

---

---

原 著

---

---

## ヒト肝細胞癌における Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ の 発現に関する研究

戸 枝 路 子

新潟大学大学院医歯学総合研究科

消化器内科学分野・肝臓病学分野

(指導：青柳 豊教授)

### Expression of Hepatocyte Nuclear Factor 4 $\alpha$ in Hepatocellular Carcinoma

Michiko TOEDA

*Division of Gastroenterology and Hepatology,*

*Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science*

*(Director: Prof. Yutaka AOYAGI)*

#### 要 旨

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核内転写因子の Hepatocyte nuclear factor 4  $\alpha$  (HNF4  $\alpha$ ) には 9 つのアイソフォームが存在し、P1 アイソフォーム（以下 P1 と略）と P2 アイソフォーム（以下 P2 と略）に大別される。本研究ではヒト肝細胞癌の組織学的分化度、門脈侵襲、肝内転移、TNM 分類と HNF4  $\alpha$  アイソフォームの発現について検索し、予後との関係についても検討を行った。

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 3 種の抗体を用いた免疫染色と HNF4  $\alpha$  蛋白と mRNA の発現が合致し、いずれの方法でも P1, P2 を識別できることを確認した。これらの抗体を用いて、外科的に切除されたヒト肝細胞癌 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 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、

---

**Reprint requests to:** Michiko TOEDA  
Division of Gastroenterology and Hepatology  
Niigata University Graduate School of Medical  
and Dental Science  
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・  
肝臓病学分野 戸 枝 路 子

TNM stage I / II 症例の陽性率 (38%) と比較して有意に高かった。この様に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。以上、P2 の肝細胞癌における発現は、組織学的分化度と予後に関連するものと考えられた。

キーワード：Hepatocyte nuclear factor 4  $\alpha$  , 肝細胞癌, 組織学的分化度, P2 プロモーター

## 緒 言

Hepatocyte nuclear factor 4  $\alpha$  (HNF4  $\alpha$ ) は、リガンド不明の核内受容体で、主に内胚葉組織に発現し、脂質や糖などの代謝に関わる遺伝子の転写を調節する<sup>1)2)</sup>。HNF4  $\alpha$  は肝細胞核にも発現し、肝細胞の分化や機能に關与する転写活性の制御に重要な役割を担っている<sup>3)4)</sup>。HNF4  $\alpha$  には 9 つのアイソフォームが存在し<sup>5)</sup>、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) を、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、抗体 H1415 は両者を認識する。これら抗体を用いて P1 と P2 の免疫組織学的識別が可能である。

HNF4  $\alpha$  アイソフォームは肝細胞の分化に關与することが知られている<sup>6)</sup>。ヒト成人の正常肝細胞では P1 が発現し、P2 は発現しないが<sup>6)</sup>、胎生期のマウス肝細胞には P2 の発現がみられ、出生後に消失し、一方 P1 は胎生期および出生後も発現が持続する<sup>7)</sup>。

癌との関連に關しては、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<sup>8)</sup>、肝細胞癌や腎細胞癌において HNF4  $\alpha$  の発現低下が癌化に關与する可能性<sup>9)10)</sup>、P2 が肝細胞の癌化に關与する<sup>11)</sup> 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い。

本研究では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興味ある結果を得たので報告する。

## 材料と方法

### 1. 検討対象

新潟大学医歯学総合病院において、2002 年から 2009 年までに外科的に切除された原発性肝細胞癌 54 例について免疫組織学的検討を行った。男性が 43 名、女性が 11 名で、平均年齢は 66.9 歳 (39 ~ 81 歳) であった (表 1)。HBsAg 陽性が 7 例、HCV 抗体陽性が 30 例、両者が陽性である症例も 1 例みられた。病理学的背景肝は切除標本の非癌部で評価、分類した。正常肝は 3 例、慢性肝炎あるいは肝線維症が 19 例、肝硬変が 32 例であった。また Child-Pugh A が 49 例、B が 5 例であり、手術時の肝予備能は保たれていた。いずれも手術時に遠隔転移がなく、ラジオ波焼却療法、エタノール注入療法などの穿刺療法や肝動脈塞栓療法等の肝細胞癌に対する前治療が行われていない、初回手術症例を検討対象とした。

病理組織学的分化度については、原発性肝癌取り扱い規約第 5 版補訂版 (2009 年)<sup>12)</sup> に基づき、2 名の病理医により分類した。高分化型が 15 例、中分化型が 30 例、低分化型が 9 例であった。検体はホルマリン固定、パラフィン包埋した後、薄切して hematoxylin eosin 染色と免疫染色を行った。

HNF4  $\alpha$  の mRNA の発現の検索には、 $-80^{\circ}\text{C}$  に凍結した原発性肝細胞癌の手術サンプル 3 例 (高分化型 1 例、中分化型 1 例、低分化型 1 例) を使用した。臨床検査成績、予後については診療録を参照した。なお、ヒト組織への本研究への使用については新潟大学倫理委員会の承認を得ている。

表1 肝細胞癌54例の臨床病理像

		症例数(%)
年齢(歳)	範囲	39-81
	平均値	66.9
性別	男性	43 (79.6)
	女性	11 (20.4)
ウイルス感染	HBsAg 陽性	7 (12.9)
	anti-HCV 陽性	30 (55.6)
	両方陽性	1 (1.9)
	なし	16 (29.6)
背景肝	正常肝	3 (5.5)
	慢性肝炎または肝線維症	19 (35.2)
	肝硬変	32 (59.3)
Child-Pugh 分類	A	49 (90.7)
	B	5 (9.3)
	C	0 (0)
組織学的分化度	高分化型	15 (27.8)
	中分化型	30 (55.6)
	低分化型	9 (16.6)

## 2. 細胞株

肝細胞癌由来の細胞株 Huh7, HepG2 は, 東京大学先端科学技術研究センターから供与を受けた. 培養には 10% 非動化胎仔牛血清 (JRH Bioscience, Lenexa, KS, USA), ペニシリン (100U/ml), ストレプトマイシン (100mg/ml) 含有 DMEM (Sigma-Aldrich, Irvine, UK) を使用した. これらの細胞株における HNF4 $\alpha$  の発現を免疫染色, ウェスタンブロット, RT-PCR で検討した.

## 3. 一次抗体

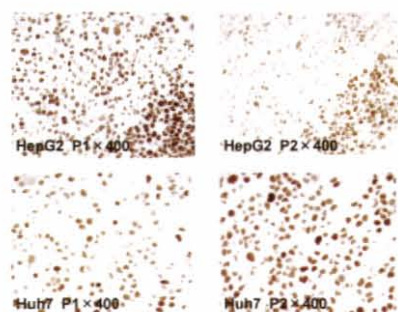
HNF4 $\alpha$  のアイソフォームを識別する 3 種類のマウス抗ヒト HNF4 $\alpha$  モノクローナル抗体を用いた. 抗体 H9218 は P1 プロモーター由来のアイソフォーム $\alpha$  1-6 (P1) を, 抗体 K6939 は P2 プロモーターのアイソフォーム $\alpha$  7, 8, 9 (P2) を, 抗体 H1415 はアイソフォーム $\alpha$  1, 2, 4, 5, 7, 8 を認識する (ペルセウスプロテオミクス・東京). H9218, H1415 は 100 倍希釈, K6939 は 50 倍希釈して使用した.

## 4. 免疫組織化学

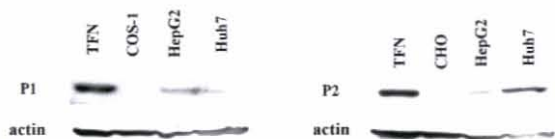
ホルマリン固定, パラフィン包埋した組織を薄切し, オートクレーブ処理 (121°C, 15 分) によって抗原を賦活化して免疫染色を行った. 上記の一次抗体に反応させた後, 二次抗体としてヒストファインシンプルステイン MAX-PO (MULTI) (Nichirei, Tokyo) を使用して酵素標識ポリマー法 (間接法) にて染色し, 発色には 3,3'-diaminobenzidine (Nichirei, Tokyo) を用いた.

## 5. ウェスタンブロット法

培養細胞に 1% TritonX, 150mM NaCl, 50mM Tris-HCl pH8.0, 5mM EDTA, 10ug/ml Aprotinin, 10ug/ml leupeptin, 1mM PMSF の混合液を加え, 氷上に 30 分間静置後に 14,000rpm で 15 分間遠心して蛋白を抽出した. 蛋白は 8% SDS-PAGE で分離し, PVDF メンブレン (Asherman, 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した後に一次抗体を 1 時間, 二次抗体として anti-mice Ig-horseradish

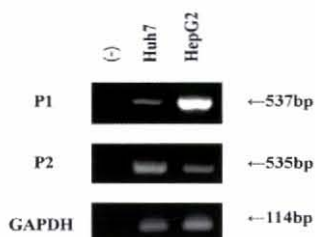
A HNF4 $\alpha$  の免疫染色

HepG2, Huh7 ともに P1, P2 陽性であった。

B HNF4 $\alpha$  の蛋白発現 (ウエスタンブロット)

TFN (transfection の略) は、それぞれ P1, P2 を強制発現させた COS-1 細胞株, CHO 細胞株から抽出した蛋白のことで、陽性対照として使用した。

HepG2, Huh7 ともに P1, P2 蛋白の発現を認める。P1 は HepG2 > Huh7, P2 は Huh7 > HepG2 であった。

C HNF4 $\alpha$  の mRNA 発現 (RT-PCR)

HepG2, Huh7 ともに P1, P2 mRNA の発現を認める。

発現強度に差があり, P1 は HepG2 > Huh7 であり, P2 は Huh7 > HepG2 であった。

図 1 肝細胞癌細胞株における HNF4 $\alpha$  の発現

peroxidase-linked F(ab)<sub>2</sub> fragment (Asherman) を 30 分間反応させ, ECL detection system (Asherman) で可視化した。陽性対照としてそれぞれ P1, P2 を強制発現させた COS-1 細胞株, CHO 細胞株から抽出した蛋白を使用した。

## 6. RNA の抽出と RT-PCR 法

培養細胞および手術サンプルから acid guanidinium-phenol-chloroform 法を用いて total RNA を抽出した。1  $\mu$ g の total RNA を RT Buffer (Invitrogen), 0.01M の dithiothreitol (Invitrogen), 20U の RNase inhibitor (Promega, Southampton, UK), 500  $\mu$ M の deoxynucleotide triphosphates

(dNTPs ; Pharmacia, Uppsala, Sweden), 1  $\mu$ g の random primer (Promega), 100U の reverse transcriptase (Invitrogen) と混和し, 蒸留水で総量 20  $\mu$ l とした。反応液を 42  $^{\circ}$ C で 60 分間インキュベート後, 95  $^{\circ}$ C, 3 分加熱して cDNA を作成した。今回用いたプライマーは, P1 : forward, 5'-GTTCGACATGGACATGGC CGAC TACA GTG-3'; P2 : forward, 5'-GGCCATGGTTCAG CGTGA ACGCGCCCCTCGG-3', P1, P2 : reverse, 5'-GCCCCGAATGTGCGCCGTTGATCCCGGAGACG3'; glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) : forward, 5'-CCACATCGCTCAGA-CACCAT-3', reverse, 5'-GGCAACAATATC-

表2 臨床病理学的各因子とP2発現との関連

		P2 陽性 (症例数)	P2 陰性 (症例数)	P value
年齢※		67.2(39-81)	66.5(55-80)	0.351
性別	女	8	3	0.179
	男	20	23	
ウイルス感染	HBV	5	2	0.898
	HCV	16	14	
	HBV+HCV	0	1	
	なし	7	9	
Child-Pugh 分類	A	25	24	0.996
	B	3	2	
	C	0	0	
背景肝	肝硬変	16	16	0.954
	肝線維症もしくは慢性肝炎	11	8	
	正常肝	1	2	
AFP(ng/ml)※		2189(4-49335)	78(4-429)	0.007*
TNMstage	I or II	12	20	0.023*
	III or IV	16	6	
腫瘍数	単発	15	20	0.155
	多発	13	6	
腫瘍径(mm)※		42(6-160)	27(8-55)	0.081
組織学的分化度	高分化	4	11	0.009**
	中分化	15	15	
	低分化	9	0	
門脈浸潤	あり	9	1	0.012*
	なし	19	25	
肝内転移	あり	8	2	0.078
	なし	20	24	

※ 平均値 (範囲) を示した。 \*(<0.05) \*\*(<0.01)

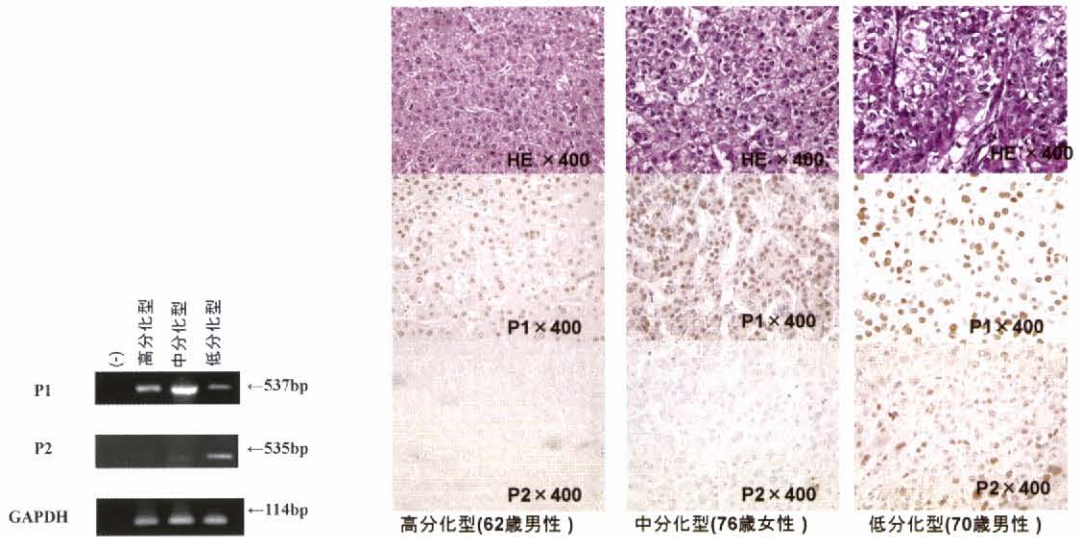
CACTTTACCAGAGT-3' である。P1, P2 の PCR は 94 °C 5 分, (94 °C 1 分, 60 °C 1 分, 72 °C 1 分) 30 サイクル, GAPDH は (94 °C 1 分, 60 °C 1 分, 72 °C 1 分) 30 サイクルの条件で行った。サーマルサイクラーは PC-816 (ASTECC, 福岡, 日本) を使用した。陰性コントロールは template DNA の代わりに滅菌蒸留水を加えたものを使用した。PCR 産物 10 $\mu$ l を 15% ポリアクリルアミドゲルで 100V, 50 分泳動後に紫外線イルミネーターで検出した。

## 7. 免疫染色における評価と統計解析

HNF4 $\alpha$  の免疫染色における評価は、陽性細胞が全体の 0% を -, 10% 未満を ±, 10% 以上 50% 未満を 1+, 50% 以上 100% 未満を 2+, 100% を 3+ と分類し, 1+ 以上を陽性とした。

クロス表の統計比較には、 $\chi^2$  test, Fisher's exact test および Mann-Whitney U test を行った。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。



A HNF4 $\alpha$  の mRNA 発現 (RT-PCR)  
ヒト肝細胞癌組織 (図 2B の免疫染色と同一症例) の RT-PCR では、P1 は高分化型、中分化型、低分化型のいずれにも発現し、P2 は高分化型、中分化型での発現はわずかであったが、低分化型では強い発現を認めた。

B HNF4 $\alpha$  の免疫染色  
高分化型肝細胞癌と中分化型肝細胞癌は P1 陽性、P2 陰性であったが、低分化型肝細胞癌では P1、P2 ともに陽性であった。

図 2 ヒト肝細胞癌組織における HNF4 $\alpha$  の発現

## 結 果

### 1. 肝細胞癌細胞株における免疫染色と蛋白および mRNA の発現

免疫染色では、HepG2、Huh7ともに、P1、P2が陽性であった (図 1A)。ウエスタンブロットでは、HepG2、Huh7ともに P1 の予想される分子量の 52kDa にバンドが検出された。細胞株によって蛋白の発現の強度に差があり、P1 は HepG2 > Huh7 であった。HepG2、Huh7ともに P2 の予想される分子量の 48kDa にバンドが検出された。細胞株によって蛋白の発現の強度に差があり、P2 は Huh7 > HepG2 であった (図 1B)。RT-PCR では、HepG2、Huh7ともに P1 および P2 の mRNA の発現が見られた (図 1C)。mRNA の発現の強度は、P1 については HepG2 > Huh7 であり、

P2 は Huh7 > HepG2 で、これは蛋白の発現強度と同様の結果であった。

### 2. 肝細胞癌の免疫染色と mRNA の発現

原発性肝細胞癌の RT-PCR では、P1 は高分化型、中分化型、低分化型のいずれにも発現が見られた。発現強度は、中分化型 > 高分化型 > 低分化型であった。高分化型、中分化型ではわずかに P2 のバンドが認識されるのみであったが、低分化型では強い発現を認めた (図 2A)。この結果は同一症例の免疫染色による蛋白発現 (図 2B) と合致した。

### 3. 肝細胞癌の臨床病理学的因子と P2 の発現

三種の抗体を用いた免疫染色の結果、正常肝細胞は P1 陽性で、P2 陰性であった。同様に、全て

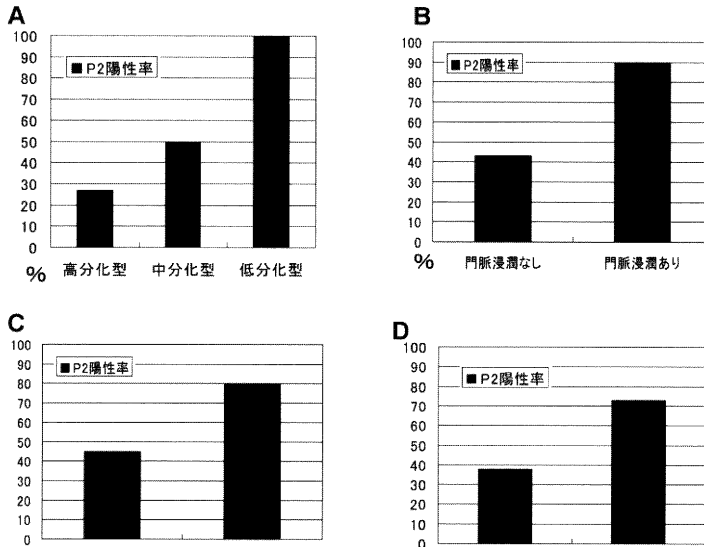


図2 ヒト肝細胞癌組織における HNF4 $\alpha$  の発現

図3 臨床病理学的因子と P2 陽性率

- A : P2 陽性率は高分化型よりも中分化・低分化になるにつれ有意に高くなった (高分化型 27 %, 中分化型 50 %, 低分化型 100 %) ( $P = 0.009$ ).
- B : 門脈侵襲のある群 (9/10 例 : 90 %) は, ない群 (19/44 例 : 43 %) と比較して P2 陽性率が有意に高かった ( $P = 0.012$ ).
- C : 肝内転移のある群 (8/10 例 : 80 %) は, ない群 (20/44 例 : 45 %) と比較して P2 陽性率が高い傾向にあったが有意差はなかった ( $P = 0.078$ ).
- D : TNM stage III/IV 症例 (16/22 : 73 %) は, TNM stage I/II 症例 (12/32 : 38 %) と比較して P2 陽性率は有意に高かった ( $P = 0.023$ ).

の非癌部の肝細胞は P1 陽性で, P2 は陰性であった. 肝細胞癌 54 例において P1 は全例に陽性 (100 %) で, 背景の非癌部と比べ, 癌部で染色強度が増強している症例と低下している症例があり, その染色態度は様々であった. P2 は 28 例が陽性 (52 %) であった (表 2).

組織学的分化度と P2 陽性率を比較すると, 高分化型は 4/15 例 (27 %), 中分化型は 15/30 例 (50 %), 低分化型は 9/9 例 (100 %) であり, 分化度が下がるにつれ P2 陽性率が有意に増加した ( $P=0.009$ ; 図 3A).

臨床病理学的各因子と P2 陽性率との関連について検討した (表 2). 門脈侵襲と P2 陽性率については, 門脈侵襲を有する群 9/10 例 (90 %) は有さない群 19/44 例 (43 %) と比し, 有意に高かった ( $P = 0.012$ ; 図 3B). 肝内転移と P2 陽性率

については, 肝内転移を有する群 8/10 例 (80 %) は, 有さない群 20/44 (45 %) と比し, 高い傾向にあるものの有意差は認めなかった ( $P = 0.078$ ; 図 3C). TNM 分類から検討すると, TNM stage III/IV 症例の P2 陽性率 16/22 (73 %) は, TNM stage I/II 症例の P2 陽性率 12/32 (38 %) と比較して有意に高かった ( $P = 0.023$ ; 図 3D).

血清 AFP 値との比較では, P2 陽性群の AFP 値 (平均値 2120.45ng/ml) は, P2 陰性群 (平均値 59.11ng/ml) に比し, 有意に高かった ( $P = 0.007$ ; 表 2).

#### 4. 肝細胞癌 54 例の予後と P2 陽性率

原発性肝細胞癌 54 例について経過追跡を行い, P2 陽性群 28 例, 陰性群 26 例の 2 群について生



生存曲線および無再発生存曲線を作成し、比較検討を行ったところ、生存率に関して有意差は認めなかった ( $P = 0.224$  ; 図 4A). 無再発生存率においても有意差は認めなかった ( $P = 0.100$  ; 図 4B). しかし術後 2 年における無再発生存率は P2 陽性群は P2 陰性群に比べ有意に低かった ( $P = 0.036$  ; 図 4C).

## 考 察

本邦における肝細胞癌による死亡者数は年間約 34,000 人余りに及んでおり、悪性新生物のなかで男性は 3 位、女性は 4 位を占めている<sup>13)</sup>. 肝細胞癌の多くは B 型慢性肝炎および C 型慢性肝炎、肝硬変を背景として発症し、前癌病変から高分化型肝細胞癌を経て、古典的肝細胞癌へ進行していくと考えられている<sup>14)15)</sup>. 腫瘍分化度は病理組織学的に主要な予後因子の一つであり<sup>16)</sup>、分化度に関連する細胞分子レベルの解析は発癌過程や予防を考える上でもきわめて重要であると思われる.

一方 HNF4 $\alpha$  は核内受容体の一つで、肝細胞の分化や癌化に関与していることが示唆されている<sup>6)17)</sup>. しかし 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少ない. 本研究では HNF4 $\alpha$  のアイソフォームを識別する抗体を用いて、免疫染色とウエスタンブロットによる蛋白発現が相関すること、及び mRNA の発現と蛋白発現が合致することを細胞株とヒト肝細胞癌新鮮材料を用いて検証した上で、54 例のヒト肝細胞癌における HNF4 $\alpha$  の発現を免疫組織学的に検討した.

検討の結果、P1 は 54 例全例に発現していた. 背景の非癌部と比べ、癌部で染色強度が増強している症例と低下している症例があり、その染色態度は様々であった. Oshima らは P1, P2 の両者を発現する大腸癌に比べ、P1 の発現が低下した大腸癌は肝転移が多いことを報告した<sup>8)</sup>. またマウスを用いた実験で、肝細胞癌が進行するにつれ HNF4 $\alpha$  1 (P1 アイソフォームの一つ) の発現が低下し、これを再び強制発現させることで癌の進行を抑制することができることが報告されている<sup>10)</sup>. このように P1 の発現が悪性度と関連する可能性が示唆されるが、

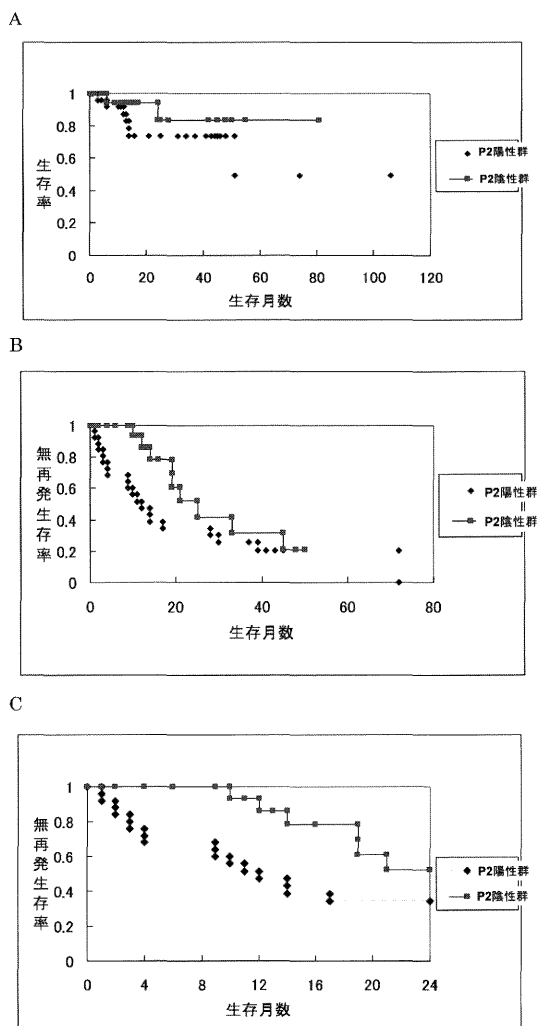


図 4 肝細胞癌 54 例の生存率および無再発生存率  
 A : 生存率に有意差はなかった ( $P = 0.224$ ).  
 B : 50 ヶ月までの無再発生存率においても有意差を認めなかった ( $P = 0.100$ ).  
 C : 術後 2 年までの無再発生存率は、P2 陽性群は P2 陰性群に比べ有意に低かった ( $P = 0.036$ ).

本研究では肝細胞癌の分化度と P1 発現との関連は認めなかった.

一方、肝細胞癌の検討では P2 は分化度が下がるにつれて、有意に免疫染色の陽性率が増加した. ヒ



ト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 は成人の正常肝細胞では発現しておらず、胎生期には発現する<sup>7)</sup>。肝細胞癌では P1 から P2 へアイソフォームが転換する<sup>11)</sup>とされているが、本研究において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。

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。肝細胞癌の多くは血管に富んだ腫瘍であり、肝内での Epidermal growth factor (EGF) および Vascular epithelial growth factor (VEGF) の過剰発現により肝細胞癌への transformation が生じることが示唆されている<sup>18)19)</sup>。一方で P2 は EGF 受容体の発現を促進するとの報告<sup>11)</sup>もあり、このような機序を介して P2 が肝細胞癌の進展に関与する可能性が推察された。

次に肝細胞癌の臨床病理学的因子と P2 陽性率について検討を行った。その結果、門脈侵襲のある群ではない群と比べて、有意に P2 陽性率が高く、TNMstage III/IV 症例は TNMstage I/II 症例と比べて有意に P2 陽性率が高かった。TNM 分類、門脈侵襲の有無は肝切除後の主要な予後因子とされている<sup>20)</sup>。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。

肝細胞癌の生存率および無再発生存率について P2 陽性群と陰性群とで比較検討を行ったが、有意差はみられなかった。肝細胞癌切除後の再発は、一般的には切除後 1 年で約 25%、2 年で約 50%、5 年で 65~80% と<sup>21)22)</sup> 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、AFP32ng/ml 以上があげられているが<sup>23)</sup>、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<sup>24)</sup>。本研究でも、術後 2 年での無再発生存率は P2 陽性群で 34%、P2 陰性群で 52% と有意差を認めたのに対

し、術後 4 年では P2 陽性群、陰性群ともに 20% であり、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。今後 P2 の発現と肝細胞の癌化、およびその進展機序における P2 の役割について解明が必要である。

## 結 論

原発性肝細胞癌において、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。

## 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 青柳豊教授、同分子細胞病理学分野 内藤眞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 Alexander S. Savchenko 先生、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大谷内健二技官、青山崇技官、斉藤祐子技官をはじめ教室の皆様へ深謝致します。

## 文 献

- 1) Jiang G, Nepomuceno L, Hopkins K and Sldek 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.
- 2) 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. *Genes Dev* 4: 2353-2365, 1990.
- 3) Parviz F, Matullo C, Garrison WD, Savatski L, Adamson JW, Ning G, Kaestner KH, Rossi JM, Zaret KS and Duncan SA: Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet* 34: 292-296, 2003.
- 4) Battle MA, Konopka G, Parviz F, Coggl AL, Yang

- C, Sladek FM and Duncan SA: Hepatocyte nuclear factor 4 alpha orchestrates expression of cell adhesion proteins during the epithelial trans - formation of the developing liver. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 8419 - 8424, 2006.
- 5) 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 alpha (HNF 4alpha) isoforms in human and rats. *Nucl Recept* 1: 1 - 12, 2003.
  - 6) 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, Peid PC, Aburatani H, Hamakubo T, Sakai J, Naito M and Kodama T: Dysregulated expression of P1 and P2 promoter - driven hepatocyte nuclear factor 4 alpha in the pathogenesis of human cancer. *J Pathol* 208: 662 - 672, 2006.
  - 7) Torres - Padilla ME, Fougère - Deschatrette C and Weiss MC: Expression of HNF4  $\alpha$  isoforms in mouse liver development is regulated by sequential promotes usage and constitutive 3' end splicing. *Mech Dev* 109: 183 - 193, 2001.
  - 8) 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 alpha expression in human colorectal carcinoma is a new prognostic factor against liver metastasis. *J Pathol* 57: 82 - 90, 2007.
  - 9) Sel S, Ebert T, Ryffel GU and Drewes T: Human renal cell carcinogenesis is accompanied by a coordinate loss of the tissue specific transcription factors HNF4  $\alpha$  and HNF1  $\alpha$ . *Cancer Lett* 101: 205 - 210, 1996.
  - 10) Lazarevich NL, Cheremnova OA, Verga EV, Ovchinnikov DA, Kudrjajtseva EI, Morozova OV, Flesishman DI, Engelhardt NV and Duncan SA: Progression of HCC in mice is associated with a down regulation in the expression of hepatocyte nuclear factors. *Hepatology* 39: 1038 - 1047, 2004.
  - 11) Niehof M and Borlak J: EPS15R, TASP1, and PRPF3 are novel disease candidate genes targeted by HNF4 alpha splice variants in hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 134: 1191 - 1202, 2008.
  - 12) 日本肝癌研究会/編：臨床・病理 原発性肝癌 取扱い規約 2009年6月第5版補訂版. 金原出版株式会社, 東京, pp24, 2009.
  - 13) 工藤正俊, 有井滋樹, 猪飼伊和夫, 小俣政男, 神代正道, 坂本亨宇, 高安賢一, 林 紀夫, 幕内雅敏, 松山 裕, 門田守人：第18回全国原発性肝癌追跡調査報告(2004 - 2005)(日本肝癌研究会追跡調査委員会). *肝臓* 51: 460 - 484, 2010.
  - 14) Takayama T, Makuuchi M, Hirohashi S, Sakamoto M, Okazaki N, Takayasu K, Kosuge T, Motoo Y, Yamazaki S and Hasegawa H: Malignant transformation of adenomatous hyperplasia to hepatocellular carcinoma. *Lancet* 336: 1150 - 1153, 1990.
  - 15) Sakamoto M, Hirohashi S and Shimasato Y: Early stage of multistep hepatocarcinogenesis: adenomatous hyperplasia and early hepatocellular carcinoma. *Human Pathol* 22: 172 - 178, 1991.
  - 16) Ker CG, Chen HY, Chen KS, Jeng IJ, Yang MY, Juan CC, Chen PH and Lo HY: Clinical significance of cell differentiation in hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology* 50: 475 - 479, 2003.
  - 17) Spath GF and Weiss MC: Hepatocyte nuclear factor 4 provokes expression of epithelial marker genes, acting as a morphogen in dedifferentiated hepatoma cells. *J Cell Biol* 140: 935 - 946, 1998.
  - 18) Huang G, Yang L, Yang J, Liu H and Yang Z: Correlation between epidermal growth factor and overexpression of vascular endothelial growth factor in hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 24: 564 - 566, 2002.
  - 19) Schiffer E, Housset C, Cacheux W, Wendum D, Desbois Mouthon C, Rey C, Clergue F, Poupon R, Barbu V and Rosmorduc O: Gefinitib, an EGFR inhibitor, prevents hepatocellular carcinoma development in the rat liver with cirrhosis. *Hepatology* 41: 307 - 314, 2005.
  - 20) Poon RT, Ng IO, Fan ST, Lai EC, Lo CM, Liu CL

- and Wong J: Clinicopathologic features of long-term survivors and disease free survivors after resection of hepatocellular carcinoma: a study of a prospective cohort. *J Clin Oncol* 19: 3037 - 3044, 2001.
- 21) Makuuchi M, Takayama T, Kubota K, Kimura W, Midirikawa Y, Miyagawa S and Kawasaki S: Hepatic resection for hepatocellular carcinoma - Japanese experience. *Hepatogastroenterology* 45: 1267 - 1274, 1998.
- 22) Lau H, Fan ST, Ng IO and Wong J: Long term prognosis after hepatectomy for hepatocellular carcinoma: a survival analysis of 204 consecutive patients. *Cancer* 83: 2302 - 2311, 1998.
- 23) Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, Ohkubo T, Hasegawa S, Sugawara Y, Minagawa M, Takayama T, Kawasaki S and Makuuchi M: Risk factors contributing to early and late phase intra-hepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy. *J Hepatol* 38: 200 - 207, 2003.
- 24) Poon RT, Fan ST, Ng IO, Lo CM, Liu CL and Wong T: Different risk factors and prognosis for early and late intrahepatic recurrence after resection of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 89: 500 - 507, 2000.

(平成23年11月24日受付)

---