

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19017

研究課題名(和文) 核内レセプターHNF4Aの変異による肝癌発症および悪性化のメカニズム解明

研究課題名(英文) The functional analysis of cancer development and progression

研究代表者

谷口 浩章(TANIGUCHI, Hiroaki)

日本大学・医学部・研究員

研究者番号：50587441

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：日本人の肝臓患者のゲノムシーケンスを行った結果、肝臓がんにおいて転写因子であるHNF4Aに複数の変異が認められることが明らかになった。機能解析を行った結果、これらの変異はZnフィンガー領域に多く認められ、タンパク発現レベルを変化させることなしに変異が誘導されるとDNA結合能が著しく失われることが明らかになった。これらのことからHNF4Aの発現が低下する、もしくはZnフィンガー領域に変異が誘導することでHNF4Aの機能が失われ、肝臓がんの発症が誘導される可能性が示唆された。今後は、通常の細胞に内在性の変異を誘導することでHNF4Aに誘導される変異の重要性をさらに明らかにしていく必要がある。

研究成果の概要(英文)：Since the HNF4A knockout mouse exhibits tumor development in the liver, it has been suggested that HNF4A loss-of-function mutations trigger liver cancer development and its progression. However, comprehensive functional analysis for the mutations in human liver cancer have not been performed. This study allows us to investigate for the first time the importance of HNF4 mutations in liver cancer. Our study has revealed that HNF4 mutations would cause crucial mutations by loss or reduce of the function of HNF4A.

研究分野：分子生物学

キーワード：がんゲノム 転写因子

## 1. 研究開始当初の背景

申請者が所属する研究室は日本国内の拠点として癌ゲノム解析国際コンソーシアム ICGC に参加し国外の研究室と連携をとりながら癌ゲノム解析を進めている。国内外の研究グループにより現在までに、GWAS 解析や、Whole-Genome Sequencing 解析を通じて癌におけるさまざまな変異が発見されているが、これら遺伝子変異の生物学的機能評価は緒についたばかりである。本研究では我々の研究室で独自に解析、同定した 300 例の肝癌患者におけるエクソン領域の変異のうち、核内レセプターである Hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4A) に着目して研究を進めることとした。

## 2. 研究の目的

HNF4A は核内レセプターとして単離された後、現在では肝臓分化のマスターレギュレーターとして同定された転写因子である。例えば、HNF4A を繊維芽細胞に過剰に発現させることで肝臓細胞へと分化することなどからも最近非常に注目されている。今回のゲノム解析では 300 例の臨床サンプルにおいて HNF4A には 6 例のエクソン領域突然変異および 1 例のイントロン欠如が発見された。過去の報告において、HNF4A の発現が低下すると癌の悪化が促されるという報告や、上皮間葉移行が促進されるという報告があり、HNF4A と癌の悪化の密接な関係が明らかにされている。我々の解析においても HNF4A の変異は 4 例において Loss-of-function の表現系を呈する可能性を示唆する予備的データを得ている。HNF4A の変異による肝臓発症メカニズム解明を行うことで肝臓癌特有の癌悪性化メカニズムの一端が明らかになる可能性が考えられた。

よって、本研究においては上記解析により明らかになった HNF4A 変異体の機能解析を行うことにより肝臓発症および悪性化のメカニズムの一端を解明することを目的とする。また申請者は肝臓癌において HNF4A の機能が欠落することで、癌細胞の脱分化が起こると同時に未分化の癌細胞が誘導される可能性についても併せて検討することに決定した。

## 3. 研究の方法

(1) HNF4A の変異体において転写活性解析および DNA 結合能力変化の検証 (EMSA など)

(2) HNF4A 突然変異によるパートナー結合様式の変化に関する解析 (LC/MS/MS)

(3) HNF4A 突然変異による肝臓細胞分化状態の変化とがん発症のメカニズム解明 (Crispr-Cas9, RNA-Seq)

(4) Synthetic Leathality に注目した遺伝学的相互作用解析を当初の目標に掲げた。

### (1) HNF4A の変異体において転写活性解析および DNA 結合能力変化の検証

HNF4A は核内レセプターであり、その結合ドメインには 2 種類のパターンがあることが知られている。すでに申請者はこれらの配列を有するリポーターを作成し、配列依存的に HNF4A 突然変異体の機能が変化することについての検討を開始している。これまでに 6 種類の HNF4A 突然変異体を作成し、特に G79C、F83C および M125I においては HNF4A の転写活性が著しく低下することが明らかになっている。非常に興味深いことに、これらのアミノ酸配列は 3 次元構造上非常に近接した位置関係にあることが in silico の構造解析により明らかになっており (未発表データ)、DNA への結合に非常に重要な領域である可能性が推察される。よって本実験においては in silico における DNA 結合能を検討する。

### (2) リガンド結合様式の変化に関する解析

HNF4A の作用発揮には Zn フィンガー領域を介した DNA 結合のほかにもリガンド結合ドメインを介した転写活性調節が知られている。今回 300 例の肝臓癌臨床サンプルにおいて 3 種類のリガンド結合ドメイン欠損型変異体が検出された。申請者の予備実験においては Q164X の変異において転写活性が著しく低下していることが明らかになっており、この変異体と HNF4A の転写共役因子がタンパク間結合できなくなることにより癌が悪性化している可能性が考えられる。そこで申請者はどのようなタンパクの結合が欠損することにより、HNF4A の転写活性が失われるかを明らかにする。

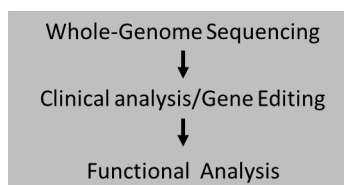
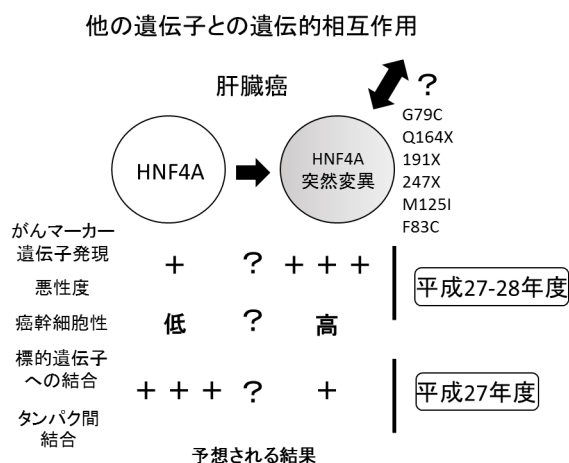
### (3) 肝細胞の分化状態とがん発症のメカニズム解明

非常に興味深いことに HLE、HLF といった非分化型の肝臓細胞株においては HNF4A の発現が高分化型の肝臓と比較して低いことが申請者の予備実験により明らかになっている。このことから申請者は肝臓の分化状態と HNF4A の発現量もしくは機能には密接な関係があると考えている。実際、HNF4A 遺伝子座に突然変異体を有する臨床サンプルの解析によりほとんどの患者が未分化から低分化型の肝臓を有することが明らかになっている (未発表データ)。そこで本実験においては、Whole-Genome Analysis で明らかになった HNF4A の変異を高分化型の肝臓細胞に Crispr-Cas を用いて導入することで、癌細胞の運命がいかに変化するかを調査する。

#### (4) Synthetic Leathality に注目した遺伝学的相互作用解析を当初の目標に掲げた実験

また、臨床サンプルの解析から HNF4A の遺伝子変異が認められるサンプルには p53 や b-catenin などのドライバー遺伝子にも変異があることが明らかになっている。そこで HNF4A およびこれらドライバー遺伝子の両方に変異があった場合肝癌細胞にどのような変化が起こるかを明らかにする。

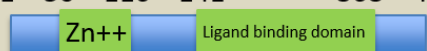
-全体的な構想-



#### Human HNF4A

DNA binding domain

1 50 116 141 368 464



F79C Q164X

F83C 192X

M125I 247X

Six mutations found in 300 liver cancer samples

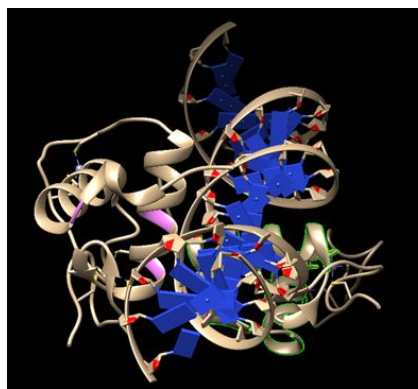
HNF4A Znフィンガー領域とリガンド結合領域に認められる変異。

#### 4. 研究成果

(1) HNF4A G79C、F83C および M125I を 3D 構造上で確認した際に、非常に近接した立体配置をとることが明らかになった。これらの変

異は DNA と HNF4A タンパクの結合を妨げることが考えられ、その結果転写活性が著しく低下することが示唆された。実際に、DNA 結合アッセイを行ったところ、野生型の HNF4A タンパクに比して、これら Zn Finger 領域に存在する HNF4A 突然変異体は HNF4A 標的遺伝子のプロモーターに対して著しく低下した結合能を示すことが明らかになった。

HNF4A の変異体の局在を免疫染色にて検討した結果、核内局在には変化が認められなかったことや、核タンパク発現量に野生型と比較して変化が認められなかったことなどから、この結合能の低下が HNF4A の転写活性を低下させていることが確認された。



Pink color indicates three mutations in Zn finger region

(2) リガンドバイディングドメインに変異が存在する場合にも核内にタンパクは局在することは明らかになったが、本ドメインに結合できなくなり、タンパクの転写活性を低下させる因子の同定までは行かなかった。今後の研究により明らかにしていく予定である。特に、点突然変異 Q164X と HNF4A と結合が認められることが報告されている HNF1A と GATA4 との結合に注目して実験を行う予定である。また同時に当初の予定通り、MS/MS 解析による網羅的な解析も行っていく予定である。また、がんゲノム研究の国際コンソーシアムである ICGC のデータベースを基に HNF4A の突然変異体を抽出したところ、日本のみではなく中国、アメリカ、フランスなどから HNF4A の突然変異に関する報告があり、非常に興味深いことに、突然変異は HNF4A の Zn フィンガードメインもしくはリガンドバイディング領域に主に存在することが明らかになった。このことから HNF4A の重要ドメインであり、DNA との結合もしくは転写共同因子との結合に重要であることが知られている Zn フィンガードメインもしくはリガンドバイディング領域に突然変異が生じた場合、肝臓がんが誘導される可能性があることが示唆される結果を得た。これらの突然変異に関しても今後その重要性を検討していく予定である。

(3)まず、CRISPR-Cas9 で変異を誘導する前に、肝がん細胞に siRNA を導入して HNF4A の発現を低下させた際に、細胞増殖には変化が認められるかを検討した。その結果、予想に反して HNF4A の siRNA では遺伝子発現が十分に低下したにも関わらず、がん細胞に増殖には影響を与えなかった。これらことから、今回実験に用いたがん細胞では HNF4A の低下によるがん細胞増殖促進作用が認められなかった可能性、もしくは、細胞増殖試験期間が短かったために顕著な作用が認められなかった可能性が考えられる。今後は、通常ヒト由来肝臓細胞に CRISPR-Cas9 を用いて変異を導入するという方法が最も良いという結論に至った。本結果を踏まえて今後更なる研究を進めていく。

(4)エピジェネティックな制御に関係する因子と HNF4A が遺伝的に相互作用する可能性を示すデータが得られた。すなわち、HNF4A の標的遺伝子として知られている遺伝子の発現を基準に siRNA で HNF4A およびエピジェネティック制御因子を siRNA により低下させたところ標的遺伝子発現に対して相乗的な発現抑制作用を示した。今後本実験を精査し、さらなる確認実験を行っていく予定である。

当初の予定から比較して、(2) - (3) のプロジェクトに遅れが生じ、今後の研究において実施していく予定ではあるが、HNF4A の Zn フィンガー変異体において転写活性解析および DNA 結合能力変化が認められた。また、その低下は転写活性と比例していた。さらに、HNF4A のリガンドドメインの変異に関しては、転写活性の低下が認められた。加えて、siRNA を用いた解析により、HNF4A と特定遺伝子の遺伝学的相互作用が認められるという結果が得られた。プロジェクトとしては終了したが、上記遅延の生じた解析に関しては現在継続、かつ進行中であり、今後、学会、科学論文等で報告を行っていく予定である。

#### 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1件)

(査読あり)

J Vis Exp. 2017 Jan 24;(119). doi: 10.3791/55077. A Protein Preparation Method for the High-throughput Identification of Proteins Interacting with a Nuclear Cofactor Using LC-MS/MS

Analysis. Tsuchiya M, Karim MR, Matsumoto T, Ogawa H, Taniguchi H.

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

谷口 浩章 (TANIGUCHI, Hiroaki)  
日本大学・医学部・研究員  
研究者番号：50587441

##### (2)研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3)連携研究者

( )

研究者番号：

##### (4)研究協力者

( )