1/P2)、HNF4 α P2、HNF4 γ 、LXR α 、PR、RXR α 、TR4) に特異性を確認した。

Caco2 細胞



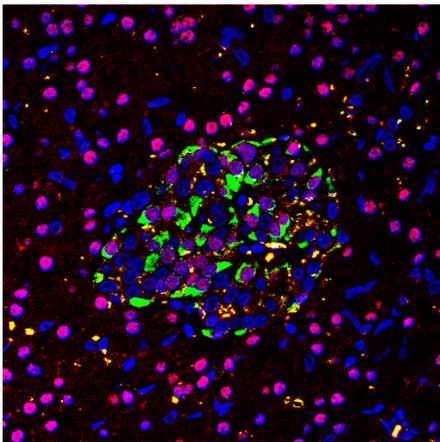
(上:蛍光二重染色、下:bright field)。nucleophosmin (赤)は核小体マーカーであり、HNF-4 α (緑)と共局在しないことから、HNF-4 α はクロマチン領域に存在することがわかる。

(4) 正常組織における核内受容体の発現

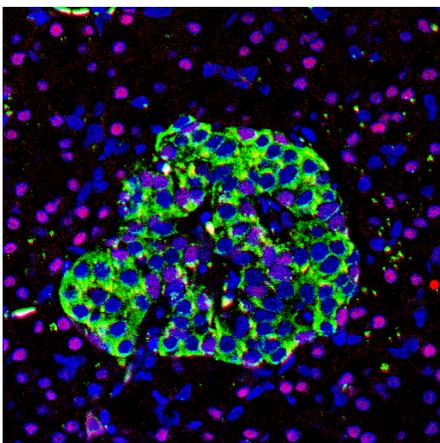
上記に加えて、本研究ではすべての核内受容体抗体を用いてヒト肝・膵組織を検討した。肝細胞では 14 種類、胆管細胞では 13 種類、Kupffer 細胞、星細胞および内皮細胞では 6 種類の核内受容体が発現した。またヒト膵組織において、膵腺房細胞では 17 種類、内皮細胞では 13 種類、 α 細胞では 20 種類、 β 細胞では 18 種類の核内受容体蛋白が発現した。(Takegoshi et al, Pathol Int 2009)。本研究によって HNF4 α のみならず、すべての核内受容体の肝・膵組織での組織特異的な発現パターンについて評価できた。今後他臓器での詳細な検討によって核内受容体のさまざまな病態への関与が明らかになると予想される。

また、HNF4 α の遺伝子変異は若年型糖尿病 (MODY1) の原因であることから、以前より膵ランゲルハンス島では HNF4 α がインシュリンを産生する β 細胞に発現しているのではないかと推測されていた。しかし、本研究で α 細胞のみに P2-HNF-4 α の発現を認めたことから、HNF4 α の糖代謝への関与について新たな視点で検討する必要があることが明らかになった。これは糖代謝、糖尿病の分野で世界的にも注目されるべき新知見と思われる。

る。



グルカゴン (緑)、HNF4 α (赤)、核は DAPI (青) で染色。グルカゴン産生細胞は HNF4 α 陽性である。



インスリン (緑)、HNF4 α (赤)、核は DAPI (青) で染色。インスリン産生細胞は HNF4 α 陰性である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Kazawa T, Kawasaki T, Sakamoto A, Imamura M, Ohashi R, Jiang S, Tanaka T, Iwanari H, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Naito M: Expression of liver X receptor α and lipid metabolism in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-induced human monocyte-derived macrophage. *Pathol Int* 59 (59): 152-160, 2009
2. Takegoshi S, Jiang S, Ohashi R, Savchenko AS, Iwanari H, Tanaka T, Hasegawa G, Hamakubo T, Kodama T, Naito M: Protein expression of nuclear receptors in human

and murine tissues. *Pathol Int* 59(2): 61-72, 2009

3. Sugai M, Umezumi H, Yamamoto T, Jiang S, Iwanari H, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T, Naito M: Expression of hepatocyte nuclear factor 4 α in primary ovarian mucinous tumors. *Pathol Int* 58(11): 681-6, 2008
4. Naito M: Macrophage differentiation and function in health and disease. *Pathol Int* 58(3): 143-155, 2008
5. Oshima T, Kawasaki T, Ohashi R, Hasegawa G, Jiang S, Umezumi H, Aoyagi Y, Iwanari H, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T, Naito M: Down-regulated P1 promoter-driven HNF4 α expression in human colorectal carcinoma is a new prognostic factor against liver metastasis. *Pathol Int* 57: 82-90, 2007

[学会発表] (計 4 件)

1. 竹越 聡、内藤 眞 他 5 名：肝類洞壁細胞における核内受容体の発現。第 21 回日本肝類洞壁細胞研究会、2007 年 12 月 24 日、松山市)
2. 須貝美佳、梅津 哉、山本 尚、姜淑英、内藤 眞：卵巣腫瘍における Hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) の発現と組織型推定の可能性 (第 97 回日本病理学会総会、2008 年 5 月 15~17 日、金沢)
3. 國井亮祐、長谷川剛、山本 尚、梅津 哉、姜淑英、大橋瑠子、内藤 眞：肺線癌における TTF-1 (Thyroid Transcription Factor-1) の発現例、非発現例の検討 (第 97 回日本病理学会総会、2008 年 5 月 15~17 日、金沢)
4. 内藤 眞：核内受容体の組織内細胞内局在の検討 (第 19 回日本レチノイド研究会、2008 年 11 月 22 日、東京)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅津 哉 (UMEZU HAJIME)

新潟大学・医歯学総合病院・准教授

研究者番号：50251799

(2)研究分担者

内藤 眞 (NAITO MAKOTO)
新潟大学・医歯学系・教授
研究者番号：30045786

長谷川 剛 (HASEGAWA GO)
新潟大学・医歯学系・准教授
研究者番号：90251800

(3)連携研究者

なし