
 原 著

Epstein - Barr virus 関連胃癌における粘液形質と Hepatocyte nuclear factor - 4 α の発現および 初期病変に関する研究

佐藤 聡 史

新潟大学大学院医歯学総合研究科

消化器内科学分野

(指導：寺井崇二教授)

**The Expression of Hepatocyte nuclear factor - 4 α , mucin phenotype, and analysis of
early lesions in Epstein - Barr virus related gastric carcinomas**

Toshifumi SATO

Division of Gastroenterology,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Shuji TERAI)

要 旨

胃癌の約 1 割は Epstein - Barr virus (以下 EBV) が潜伏感染している EBV 関連胃癌である。本研究では胃癌症例 252 症例 265 病変 (早期胃癌 189 病変, 進行胃癌 76 病変) を in situ hybridization (以下 ISH) で検索し, EBER1 陽性 20 病変 (7.55%) を検出して EBV 関連胃癌と EBV 非関連胃癌を臨床病理学的に比較し, さらに粘液形質と Hepatocyte nuclear factor - 4 α (以下 HNF4 α) の発現を検討した。EBV 関連胃癌の年齢 (65.9 \pm 8.6 歳) は EBV 非関連胃癌 (71.0 \pm 9.7 歳) と有意差はなく, 男女比は EBV 関連胃癌 (男 17 例/女 2 例), EBV 非関連胃癌 (男 159 例/女 74 例) と, EBV 関連胃癌は男性により多かった。発生部位は EBV 関連胃癌が上部, 次いで中部に多いのに対し, EBV 非関連胃癌では中部に最も多く, 下部, 上部の順であった。残胃癌は EBV 関連胃癌 10.0% (2/20), EBV 非関連胃癌 3.3% (8/245) と, EBV 関連胃癌に多かった。その他, 腫瘍径と深達度, 脈管侵襲は両者に有意差を認めなかった。組織型を見ると, EBV 関連胃癌では中分化管状腺癌 (tub2), 充実型低分化腺癌 (por1) が多く, EBV 非関連胃癌では高分化管状腺癌 (tub1) が多く, 中分化管状腺癌 (tub2) がそれに次いだ。これら

Reprint requests to: Toshifumi SATO
Division of Gastroenterology,
Niigata University Graduate School of Medical
and Dental Sciences,
1 - 757 Asahimachi - dori, Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510, Japan.

別刷請求先: 〒951 - 8510 新潟市中央区旭町通 1 - 757
新潟大学大学院医歯学総合研究科
消化器内科学分野

佐藤 聡 史

の結果はこれまでの報告とほぼ一致した。

EBV 関連胃癌と EBV 非関連胃癌における粘液形質発現タイプを分類すると、EBV 関連胃癌では Null type 5 病変 (25.0%), Gastric type 14 病変 (70.0%), Intestinal type 0 病変 (0%), Mixed type 1 病変 (5.0%) であり、Null type と Gastric type で全体の 95.0% を占めた。一方、EBV 非関連胃癌では Null type 4 病変 (8.9%), Gastric type 18 病変 (40.0%), Intestinal type 11 病変 (24.4%), Mixed type 12 病変 (26.7%) であり、EBV 関連胃癌では EBV 非関連胃癌に比べて Null type + Gastric type が有意に多かった。

HNF4 α の P1 および P2 アイソフォーム (以下 P1-, P2-HNF4 α) の発現をみると、EBV 関連胃癌では P1-HNF4 α は 20.0%, EBV 非関連胃癌では 51.1% が陽性で、EBV 関連胃癌では有意に P1-HNF4 α の発現頻度が低下していた。一方、P2-HNF4 α は EBV 関連胃癌、EBV 非関連胃癌ともに全例で陽性となった。以上の成績から、EBV 関連胃癌の P1-HNF4 α の発現低下が Null type と Gastric type の粘液形質に関与する可能性が考慮された。

EBV 関連胃癌ではウィルスは環状 DNA であるため、ウィルス粒子の形態を示さない。EBV 関連胃癌や EBV 潜伏感染胃癌細胞株では BamHIW, LMP2, EBNA1 が恒常的に発現し、EBER1-ISH で核全体が染色されたが、微小な胃粘膜内癌 2 病変では核の一部にのみ核小体様の dot 状陽性像を呈した。この 2 病変の PCR では BamHIW と LMP2 の発現の低下が見られた。以上より微小胃粘膜内癌に見られた dot 状染色像は EBV 潜伏感染の初期像である可能性が示唆された。

キーワード：Epstein - Barr virus (EBV), 胃癌, Hepatocyte nuclear factor - 4 α (HNF4 α), 粘液形質

緒 言

Epstein - Barr virus (以下 EBV) 関連胃癌は 1990 年に Burke らにより初めて報告されたが¹⁾、現在では胃癌全体の約 8.7% (7.5% - 10.0%) を占めることが明らかにされた²⁾。EBV 関連胃癌は一般の胃癌に比べ、特徴的な臨床病理学的性質を有する。すなわち EBV 関連胃癌は男性により優位であり、噴門部や胃体部に多く発生し、残胃癌での頻度が高い。組織型では中分化管状腺癌 (tub2), 充実型低分化腺癌 (por1) で特に頻度が高く、粘膜内病変ではときに小型の腺管が樹枝状、網目状に不規則に分岐、融合する “lace pattern”, 粘膜下層以深では著明なリンパ球浸潤を伴う “lymphoepithelioma-like gastric carcinoma” を特徴的形態とする³⁾。

EBV 関連腫瘍ではウィルスは腫瘍細胞内で潜伏感染状態にあるとされ、潜伏感染様式はウィルス遺伝子発現パターンの違いから I-III 型に分類される⁴⁾。EBV 関連胃癌は Burkitt リンパ腫と同

様に I 型潜伏感染様式をとり、発現している EBV 遺伝子産物は LMP2A, EBNA1, EBER1, BARTs に限られている⁵⁾。このうち EBER1 は全ての EBV 潜伏感染細胞に 10⁶ から 10⁷ 分子発現するため、EBV 感染の証明には EBER1 の ISH が一般に用いられ、EBV 関連胃癌も感染細胞の核全体が染色される事で同定される事が多い。

Hepatocyte nuclear factor - 4 α (以下 HNF4 α) は核内受容体 superfamily の一つであり、主に内胚葉の発生、糖代謝、脂質代謝を司っている転写調節因子である⁶⁾⁻⁸⁾。HNF4 α には選択的プロモーター (P1 プロモーター, P2 プロモーター) 使用及びスプライシングにより、9 種の異なるアイソフォーム (HNF4 α 1- α 9) が存在し、HNF4 α 1-6 は P1 プロモーター由来、HNF4 α 7-9 は P2 プロモーター由来である⁹⁾¹⁰⁾。P1 プロモーター由来 HNF4 α (以下 P1-HNF4 α) と P2 プロモーター由来 HNF4 α (以下 P2-HNF4 α) の発現臓器はそれぞれ異なっており、P1-HNF4 α は小腸、大腸、肝臓、腎臓、精巣上体に、P2-HNF4 α は胃、小腸、

大腸, 胆管, 膵臓, 精巣上体に発現している⁹⁾¹⁰⁾.

胃癌は粘液形質から Gastric type, Intestinal type, Mixed type, Null type の 4 型に分類される. Takano らは腸上皮化生を伴った胃粘膜や Intestinal type・Mixed type の粘液形質を有する分化型早期胃癌では P1-HNF4 α の発現頻度が高く, Gastric type の粘液形質を有する分化型早期胃癌では P1-HNF4 α の発現頻度が低い事を報告した¹¹⁾. HNF4 α 発現は組織特異性より胃癌¹¹⁾, 卵巣癌¹²⁾ や大腸癌¹³⁾ の診断や予後指標因子として応用される可能性が考えられてきた.

EBV 関連胃癌の tub2, por1 の粘液形質は, 腸型への分化能を有さない Null type 及び Gastric type が多数を占めるとの報告がある¹⁰⁾. しかし EBV 関連胃癌における HNF4 α の発現の検討は極めて少ない.

本研究では抗ヒト HNF4 α 抗体を用いて, EBV 関連胃癌における HNF4 α の発現及び粘液形質と HNF4 α の発現との関係について検討した. さらに EBER1-ISH で核内に dot 状に陽性となった微小胃粘膜内癌についても EB ウィルス遺伝子産物の発現を検索したので報告する.

材料と方法

1. 検討対象

1999 年から 2010 年の間に外科的あるいは内視鏡的切除が行われ, 新潟大学分子細胞病理学教室において胃癌と診断された 252 症例 265 病変 (早期胃癌 189 病変, 進行胃癌 76 病変) を対象とした. また, 粘液形質を比較するために EBV 関連胃癌 20 例と性・年齢, 病理像に大差のない EBV 非関連胃癌対照群 45 病変/43 症例を用いた.

2. EBER in situ hybridization

ホルマリン固定, パラフィン包埋検体の薄切片を用いて FITC 標識 EBV-encoded small RNA 1 (以下 EBER1) Oligonucleotide Probe を用い, ISH を行った. 検出にはアルカリフォスファターゼ (BCIP/NBT) 発色検出キット (DAKO, Denmark) を使用し, 核全体に染色される像を以て陽性と判定したところ, 265 病変中, EBER1 陽性は 20 病変 (7.55%) であった. 対象となった胃癌の臨床病理学的特徴を表 1 に示す.

3. ヒト胃癌細胞株

AGS (印環細胞癌由来ヒト胃癌細胞株), ネオ

表 1 EBV 関連胃癌, EBV 非関連胃癌 (全検索群) の臨床病理学的特徴

	EBV 関連胃癌	EBV 非関連胃癌
No. of cases (No. of patients)	20(19)	245(233)
Age, year (mean \pm SD)	65.9 \pm 8.6	71.0 \pm 9.7
Sex (Male/Female)	17/2	159/74
Location (Upper/Middle/Lower/Remnant)	11/5/2/2	50/107/80/8
Size, cm (mean \pm SD)	3.8 \pm 3.1	3.4 \pm 3.0
Depth (m/sm/mp/ss/se/si)	4/8/3/1/3/1	113/64/22/26/19/1
Histology (pap/tub1/tub2/por1/por2/sig/muc)	0/6/10/8/6/2/0	8/144/84/46/41/27/0
Lymphatic invasion	6/20 (30.0%)	78/245 (31.8%)
Vascular invasion	7/20 (35.0%)	71/245 (29.0%)
Lymph node metastasis	4/19 (21.1%)	47/233 (20.2%)

マイシン耐性リコンビナント EBV 感染 AGS (以下 AGS-EBV) は北海道大学遺伝子病制御研究所感染癌研究センター 吉山裕規先生(現島根大学医学部微生物学講座教授)の御厚意により供与頂いた。AGS は 5% CO₂, 37°C で 10% 非動化胎仔ウシ血清 (JRH Bioscience Inc, Lexinexa, LS), ペニシリン (100U/ml), ストレプトマイシン (100mg/ml) 含有 DMEM, low glucose (GIBCO) 培養液で培養した。AGS-EBV は 5% CO₂, 37°C で 10% 非動化胎仔ウシ血清 (JRH Bioscience Inc, Lexinexa, LS), ペニシリン (100U/ml), ストレプトマイシン (100mg/ml) 含有 DMEM, low glucose (GIBCO) 培養液に neomycin sulfate [Geneticin R, (G418), GIBCO] を 300 μg/ml の濃度で加え, EBV 非感染 AGS 細胞を選別, 死滅させ, AGS-EBV を選択的に培養した。EBV 感染の有無は培養細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定, パラフィン包埋組織を薄切し, EBER1-ISH を行って確認した。

4. 一次抗体

P1-HNF4 α , P2-HNF4 α の発現を評価するために, 各々抗ヒト HNF4 α マウスモノクローナル抗体 (clone. K9218, Perseus Proteomics, Tokyo), 抗ヒト HNF4 α 7 マウスモノクローナル抗体 (clone. H6939, Perseus Proteomics, Tokyo) を 100 倍希釈して使用した。また粘液形質の評価のため, マウス抗 Human Gastric Mucin (以下 HGM) 抗体 (clone. 45m1, Novocastra, UK) 50 倍希釈, マウス抗ムチンモノクローナル抗体 (以下 M-GGMC-1 抗体) (clone. HIK1083, Kanto Chemical, Tokyo) 50 倍希釈, マウス抗 MUC5AC モノクローナル抗体 (clone. CLH2, Novocastra, UK) 100 倍希釈, マウス抗 MUC6 モノクローナル抗体 (clone. CLH5, Novocastra, UK) 100 倍希釈, マウス抗 MUC2 モノクローナル抗体 (clone. Ccp58, Novocastra, UK) 100 倍希釈, マウス抗 CD10 モノクローナル抗体 (clone. 56C6, Novocastra, UK) 100 倍希釈を用いた。

5. 免疫組織化学染色

EBER1 陽性 20 病変, EBER1 陰性は 245 病変から 45 病変を抽出し対象とした。切除された検体についてはホルマリンで固定, 培養細胞については 4% パラホルムアルデヒドで固定, パラフィン包埋した組織を薄切し, M-GGMC-1 以外はオートクレーブ処理 (121°C, 15 分) によって抗原を賦活化して免疫染色を行った。前記の一次抗体を 4°C, 一晩反応させた後, 二次抗体としてヒストファインシンプルステイン MAX-PO (MULTI) (Nichirei, Tokyo) を使用して酵素標識ポリマー法 (間接法) にて染色した。発色基質は 3, 3'-diaminobenzidine (以下 DAB) (Nichirei, Tokyo) を用いた。

6. 粘液形質評価

胃癌の粘液形質を免疫組織化学的に検討し, 胃型マーカー (HGM, M-GGMC-1, MUC5AC, MUC6) と腸型マーカー (MUC2, CD10) の発現パターンにより, 4 タイプに分類した。胃型マーカーのうち少なくとも 1 種類が陽性である時は胃型, 腸型マーカーのうち少なくとも 1 種類が陽性である時は腸型とし, その組み合わせ (胃型マーカー/腸型マーカー) により, Null type (-/-), Gastric type (+/-), Intestinal type (-/+), Mixed type (+/+) とした。なお, 陽性判定基準は各検体につき各々の抗体の陽性細胞数が胃癌上皮細胞の 5% 以上をもって陽性と判定した。

7. Western blot 法

培養細胞に 1% Triton X, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH8.0, 5mM EDTA, 10 μg/ml Aprotinin, 10 μg/ml leupeptin, 1mM PMSF の混合溶液を加え, 氷上に 30 分静置後, 14,000rpm 15 分間遠心し蛋白を抽出した。蛋白は 8% SDS-PAGE で分離し, PVDF メンブレン (Amersham, Aylesbury, UK) に転写した。メンブレンは, 5% スキムミルクで一晩ブロッキング後, 一次抗体 1 時間, 二次抗体 anti-mice Ig-horseradish peroxidase-conjugated antibody (Amersham) を 30 分反応させた。ECL detection system (Amersham) で可視化した。

8. DNA 抽出, PCR 法

DNA は切除検体ではホルマリン固定・パラフィン包埋切片から、培養細胞では 4%パラホルムアルデヒド固定・パラフィン包埋切片から DEX-PAT (TaKaRa 社製) を用いて抽出し、フェノール/クロロホルムで精製を行った。PCR 反応液は 1U の Taq polymerase, 5 \times PCR reaction buffer 4 μ l, 25 mmol/L MgCl₂ (それぞれ Promega 社製) 0.8 μ l, 2.5 mmol/L dNTP (TaKaRa 社製) 1.6 μ l に 20pmol のプライマーと DW で 19 μ l とし、抽出した DNA を 1 μ l 加えて 20 μ l とした。プライマーは EBV ゲノム繰り返し配列である BamHIW さらに EBV 潜伏感染遺伝子である LMP2, EBNA1 を使用した。陽性コントロールとして EBER1-ISH で核全体に陽性となった胃癌 2 病変 (以下 EBV + GC) と AGS-EBV, 陰性コントロールとして EBER1-ISH 陰性であった胃癌 2 病変 (以下 EBV - GC), AGS と template DNA の代わりに DW を加えたものを用いた。今回用いたプライマーの塩基配列を表 2 に示す。PCR は BamHIW, LMP2, EBNA1 全て 95 $^{\circ}$ C 2 分, (95 $^{\circ}$ C 30 秒 60 $^{\circ}$ C 30 秒 72 $^{\circ}$ C 1 分) 35 サイクル, 72 $^{\circ}$ C 10 分の条件で行った。サーマルサイクラーは ASTEC 社の PROGRAM TEMP CONTROL SYSTEM PC-700 及び PC-816 の 2 台を使用した。PCR 産物 10 μ l を, 15%ポリアクリルアミドゲルで 100V, 45 分泳動後に紫外線イルミネーターで検出を行った。

9. 統計解析

統計解析には, Student's t 検定, χ^2 検定, Fisher の直接確率計算法を用い, $p < 0.05$ を有意差ありとした。

結 果

1. EBV 関連胃癌の臨床病理学的特徴 (表 1)

1-1. 性・年齢

1999 年から 2010 年の間に外科的あるいは内視鏡的切除が行われた胃癌症例 252 症例 265 病変 (早期胃癌 189 病変, 進行胃癌 76 病変) 中 ISH で EBER1 陽性と判定されたのは 20 病変 (7.55%) であった。EBV 関連胃癌の平均年齢は 65.9 \pm 8.6 歳, EBV 非関連胃癌は 71.0 \pm 9.7 歳で, 男女比は EBV 関連胃癌は男 17 例/女 2 例で, EBV 非関連胃癌は男 159 例/女 74 例であり, EBV 関連胃癌では特に男性に多かった。

1-2. 発生部位, 腫瘍径, 深達度

発生部位は EBV 関連胃癌が上部, 次いで中部に多いのに対し, EBV 非関連胃癌では中部にもっとも多く, 下部, 上部の順になっていた。残胃癌は EBV 関連胃癌では 10.0% (2/20), EBV 非関連胃癌では 3.3% (8/245) と, EBV 関連胃癌に多かった。腫瘍径は EBV 関連胃癌 3.8 \pm 3.1cm, EBV 非関連胃癌は 3.4 \pm 3.0cm と有位差を認めなかった。腫瘍の深達度をみると EBV 関連胃癌では早期癌 12 例, 進行癌 8 例, EBV 非関連胃癌は早期癌 177 例, 進行癌 68 例であり, 早期癌の比率はそ

表 2 BamHIW, LMP2, EBNA1 のプライマー塩基配列

	塩基配列	
BamHIW	forward:5'-GCAGCCGCC CAGTCTCT-3'	reverse:5'-ACAGACAGT GCACAGGAGCCT-3
LMP2	forward:5'-AGCTGTAAGTGT GGTTTCCATGAC-3'	reverse:5'-GCCCCCTGG CGAAGAG-3'
EBNA1	forward:5'-TACAGGACC TGGAAATGGCC-3'	reverse:5'-TCTTTGAGG TCCACTGCCG-3'

れぞれ 60.0%, 72.2% と有意差を認めなかった。

1-3. 組織型, 脈管侵襲, リンパ節転移

組織型を見ると, EBV 関連胃癌では中分化管状腺癌 (tub2), 充実型低分化腺癌 (por1) が多く, EBV 非関連胃癌では高分化管状腺癌 (tub1) が多く, 中分化管状腺癌 (tub2) がそれに次いだ。

リンパ管侵襲は EBV 関連胃癌で 6/20 (30.0%), EBV 非関連胃癌では 78/245 (31.8%) であり, 静脈侵襲は前者が 7/20 (35.0%), 後者が 71/245 (29.0%) であり, リンパ節転移は前者で 4/19 (21.1%), 後者では 47/233 (20.2%) と有意差を認めなかった。

2. EBV 関連胃癌, 非関連胃癌における粘液形質および HNF4 α の発現

2-1. EBV 関連胃癌および非関連胃癌と HNF4 α 発現との関係

EBV 関連胃癌, EBV 非関連胃癌における HNF4 α アイソフォームの発現を調べるため, EBV 関連胃癌 20 例と性・年齢, 病理像に大差のない対照群 45 病変/43 症例について 2 種のアイソフォーム (P1-HNF4 α , P2-HNF4 α) を認識する抗ヒト HNF4 α マウスモノクローナル抗体を用いて免疫染色を行った (図 1)。EBV 関連胃癌では P1-HNF4 α は 20.0% (4/20 病変), EBV 非関連胃癌では 51.1% (23/45 病変) が陽性であった。一方, P2-HNF4 α は EBV 関連胃癌, EBV 非関連胃癌ともに全例で陽性となった (20/20 病変,

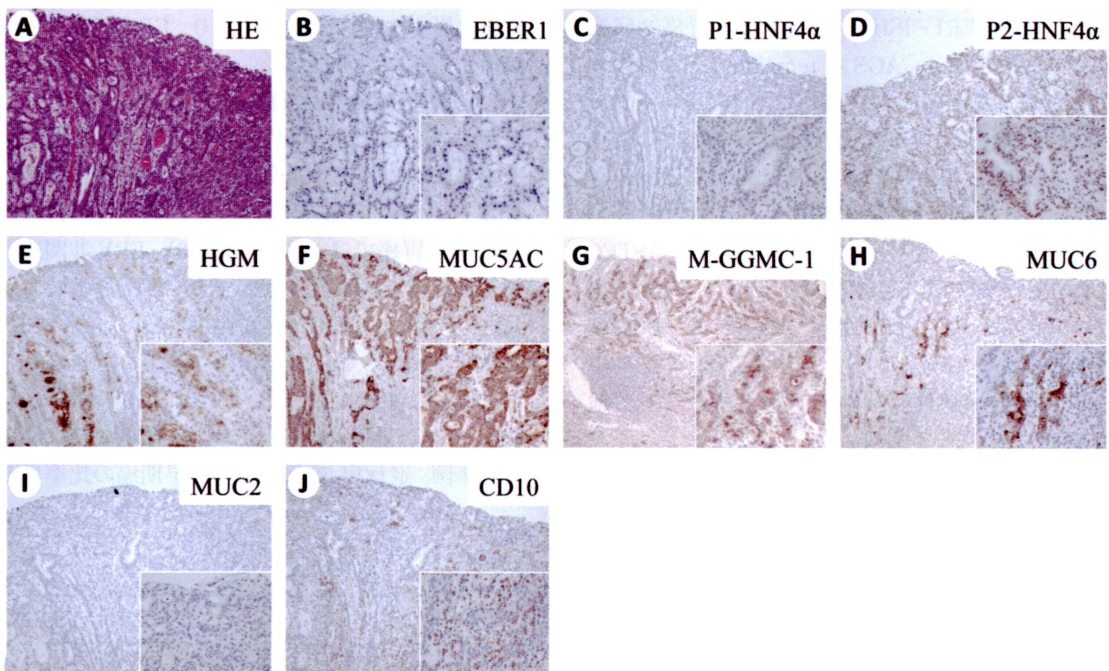


図 1 EBV 関連胃癌の免疫染色 (×100, 拡大像×400)

Gastric type の粘液形質を呈した 1 例.

A : HE 染色.

B : EBER1-ISH. 腫瘍細胞と一致して, 核全体に陽性となっている.

C, D (HNF4 α) : P1-HNF4 α は陰性, P2-HNF4 α は陽性.

E~H (胃型マーカー) : HGM, MUC5AC, M-GGMC-1, MUC6 全て陽性であり, 胃型の形質を有する.

I, J (腸型マーカー) : MUC2, CD10 とともに腫瘍細胞は陰性.

表 3 EBV 関連胃癌, EBV 非関連胃癌における HNF4 α の発現

	P1-HNF4 α (+)	P2-HNF4 α (+)
EBV 関連胃癌 (n=20)	4/20 (20.0%)	20/20 (100%)
EBV 非関連胃癌 (対照群) (n=45)	23/45 (51.1%)	45/45 (100%)

表 4 粘液形質の検討における EBV 関連胃癌, EBV 非関連胃癌 (対照群) の臨床病理学的特徴

	EBV 関連胃癌	EBV 非関連胃癌
No. of cases (No. of patients)	20(19)	45(43)
Age, year (mean \pm SD)	65.9 \pm 8.6	69.3 \pm 8.9
Sex (M/F)	17/2	29/14
Location (U/M/L/R)	11/5/2/2	9/19/15/2
Size, cm (mean \pm SD)	3.8 \pm 3.1	4.1 \pm 3.4
Depth (m/sm/mp/ss/se/si)	4/8/3/1/3/1	19/9/6/7/4/0
Histology (pap/tub1/tub2/por1/por2/sig/muc)	0/6/10/8/6/2/0	0/28/15/4/2/0/0

表 5 EBV 関連胃癌, EBV 非関連胃癌 (対照群) の粘液形質

	Null type	Gastric type	Intestinal type	Mixed type	N+G type	I + M type
EBV 関連胃癌 (n=20)	5/20 (25.0%)	14/20 (70.0%)	0/20 (0.0%)	1/20 (5.0%)	19/20 (95.0%)	1/20 (5.0%)
EBV 非関連胃癌 (対照群) (n=45)	4/45 (8.9%)	18/45 (40.0%)	11/45 (24.4%)	12/45 (26.7%)	22/45 (48.9%)	23/45 (51.1%)

N: Null, G: Gastric, I: Intestinal, M: Mixed

45/45 病変). EBV 関連胃癌では EBV 非関連胃癌に比し, 有意に P1-HNF4 α の発現頻度が低かった ($p < 0.05$) (表 3).

2-2. EBV 関連胃癌および非関連胃癌における粘液形質発現タイプ (表 5)

EBV 関連胃癌 20 病変および EBV 非関連胃癌 45 病変における臨床病理学的特徴と粘液形質発現タイプを表 4, 5 と図 1, 2 に示す. 前述の粘液形質発現タイプに従い分類すると, EBV 関連胃癌では Null type 5 病変 (25.0%), Gastric type 14

病変 (70.0%), Intestinal type 0 病変 (0%), Mixed type 1 病変 (5.0%) であり, Null type と Gastric type で全体の 95.0% を占めた. 一方, EBV 非関連胃癌では Null type 4 病変 (8.9%), Gastric type 18 病変 (40.0%), Intestinal type 11 病変 (24.4%), Mixed type 12 病変 (26.7%) であった. このように EBV 関連胃癌では EBV 非関連胃癌に比べ, Null type と Gastric type が有意に多かった ($p < 0.05$).

2-3. 粘液形質と P1-HNF4 α 発現との関係 (表 6)

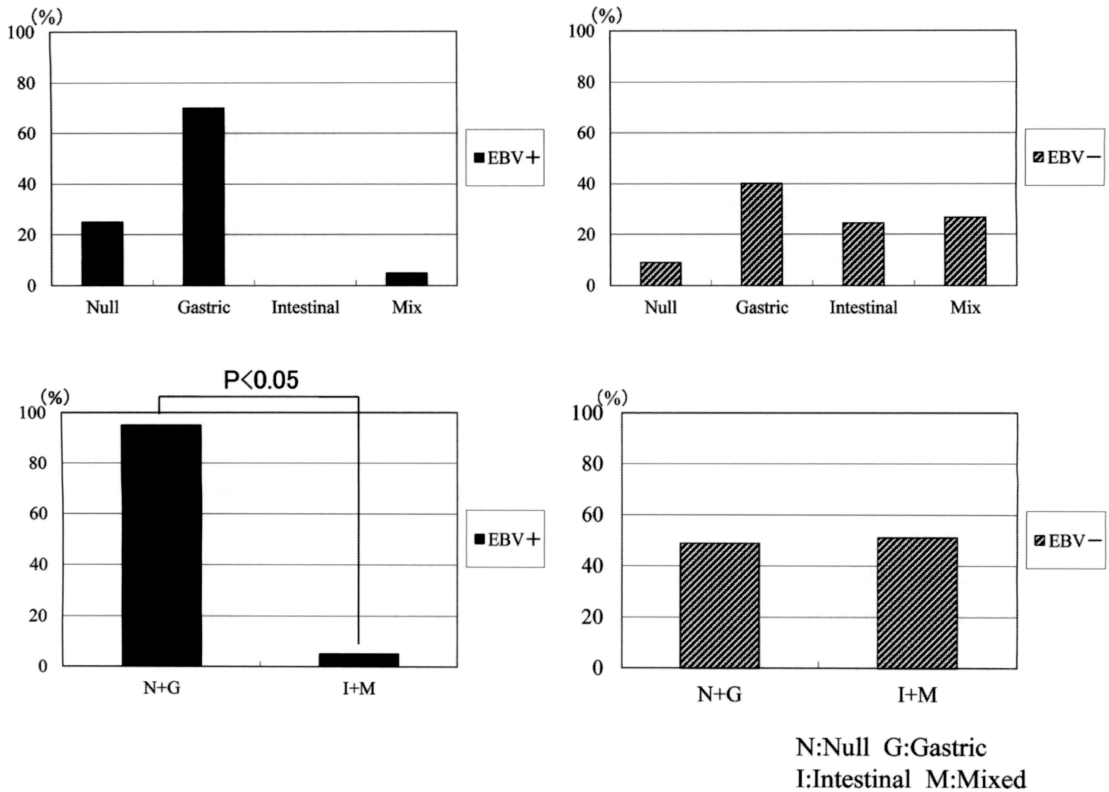


図 2 EBV 関連胃癌, EBV 非関連胃癌の粘液形質の割合

Null type, Gastric type は EBV 関連胃癌で多く, Intestinal type と Mix type は EBV 非関連胃癌で多い. Null type + Gastric type において EBV 関連胃癌の割合は EBV 非関連胃癌に比べ有意に高い ($p < 0.05$).

表 6 粘液形質と P1-HNF4α 発現の関係 (EBV 関連胃癌+対照群)

	Null type	Gastric type	Intestinal type	Mixed type	N+G type	I + M type
P1-HNF4α 陰性	6/9 (66.7%)	28/32 (87.5%)	2/11 (18.2%)	3/13 (23.1%)	34/41 (82.9%)	5/24 (20.8%)
P1-HNF4α 陽性	3/9 (33.3%)	4/32 (12.5%)	9/11 (81.8%)	10/13 (76.9%)	7/41 (17.1%)	19/24 (79.2%)

N: Null, G: Gastric, I: Intestinal, M: Mixed

粘液形質と P1-HNF4α の発現を比較すると, Null type は 9 病変中 6 病変 (66.7%), Gastric type は 32 病変中 28 病変 (87.5%) が P1-HNF4

α 陰性であった. 一方, Intestinal type 11 病変, Mixed type 13 病変のうち P1-HNF4α 陽性を呈したものはそれぞれ 9 病変 (81.8%), 10 病変

(76.9%) であった。 Null type と Gastric type を合わせると 34/41 病変 (82.9%) で P1 - HNF4 α 陰性、 Intestinal type と Mixed type は 19/24 病変 (79.2%) が P1 - HNF4 α 陽性であり、 Null type と Gastric type は P1 - HNF4 α 陰性傾向を、 Intestinal type と Mixed type は P1 - HNF4 α 陽性の傾向を示した ($p < 0.05$) (表 6)。

3. EBER1 - ISH 陽性胃粘膜内癌

胃粘膜内癌は 3 例・ 4 病変 (腫瘍径 18 - 37mm) において EBER1 - ISH で核全体に染色された。 また今回検討対象から除外した微小粘膜内癌 2 例において EBER1 - ISH で核の一部にのみ dot 状に染色される特異な像を観察した (図 3)。 この 2 病変の腫瘍径は 2mm、 15mm であり、 検討した

EBER1 - ISH 陽性全 20 病変よりも微小であった。 この dot 状の EBER1 - ISH 陽性胃癌は 2 病変ともに P1 - HNF4 α 陽性で、 粘液形質は Mixed type であった。 一方、 核全体に染色される EBER1 - ISH 陽性胃癌は 4 病変全て P1 - HNF4 α 陰性で、 粘液形質は Null type 2 病変、 Gastric type 2 病変であった。

4. ヒト胃癌細胞株を用いての比較検討

4-1. ヒト胃癌細胞株における HNF4 α 蛋白の発現

AGS、 AGS - EBV における HNF4 α 蛋白の発現を Western blot 法、 免疫染色で確認した (図 4A、 4B)。 Western blot 法では両細胞株ともに P2 - HNF4 α では 48kDa 付近に明瞭なバンドを検出し

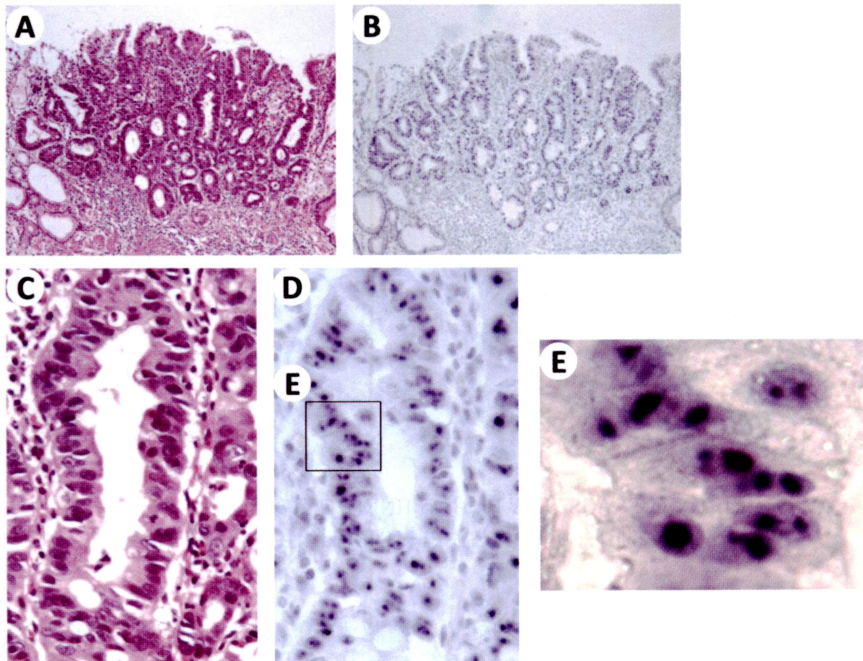


図 3 核内に dot 状に EBER1 - ISH 陽性となる胃癌

- A : HE 染色 ($\times 100$)。 腫瘍径 2mm の高分化管状腺癌。
- B : EBER1 - ISH ($\times 100$)。 腫瘍細胞に一致して EBER1 陽性。
- C : A の拡大像 ($\times 400$)。
- D : B の拡大像 ($\times 400$)。 EBER1 は核内に 1 ~ 3 個程度に dot 状に陽性となっている。
- E : D の拡大像 ($\times 1000$)。 dot 状染色は周囲との境界は比較的明瞭な円形、 楕円形の形態をとっている。

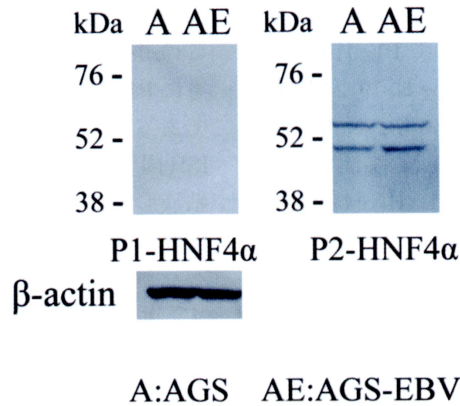


図4A AGS, AGS-EBVにおけるHNF4 α のWestern blot法
P1-HNF4 α 蛋白の発現は両細胞株とも認められない. P2-HNF4 α 蛋白は
両細胞株ともに発現を認める.

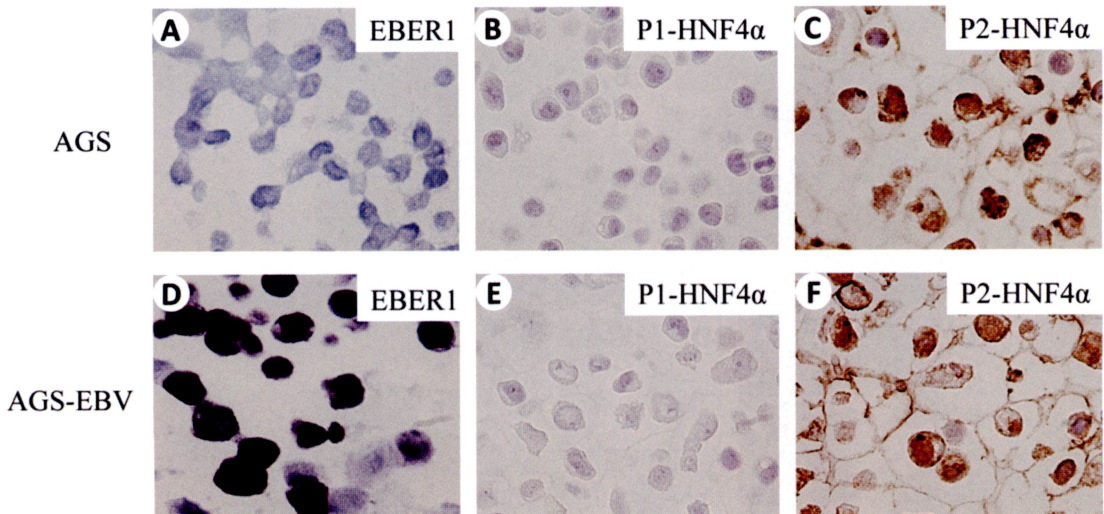


図4B AGS, AGS-EBVにおけるHNF4 α の免疫染色(×400)
Western blot法同様, 両細胞株ともP1-HNF4 α 陰性, P2-HNF4 α 陽性.

たものの, P1-HNF4 α 蛋白の発現は確認できなかった. また免疫染色においてもAGS, AGS-EBVともにP2-HNF4 α は陽性であったが, P1-HNF4 α は陰性であった.

4-2. ヒト胃癌細胞株, 切除検体におけるEBV I型潜伏感染遺伝子産物の発現

EBER1-ISHで核の一部にdot状に染色された胃粘膜内癌(以下dGC)2病変でのEBV感染を

確認すべく, BamHIW, LMP2, EBNA1によるPCR法を行った(図5). BamHIWではdGC, 陽性コントロールの全てにおいて83bp付近にバンドが検出された. このうち, 陽性コントロールには明瞭なバンドが検出されたが, dGCでは発現量の低下が見られた. LMP2では陽性コントロール全て及びdGCにおいて69bp付近にバンドが検出されたが, dGCは陽性コントロールに比し発現

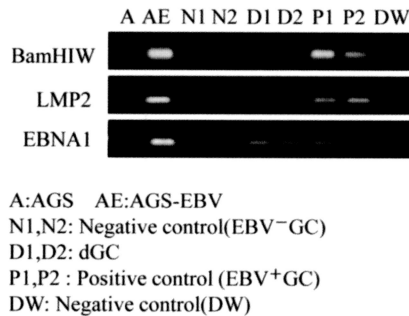


図5 dGCにおけるBamHIW, LMP2, EBNA1のPCR法
dGCではBamHIW, LMP2, EBNA1全てのDNAが発現している。BamHIW, LMP2は陽性コントロールよりもdGCで発現が低下している。

量が低かった。EBNA1では陽性コントロール、dGCにおいて78bp付近にバンドが検出された。AGS-EBVでのバンドが最も明瞭であり、EBV⁺GC、dGCの発現量は同程度に減弱していた。以上、dot状に染色される像を呈した胃粘膜内癌においてBamHIW, LMP2, EBNA1の発現を認め、EBV感染を確認したが、dot状に染色される胃癌は核全体に染色される胃癌に比べ、BamHIWとLMP2の発現量が低下していた。

考 察

EBV関連胃癌は一般の胃癌と比べ特徴的な臨床病理学的性質を有している。1990年にEBV関連胃癌が報告¹⁾されて以来、胃癌全体の約8.7% (7.5%-10.0%)を占めることが各国の施設から報告されており²⁾、本研究でも胃癌症例252症例265病変をISHで検索し、EBER1陽性20病変(7.55%)を検出した。また、EBV関連胃癌の年齢、男女比、発生部位も既報告例と近似し、残胃癌に多いことも相似していた。その他、腫瘍径と深達度、脈管侵襲は両者に有意差を認めなかった。組織型を見ると、EBV関連胃癌の組織型は中分化管状腺癌(tub2)と充実型低分化腺癌(por1)が多い点もこれまでの報告とほぼ一致した。以上の成績から、EBV関連胃癌は臨床病理学的に地域格差が少ないことが示唆された。

最近、EBV関連胃癌はNull type及びGastric typeの粘液形質を示すことが多いと報告された¹⁴⁾。本研究ではGastric typeが70%、Null typeは25%であり、Gastric type 39%、Null type 44%としたBaruaらの報告と開きが見られた¹⁴⁾。その要因の一つとして、Baruaらは胃型マーカーとして粘液コア蛋白であるMUC5AC, MUC6のみを用いたが、本研究ではコア蛋白に糖鎖の結合した蛋白であるHGM, M-GGMC-1も加えた事が挙げられる。加えて、Baruaらの免疫染色の陽性判定基準が陽性細胞25%以上に設定していたのに対し、本研究例では5%以上に設定したことも粘液形質の判定でNull typeとなりにくかった要因と思われる。しかしながら、EBV関連胃癌にGastric typeとNull typeが多いことにおいては合致していた。

HNF4 α は核内受容体superfamilyの一つであり、主に内胚葉の発生、糖代謝、脂質代謝などの転写調節を担っている⁶⁾⁻⁸⁾。HNF4 α はプロモーター領域の違いによりP1-HNF4 α とP2-HNF4 α の2種のアイソフォームが存在する⁹⁾¹⁰⁾。正常胃粘膜においては腺窩上皮、噴門腺、胃底腺、幽門腺はP1-HNF4 α を発現しないがP2-HNF4 α を発現し、腸上皮化生粘膜、正常な小腸、大腸粘膜はP1-HNF4 α 、P2-HNF4 α ともに発現する⁸⁾¹¹⁾¹⁵⁾。近年HNF4 α アイソフォームの発現パターンが非癌胃粘膜における腸上皮化生の有無や分化

型早期胃癌における粘液形質と関連していることが報告され、Takanoらは分化型早期胃癌において Gastric type では P1-HNF4 α は陰性で、Intestinal type と Mixed type では陽性であるとした¹¹⁾。しかし EBV 関連胃癌における HNF4 α の発現についての検討は極めて少なく、P1 と P2 アイソフォームの両者を比較検討した研究はない¹⁶⁾。

本研究ではまず EBV 関連胃癌、EBV 非関連胃癌における HNF4 α の発現を免疫組織学的に検討した。その結果、EBV 関連胃癌では EBV 非関連胃癌よりも有意に P1-HNF4 α の発現が低く、これは Uozaki らが報告した EBV 関連胃癌、EBV 非関連胃癌における P1-HNF4 α の発現結果に類似する¹⁶⁾。粘液形質は前述のように、EBV 関連胃癌では Gastric type と Null type が大半を占めており、これらはほとんど P1-HNF4 α 陰性であった。Null type も Gastric type 同様 MUC2、CD10 の腸型マーカーを発現しておらず、非腸型とも言える。このように P1-HNF4 α の発現は腸型への分化と密接な関係にある。すなわち胃において HNF4 α アイソフォームの発現から、Gastric type は P1-HNF4 α (-) / P2-HNF4 α (+)、Intestinal type は P1-HNF4 α (+) / P2-HNF4 α (+) と読み替える事が可能であり、EBV 関連胃癌は HNF4 α アイソフォームの発現からも胃型が多いと考えられる。EBV 感染が胃癌細胞の P1-HNF4 α 発現を抑制するかどうかを EBV 感染胃癌細胞株と非感染細胞株を用いて検討したが、用いた細胞株はもともと P1-HNF4 α を発現していなかったため確認できなかった。この点については今後の検討が必要である。

本研究では EBER1-ISH で陽性像を呈した微小な胃粘膜内癌のうち2病変で、核内の一部に核小体に類似した dot 状染色像が認められた。これまで EBV 関連胃癌では EBER1-ISH で核全体が染色されており、dot 状に染色されたという報告例はない。EBV エピソームは核内の傍クロマチン領域に存在しており、EBNA1 蛋白を介して染色体上につながりとめられており¹⁷⁾、共焦点レーザー顕微鏡を用いた解析でも核に局在する¹⁸⁾ことが報告されているものの EBER の核内局在の詳細

は検討されていない。

興味深いことに dot 状に染色された病変は本研究の EBER1-ISH 陽性例のうち最も小さな2病変(腫瘍径 2mm, 15mm)であった。腫瘍径の大きい粘膜内癌、粘膜下層以深の癌ではこの dot 状の染色性が認められなかった事から、この染色性が EBV 関連胃癌の初期病変を表している可能性が示唆される。さらに、PCR による EBV 遺伝子産物の検索では dot 状染色を呈した微小胃癌は2病変ともに陽性コントロールと比較して BamHIW と LMP2 の発現量の低下が見られ、これらの差異も EBV 潜伏感染初期のウィルス増殖状態を反映している可能性が考慮される。

dot 状染色を呈する胃癌は2病変ともに P1-HNF4 α 陽性、粘液形質は Mixed type であり、腸型の性質が混在するものであった。EBV 関連胃癌の粘液形質は Null type を示す事が多かったため、EBV 感染の標的は正常胃粘膜の中で Null type の粘液形質を呈する腺頸部の胃上皮幹細胞であると考えられてきた¹⁴⁾。しかしながら、微小な2病変において P1-HNF4 α 陽性、Mixed type の粘液形質を呈した事から、EBV が胃底腺のみならず腸上皮化生粘膜をも標的にしている可能性が示唆された。これらの問題点については今後さらなる検討が必要である。

結 論

EBV 関連胃癌 20 病変と EBV 非関連胃癌 245 病変の検討によって既報告例と類似した臨床病理学的特徴を認めた。EBV 関連胃癌では EBV 非関連胃癌に比べて Null type + Gastric type が有意に多く、P1-HNF4 α 陰性を呈する傾向が認められ、EBV 関連胃癌が腸型の性質を示しにくいことが示された。また EBER1-ISH で核の一部にのみ dot 状に染色される特異な胃癌を見出し、この染色像は EBV 関連胃癌の初期像に相当する可能性が示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました新潟大学大

学院医歯学総合研究科消化器内科学分野 寺井崇二教授，同 青柳 豊前教授（現新潟大学名誉教授），同分子細胞病理学分野 内藤 真前教授（現新潟大学名誉教授），北海道大学遺伝子病制御研究所感染癌研究センター 吉山裕規先生（現島根大学医学部微生物学講座教授）に深謝致します。また，本研究に関して助言・協力頂きました大橋瑠子先生，姜 淑英先生，長谷川 剛先生，技術指導を頂きました青山 崇技官をはじめ教室の皆様

文 献

- 1) Burke AP, Yen TS, Shekitka KM and Sobin LH: Lymphoepithelial carcinoma of the stomach with Epstein - Barr virus demonstrated by polymerase chain reaction. *Mod Pathol* 3: 377 - 380, 1990.
- 2) Murphy G, Pfeiffer R, Camargo MC and Rabkin CS: Meta - analysis shows that prevalence of Epstein - Barr virus - positive gastric cancer differs based on sex and anatomic location. *Gastroenterology* 137: 824 - 833, 2009.
- 3) Uemura Y, Tokunaga M, Arikawa J, Yamamoto N, Hamasaki Y, Tanaka S, Sato E and Land CE: A unique morphology of Epstein - Barr virus - related early gastric carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3: 607 - 611, 1994.
- 4) Rickinson AB and Kieff E: Epstein - Barr virus, In: *Fields Virology*. 3rd ed. Lippincott - Raven, Philadelphia, New york, pp2397 - 2445, 1996.
- 5) Fukayama M: Epstein - Barr virus and gastric carcinoma. *Pathol Int* 60: 337 - 350, 2010.
- 6) Sladek FM, Zhong WM, Lai E and Darnell JE Jr.: Liver - enriched transcription factor HNF - 4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev* 4: 2353 - 2365, 1990.
- 7) Jiang G, Nepomuceno L, Hopkins K and Sladek FM: Exclusive homodimerization of the orphan receptor hepatocyte nuclear factor 4 defines a new subclass of nuclear receptors. *Mol Cell Biol* 15: 5131 - 5143, 1995.
- 8) Sladek FM: Orphan receptor HNF4 and liver - specific gene expression. *Receptor* 3: 223 - 232, 1993.
- 9) Jiang S, Tanaka T, Iwanari H, Hotta H, Yamashita H, Kumakura J, Watanabe Y, Uchiyama Y, Aburatani H, Hamakubo T, Kodama T and Naito M: Expression and localization of P1 promoter - driven hepatocyte nuclear factor - 4 α (HNF4 α) isoforms in human and rats. *Nucleic Recept* 1: 1 - 12, 2003.
- 10) Tanaka T, Jiang S, Hotta H, Takano K, Iwanari H, Sumi K, Daigo K, Ohashi R, Sugai M, Ikegame C, Umezu H, Hirayama Y, Midorikawa Y, Hippo Y, Watanabe A, Uchiyama Y, Hasegawa G, Reid P, Aburatani H, Hamakubo T, Sakai J, Naito M and Kodama T: Dysregulated expression of P1 and P2 promoter - driven hepatocyte nuclear factor - 4 α in the pathogenesis of human cancer. *J Pathol* 208: 662 - 672, 2006.
- 11) Takano K, Hasegawa G, Jiang S, Kurosaki I, Hatakeyama K, Iwanari H, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T and Naito M: Immunohistochemical staining for P1 and P2 promoter - driven hepatocyte nuclear factor - 4 α may complement mucin phenotype of differentiated - type early gastric carcinoma. *Pathol Int* 59: 462 - 470, 2009.
- 12) Sugai M, Umezu H, Yamamoto T, Jiang S, Iwanari H, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T and Naito M: Expression of hepatocyte nuclear factor 4 α in primary ovarian mucinous tumors. *Pathol Int* 58: 681 - 686, 2008.
- 13) Oshima T, Kawasaki T, Ohashi R, Hasegawa G, Jiang S, Umezu H, Aoyagi Y, Iwanari H, Tanaka T, Hamakubo T, Kodama T and Naito M: Downregulated P1 promoter - driven hepatocyte nuclear factor - 4 α expression in human colorectal carcinoma is a new prognostic factor against liver metastasis. *Pathol Int* 57: 82 - 90, 2007.
- 14) Barua RR, Uozaki H, Chong JM, Ushiku T, Hino R, Chang MS, Nagai H and Fukayama M: Phenotype analysis by MUC2, MUC5AC, MUC6, and CD10 expression in Epstein - Barr virus - associated gastric carcinoma. *J Gastroenterol* 41: 733 - 739, 2006.
- 15) Kojima K, Kishimoto T, Nagai Y, Tanizawa T, Nakatani Y, Miyazaki M and Ishikura H: The

- expression of hepatocyte nuclear factor - 4alpha, a developmental regulator of visceral endoderm, correlates with the intestinal phenotype of gastric adenocarcinomas. *Pathology* 38: 548 - 554, 2006.
- 16) Uozaki H, Barua RR, Minhua S, Ushiku T, Hino R, Shinozaki A, Sakatani T and Fukayama M: Transcriptional factor typing with SOX2, HNF4aP1, and CDX2 closely relates to tumor invasion and Epstein - Barr virus status in gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 4: 230 - 240, 2011.
- 17) Deutsch MJ, Ott E, Papior P and Schepers A: The latent origin of replication of Epstein - Barr virus directs viral genomes to active regions of the nucleus. *J Virol* 84: 2533 - 2546, 2010.
- 18) Fok V, Friend K and Steitz JA: Epstein - Barr virus noncoding RNAs are confined to the nucleus, whereas their partner, the human La protein, undergoes nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Biol* 173: 319 - 325, 2006.

(平成 28 年 12 月 28 日受付)
