

# 博士の学位論文審査結果の要旨

申請者氏名 澤住 知枝

横浜市立大学大学院医学研究科 病態病理学

## 審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科 血液・免疫・感染症内科学 主任教授 中島 秀明

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 公衆衛生学 主任教授 後藤 温

副査 横浜市立大学大学院医学研究科 組織学 講師 富澤 信一

## Prognostic impact of HNF4 $\alpha$ expression in interstitial lung disease

(間質性肺疾患における HNF4  $\alpha$  発現と予後指標としての有用性)

<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34643024/>

【目的】 間質性肺疾患 (Interstitial lung disease; ILD) は、両肺びまん性に間質に炎症や線維化が広がる疾患群の総称である。原因不明の特発性間質性肺炎 (Idiopathic pulmonary fibrosis; IPF) を代表とし、鑑別疾患が多岐に渡り、診断や治療に難渋することが多い。特に肺胞上皮傷害は、間質性肺疾患の重症度に影響を及ぼす重要な因子であると考えられている (石川ら, 2012)。

Hepatocyte nuclear factor  $\alpha$  (HNF4  $\alpha$ ) は、腸管や肝臓などの消化管上皮に発現する転写因子である。消化管の分化や、代謝、機能の制御に重要な役割を果たすとされている (Stegmann, A et al. 2006)。更に癌では、胃や小腸、大腸、膵、肝など幅広い癌に陽性となる。肺癌では TTF-1 陰性となる粘液性腺癌や、腸型腺癌の分子マーカーとして免疫染色が使用されている。今回我々は、間質性肺疾患や肺癌の診療、研究において、肺胞上皮傷害の結果生じるとされる器質化病変、すなわち線維芽細胞巣 (fibroblastic foci ; FF) や Masson 体を覆う再生上皮に、HNF4  $\alpha$  が強く発現することを見出した。本研究では、HNF4  $\alpha$  が肺胞上皮傷害を検出する免疫組織化学的マーカーとして有用であることを検証し、更に予後予測因子としての可能性を検討した。

【材料と方法】 2008年1月から2019年5月までに、神奈川県立循環器呼吸器病センターにおいて、胸腔鏡下に生検された間質性肺疾患患者 309 例 (IPF 61 例, non-IPF173 例、unclassifiable ILD75 名) の肺生検標本を収集した。組織型の診断は、2018年国際ガイドラインによる診断基準に基づいて行い、最終診断は、臨床、放射線、病理所見に基づく集学的検討 (multidisciplinary discussion ; MDD) によって行われた (Raghu, G et al. 2018)。それぞれの組織型において HNF4  $\alpha$  免疫染色陽性細胞の頻度 (/mm<sup>2</sup>) を算出した。なお、全患者から切除した材料を研究目的で使用することにつき、インフォームドコンセントを得た。横浜市立大学倫理委員会 (A180726009) 及び神奈川県立循環器呼吸器病センター病院倫理委員会 (KCRC-17-0015) により本研究は承認された。

【結果】 Non-IPF 群、及び unclassifiable ILD 群では、HNF4a 陽性細胞が高頻度に発現している症例において有意に生存期間が短く、10 年生存率も低いことが示された。更に non-IPF

群の生存期間、及び 10 年生存率と比較して(death due to ILD, log-rank test, P=0.0016; hazard ratio 2.6, Wald test, P=0.0023), unclassifiable ILD 群では予後との相関が特に顕著であり, 10 年生存率でも有意差が認められた(death due to ILD, log-rank test, P<0.0001; hazard ratio 11.1, Wald test, P=0.0003). また, unclassifiable ILD 群に注目した多変量解析では, HNF4 $\alpha$  陽性細胞の発現が独立した予後因子であることが確認された (hazard ratio 28.6, Wald test, P=0.0033).

【結論】 HNF4 $\alpha$  は肺胞上皮傷害の免疫組織化学的マーカーとして有用であり, 特に unclassifiable ILD 患者において, 予後に影響を及ぼす可能性があると考えられる.

【考察】 間質性肺疾患のなかでも, unclassifiable ILD は, MDD を行っても病型を特定できない症例など, 多様で不均一な疾患群となっている (Cottin, V et al, 2018 ; Guler, S. A et al, 2018). その疾患群で予後を予測することは, 実際の診療において非常に有益と考えられる. 更に病型診断につながる可能性や, 治療薬の適応の判断に結び付く可能性が期待される.

以上の論文要旨の説明の後に, 以下の質疑応答がなされた.

後藤副査より以下のように質問がなされた。

- ① 仮説として ILD 症例に対し HNF4 陽性率を評価したということですが, ILD のタイプによらず同様の結果が得られることを仮説としてもっていたのか, それともタイプによって違う結果が得られることを想定されていたのでしょうか。
- ② 外科的生検で染色されたようですが, 部分的な組織情報で全体像がわかるものなのでしょうか。
- ③ ILD 3つのタイプにより病変の広がり方は違うと思いますが, 生検であたっていなかったら陰性となることはあるのでしょうか。
- ④ 予後の検討において ILD 3つのタイプ別のカットオフを作られていますが, カットオフは一つにして, ものさしを揃えた上で見た方がしっくりする気もします。それぞれで変えてデータにフィットさせたカットオフ値を作ることで症例数が少ない Unclass のデータがたまたま出てしまったような, Unclass のようにごちゃまぜ症例のような ILD ですと, そこで強くでるのがピンとこない気がするのですが。

申請者の回答

- ① 診断を行う上で予後が悪い症例については FF が多く, HNF4 $\alpha$  陽性細胞が多いということが感覚的にあり (タイプを特定していたというわけではなく), それを証明したいということが始まりでした。ただ IPF の陽性率が低くでってしまったのですが, 慢性的に進行するタイプでは一時点の生検では低いのかと考えています。
- ② 場所により組織像が違うことはあるのですが, 当院の外科的生検はかなり大きくとってくるので, 評価はかなりできると思います。

- ③ IPF は小葉辺縁からおきるタイプで、例えば過敏性肺炎などは小葉中心から起こってくるのですが、小葉の単位は大体 1cm くらいですので、分布についても外科的肺生検ではわかることが多いです。
- ④ 当科でも議論はしましたが、ILD 自体沢山のタイプがあり、予後がよいものや診断が容易なものは HNF4 $\alpha$  で評価する必要がないかもしれないこと、予後が悪い症例を確実に detect することに注目してこのような解析にしました。ただ先日教えて頂いて考えましたが、やはり Unclass の症例が少ないと考えまして、当院の院長とも相談して他の施設の症例も集めて今後解析したいと思っております。

富澤副査より以下の質問と示唆がなされた。

- ① HNF4 $\alpha$  を同定されたことは大きな意義と考えますが、その impact について伺いたいです。予後との関連性について治療にどうフィードバックできると考えておりますか。
- ② Unclassifiable 以外の ILD でも陽性率が高くでたということですが、他の ILD でも上がっている意義は何かありますでしょうか。
- ③ 他の ILD でも高いということであれば、IPF とか Unclassifiable とか全部ひっくるめた上で HNF4 $\alpha$  陽性陰性で分けて新しいことが見えるといいなと思うのですが、Unclassifiable に意味があるということであれば、それぞれで有意差検定をされてもよいのかなと思いません。
- ④ 今後の方針として、分子病理学的な働きについて検討したいというのはどんなことをして検討されるのでしょうか。

申請者は以下のように回答した。

- ① 現在抗線維化薬が進行を遅くする効果が得られると言われており、PF-ILD（進行性線維化を伴う ILD）や強皮症の ILD にも適応が拡大してきているのですが、今回の高発現症例は PF-ILD に相当するのではないかと考えています。今回は生検前のデータしかとれていないのですが、PF-ILD は 1 年や 2 年で経時的に悪化することが診断基準になっていますので、今回の症例を経時的なデータと照合して、それに相当するかの解析をしたいと考えております。
- ② ILD は発症の様式や分布や程度は様々ですが、HNF4 $\alpha$  は軽い上皮傷害も検出しているので、予後の良い症例でも高くなっていますが、それらは日常診療に困ることがあまりないので、診断に難渋する進行性のものを検出することに意義があると考えています。
- ③ ありがとうございます。
- ④ FF の上にある陽性細胞を抽出して遺伝子的な異常が検出されないか解析していますが、今のところはっきりしていません。ただ一定期間再生とみられる時期は発現していますが、線維化が進んで硬くなると消えてしまうので、修復過程で一時的に脱分化か何かを起こして発現しているものなのかと予想しています。これは他の教室員も頑張っているところです。

中島主査より以下の質問がなされた。

- ① バックグラウンドの部分でILDの報告はありましたが、HNF4 $\alpha$ に関するこれまでの報告とか、何がわかっているのでしょうか。
- ② そもそもHNF4 $\alpha$ はどのような細胞にみられるのでしょうか。
- ③ その因子の役割としては、幹細胞性にかかわるような因子でしょうか、それとも細胞の増殖ですとか知られているような役割はありますか。
- ④ (回答を受けて)そうすると逆に肺や腸管とか色々な組織で発現するのがわからないのですが。
- ⑤ (回答を受けて)そうするとHNF4 $\alpha$ の発現が肺の線維化の過程に直接かかわっているかどうかは鍵になると考えます。再生上皮に発現してきて、通常の肺上皮と異なる表現型をもっている意味についてspeculationがあれば教えてもらえますか。
- ⑥ HNF4 $\alpha$ が発現するとむしろ腸管形質を示すということだったので、必ずしも脱分化とは言えないのではないのでしょうか、あくまでabberantな発現ということでは言えて、何かおかしいことが起こっているのは確かだと思います。そういった異常な遺伝子発現を起こすような肺胞上皮細胞がIPFの状態にどう絡んでいるのでしょうか。やはりそこが一番興味深いところで、もしそうだとすると、FFの頻度に相関するということと線維化のプロセスに直接かかわっている可能性が、単なるマーカーではなくあると思って聞いていました。HNF4 $\alpha$ 陽性率を調べたドットプロットで、ILDのサブタイプで予後の良いタイプでも悪いタイプでも同じように陽性となって陽性率に統計学的に差がないのかなと思うのですが、NSIPとHPとUnclassの中では明確に生存率に差があるのだけど、おそらく線維化の程度に差があって、だけどHNF4 $\alpha$ の頻度にそれほど大きな差異がみられていないのがひっかかりました。その辺りはどのように考えているのでしょうか。

申請者は以下のように回答した

- ① ILDの分野じゃないところでは、発癌の抑制に関係しているのではないかと、線維化に関係しているのではないかと、など色々報告がでてきていますが、ILDに関しての研究は自分達以外に見つけられていないです。
- ② 普通は腸管や肝細胞に発現しているようです。たまたま肺の粘液性腺癌で免疫染色がよく染まるので、臨床的にはそちらで日常的に使われています。
- ③ 細胞の分化方向を決定するような働きと考えています。
- ④ 肺の粘液性腺癌の場合は、肺胞上皮の分化はもたなくなり腸型の粘液形質をもっていて、KRASの遺伝子変異をもつ大腸がんや膵癌に近いような癌なので、それで発現しているのかと思います。通常の肺では発現はしないので、異種性に発現していると考えます。
- ⑤ 通常ですと肺胞上皮はTTF-1 (thyroid transcription factor)が発現し、肺胞上皮分化を示していることを示唆していますが、HNF4 $\alpha$ とは相互排他的で、同時に陽性となることはないと言われているのですが、今回二重染色で確認しても同じ細胞に発現していたことが確認され、何らかの脱分化の状態をみているのではないかと考えています。

- ⑥ HP と NSIP は軽い上皮傷害がメインなので、ポリープ状の器質化は肺胞構造の破壊を伴わないので、肺のダメージが少ないと考えます。Unclass の方は重度の上皮傷害でできる FF が多かったものに対して HP と NSIP は軽いものが多かったので、上皮傷害の程度の問題かと考えています。Unclass high の症例は軽いものから重い上皮傷害まで色々な程度で一気に起こっている状態を見ているのかなと考えております。

富澤副査より以下のように追加質問がなされた

- ① 細胞をとってきてどんな解析を具体的に行っているのでしょうか。
- ② そこに遺伝子発現の変化がもし起きているとしたら、HNF4 $\alpha$  が何等かの形でかかわっている可能性を考えるわけですね。
- ③ 転写因子ということだったのでゲノムの色々なところに結合して何かをしているのだろうと思うのだけど、そういうところも見えていかれるとメカニズムもわかってくるのだろうのかなと思います。

申請者は以下のように回答した。

- ① 網羅的に通常の上皮と比較してどんな遺伝子の異常があるのかを見ております。
- ② ただ何かを得られたとしても解釈が難しいかなとは思っていますが、その部分だけに参与しているのか、ILD 自体に参与しているのかなかなか判断が難しいかなとは思っています。
- ③ ありがとうございます。

中島先生より以下のように示唆があった。

方向性に2つあって、一つはメカニズムのことで、HNF4 $\alpha$  が単なるマーカーではなく線維化のプロセスそのものに関わっているということであれば、そこを突き詰めていくことに新しい創薬のターゲットだとか、治療に結び付く可能性があるのも、そこを是非やって欲しいということと、一方でやっぱり予後予測を明確に肺の上葉からとってきたサンプルでは差異が出ているので、そこをどういう風に臨床に落とし込んでいくか。少し障害になるのは VATs で大きな切片をとってこなければいけないのが大きいと思い、なんとか TBLB で検討できないかなということだと思います。TBLB の利点は色々なところからサンプルをとって来ることができるので、VATs はなかなか1か所、せいぜい2か所だと思うし（肺の胸膜下の組織がとれるのはよいと思うのですが）、患者さんの侵襲を考えると TBLB に落とし込めないかなと。そうでないと逆に臨床的に厳しいかなと思うところがあるので、そこを臨床応用できないか工夫をしてもらいたいと思います。

以上より、本研究は博士（医学）の学位論文に値するものと判定された。