

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 10 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22590331

研究課題名（和文） 肝細胞核内因子（HNF4 $\alpha$ ）の分子病理学的解析研究課題名（英文）Molecular pathological analysis of hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ 

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

研究成果の概要（和文）：HNF-4 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$ ) は内胚葉形成や肝細胞の分化に重要な転写因子である。HNF-4 $\alpha$  には2種のアイソフォーム（P1, P2）があり、組織特異的に発現する。本研究では2種類の HNF-4 $\alpha$  アイソフォームを識別できる抗体を用いてヒト肺癌と肝細胞癌を免疫組織学的に検討した。肺腺癌の大半は転写因子 TTF-1 を発現するが、TTF-1 陰性肺腺癌は HNF4 $\alpha$  陽性で P2 アイソフォームを発現し、その多くは粘液産生性であった。肝細胞癌では組織学的分化度の低下に伴って P2 の発現率が高くなり、P2 の発現は術後早期の再発を推測する指標となりうる。

研究成果の概要（英文）：Hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) is a member of the nuclear receptor superfamily involved in endodermal development and hepatocyte differentiation. The expression of HNF4 $\alpha$  isoforms is specific to the cell type in normal tissues. Using antibodies recognizing P1- and P2-isoforms, we investigate pulmonary adenocarcinoma and hepatocellular carcinoma. Thyroid transcription factor-1 (TTF-1) is highly expressed in a large proportion of pulmonary adenocarcinoma; however, most TTF-1-negative pulmonary adenocarcinomas were mucinous lesions with the predominant expressions of HNF4 $\alpha$ . The higher expression of P2-isoform was observed in low histological grading of hepatocellular carcinomas and was regarded as an index to predict poor prognosis of the patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
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：人体病理学

キーワード：HNF-4 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$ )、アイソフォーム、免疫組織学、肺腺癌、肝細胞癌

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 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転写因子である。核内受容体の一つである HNF-4 $\alpha$  (hepatocyte nuclear factor-4 $\alpha$ ) は内胚葉形成、ことに肝細胞の分化や肝癌の増殖に係わり、若年型糖尿病 (MODY-1) の責任遺伝子であることが明らかにされている。

(2) われわれは HNF-4 $\alpha$  の P1 および P2 アイソフォームを認識する抗体を得たが、本抗体によってパラフィン切片でも良好な染色が得られる (Jiang S et al. *Nucl Recept* 2003)。これまでこれら抗体を用いて、組織による HNF-4 $\alpha$  アイソフォームの発現の違いに注目して、平成 19-20 年度科学研究費 基盤 C 「肝細胞核内因子(HNF4 $\alpha$ )の生物学的解析と病理応用」に関する研究を行った。

(3) その成果を踏まえて、本研究では HNF-4 $\alpha$  の発現を肺および肝腫瘍で解析し、その分子機構の解明と病理診断への利用を目指す。

## 2. 研究の目的

(1) われわれはこれまでの研究で、HNF-4 $\alpha$  の発現の検索は原発不明癌の推定に有用であることが示した (Jiang S et al. *Nucl Recept* 2003)。大腸癌における P1 の発現低下は肝転移の予後因子となることも明らかにした (Oshima T et al. *Pathol Int* 2007)。HNF-4 $\alpha$  の検出が腫瘍の病理診断や細胞診、さらに予後の推定に有用であることを明らかにすれば、臨床病理学的に意義が大きいと考え、本研究では初年度に肺癌の HNF-4 $\alpha$  発現を指標として粘液産生との関係を検討する。また、2-3 年次は HNF-4 $\alpha$  アイソフォームのヒト肝細胞癌における発現を検討する。

(2) TTF-1 (thyroid transcription factor-1) は核内の転写因子で、甲状腺、肺、脳に発現し、

肺癌 (腺癌) にも高率に発現することが知られている。TTF-1 陰性腺癌の検討は少ないが、低分化な病変や粘液産生性の病変に TTF-1 陰性例が多いとの報告がある。粘液産生性病変に TTF-1 陰性例が多く、さらにこれらの多くに消化管組織との類似性があると推定して、TTF-1 陰性症例と TTF-1 陽性症例の HNF4 $\alpha$  発現を比較し、HNF4 $\alpha$  の肺腺癌における発現と粘液形質発現との関連を明らかにする。

(3) 肝細胞癌の分化度は重要な予後因子とされているが、分化度に関連する分子の解析は十分でない。肝細胞の分化に関与する HNF4 $\alpha$  が肝細胞癌や腎細胞癌において発現低下することが癌化に関与するなどの報告が散見されるものの、HNF4 $\alpha$  の癌化における役割は明らかではなく HNF4 $\alpha$  アイソフォームのヒト肝細胞癌における発現を検討した報告はほとんどない。それで、外科的に切除されたヒト肝細胞癌について HNF4 $\alpha$  アイソフォームの発現を免疫組織学的に検討し、臨床病理学的因子と比較して検討を行う。また HNF4 $\alpha$  アイソフォームの発現と予後との関連についても解析する。

## 3. 研究の方法

(1) HNF4 $\alpha$  には 9 つのアイソフォームが存在し、抗体 K9218 は P1 プロモーター由来のアイソフォーム (以下 P1 と略)、抗体 K6939 は P2 プロモーター由来のアイソフォーム (以下 P2 と略) を認識する。この両抗体を用いた。

(2) 肺癌については、新潟大学医歯学総合病院、および西新潟中央総合病院 (呼吸器外科) で切除された肺腺癌 262 例に対し、代表的な標本を選択して以下の方法で検討する。2 名の病理医により WHO 分類 (2004) に準じた組織診断を行い、組織亜型を分類した。TTF-1, HNF4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ -P1 と P2) 粘液形質の

MUC5AC と MUC2 (それぞれ胃粘膜上皮、腸粘膜上皮に発現)、 SpA (Surfactant protein) に対する各抗体を用いて Histostainer (ニチレイサイエンス) による免疫染色を施行した。免疫組織化学的検討では、腫瘍細胞全体における各抗体の発現細胞の割合が 26% 以上の場合を陽性と判定した。結果は TTF-1 陽性例、陰性例に分けて比較した。TTF-1 陽性例、陰性例の凍結組織 (各々3症例) から mRNA を抽出し、Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) を施行して、TTF-1 と HNF4 $\alpha$  の mRNA の発現を検討する。

(3) 肝癌については新潟大学医歯学総合病院において外科的に切除された肝細胞癌 54 例について、抗 HNF4 $\alpha$  抗体 (P1,P2) を用いて免疫染色を行い、P2 陽性率と組織学的分化度、門脈侵襲、肝内転移、TNM 分類について比較検討し、統計解析を行った。また予後についても経過追跡を行い、P2 陽性群と P2 陰性群の間で生存解析を行った。クロス表の統計比較は  $\chi^2$  test、Fisher's exact test および Mann-Whitney U-test を行い、生存曲線については、Kaplan-Meier method を用い、群間比較に関しては log-rank test を行った。P<0.05 を有意差ありとした。抗体の評価のためヒト肝細胞癌 (高分化型 1 例、中分化型 1 例、低分化型 1 例) と 2 種の肝細胞癌由来の細胞株 HepG2、Huh7 についても抗 HNF4 $\alpha$  抗体の免疫染色と HNF4 $\alpha$  蛋白と mRNA の発現が合致し、いずれの方法でも P1 と P2 を識別できることを確認した。

#### 4. 研究成果

(1) 肺癌の検討では免疫組織化学的に TTF-1 は 222 例 (84.7%) に発現し、組織学的には Papillary type を含む病変が多く含まれ、11 例の粘液産生性病変が確認された。HNF4 $\alpha$ 、MUC5AC、MUC2 の発現は、それぞれ 17 例 (7.7%)、18 例 (3.6%)、1 例 (0.4%) に認

められた。TTF-1 陰性肺腺癌は 40 例 (15.3%) であり、この中に粘液産生性病変は 31 例含まれた。組織亜型別には、BAC (Bronchioloalveolar carcinoma) 9 例、Papillary type 1 例、Acinar type 2 例、Mixed type (Papillary, BAC) 8 例、Mixed type (Acinar, Papillary) 5 例、Mixed type (BAC, Acinar) 2 例、mucinous cystadenocarcinoma 2 例、Colloid type 2 例が含まれていた。免疫組織化学的には、HNF4 $\alpha$  は 34 例 (85%)、MUC5AC は 29 例 (72.5%)、MUC2 は 4 例 (10%) で発現が確認された。HNF4 $\alpha$  の isoform に関しては、P2 が HNF4 $\alpha$  陽性の全例で発現し、P1 は 10 例で発現が認められた。

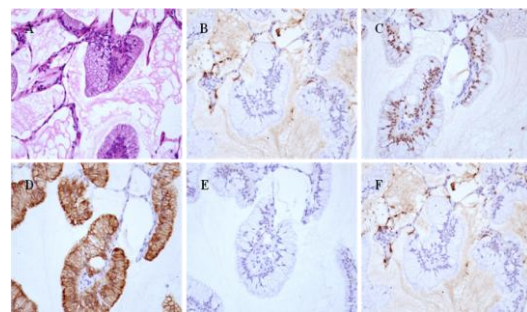
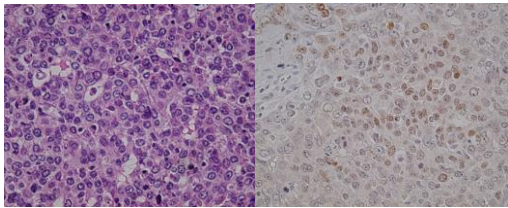


図 粘液産生性肺癌の免疫染色 (A:HE 染色、B:HNF4 $\alpha$ 、C:MUC2 [粘液形質]、D:TTF-1、E:MUC5AC [粘液形質]、F:SpA)

以上のことから、TTF-1 陰性肺腺癌では粘液産生性病変の割合が高く、HNF4 $\alpha$ 、MUC5AC が高率に発現することが示された。さらに、統計学的に肺腺癌において TTF-1 と HNF4 $\alpha$ 、MUC5AC の発現が逆相関の関係にあることが示された。RT-PCR でも、TTF-1 と HNF4 $\alpha$  の発現は負の相関関係にあることが確認された。

(2) 肝細胞癌の検討では、ヒト肝細胞癌 54 例 (高分化型 15 例、中分化型 30 例、低分化型 9 例) について、免疫染色を行った結果、肝細胞癌は全例 HNF4 $\alpha$  の P1 陽性であった。P2 の発現は高分化型では低く、分化度が低くな

るにつれ高率になる傾向がみられた（高分化型 27%、中分化型 50%、低分化型 100%）。門脈侵襲がみられる症例での P2 陽性率（90%）は、門脈侵襲のない例(43%)に比較して有意に高かった。また TNM stage III/IV 症例の P2 陽性率（73%）は、TNM stage I/II 症例の陽性率（38%）と比較して有意に高かった。肝切除後の重要な予後因子である脈管侵襲および TNM 分類と、P2 発現との関連性が認められた。肝細胞癌症例 54 例の生存率および無再発生存率については、P2 陽性群と P2 陰性群の間で有意差は認められなかった。しかし切除 2 年後の無再発生存率は P2 陽性群が P2 陰性群に比し、有意に低かったことから、P2 の発現は術後早期の再発に関連することが示唆された。



低分化肝細胞癌の HE 染色（左）と免疫染色（右：HNF4α の P2：核に陽性）

肝細胞癌のサンプルを用いた RT-PCR では低分化型肝細胞癌は高・中分化型肝細胞癌に比して P2 が強く発現することが mRNA レベルでも確認できた。P2 は正常肝細胞では発現しておらず、胎生期には発現する。肝細胞癌では P1 から P2 へアイソフォームが転換するとされているが、本研究でも分化度の低下がより幼若な肝細胞への形質転換を惹起し、それに伴ってアイソフォームの変化をきたした可能性が示唆された。また肝細胞癌細胞株の検討では HepG2、Huh7 の両者が P2 を発現することが蛋白および mRNA レベルで確認された。肝細胞癌の臨床病理学的因子と P2 陽性率についての検討では、脈管侵襲および TNM 分類と

P2 発現との関連性が認められ、P2 の発現は腫瘍の進行度および術後の肝内再発に関わるものと考えられた。また肝細胞癌の生存率および無再発生存率について P2 陽性群と P2 陰性群とで比較検討を行っても有意差はみられなかった。肝細胞癌切除後の再発は切除後 2 年までに比較的多く、4 年以降はほぼ一定になる傾向にある。術後早期の再発と 4 年以降の再発では再発形式が異なると考えられており、術後 2 年未満の早期再発因子としては非系統的切除、病理学的脈管侵襲、AFP 32ng/ml 以上があげられているが、それ以降の再発は肝炎の活動性など背景肝に応じた多中心性発癌によるものが多いと考えられている。本研究でも術後 2 年での無再発生存率は P2 陰性群で有意に高かったのに対し、術後 4 年では有意差はなかった。このことから P2 の発現は門脈侵襲に伴った術後早期の肝内再発を予測する有用な因子になりうると思われた。

以上、肝細胞癌において、組織学的分化度の低下に伴って、P2 の発現が上昇することが示された。また P2 の発現が門脈侵襲や TNM 分類にも関係し、術後早期の再発を推測する有用な指標となりうることを示唆された。

#### 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 2 件）

1. Kunii R, Jiang S, Hasegawa G, Yamamoto T, Umezu H, Watanabe T, Tsuchida M, Hahimoto T, Hamakubo T, Kodama T, Sasai K, Naito M: The predominant expression of hepatocyte nuclear factor 4α (HNF4α) in thyroid transcription factor-1 (TTF-1)-negative pulmonary adenocarcinoma. **Histopathology** 58(3): 467-476, 2011
2. Li G, Kawashima H, Ji L, Ogose A, Ariizumi T, Umezu H, Xu Y, Hotta T, Endo N: Frequent absence of tumor suppressor FUS1 protein expression in human bone and

soft tissue sarcomas. **Anticancer Res** 31(1):  
11-21, 2011

〔学会発表〕（計 5 件）

1. 大橋瑠子、姜淑英、岩成宏子、梅津哉、内藤眞: 核内受容体 LXR $\alpha$  の核小体内への局在と機能の解析. 第 101 回日本病理学会総会（東京, 2012.4.26~28）
2. 姜淑英、長谷川剛、邱学杉、大橋瑠子、梅津哉、岩成宏子、内藤眞: ROBO1 の発現を指標とした肝細胞癌組織型の鑑別. 第 100 回日本病理学会総会（横浜, 2011.4.28~30）
3. 戸枝路子、姜淑英、長谷川剛、内藤眞: ヒト肝細胞癌における Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  の発現. 第 100 回日本病理学会総会（横浜, 2011.4.28~30）
4. 戸枝路子、姜淑英、長谷川剛、内藤眞: ヒト肝細胞癌における Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  の発現. 第 99 回日本病理学会総会（東京, 2010.4.27~29）
5. 姜淑英、長谷川剛、須貝美佳、大橋瑠子、梅津哉、岩成宏子、内藤眞: ラット発生における HNF4 $\alpha$  アイソフォームの発現. 第 99 回日本病理学会総会（東京, 2010.4.27~29）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

梅津 哉 (UMEZU HAJIM)  
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

研究分担者

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

