

# 学位論文の要旨

氏名 佐々木 翔太 印

核内受容体ファミリーに属する Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ) は、肝臓で高発現する遺伝子群のプロモーター領域に結合する転写因子として発見されたが、その後の研究で、腎臓、膵臓、腸にも発現していることが明らかとなった。

肝臓における HNF4 $\alpha$  の機能解析のため、肝臓特異的 HNF4 $\alpha$  欠損マウス (KO マウス) が作成されたところ、KO マウスは様々な表現型を示すことが判明した。また、HNF4 $\alpha$  は肝細胞がん (HCC) で発現が減少しており、また HNF4 $\alpha$  を HCC 細胞に発現させることにより HCC が再分化することが報告されている。以上より、HNF4 $\alpha$  は肝臓の発生や成体における肝機能維持を行うマスター因子として機能しており、人工肝細胞の開発や HCC の治療に有用な遺伝子として注目されている。

KO マウスは多くの表現型を示すため、顕著な遺伝子の発現変動が起きていると予想して肝臓の転写因子の発現解析を行った結果、正常肝臓で発現がほとんどなく、機能解析の報告もほとんどない HNF4 $\gamma$  が KO で顕著に発現上昇していた。さらに解析を進めると、KO マウスでは既知バリエントの HNF4 $\gamma$  (HNF4 $\gamma$ 1) と新規バリエントの HNF4 $\gamma$  (HNF4 $\gamma$ 2) がともに 10 倍程度発現上昇していることが分かった。しかし、KO マウスでの HNF4 $\gamma$ 1 と HNF4 $\gamma$ 2 の発現量は HNF4 $\alpha$  の機能を補完するには十分量ではなかった。肝臓や他の組織での HNF4 $\gamma$  の機能に関する研究は乏しく、さらに HNF4 $\gamma$  のバリエントに関する言及をした報告が存在しないため、本研究では HNF4 $\gamma$ 2 の機能解析を行った。その結果、HNF4 $\alpha$ 、HNF4 $\gamma$ 1、HNF4 $\gamma$ 2 はヘテロ二量体を形成することや、HNF4 $\alpha$  結合配列に対する結合能にほぼ違いがないことが判明した。その一方で、既知の HNF4 $\gamma$ 1 は HNF4 $\alpha$  よりも弱い転写活性化能と肝機能誘導能を示したが、新規の HNF4 $\gamma$ 2 は、HNF4 $\alpha$  よりも高い転写活性化能、肝細胞マーカーと肝機能誘導能を示した。以上のことから、HNF4 $\gamma$ 2 は HNF4 $\alpha$  以上に肝細胞分化や肝機能維持に有用であると考えられ、人工肝細胞や HCC 治療薬の開発への応用が期待される。

肝臓と同様に HNF4 $\alpha$  が高発現する他の組織でも、組織特異的 HNF4 $\alpha$  欠損マウスが作成されており、膵臓と腸では機能低下が起こることが報告されている。一方で、腎臓特異的 HNF4 $\alpha$  欠損マウスが作成されていないため、腎臓での HNF4 $\alpha$  の機能解析は少なく、HNF4 $\alpha$  による腎臓で発現する遺伝子の転写制御に関する報告は乏しい。しかし、重要な腎機能である「再吸収」を担う近位尿細管上皮細胞において HNF4 $\alpha$  の強い発現が認められることから、様々な遺伝子が HNF4 $\alpha$  により転写制御されていることが示唆される。

そこで、ヒト近位尿細管上皮細胞由来の HK-2 細胞に HNF4 $\alpha$  を一過性強制発現させ、遺伝子発現変動を解析した。再吸収を担う Solute carrier (SLC) トランスポーターや近位尿細

管上皮細胞特異的な遺伝子を含む 82 種類の遺伝子の発現変動を解析した結果、3 種類の SLC トランスポーター遺伝子と様々な物質輸送に関わるメガリンの発現上昇が判明した。メガリンは正常腎臓では様々な輸送を担う重要な輸送タンパク質だが、腎障害発生時には、慢性腎臓病 (CKD) の発症・進行に関与することが報告されているため、HNF4 $\alpha$  によるメガリンの発現制御機構を解析した。その結果、ヒトメガリンプロモーター上に HNF4 $\alpha$  が直接結合して転写活性化することが明らかとなった。以上の結果から、HNF4 $\alpha$  はメガリンと SLC トランスポーターの発現を亢進することが分かったため、HNF4 $\alpha$  は腎近位尿細管上皮細胞の機能維持に重要な役割を担っていることが示唆された。

本研究の結果から、肝臓における新規 HNF4 $\gamma$  である HNF4 $\gamma$ 2 の機能解析と腎臓の近位尿細管上皮細胞における HNF4 $\alpha$  の標的遺伝子の同定を行った。HNF4 $\gamma$ 2 は HNF4 $\alpha$  以上の再分化誘導能を有することから、肝臓以外の HNF4 $\alpha$  発現組織においても HNF4 $\alpha$  の標的遺伝子を活性化し、組織恒常性を維持できる可能性が考えられる。しかし、HNF4 $\gamma$  は各組織での発現量が非常に低いため、今後は HNF4 $\gamma$  バリエーションごとの特異的な発現制御機構の探索や転写活性化に関与するコアクチベーターの同定が期待される。

また、腎臓においては、HNF4 $\alpha$  による腎臓で高発現しているトランスポーターとメガリンの発現上昇が確認された。今回解析されなかった SLC トランスポーターを含む再吸収関連遺伝子について HNF4 $\alpha$  標的遺伝子の探索を行うことにより、腎臓における HNF4 $\alpha$  の機能解析を行っていくことが今後の課題となる。

# 学 位 論 文 の 要 旨

氏 名 佐々木 翔太 印

Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ), a tissue-specific transcription factor that is a member of the nuclear receptor superfamily, was identified in the liver, kidney, pancreas and intestine. To investigate the function of HNF4 $\alpha$  in the liver, whole body HNF4 $\alpha$ -null mice and liver-specific HNF4 $\alpha$ -null mice were generated. Whole body HNF4 $\alpha$ -null mice exhibited embryonic lethality and liver-specific HNF4 $\alpha$ -null mice exhibited many phenotypes associated with liver dysfunction. Expression of HNF4 $\alpha$  is suppressed in hepatocellular carcinoma (HCC) and overexpression of HNF4 $\alpha$  in HCC cells is known to induce redifferentiation of the cells. Thus, HNF4 $\alpha$  is a master regulator of the liver and a useful gene for the development of an artificial hepatocyte and for HCC therapy.

Expression of mRNAs encoding several transcription factors was altered in liver-specific HNF4 $\alpha$ -null (*Hnf4a* <sup>$\Delta$ H</sup>) mice. Interestingly, hepatic expression of hepatocyte nuclear factor 4 $\gamma$  (HNF4 $\gamma$ ), which is not expressed in a normal liver, was markedly upregulated in *Hnf4a* <sup>$\Delta$ H</sup> mice. The increased HNF4 $\gamma$  included two variants, a known short variant, designated HNF4 $\gamma$ 1, and a novel long variant, designated HNF4 $\gamma$ 2. The expression levels of HNF4 $\gamma$ 1 and HNF4 $\gamma$ 2 mRNAs were increased by about 10-fold compared with the levels in control mouse livers and were quite low relative to the levels of HNF4 $\alpha$  mRNAs in control mice, indicating that increased expression of HNF4 $\gamma$ 1 and HNF4 $\gamma$ 2 would not be sufficient to compensate for the loss of function caused by reduced expression of hepatic HNF4 $\alpha$  in *Hnf4a* <sup>$\Delta$ H</sup> mice. Since the functions of HNF4 $\gamma$  variants have not been examined in the liver and other tissues, we performed further analysis of HNF4 $\gamma$ 1/2 functions in the liver. HNF4 $\alpha$ , HNF4 $\gamma$ 1, and HNF4 $\gamma$ 2 have the potential to form different heterodimers among these HNF4 family members. HNF4 $\gamma$ 1 and HNF4 $\gamma$ 2 bound to the HNF4 $\alpha$  binding sites with similar affinity in the same way as HNF4 $\alpha$ . The transactivation potential of HNF4 $\gamma$ 2 was the strongest among these variants, but the potential of HNF4 $\gamma$ 1 was the lowest. Furthermore, HNF4 $\gamma$ 2, but not HNF4 $\gamma$ 1, robustly induced expression of typical HNF4 $\alpha$  target genes to a greater degree than did HNF4 $\alpha$ . Additionally, HNF4 $\gamma$ 2 induced critical hepatic functions more strongly than did HNF4 $\alpha$  and HNF4 $\gamma$ 1. These results reveal that HNF4 $\gamma$ 2 has the potential to efficiently induce redifferentiation of HCC cells and thus should be explored for HCC therapy.

Pancreas- and intestine-specific HNF4 $\alpha$ -null mice were also generated. Several studies have indicated that HNF4 $\alpha$  plays an essential role in the maintenance of specific function in these tissues. However, kidney-specific HNF4 $\alpha$ -null mice have not been generated, and regulation of kidney-specific genes by HNF4 $\alpha$  remains poorly understood. In the kidney, HNF4 $\alpha$  is highly

expressed in proximal tubular epithelial cells (PTECs). Since the main function of the proximal tubule is reabsorption of many substances, we aimed to identify novel HNF4 $\alpha$  targets that are highly expressed in PTECs. Expression of several SLC transporters and megalin was upregulated by overexpression of HNF4 $\alpha$  in human PTEC-derived HK-2 cells. Megalin plays an important role in the reabsorption of many substances in a normal kidney, and it causes the development and progression of chronic kidney disease (CKD) in a dysfunctional kidney. HNF4 $\alpha$  was found to transactivate the megalin gene and directly bind to an HNF4 $\alpha$  binding site in the megalin promoter, indicating that HNF4 $\alpha$  plays an important role in the maintenance of reabsorption and metabolism in PTECs by positive regulation of several SLC transporter and megalin genes at the transcriptional level.

In the present study, we performed functional analysis of a novel HNF4 $\gamma$  variant, HNF4 $\gamma$ 2, in the liver and identified a novel HNF4 $\alpha$  target gene, megalin, in kidney PTECs. Since HNF4 $\gamma$ 2 induced redifferentiation of HCC cells more strongly than did HNF4 $\alpha$ , HNF4 $\gamma$ 2 may also play an important role in tissue homeostasis by activation of HNF4 $\alpha$  target genes in tissues other than the liver. However, since HNF4 $\gamma$  variants were slightly expressed in many tissues, further study is needed to determine the transcriptional mechanism of each HNF4 $\gamma$  variant and to identify HNF4 $\gamma$  variant-specific coactivators/corepressors.

HNF4 $\alpha$  was also found to upregulate SLC transporter and megalin genes that are highly expressed in PTECs. Further study is needed to determine HNF4 $\alpha$  functions in proximal tubules by investigation of other genes that are involved in reabsorption including other SLC transporters.