

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26860231

研究課題名(和文) 大腸発癌過程においてHNF4a(P1)発現が消失するメカニズムの解明に向けた研究

研究課題名(英文) Pathological basis of isoform specific loss of HNF4a(P1) during the colorectal oncogenesis

研究代表者

菅野 雅人 (Sugano, Masato)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：40643606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：HNF4aは、細胞の分化(運命決定)に重要な役割を持つだけでなく、細胞のエネルギー代謝においても重要な役割を持つ。本研究ではHNF4aのスプライシングバリエーションであるHNF4a(P1)の発現が、大腸癌発癌の初期段階から高頻度かつ特異的に消失することを見出し、HNF4a(P1)の消失が大腸癌発癌に関与する可能性が示唆された。また、HNF4a(P1)の発現と細胞増殖マーカーであるki-67発現との関連を検討し、大腸癌では、その前癌病変である高度異型腺腫の時点からHNF4a(P1)発現とki-67発現との関連に異常が生じていることが明らかとなった。

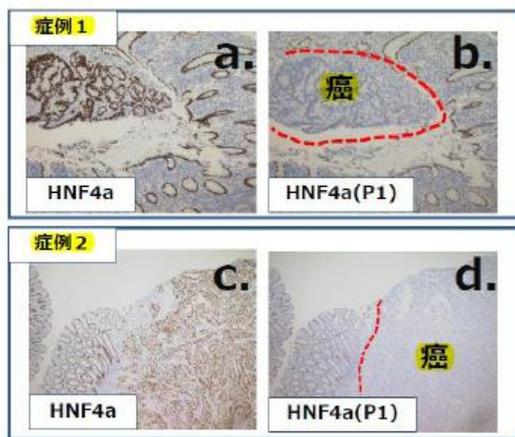
研究成果の概要(英文)：HNF4a is not only a critical transcription factor imposes endodermal phenotype on somatic cells, but it also plays a role as a master regulator of energy metabolism. Through this work, I found frequent and specific loss of splicing variant (specific isoform) of HNF4a (P1), especially from the very early stage of colorectal cancer, which suggested its involvement in colorectal carcinogenesis. Besides, along with ki-67 expression analysis reveals aberrant co-expression or vanishing pattern observed as early as a pre-cancerous lesion of high grade adenoma, which suggests breaking down of regulatory mechanism balancing HNF4a (P1) expression and cell cycle has some key-role in the development of colorectal cancer.

研究分野：人体病理学

キーワード：HNF4a HNF4a(P1) 大腸癌 癌化 免疫染色 オートファジー

## 1. 研究開始当初の背景

癌細胞（組織）が特異な代謝背景を持つことは、歴史的にもワールブルク効果として知られており、臨床的にはPETなど画像診断モダリティに応用されている。HNF4aは、肝臓や膵臓、消化管など内胚葉由来臓器の発生や恒常性維持に不可欠な遺伝子としてだけでなく、近年では、若年発症糖尿病の原因遺伝子であることが明らかにされるなど、生体におけるエネルギー代謝にも大きな役割を果たしていることが明らかにされつつある。本研究は、研究代表者が、大腸癌組織においてHNF4aのsplicing variantのうち、P1プロモータにより転写活性化されるHNF4a(P1)の発現が特異的に消失、減弱することを見出したことが研究の発端である（図1）。



(図1)大腸癌でHNF4a(P1)発現が消失する。

本研究は、(図1)のように大腸癌組織においてHNF4a(P1)の発現が消失する背景を明らかにしようとしたもので、研究開始当初には、ほぼ論文報告がない状況であった。

## 2. 研究の目的

臨床現場、言い換えればヒト悪性腫瘍(がん)の定義は、病理診断、即ち顕微鏡下に観察された形態像により、癌とする「異型」を

生じている病変ということができる。しかし、こうした形態的な悪性像である「異型」は、悪性腫瘍の一側面を見ているに過ぎず、こうした形態学的に定義された悪性像の他にも、悪性腫瘍特有に見られる生物現象は少なくない。代表的なものとしては、ワールブルク効果に代表される、悪性腫瘍特有と考えられている代謝経路であり、診断や治療の標的として臨床応用がなされてきた。本研究の目的は、HNF4a(P1)という、正常組織においては代謝のマスターレギュレータの一つと考えられる分子が大腸癌局所で消失することから、このHNF4a(P1)こそが、これまで異型として顕微鏡下に観察されてきた「形態的悪性像」と、「代謝的悪性像」をつなぎうる分子ではないか、と考え、大腸癌におけるHNF4a(P1)消失の分子病理学的背景を探ろうとするものである。

## 3. 研究の方法

本研究では、大腸癌におけるHNF4a(P1)発現消失の背景と意義を明らかにするため、以下の3項目からなる研究を計画した。

(1) 大腸癌のadenoma-carcinoma sequenceをモデルとして、大腸癌前駆病変である腺腫から大腸癌発癌までの過程と、HNF4a(P1)発現消失との関連を明らかにする。

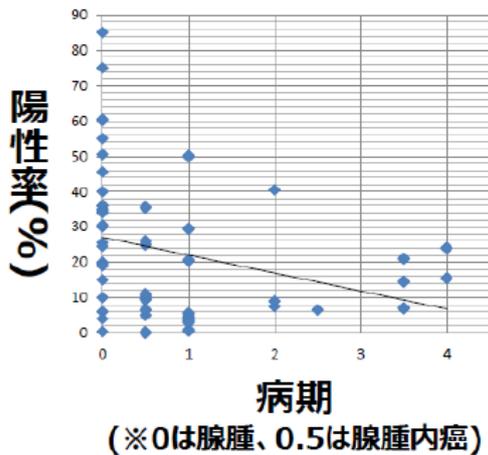
(2) 大腸癌の培養細胞株を用いて、HNF4a(P1)が大腸癌の悪性度に関与するメカニズムを明らかにする。

(3) 免疫組織化学的手法などにより、HNF4a(P1)と“機能的悪性形質”と定義した腫瘍(癌)特異的代謝系との関連を明らかにする。

#### 4. 研究成果

本研究では、まず大腸癌の発生、進展と HNF4a (P1) 発現との関連を検討するべく、高度異型腺腫、腺腫内癌、進行癌及び大腸癌リンパ節転移巣に対する HNF4a (P1) 免疫染色を行った。その結果、HNF4a (P1) の発現は高度異型腺腫から腺腫内癌に至る発癌過程で最も減弱することが明らかになった ( $p < 0.05$ )。一方、検討数は少ないものの、腺腫内癌から進行癌、進行癌における原発巣とリンパ節転移巣では HNF4a (P1) の消失する割合に有意な差は認められなかった (図 2)。この結果、HNF4a (P1) の消失は発癌の過程に関与することが考えられた。

#### HNF4a陽性率と大腸癌病期



(図 2) 大腸癌の発癌過程と HNF4a (P1) 発現

しかし、(図 2) のとおり、腫瘍 (腺腫或いは癌) 組織ではほぼ完全に HNF4a (P1) 発現が消失するものと、比較的多くの陽性細胞が残存するものとが存在することも分かった。特に、前癌病変である高度異型腺腫については HNF4a (P1) 発現の消失する割合に大きな幅が見られた。これに関連して、消失しないものが見られた。この原因について、高度異型腺腫の免疫染色標本では、HNF4a (P1) 発現の消失した割合の高い、低いに関わらず、殆どの病変で HNF4a (P1) 発現の消失には領域性がある。

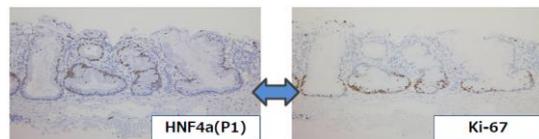
った。

詳細に観察すると、正常 (非腫瘍) 組織における HNF4a (P1) の発現は、大腸陰窩における増殖帯である陰窩底部で減弱しており、高度異型腺腫における HNF4a (P1) 発現の領域的な消失は、腺腫における増殖帯の異常に関連していることが推測された (図 3)



(図 3) 正常 (左)、高度異型腺腫 (中)、大腸癌 (右) における HNF4a (P1) 発現。高度異型腺腫で aberrant な発現消失が拮がり、大腸癌では発現が消失している。

HNF4a (P1) 消失と増殖帯との関連を検討するため ki-67 の免疫染色を行ったところ、正常及び増殖帯に明らかな異常のない良性病変 (ここでは増殖帯を評価しやすい SS-A/P を提示) では、HNF4a (P1) 陽性細胞と Ki-67 陽性細胞とがほぼ相互排他的であることが分かった (図 4)。

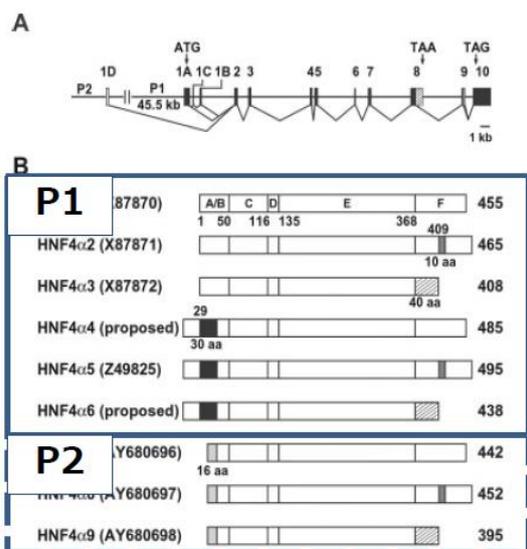


(図 4) HNF4a (P1) は Ki-67 と相互排他性を示す。

一方、高度異型腺腫においては、HNF4a (P1) の発現は全般に低下するものの、相互排他性は高度異型腺腫において既に失われ、一部には HNF4a (P1) 陽性にも関わらず、Ki-67 陽性となる細胞も見られた。これらのことから、HNF4a (P1) の発現が細胞周期、細胞増殖に何らかの影響を与えていることが推測された。

以上のことから、HNF4a (P1) 発現と細胞増

殖との関連を *in vitro* に検討するため、既に HNF4a(P1) が陰性であることを確認した大腸癌由来培養細胞株である SW480 及び、HNF4a(P1) が発現していることを確認した同じ大腸癌由来培養細胞株である Caco2 細胞を用いて、それぞれ、HNF4a(P1) の強制発現系及び shRNA による発現抑制系構築を考えた。これらの系については、増殖の評価のみならず、場合によっては xenograft による造腫瘍能の評価も必要と考えたため、transient な遺伝子導入ではなくレンチウイルスベクターを用いた強制発現、或いはレンチウイルスと shRNA を用いた発現抑制系を試みた。しかし、この時点で HNF4a の強制発現系及び発現抑制系を構築することは可能と考えられたものの、HNF4a には、HNF4a(P1) として括られる複数の variants が存在することに加え、このほか別プロモータにより発現が誘導される複数の splicing variants も存在し (図 5)、これらのうち、特定の splicing variant(s) の発現を誘導、或いは抑制するメカニズムについては、一般的にも確立していなかったため、方法論の段階で研究の進行に支障が生じた。



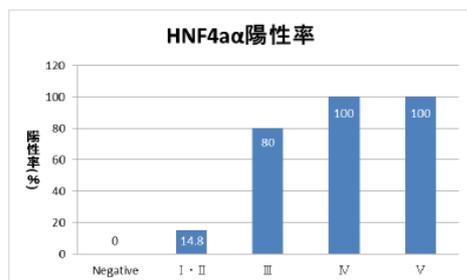
(図 5) HNF4a には、HNF4a(P1) に属する 6 種類の splicing variants を含め、9 種類の splicing variants が存在する (N. Briancon

et al., J Biol Chem, 2004 を一部改変)。

更に、研究 1 年目途中である 2014 年 8 月に研究代表者の異動が決定し、以後、地域機関病院一施設並みの病理診断業務 (4000 件/年)、及び、結果的に該当年度中、学部教官中で最も多くの授業、実習を担当したことや研修医の指導をほぼ 1 人で担当していたことなどもあり、その後の研究継続が困難となった。中途半端な成果に留まったことが大変悔やまれると同時に、エフォート割合については見通しが甘かったと反省せざるを得ない。しかし、研究機関異動後の第 46 回高松宮妃癌研究基金国際シンポジウム (パレスホテル東京(東京)) においても主題となったように、癌特異的な代謝については未知な部分が多いと同時に、画期的な診断法開発や治療標的になりうる可能性が秘められており、更に近年、発癌や腫瘍の悪性化、薬剤耐性に関連して、腫瘍細胞のエネルギー代謝にも密接に関与するオートファジーが注目され、論文も相次いで発表されている。特に、オートファジーの“目安”ともいえるべき LC3-II 発現については、APC<sup>+/+</sup>マウスにおいて、腺腫の段階から発現が亢進し、腫瘍の進展と関連することなどが報告されており (Levy J et al., Nat Cell Biol, 2015)、本研究における HNF4a(P1) の発現消失とも関連するよう見える結果が報告されている。LC3-II の発現は免疫染色においても評価可能であることから、今後、HNF4a(P1) の発現消失と LC3-II の発現、ひいてはオートファジーとの関連について検討することも必要と考えている。

なお、上記研究と直接関連しないものの、これらの研究を遂行する過程で HNF4a 自体の発現が非腫瘍組織から癌に至るまで、消化管においてはその上皮細胞に限局して発現し、かつ良好に保持されていることが分かった。こうした鋭敏かつ特異的な lineage マーカーとしての HNF4a の特質を利用し、免疫染色によ

って腹水中に出現する胃癌細胞を検出することが可能ではないかと考え良好な結果を得た(図6)。本検討結果については別途詳細に検討を行い、現在論文執筆中である。



(図6) HNF4aの免疫染色は、腹水中の胃癌細胞の検出に有用である。なお、ClassIII、IVのみならず、ClassI、II細胞についても、cytopathologist/cytotechnologistによるblind reviewにおいて胃癌細胞と判定され、これらが胃癌細胞であった可能性が高いと考えられた(M. Fujisawa, M. Sugano et al., 現在論文執筆中)。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 3 件)

- ① Shingo Sakashita, Masafumi Muratani, Masato Sugano, Masayuki Noguchi, et al.

Site-selected Chromatin-immunoprecipitation (ChIP) analysis by Laser captured microdissection, 16<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer (Colorado Convention Center (Denver, Colorado, USA), 2015.9.6)

- ② 藤沢 美来, 菅野 雅人, 他 胃癌の腹腔洗浄細胞診におけるHNF4a免疫染色有用性の検討 第28回 関東臨床細胞学会学術集会 (ふじのくに千本松フォーラム(沼津市), 2014.9.13)

- ③ 藤沢 美来, 菅野 雅人, 他 HNF4a is a Useful Marker for Cytopathologic Diagnosis of Peritoneal Fluid in Gastric Cancer 第53回 日本臨床細胞学会 秋期大会 (海峡メッセ下関(下関市), 2014.11.8)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等 (計 0 件)

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

菅野 雅人 (SUGANO MASATO)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号: 40643606