

博士論文

肝臓・腎臓の恒常性維持に関する
核内受容体 HNF4 ファミリーの同定と機能解明

Identification and functional analysis of hepatocyte
nuclear factor 4 family involved in homeostatic
maintenance in the liver and kidney

群馬大学大学院 理工学府 理工学専攻 物質・生命理工学領域

分子生命科学研究室

佐々木 翔太

目次

【第1章 諸言】

第1節 転写	1
(1) 基本転写因子の役割	1
(2) 転写因子の役割	2
(3) 核内受容体	4
第2節 肝臓・腎臓の機能、構造、疾患	
(1) 肝臓の機能と構造	4
(2) 肝臓での疾患	5
(3) 腎臓の機能と構造	7
(4) 腎臓での疾患	8
第3節 Hepatocyte nuclear factor 4 ファミリー HNF4 α	
(1) HNF4 ファミリー	9
(2) HNF4 α	9
(3) 肝臓における HNF4 α の機能	11
(4) 腎臓における HNF4 α の機能	12
(5) HNF4 α 欠損マウス	13
第3節 Hepatocyte nuclear factor 4 ファミリー HNF4 γ	
(1) HNF4 γ	14
(2) HNF4 γ のスプライシングバリエント	15
(3) HNF4 γ の発現分布	16
(4) HNF4 γ の機能	16
第4節 研究目的および章構成	17

【第2章 新規 HNF4 γ の肝臓における機能解析】

第1節 HNF4 γ について	19
第2節 研究概説	19
第3節 実験材料・方法	
(1) 肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスにおける転写因子の発現変動	21
(2) 5'-RACE	24
(3) HNF4 γ バリエントの発現量の比較	26
(4) HNF4 α -HNF4 γ タンパク質間の相互作用解析	28
(5) Luciferase assay による HNF4 α /HNF4 γ の転写活性化能の比較	32

(6) Gel shift assay による HNF4 α /HNF4 γ の結合活性の比較	35
(7) HNF4 α /HNF4 γ による肝細胞マーカー遺伝子と EMT マーカーの発現解析	38
(8) HNF4 α /HNF4 γ による細胞増殖抑制能と肝機能誘導能の比較	40
第 4 節 結果	
(1) 肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスにおける転写因子の発現変動	42
(2) 5'-RACE	43
(3) HNF4 γ バリエーションの発現量の比較	46
(4) HNF4 α -HNF4 γ タンパク質間の相互作用解析	51
(5) Luciferase assay による HNF4 α /HNF4 γ の転写活性化能の比較	53
(6) Gel shift assay による HNF4 α /HNF4 γ の結合活性の比較	56
(7) HNF4 α /HNF4 γ による肝細胞マーカー遺伝子と EMT マーカーの発現解析	57
(8) HNF4 α /HNF4 γ による細胞増殖抑制能と肝機能誘導能の比較	60
第 5 節 考察	62
【第 3 章 腎臓 HNF4 α の標的遺伝子の探索】	
第 1 節 腎臓のトランスポーターについて	67
第 2 節 研究概説	67
第 3 節 実験方法	
(1) HK-2、HEK293T 細胞での遺伝子発現解析	68
(2) Luciferase assay	71
(3) Western Blot	74
(4) Gel shift assay	74
(5) ChIP アッセイ	76
第 4 節 実験結果	
(1) 近位尿細管上皮細胞で発現する遺伝子の HNF4 α による発現誘導	78
(2) Megalin のプロモーター解析	83
(3) Megalin プロモーターの種間での保存性と HNF4 α の結合	84
第 5 節 考察	87
【第 4 章 総括】	90
参考文献	98

【第1章 諸言】

第1節 転写

生物の遺伝情報は核内に存在する DNA に保存されている。この情報を生物の細胞は分裂の際に複製しているが、利用する際には DNA から mRNA への転写、mRNA からリボソームを介しての翻訳が行われ、タンパク質が遺伝情報の最終産物として合成される。この転写から翻訳の過程は「セントラルドグマ」と呼ばれており、原核生物から真核生物まで広く保存されている。

mRNA に転写される DNA 領域は、大きく分けると2つの構造で成立しており、それぞれ構造遺伝子と転写調節領域と呼ばれている。構造遺伝子は更にエキソンとイントロンに分別でき、エキソンは翻訳後に最終産物となるタンパク質の情報を持つ領域 (CDS) と、非翻訳領域(UTR)を有している。一方イントロンは、スプライシングで除去される領域である。転写調節領域は転写を開始するのに必要なプロモーター、活性化に必要なエンハンサー、転写の抑制を行うサイレンサーなどの領域を有する。多くの遺伝子で保存されており、転写の中心的な役割を果たすプロモーター領域として「TATA Box」が知られている。TATA Box は転写開始点から約 25~30 塩基対上流に存在している「TATA(A/T)A(A/T)」という6塩基対の領域であり、この TATA Box を基本転写因子が認識することで転写が開始される (1)。この様に一定の領域内において機能性を持ち、保存された配列のことを「コンセンサス配列」と呼ぶ。また TATA Box が存在しないプロモーターも存在し、UCSC データベース上に記録されているヒト遺伝子において、約 76%のコアプロモーターにおいて TATA BOX が存在せず (2)、TATA BOX が存在しない場合にも基本転写因子が認識する TFIIB 認識エレメント (TFIIB recognition element ;BRE)、モチーフ 10 エレメント (Motif ten element ;MTE) や、下流コアプロモーターエレメント (Downstream core promoter element; DPE)、TATA Box や MTE、DPE と共に存在する配列として、イニシエーター配列(initiator 配列; Inr 配列)などが基本転写因子を認識することが報告されており、これらの組み合わせによってプロモーター領域が構築されている (1)。近年の報告では GGAA の重複配列が TATA Box がないプロモーター上において、コンセンサス配列ではないかとされている (3)。

(1) 基本転写因子の役割

ヒトにおける RNA を合成する RNA ポリメラーゼは RNAP I, II, III の三種類が存在することが知られているが、RNAP I はリボソーム RNA の前駆体の合成に、RNAPIII は 5S リボソーム RNA やトランスファーRNA、細胞小器官や核の小 RNA の合成を行って

おり、タンパク質を発現させるための mRNA の合成には RNAP II が主に使用される。

RNAP II は単独での転写を行うことができず、基本転写因子との複合体を形成することによって、転写を開始することができる。

基本転写因子は 6 種類のタンパク質で構成されており、まず DNA 上の TATA Box を認識するのは TFIID である。TFIID もサブユニットの集合した複合タンパク質であり、TATA Box に結合するタンパク質は TATA-binding protein (TBP) と呼ばれ、そこに TBP 関連因子 (TBP-associated protein ;TAF) と呼ばれる 17 個のサブユニットが集合して TFIID が形成される。形成された TFIID のサブユニット部分に TFIIA、TFIIB が結合し、その後、TFIIF、TFIIE、TFIIH の順に結合していき複合体を形成する。完成したこの複合体は開始前複合体(PIC)と呼ばれ、TFIIH が ATP を消費してヘリカーゼと同様の働きをすることで DNA の構造を崩し、転写が開始される。転写開始後は RNAP II 複合体の C 末端がリン酸化されることで、複合体がプロモーターから乖離し、伸長複合体へと移行していくが、TFIIA,B,D はプロモーター上に残り、連続した転写反応を助ける (1)。

(2) 転写因子の役割

開始前複合体は単独で働くことはなく、遺伝子特異的に働く「転写因子」と協奏的に働くことが知られている。転写因子も TATA Box と同様に、特異的な認識配列が存在し、転写因子上の DNA 結合ドメイン (DNA binding domain: DBD) がプロモーター上の DNA 配列に結合する。結合によって TFIID、TFIIB との相互作用が起き、その結果、遺伝子発現のスイッチをオンにする。転写因子は組織ごとに発現が異なり、そのバランスによって各組織での特異的な遺伝子の発現が異なってくる。肝臓においては、肝臓で豊富な転写因子として LETFs (Liver Enriched Transcription families) が知られており、HNF1、HNF3、HNF4、HNF6、C/EBP、DBP などの転写因子ファミリーが働いている (Fig. 1-1) (1)。

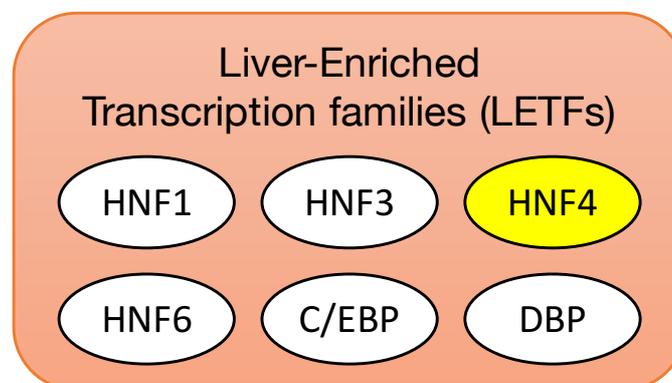


Fig. 1-1. LETFs

HNF1はPit-Oct-Uncドメイン(POUドメイン)を持つ転写因子であり、HNF1 α とHNF1 β が存在する。HNF1 α とHNF1 β は、それぞれ若年性成人発症型糖尿病(maturity-onset diabetes of the young; MODY)の原因遺伝子の一つとされており、HNF1 α の遺伝子異常がMODY3の原因とされ、HNF1 β の遺伝子異常はMODY5の原因とされている(4)。

HNF3はフォークヘッドボックスドメインを持つことから、Forkhead box A(FOXA)とも呼ばれており、HNF3 α (FOXA1)、HNF3 β (FOXA2)、HNF3 γ (FOXA3)が存在する。HNF3 β は、肝臓における発現がLETfsの中で最も早く、初期発生への関与が報告されている(5,6)、さらに、HNF3 γ には肝細胞の増殖抑制能があるとされている(7)。

HNF4ファミリーにはHNF4 α 、HNF4 β 、HNF4 γ が存在し、HNF4 α の遺伝子異常はMODY1の原因であると報告されている(8)。詳細に関しては後述する。

HNF6はカット・ドメインとホメオドメインと呼ばれるDNAに結合するドメインをもつ転写因子であり、転写活性化能が異なるHNF6 α とHNF6 β が発現している。HNF6ファミリーも肝臓の発生に関わり、肝臓形成の開始時にHNF6 α/β が共に発現上昇する(9)。C/EBPはベーシックジッパープロテイン(bZIP)と呼ばれる塩基性アミノ酸残基とロイシンジッパー構造を持つ転写因子であり、C/EBP α 、 β 、 γ 、 δ 、CRP1、CHOPの6種類から構成されるC/EBPファミリーが存在する。この中でもC/EBP α は、肝臓でのグリコーゲン貯蔵や脂肪蓄積に重要な因子であり、欠損マウスでは生後8時間程度で低血糖を引き起こして死亡してしまう(10)。

DBPは肝臓でアルブミンプロモーター上のD-Boxに結合するタンパク質として同定され、C/EBPファミリーと同様に、bZIPタンパク質でありながらも、Proline acidic amino acid-rich(PAR)ドメインを持つbZIP/PARという転写因子である。DBPのmRNAは全身で発現が確認されているが、細胞の大きさによってそのタンパク質発現量が制御されており、特に、細胞が大きい肝臓においては、タンパク質レベルでの発現量が非常に豊富であることが報告されている(11)。

これら肝臓で働く転写因子群の発現調節は、各転写因子で協調的に働くことが知られており、HNF1 α はHNF4 α と相互に発現制御を行い、HNF1 α 自身による抑制も報告されている。HNF3 β はHNF1 α によって発現制御をされ、特にHNF4 α の調節は、HNF1、3、6とGATA-6によって報告されている。HNF6 α 、 β はHNF6自身とHNF4 α による転写活性化がされている。また、C/EBP α がHNF6のプロモーター上に結合することにより、発現抑制がされていることも報告されている(12)。

(3) 核内受容体

核内受容体は転写因子の一つであり、生物の発生・分化などから機能維持に至るまでの多くの遺伝子の転写制御に関わる因子である。核内受容体は、主に二量体を形成して働くが、リガンドが結合することで活性化され、核内移行の後に DNA 上の応答配列に結合する。その構造は保存性が高く、大きく分けて 5 つのドメインに分類される (13)。リガンド非依存的に転写活性化を促す A/B ドメイン、DNA 結合ドメイン (DNA binding domain; DBD)として機能する C ドメイン、可変的なヒンジ領域である D ドメイン、リガンドの結合や形成に関わり、リガンド依存的転写活性化ドメインである AF-2 を含む E/F ドメインが存在する。また E ドメインはリガンド結合ドメイン (Ligand binding domain; LBD) ともよばれている (Fig. 1-2)。核内受容体は、ヒトでは 48 種類存在しており、現在では創薬ターゲットとしても知られ、米国 FDA にて認可が下りている医薬品の約 13%が核内受容体をターゲットとしている (14)。



Fig. 1-2. 核内受容体の構造

A/B ドメイン：リガンド非依存的転写活性化ドメイン C ドメイン：DNA 結合ドメイン (DBD) D ドメイン：ヒンジ領域 E ドメイン：リガンド結合・二量体形成ドメイン (LBD) F ドメイン：転写活性化ドメイン

第 2 節 肝臓・腎臓の機能、構造、疾患

(1) 肝臓の機能と構造

肝臓は、体重の約 1/50 の重量を占める (成人で約 1.2~1.5kg)、人体の中で最も大きな腺組織である。肝臓を構成する細胞は大きく二つに分けることができ、それぞれを肝実質細胞と非肝実質細胞に分類することができ、一般的に肝細胞 (Hepatocyte)と呼ばれるのは上皮系細胞である肝実質細胞を指す。非肝実質細胞は血液の流路などの類洞を占めており、内皮細胞、クッパー細胞、ピット細胞、肝星細胞と呼ばれる細胞が存在し、実質細胞とは異なる機能を有している。この二種類の肝細胞が中心静脈を中心に、門脈が外周上に存在する六角形の肝小葉を作り出す。この肝小葉集合体が肝臓組織を形成している。肝実質細胞は肝臓の約 60%を占めているとされ、2500 億個の細胞で 500 以上の機能を担っている。その機能の代表として、糖や脂質の代謝から胆汁酸の合成、薬剤やアルコールの分解、生体内で発生した有害物質などの解毒などが挙げられる (15,16)。

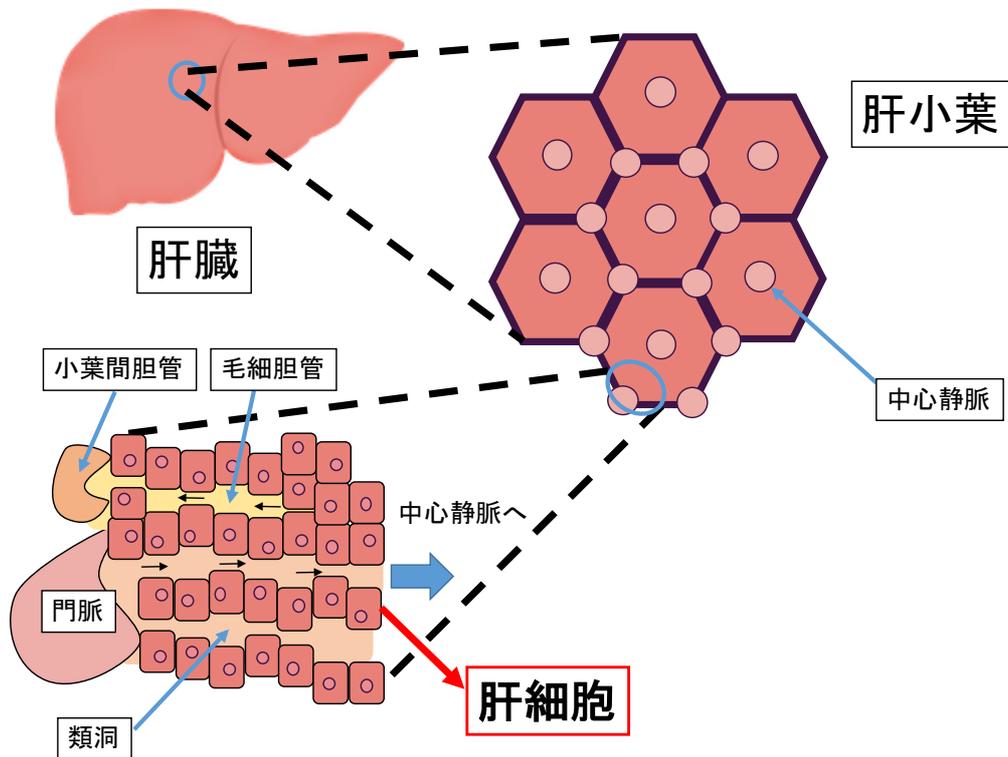


Fig. 1-3. 肝組織の組織階層の概略図

(2) 肝臓での疾患

肝臓は「沈黙の臓器」と呼ばれており、様々な疾患が発症した時でも、初期症状が顕在化することがほとんどない。そのため、自覚症状が発症してからでは手遅れとなるパターンも多く存在する。

肝臓における疾患である肝臓病は大きく分けて4つの病態で表される (Fig. 1-4)。まず、急性肝炎になり、そのうちの 60-80%が慢性化する。慢性化した肝臓は肝硬変となり、最終的には肝がんとなっていくという病態の変化をしていく。肝がんを罹る最初の段階として肝炎ウイルスの感染も存在しており、ウイルスへの感染によって引き起こされる慢性肝炎が原因となる肝がんも広く問題となっている。

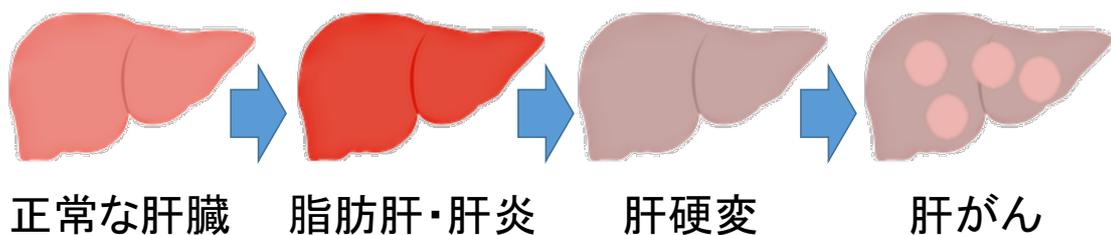


Fig.1-4. 肝臓疾患の病態の進行

肝がんの中には Fig. 1-4 で示した遷移をたどり、肝臓内で発生する「原発性肝がん」と、他の臓器からの転移してきた「転移性肝がん」の二種類に分けられる (15)。原発性肝がんではその 90%以上が肝細胞で発症する肝細胞がん (HCC)となるため、肝がん = HCC と指すのが一般的である。日本においては、年間約 3 万人の肝がんでの死亡者がおり、死亡原因疾患の第 3 位となっている。更に、5 年再発率は 80%以上と高く、これは肝炎ウイルスによる発症が、多くの原因となっている。肝炎ウイルスには Hepatitis B virus (HBV) と Hepatitis C virus (HCV) が存在し、それぞれ感染することで B 型肝炎と C 型肝炎を発症するが、欧米やアフリカでは HBV への感染が多く、日本においては HCV への感染が多く報告されてきた。現在では HBV、HCV に対する抗 HBV、HCV 薬の開発が進んでおり、ウイルス感染による肝硬変、HCC の発症率は減少傾向にある。一方で、生活習慣の変動により発生したメタボリックシンドロームや糖尿病といった生活習慣病や、非アルコール性脂肪肝 (Non-alcoholic fatty liver disease; NAFLD) や非アルコール性脂肪肝炎 (Non-alcoholic steato-hepatitis; NASH) などによる発症件数が増加しており、現在はこの NAFLD と NASH に対する対策が必要と考えられている (17,18)。

NAFLD と NASH はアメリカでは 25 年前から、日本では 15 年ほど前から疾患指定をされた比較的新しい病気であり、特に日本では食の欧米化により、その広まりを見せている (19)。欧米、ヨーロッパにおいては 20-40%、日本でも 9-30% の人が NAFLD であるという報告もされており、NASH は世界では 3-5%、日本では正確な数字は出ていないものの、およそ 100 万人程度と推定されている。NAFLD と NASH は、非常に密接な関係をしており、NAFLD 患者の生活習慣や糖尿病によるインスリン抵抗性によって、肝細胞に脂肪の沈着が発生する。その後、肝細胞の炎症などによる障害や、遺伝的な原因によって、NASH 形成がされるという「Two hits theory」が報告されている (20)。また、近年では、複数の原因が同時に起こることによって、肝臓の炎症、脂肪変性を引き起こし、NASH を発症させるという「Multiple parallel hits theory」も報告されている (21)。

NASH を発症すると細胞骨格の障害や、肝小葉の炎症、肝繊維化などが進行し、その後肝硬変、肝細胞がんの発症に至ることが報告されているが、NAFLD からの発症機構などに関しては未解明である。NASH 発症の原因究明のために、NAFLD/NASH のモデルマウスが作成されているが、コリン欠乏アミノ酸飼料や、メチオニンとコリンを欠乏した高脂肪食などを利用した外的因子による発症を促すものであり、その遺伝子制御機構の解明は未報告である (22,23)。

(3) 腎臓の機能と構造

腎臓は、生体のホメオスタシスを維持する上でも重要な臓器であり、血液の濾過や老廃物の排出、血中の塩分や水分量の調整、血圧の調節など様々な機能を有している。その最小単位として知られているのはネフロン(nephron)であり、ネフロンは大きく分けて糸球体と尿細管に分けることができる。糸球体は血液の濾過を行い、原尿を作り出す。尿細管はその原尿から体内で必要な物質の「再吸収」を行い、原尿から尿を作成する(24)。

尿細管は、さらに3種類に分画されており、ネフロンから最も近い部分は近位尿細管と呼ばれ、その後、中間尿細管へと続き、ヘンレのループと呼ばれる部分で大きく湾曲し、その後、集合管近くの遠位尿細管へと続く。これらの経路を原尿がたどり、原尿から約99%の物質が再吸収され、尿が生成される。各部位での再吸収の比率は近位尿細管が約65%で、中間尿細管では30%、遠位尿細管と集合管で残りの部分を吸収しており、基質のほとんどが近位尿細管において吸収されている(24)。

近位尿細管において、再吸収する基質として、水、グルコース、カリウムやナトリウムの陽イオン、リン酸、アミノ酸、タンパク質など多くの基質が存在する。それらを輸送するタンパク質として、多種多様なチャネルや受容体トランスポーターが近位尿細管において発現していることが知られている(Fig. 1-5)。

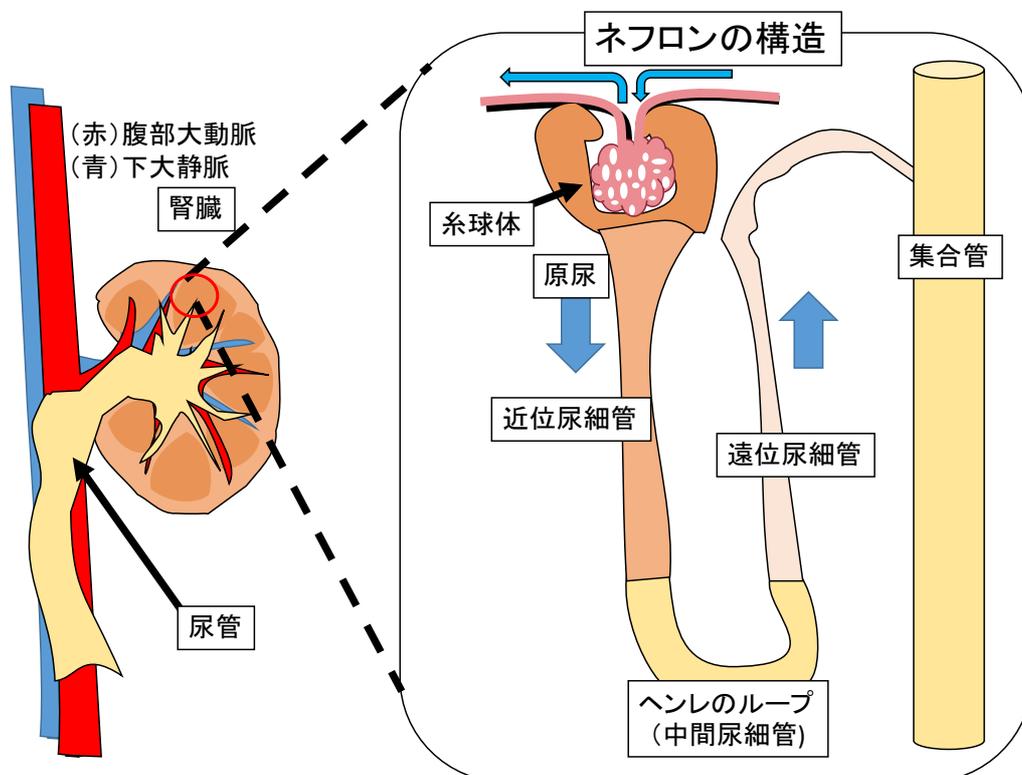


Fig. 1-5. 腎臓とネフロンの構造

(4) 腎臓での疾患

腎臓における疾患として、急性腎障害 (Acute kidney injury; AKI)や慢性腎臓病 (Chronic kidney disease; CKD)が知られている。急性腎障害は短期間の間に腎機能が低下することによって尿や老廃物の排出不良や、体液のバランス調節などができなくなる疾患である。主な症状として、尿量の低下や全身のむくみ、食欲不振などが挙げられている (24)。

一方 CKD は、症状はほとんど出ないが 3 ヶ月以上腎機能の低下が続いた状態のことを指す。診断にはタンパク尿の検査や、血液検査による糸球体濾過量 (Glomerular filtration rate; GFR) などの測定が必要である。発症原因としては糖尿病や高塩分や高脂肪食、喫煙などの様々な原因によって引き起こされるとされているが、特に糖尿病性腎症から CKD を発症する報告が非常に多く存在している (24)。また、近位尿細管の機能不全は急性腎障害において障害の原因や、その治療標的となることが多く、CKD の進行とも深く関わっている (25-27)。

第3節 Hepatocyte nuclear factor 4 ファミリー HNF4 α

(1) HNF4 ファミリー

HNF4 ファミリーは肝臓で発現の多い LETFs の中で唯一の核内受容体ファミリーであり、リガンドが同定されていないオーファン受容体である (28)。サブファミリーとして HNF4 α 、HNF4 β 、HNF4 γ が報告されているが、HNF4 β はヒトやマウスでの発現は確認されておらず、アフリカツメガエルのみで発現が認められている HNF4 タンパク質である (29)。

生物種間及びファミリー間のドメイン保存性は、DNA 結合に重要な C ドメイン、リガンドの結合や二量体形成に重要な E ドメインでは非常に高い (30) (Fig. 1-6)。

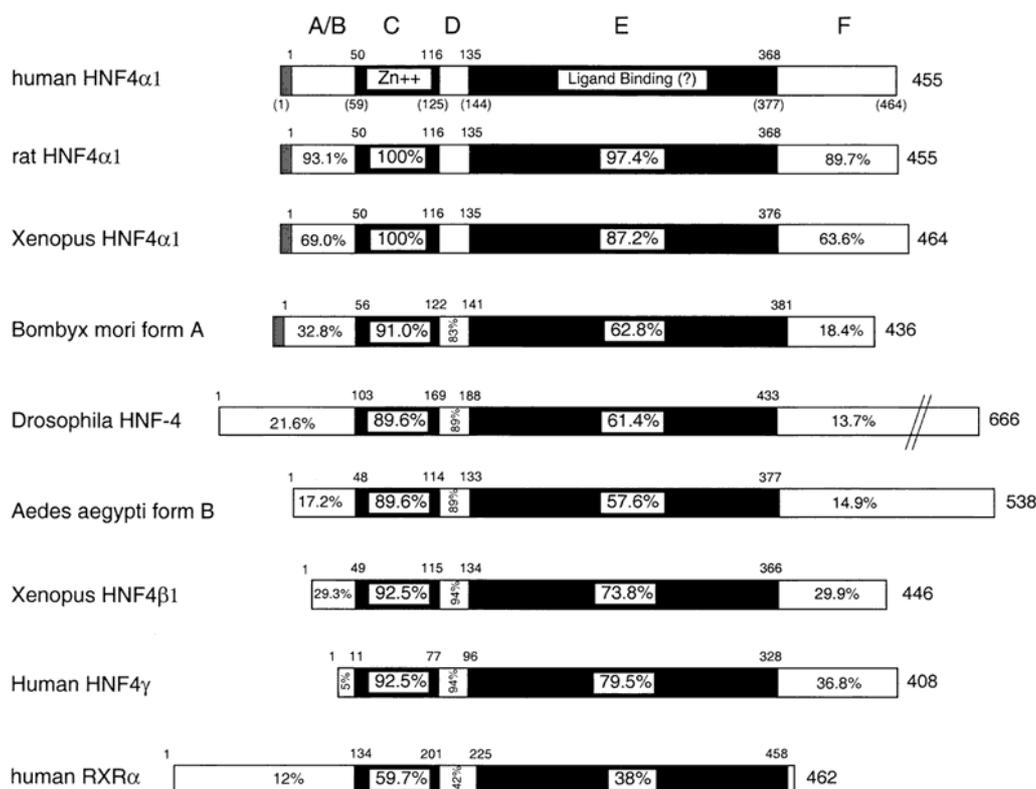


Fig. 1-6. HNF4 ファミリーの保存性 (参考文献 (30)より引用)

各ドメイン内の数字は、humanHNF4 α 1 を基準とした時のアミノ酸配列の相同性を示す。各配列の上部及び右側の数字はアミノ酸数を表す。

(2) HNF4 α

HNF4 α はラット肝臓核抽出物から TTR や ApoCIII のプロモーターに結合するタンパク質として最初に抽出され、現在は HNF4 α 1 と呼ばれている (28,31)。核内受容体であることからリガンドが探索され、1998 年に Acyl-CoA がリガンドとして報告されていた

が、その実証がなされていないことから、現在もオーファン受容体とされている (32)。また、リガンドを同定するために、ラット HNF4 α の LBD 領域 (133-382a.a)の領域を結晶化し、構造解析が行われた結果、12 個の α -ヘリックスと 2 個の β シート構造で構成されており、解析された構造から、HNF4 α のリガンドは内在性の脂肪酸ではないかという予測がたてられた (33)。

HNF4 α はホモダイマーを形成し、標的遺伝子プロモーター上のダイレトリピート配列 (DR-1 配列)に結合することで転写活性化を行っている (34)。また、HNF4 α は肝細胞で発現している遺伝子の 12%のプロモーター領域に結合することが報告されている (30)。さらに、HNF4 α の突然変異は若年発症成人型糖尿病(MODY1)を引き起こす原因遺伝子であると報告されている (35)。MODY1 の患者は、インスリン感受性は正常だが HNF4 α の突然変異によってインスリンやグルコース輸送関連遺伝子の異常が起こること、インスリン分泌能が徐々に失われて発症に至る。

HNF4 α のスプライシングバリエーションは、予測を含めて 12 種類のアイソフォームが存在しており、HNF4 α 1 から HNF4 α 12 と命名されている (36)。これらのアイソフォームは発現に使われるプロモーターの違いから二種類に分別でき、P1 プロモーターを用いて Exon1A を持つ HNF4 α 1~6 と P2 プロモーターを用いて Exon 1D、1E を持つ HNF4 α 7-12 が存在する (37-40)。ヒト HNF4 α は 20 番染色体に座位し、13 個のエキソンが全長 25kb にわたって存在している。ヒト成体肝臓内で最も発現が多いのは HNF4 α 2 であり、最初に発見された HNF4 α 1 と比較して転写活性化能が高いことが知られている (30)。マウス HNF4 α は 2 番染色体上に座位し、ヒトと同様に 13 個のエキソンと 12 個のアイソフォームを有している。そのアミノ酸相同性は DBD や LBD 以外においても非常に高い (36) (Fig. 1-7)。

HNF4 α の成体組織における発現分布は、肝臓、腎臓、小腸、大腸、精巣上体で P1 プロモーター由来が発現しており、P2 プロモーター由来の HNF4 α は、肝臓、膵臓、胃、小腸、大腸、精巣上体での発現が確認されている。

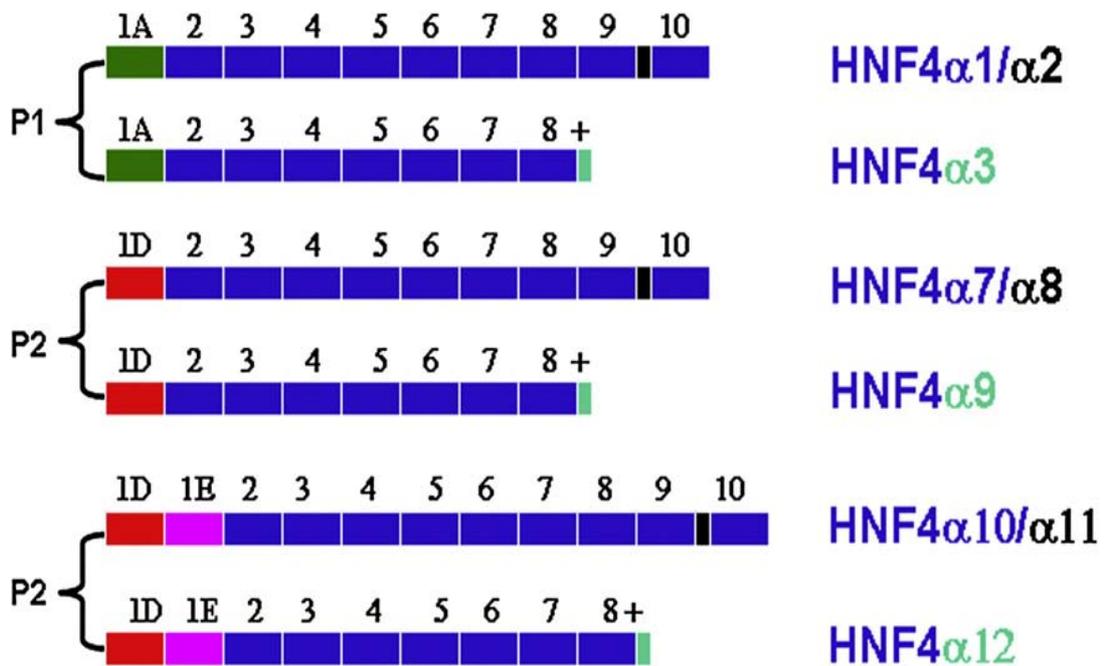
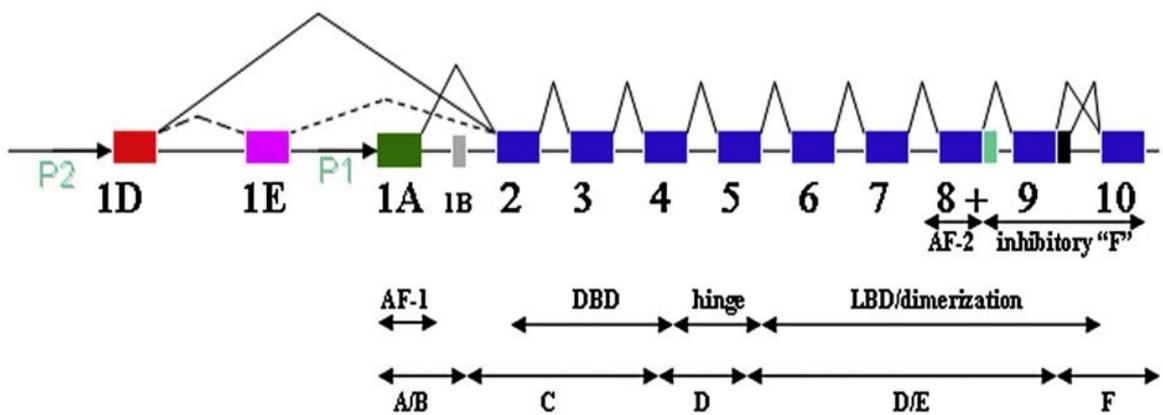


Fig. 1-7. HNF4α の構造 {参考文献 (36)より引用}

一番上はゲノム DNA 上での各エクソンの番号と、対応するドメインを示している。
 P1 由来は HNF4α1、2、3。P2 由来は HNF4α7、8、9、10、11、12 となっている。
 HNF4α4、5、6 の存在は予測されているが、未確認のため省略されている。

(3) 肝臓における HNF4α の機能

肝臓における HNF4α の機能解析は多くされており、様々な遺伝子の転写制御をしていることが明らかとなっている。遺伝子発現を正に制御する標的遺伝子としては、尿素回路に関わる Ornithine transcarbamylase (OTC) (41)や、脂質代謝に関わる ApoC3 (28,42)、

肝細胞分裂に寄与する Bmp7 (43)、鉄代謝に関連する Tfr2 (44)をはじめとした多くの遺伝子が知られている。また、HNF4 α は多数の microRNA (miR-7, miR-21, miR-124, miR-134, miR-192, miR-194)の発現制御をしていることも明らかとなっており、miRNA を介してがん原遺伝子や、炎症、上皮間葉転換 (epithelial-to-mesenchymal; EMT)に関連した遺伝子群の発現抑制を担っていることが明らかとなった (45-48)。さらに、ES 細胞や iPS 細胞に、SOX17、HEX を導入して肝芽細胞に分化させた後に、HNF4 α を発現させることによって、肝細胞マーカー遺伝子となる薬物代謝関連遺伝子の上昇が確認され、更に、上皮間葉転換(mesenchymal-to-epithelial transition; MET)を引き起こすことによって、肝細胞分化を維持していることがわかり、肝細胞様への分化が報告されている (49)。また、マウス胚性繊維芽細胞に HNF4 α 、FOXA1、FOXA2、FOXA3 を発現させることによって、アルブミンの上昇や薬物代謝活性の上昇などを確認でき、肝細胞様に分化させることができるという報告もされている (50)。

一方、脱分化した肝細胞がん (HCC)においては HNF4 α の発現量が減少していることも報告されている (47)。さらに、肝細胞がん HNF4 α を発現させることによって、がん細胞の細胞周期の停止や細胞老化を引き起こし、アポトーシスを誘導することによって、腫瘍の縮小や増殖能の低下、肝細胞マーカーの発現上昇が認められている (51,52)。以上のことから、HNF4 α は肝機能の維持に重要であり、脱分化状態の肝細胞を再分化させる機能があることも報告されている。このことから、HNF4 α は未分化幹細胞である iPS/ES 細胞から肝細胞を構築するシステムなどに利用できる可能性を秘めており、さらに HCC 治療の標的遺伝子として使える可能性がある。

(4) 腎臓における HNF4 α の機能

腎臓の HNF4 α は発生においても重要な役割をしており、胎児時においては HNF4 α の発現は受胎後 12.5 日では確認できず、受胎後 15 日目にあたる腎発生の後腎 (コンマ体) の形成時に HNF4 α の発現が認められていた (53)。また、成体腎臓における HNF4 α のバリエーションは P1 由来のものが多く、胎児時においても受胎後 15 日ではわずかに P2 由来の HNF4 α の発現が認められたが、その後は P1 由来の発現のみであり、更に、その発現を抑制すると胎児腎臓の縮小が認められた (54)。

成体腎臓における HNF4 α の発現部位は近位尿細管上皮細胞 (Proximal tubule epithelial cell; PTEC)とされている (53,55)。近位尿細管には多くのトランスポーター遺伝子が存在しているが、HNF4 α による遺伝子発現制御に関する研究は乏しく、ラット腎臓において、薬物などの輸送を担う有機アニオン・カチオン輸送トランスポーターである SLC22 ファミリーの SLC22A1 (OCT1)、SLC22A6 (OAT1)、SLC22A8 (OAT3)のプロモー

ター領域に結合するということが報告されているが、それ以外の発現制御機構に関しては未だ報告がない (56)。

(5) HNF4 α 欠損マウス

HNF4 α の網羅的な機能解析を行うため、全身 HNF4 α 欠損マウスが作成された (57)。しかし 6.5 日胚において、内臓内胚葉が HNF4 α の欠損により分化誘導ができず、原腸形成が原始線条段階の前で進行できなくなる。この結果、胎生致死となってしまうため機能解析ができなかった。HNF4 α を欠損した胚四倍体時に HNF4 α を導入すると、受精後 6.5 日目で起こる原腸形成はされるが、その後受精後 12 日目の時点で胚が死亡するという報告がなされた (58)。そのため、各組織で発現する HNF4 α を組織特異的ノックアウトする手法として、Cre-loxP 法を用いた組織特異的 HNF4 α 欠損マウスが作成された。

Cre-loxP 法とは、ゲノム上のイントロン部分にエキソンを挟み込むように loxP 配列と呼ばれる配列を 2 箇所組み込み、loxP 配列を認識し部位特異的組み換え反応を行う Cre を発現することによって、エキソン欠失を起こして、正常な遺伝子の発現を抑制させるという手法である。この反応は特定の DNA 配列の除去に用いられ、肝臓では Exon4-5 を欠損させることで作成が行われた (59)。この Cre-LoxP 法を用いて、膵臓・腸・腎臓そして肝臓における組織特異的 HNF4 α 欠損マウスの作成が行われた。

膵臓特異的 HNF4 α 欠損マウスは、膵 β 細胞に特異的な発現のあるラットのインスリン 2 プロモーターを利用した RIP-Cre を用いて膵 β 細胞特異的にノックアウトがなされた (60)。その結果、インスリン分泌に重要とされるカリウム ATP チャネルの機能不全が原因で、グルコース応答性のインスリン分泌を阻害することが明らかとなった。

腸特異的 HNF4 α 欠損マウスはタモキシフェン誘導性で、腸管上皮細胞特異的に発現のある Villin のプロモーターを持つ Villin-Cre-ERT2 を用いて作成された (37)。腸管上皮で HNF4 α を欠損させたマウスでは腸陰窩の増殖の増加と、Wnt/ β -catenin 経路のいくつかの遺伝子が発現上昇していることが明らかとなっている。また腸上皮組織の細胞間のジャンクションの不安定化も報告され、以上のことから、HNF4 α は腸において、腸上皮細胞の形態、増殖速度、Wnt/ β -catenin 経路に関連する遺伝子の抑制などで働くことから、腸における増殖・分化のバランスをとるために働いていることがわかった。このことから、HNF4 α は腸上皮のがん抑制因子として働くことが示唆されている。潰瘍性大腸炎 (Inflammatory bowel disease; IBD) の患者では HNF4 α が減少傾向を示しており、事実、IBD-モデルマウスの DSS 処理マウスでも同様の傾向が確認された (61)。さらに、腸上皮細胞特異的 HNF4 α 欠損マウスに DSS 処理を行うと、正常マウスに、DSS 処理を

した時よりも激しい体重の減少や、TNF α や IL-1 β の発現上昇が認められ、以上のことより HNF4 α が IBD の抑制因子としても働いているということが明らかとなった。また、HNF4 α の欠損により、細胞間接着に重要な Claudin15 の発現減少が引き起こされ、それにより IBD の発症を促進していることも報告されている (62)。

腎臓特異的 HNF4 α マウスの作成においては、PTEC 特異的に Cre を発現させるプロモーターは存在するが、HNF4 α を十分量ノックアウトさせる条件が報告されていないことから、PTEC 特異的 HNF4 α 欠損マウスは作成されていない。

肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスは、肝臓特異的に発現制御をするアルブミン遺伝子プロモーターを持つ Alb-Cre 遺伝子を用いて作成された (59)。その結果、肝臓重量の増加、血中 ALT の上昇や、TG、総コレステロール、HDL の減少等が確認され、血中のリポタンパク質の減少が確認された。さらに、血中アンモニア濃度の上昇 (41)や、血液凝固因子の発現減少 (63)、血中胆汁酸濃度の上昇 (64)、血中鉄濃度の低下 (44)など様々な表現型の変動が確認された。

以上の結果から、KO マウス肝臓では遺伝子発現も大きな変動があると予測されたため、本研究では遺伝子発現変動に関わる肝臓特異的転写因子群の発現変動を、定量的 PCR を用いて解析した。その結果、正常マウス肝臓と比較して様々な遺伝子発現の変動が確認され、その中でも HNF4 γ の顕著な発現上昇が判明した。本解析の詳細については第 2 章にて記述する。

第 3 節 Hepatocyte nuclear factor 4 ファミリー HNF4 γ

(1) HNF4 γ

HNF4 γ は HNF4 α と同じ HNF4 サブファミリーに属する核内受容体であり、ヒト腎臓から同定された (65)。HNF4 γ は正常な成体肝臓では発現が認められておらず、肝臓内における機能は報告されていない。当初クローニングされた HNF4 γ は、HNF4 α と比較して転写活性化能が低いと報告されていた (65)。しかし、そのクローンは 5'末端の配列に誤りが有り、その後ヒトの cDNA から正しくクローニングされた HNF4 γ は 407 アミノ酸残基で約 47kDa であることがわかった (66)。

マウスにおいても HNF4 γ がクローニングされ、配列を解析した結果、マウス HNF4 γ の分子量は 10 アミノ酸残基分多い、418 アミノ酸残基であり、47kDa であることが判明した (67)。またヒトの HNF4 γ と同様に、A/B ドメインに存在する AF-1 ドメインを欠いた構造であった。その一方で、DNA 結合ドメイン (C ドメイン) やリガンド結合ドメイン (E ドメイン) の相同性は、それぞれ 94%と 80%と非常に高い相同性であった。このことから、HNF4 γ は HNF4 α と同じ標的遺伝子を認識し、転写調節することができ

ると考えられる (Fig. 1-8)。

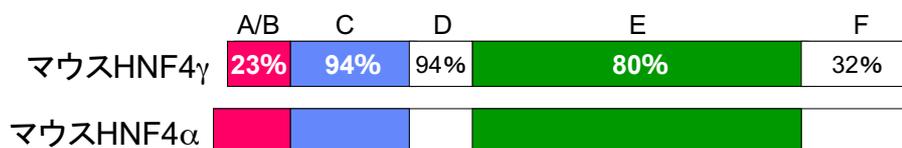


Fig. 1-8. マウス HNF4 α と HNF4 γ のアミノ酸相同性

(参考文献 (67)より引用し作成)

数字(%)は HNF4 α と HNF4 γ のアミノ酸配列の相同性を示す。C ドメイン(DNA 結合ドメイン)と E ドメイン(リガンド結合ドメイン) のアミノ酸相同性は高いが、A/B ドメイン (転写活性化ドメイン)と F ドメインのアミノ酸相同性は低い

(2) HNF4 γ のスプライシングバリエント

HNF4 γ も HNF4 α と同様に、スプライシングバリエントが存在することがゲノム解析により報告されている。マウスでは、上記で示した 418 アミノ酸 (47kDa)で構成される HNF4 γ の他に、462 アミノ酸 (52kDa)で構成されている HNF4 γ のスプライシングバリエントが Ensembl genome Browser (<https://www.ensembl.org/index.html>) において報告されている。これまでの先行研究で示されている HNF4 γ はこの二種類のバリエントを区別しておらず、47kDa の HNF4 γ での報告がなされていると考えられている。本論文では既知のバリエントとして知られている 47kDa の HNF4 γ を HNF4 γ 1、52kDa の HNF4 γ を新規のバリエント HNF4 γ 2 と表記していく (Fig.1-9)。

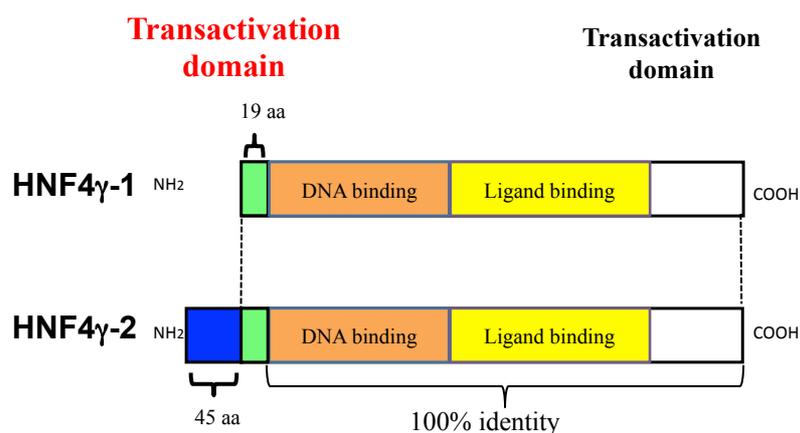


Fig. 1-9. マウス HNF4 γ 遺伝子の構造

データベース上の情報では、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の構造は、N 末端側に違いがあり、その違いは使用している Exon1 の違いから生じている。HNF4 γ 1 では Exon1A を用いて

おり、HNF4 γ -2 では Exon1B を用いている。その下流に存在する Exon2 から Exon10 においては、同一のエキソンを用いている。ヒトにおいても同様なスプライシングバリエントが報告されており、HNF4 γ 1 は 408 アミノ酸 (46kDa)であり、HNF4 γ 2 は 445 アミノ酸 (約 50kDa)と報告されている。しかし、ヒト HNF4 γ 2 は開始コドン上流にも開始コドンが確認でき、その場合 10 アミノ酸が追加され、455 アミノ酸 (51kDa)となることがデータベースから予測できる。しかし、マウスやヒトを問わず、HNF4 γ 2 の存在を含めて、検証をした先行研究は存在しない。

(3) HNF4 γ の発現分布

全身での HNF4 γ 発現分布はマウスとヒトの成体において解析がなされており、ヒトの大腸、結腸、小腸、腎臓、膵臓、精巣での発現が mRNA レベルで確認された (65)。しかし、その発現量は膵臓、腎臓、小腸において HNF4 α の発現量の 1/10 量程度しか存在しないことが明らかになっている (65)。マウスの胚生期では、HNF4 γ は 7 日胚では発現が認められなかったが、低レベルではあるが 15.5 日胚の腸管において発現が認められた (67)。

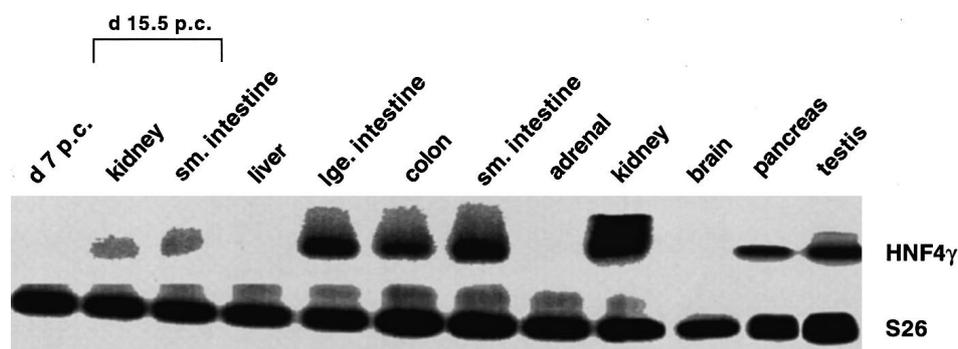


Fig. 1-10. マウス HNF4 γ の mRNA の組織分布 (参考文献 (67)より引用)

HNF4 γ 発現は大腸、結腸、小腸、腎臓、膵臓、精巣で認められるが、肝臓では認められない。

(4) HNF4 γ の機能

HNF4 γ は HNF4 α とサブファミリーとして報告されたことから、同様に転写因子として働くことが予測される。HNF4 γ の機能解析のために、全身 HNF4 γ 欠損マウスが作成され、その表現型の解析がなされた (68)。HNF4 γ 欠損マウスは全身 HNF4 α 欠損マウスとは異なり、胎生致死には至らず、形態的変化、身体機能、臓器異常、病理的異常などは認められなかった。しかし、HNF4 γ 欠損マウスは夜間運動量、エネルギー消費量、

呼吸交換率、巣作りの積極性などの低下が認められ、さらに強制水泳試験での無動時間が長かったため、うつ状態に陥りやすい傾向があると考えられている。この原因として、神経ステロイドである 5 α -DHP (ジヒドロプロゲステロン)から 3 α 5 α -THP (テトラヒドロプロゲステロン)への還元反応を触媒する AKR1C4/3 α -HSD (水酸化ステロイド脱水素酵素)の転写量の低下が肝臓で確認されている。AKR1C4/3 α -HSD は HNF4 α と HNF4 γ によって転写制御するということが示唆されている (69)。これにより、HNF4 γ 欠損マウスでは 3 α 5 α -THP 合成量が低下し、単極性うつ病と同様の傾向が発症したと考えられる。肝臓以外では HNF4 γ による転写制御の報告がいくつかされており、膀胱がんにおいて発現上昇し、2 型ヒアルロン酸合成酵素をコードする HAS2 のプロモーター上に結合して転写活性化を行なうことが知られている。これにより、腫瘍の成長やがんの浸潤・転移を促進していることが示唆されている (70)。さらに、同じく膀胱がんでは非翻訳 RNA の一つである microRNA (miRNA)の miR-34a が発現減少しており、miR-34a は HNF4 γ の 3'UTR に結合して発現抑制することが報告された (71)。これによって、膀胱では、miR-34a の発現低下により HNF4 γ が発現された結果、HAS2 の発現が上昇し、がん形成を促進することが予想された (71)。また、胃では HNF4 γ は miR-30a によって発現抑制されており、他にも同じ核内受容体である NR2F2 (COUO-TFII)が miR-194 によって発現抑制されることが報告された (72)。正常組織では、miR-30a の発現量が大きく、miR-194 の発現量が低いいため、HNF4 γ の発現が低く、NR2F2 の発現量が高いことが知られている。しかし、胃がんの前段階である鎮瘻ペプチド産生型化生が起こる際には、miR-30a の発現減少が原因で HNF4 γ が発現上昇し、miR-194 は発現上昇するため NR2F2 が発現減少するという、正常組織とは真逆の状態になる。この状態が鎮瘻ペプチド産生型化生を進行させ、胃がんの発症にかかるという報告がある (72,73)。一方で、肝臓は HNF4 γ の発現がほとんど認められないため、その機能は注目されておらず、KO マウス肝臓での HNF4 γ 2 の発現上昇と表現型との相関性を議論することはできていない。

第 4 節 研究目的および章構成

本研究では研究目的を「肝臓・腎臓の恒常性維持に関与する核内受容体 HNF4 ファミリーの同定と機能解明」と定めて、研究を行った。

肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスでは、脂肪肝や低血糖を始めとする肝機能の異常が認められるが、それらの原因が HNF4 α を起点とする、様々な遺伝子ネットワークでの下流の標的遺伝子の発現変動が原因と考えられている。肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウス肝臓では HNF4 γ の発現上昇が認められた。HNF4 γ はその構造から HNF4 α と同様の発現制御機構に関わり、表現型発症に関与していることが予測される。しかし、現在までに

HNF4 γ の詳細な機能解析や HNF4 α との比較については報告がない。さらに、HNF4 γ はゲノム配列から 2 つのバリエーションが予測されているが、その 2 種類の機能の違いなどの解析も未だされていない。肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスは多くの表現型を示すが、今までに解析された以外に未解析の新規の表現型の存在も考えられる。以上より、肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスで大きな発現変動をする遺伝子の解析が、表現系発症を理解するために必須だと考えられる。そこで第 2 章では肝臓では肝臓特異的 HNF4 α KO マウスで発現上昇する HNF4 γ の機能解析を行った。

また、HNF4 α の発現は肝臓以外の組織、例えば、生体の機能維持に重要な組織である膵臓、腸、そして腎臓でも認められている。膵臓や腸では組織特異的 HNF4 α 欠損マウスによる表現型などの解析がなされているが、腎臓の PTEC 特異的 HNF4 α 欠損マウスが作成されていないことから、腎臓における HNF4 α の機能解析は十分にはなされていない。一方で、先行研究によって HNF4 α が腎臓の分化や機能維持に関与していることが予測される。そのため、第 3 章においては、HNF4 α の機能が未知な腎臓での機能探索を行うために、PTEC 由来の細胞株を用いて、HNF4 α の新規標的遺伝子の同定を行った。

以上の研究結果をふまえ、第 4 章では総括を行い、肝臓と腎臓で働く核内受容体 HNF4 ファミリーを基軸とした遺伝子ネットワークの詳細を解明することで、肝臓・腎臓における核内受容体 HNF4 ファミリーの機能の考察と今後の研究課題について記す。

【第2章 新規 HNF4 γ の肝臓における機能解析】

第1節 HNF4 γ について

HNF4 ファミリーの代表格である HNF4 α は、第1章 第2節で示されたように肝臓での代謝関連因子の制御や、脱分化抑制因子や肝細胞分化誘導因子としての働きなど、様々な報告がなされており、また膵臓、小腸、大腸などの様々な代謝器官においても重要な働きを示すことが明らかとなっている。

一方で同じ HNF4 ファミリーに属する HNF4 γ は、その機能の解析は十分にされておらず、第1章 第3節で示されたように、ごくわずかな報告例しかない (69-71)。このことから、肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスにおいて、HNF4 γ 発現上昇が認められているものの、発現上昇によって表現型にどのような影響を及ぼすかは未解明である。

また遺伝子データベースである Emsembl genome browser では、マウスやヒトの HNF4 γ には2つのスプライシングバリエントが存在し、N 末端に存在するリガンド非依存的な転写活性化領域 (A/B ドメイン)の構造には大きな違いが生じており、このことから各バリエントで、転写活性化能が異なることが予測される。しかし、これまでバリエントごとの解析がなされた研究報告はなく、HNF4 γ の機能を解明する上で無視できない問題である。

第2節 研究概説

本章 第1節で述べた様に、HNF4 γ の機能に関しては未解明な点が多いことを踏まえ、本研究では HNF4 γ の機能を HNF4 α と比較した。

本研究において、肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスでの HNF4 γ を含む様々な転写因子の発現変動を qPCR で確認し、その後、発現上昇が認められた HNF4 γ のタンパク質レベルでの解析を行い、2つの HNF4 γ タンパク質のバンドが検出された。

この2つのバリエントがデータベース上に存在するスプライシングバリエントであると仮定し、このバリエントの N 末端領域の構造が異なることから、マウスとヒトの HNF4 γ において、各 HNF4 γ バリエントの 5'-RACE による N 末端領域と転写開始点の決定を行った。その結果、それぞれの種で2つのバリエントが確認され、既に配列などの報告のあった HNF4 γ を「HNF4 γ 1」とし、新規に存在が確認された HNF4 γ を「HNF4 γ 2」と呼ぶ事とし、HNF4 α と HNF4 γ 1/2 構造的な比較を、各 HNF4 タンパク質のアミノ酸配列を基に行った。

また、肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスとコントロールマウスにおける HNF4 α と HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 の発現量の比較を行ったところ、HNF4 α の顕著な発現減少と、HNF4 γ 1 と

HNF4 γ 2 の両方のバリエーションの発現上昇が確認された。次に、各 HNF4 遺伝子発現量を各遺伝子のコピー数で比較を行い、肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスにおける HNF4 γ の発現上昇の意義を探った。

HNF4 α は全身の様々な組織において発現していることが報告されている (65)。このことから、HNF4 γ の各組織分布を正常マウス組織で解析した。さらに、同様の実験をヒト組織とヒト細胞系において解析した。

また、HNF4 α と HNF4 γ の構造に着目したところ、ダイマーを形成する部位である、E ドメインの相同性が高いことから、これらがヘテロダイマーを形成することが予測されたため、プルダウンアッセイによる複合体形成能の確認を行い、ヘテロダイマーの形成を証明した。

HNF4 α は肝臓で様々な遺伝子の発現制御に関わる転写因子として多くの報告がなされている。そこで同じサブファミリーの HNF4 γ の転写因子としての機能を確認するため Luciferase assay による転写活性化能の比較を行った。その結果、HNF4 γ 2 は HNF4 α よりも転写活性化能が高く、HNF4 γ 1 は HNF4 α よりも転写活性化能が低いことが示された。また、HNF4 α と HNF4 γ の共導入をした際も同様の結果が得られた。また、Luciferase assay の結果が DNA に対する結合能の差でないことを示すために、EMSA を用いた DNA 結合活性能の比較を行い、同等の結合活性を有することが確認された。

最後に、上記の転写活性化能の違いから、HNF4 α と HNF4 γ によって標的遺伝子の発現誘導能に違いがあることが示唆されたため、肝細胞のマーカー遺伝子群の発現への影響を検証する事を目的に、肝がん由来細胞株に HNF4 α と HNF4 γ を強制発現させ、肝細胞マーカーの遺伝子の発現変動を解析した。また同時に、実際の肝機能への影響も確認するために、細胞増殖能と主要な肝機能を比較し HNF4 α または HNF4 γ の発現による、肝機能への影響を確認した。

以上の結果を総合し、新規に同定された HNF4 γ 2 は HNF4 α 以上の脱分化抑制能や肝機能維持因子としての働きを持つことが示され、創薬や疾患治療における標的として有用であるということが示された。

第3節 実験材料・方法

(1) 肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスにおける転写因子の発現変動

第1章第2節より、肝臓での HNF4 α の機能解析を行う為、肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスを作成した。肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスの作成方法に関しては、第1章第2節に記述済みである。表現型の変動から、遺伝子の発現変動があることが示唆された。そこで、肝臓で発現が認められる転写因子の発現を解析するために、転写因子の mRNA の発現の比較を、qPCR を用いて行った。

1. 使用したマウス肝臓について

肝臓は、全て 45 日齢のコントロールマウス (*Hnf4a*^{fl}、FLOX マウス)と KO マウス (*Hnf4a*^{ΔH})の雄から採取したものを使用し、液体窒素条件下で乳鉢を用いて粉末状にしたものから、ミクロスパチュラー一杯分 (約 10 mg)の肝臓粉末を 1 mL ISOGEN に溶解して Total RNA の回収を行った。

2. Total RNA の抽出精製と cDNA の合成

Isogen II で回収した肝臓組織に 400 μ L の DEPC 水を加え、30 秒間ボルテックスをした後に氷上で 10 分静置、その後 12 krpm、10 分の遠心を 4°Cで行った。上清を回収し、等量の 100% イソプロパノールを加えて氷上で 5 分静置した。その後 12 krpm、10 分の遠心を 4°Cで行い、Total RNA の沈殿を得た。RNA 沈殿を 500 μ L の 70% EtOH で 2 回リンスした後に、100 μ L Nuclease Free Water で溶解した。

cDNA の合成には ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて行った。84 ng/ μ L に希釈した Total RNA 6 μ L (\approx 500 ng)を 65°C、5 分で変性後、氷上で 2 分急冷した。その溶液に 4 \times DN Master Mix + gDNA Remover の混合液を 2 μ L 加え、37°C、5 分で gDNA の除去を行った。そして、氷上でサンプルに、5 \times RT Master Mix II を 2 μ L 加え、37°C で 15 分、50°C で 5 分の逆転写反応を行い、98°C、5 分で酵素を失活させた。その後、MiliQ を 20 μ L 加えて cDNA を 3 倍希釈し、cDNA サンプル (3 \times diluted cDNA) とした。

3. リアルタイム定量 PCR (qPCR)

本研究では、蛍光試薬を含む qPCR 酵素に Fast Start SYBR Mix (Roche)と上記で合成した cDNA を用いて qPCR を行った。qPCR 装置は LightCycler 480 system II (Roche)を用いた。反応 Mix として、3 μ L の 3 \times diluted cDNA、10 μ M forward Primer と Reverse Primer

をそれぞれ 0.48 μL (f.c =0.3 μM), Fast Start SYBR Mix を 8 μL 、MiliQ を 4.04 μL 加えて、合計 16 μL で反応を行った。qPCR に用いたプライマーは Table 2-1 に示した。

反応条件は、95°C/10 分の Denature を 1 サイクル、95°C/ 15 分、60°C/ 1 分の Extension を 40 サイクル行い、各サイクルの最後に蛍光測定を行った。その後 qPCR 産物の融解温度 (melting temperature; T_m)を測定して、非特異的増幅の有無を確認する Melting の工程を行った。溶液温度を 60°Cから 95°Cまでの温度域で、6.6°C/分 (Ramp rate 0.11°C/秒) の温度上昇を行った。その際、常に蛍光測定を行って、qPCR 増幅産物の解離の確認を行った。また、増幅産物は二重鎖 DNA 産物に再形成させるために、反応後に溶液温度を、40°Cまで 12.2°C/分 (Ramp rate 0.22°C/秒)の速度で冷却を行い、再度、PCR 産物を形成するようにした。qPCR の結果は $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法 (比較 Ct 法)を使用して行う。標的遺伝子と内部標準の遺伝子の Ct 値をそれぞれ求め、それぞれの Ct 値の差を算出する。この値を ΔCt 値とする。それぞれのサンプルの ΔCt 値からキャリブレーションの ΔCt 値の差を $\Delta\Delta\text{Ct}$ 値として、以下の式に代入することで、発現量を算出する。

標的遺伝子の ΔCt = (標的遺伝子の Ct 値) – (内部標準遺伝子の Ct 値)

$\Delta\Delta\text{Ct}$ = (標的遺伝子の ΔCt 値) – (キャリブレーションの ΔCt 値)

発現量比 = $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

Table 2-1. qPCR プライマーの配列

Gene		Nucleotide sequence	Gene		Nucleotide sequence
mouse <i>Hnf1a</i>	F R	cagcaaggaagagcgagaga cgtgacaaggttggagccta	mouse <i>Cebpb</i>	F R	atcgaactcagcccctactct tagtcgctcggcgaagagg
mouse <i>Hnf1b</i>	F R	aatccccagcaatctcagaa ggcttgggaggtgtgag	mouse <i>Cebpd</i>	F R	ttcaacagcaaccacaaagc ctagcgacagaccacac
mouse <i>Hnf3a</i>	F R	cagggttgatggttgggt gacagggacagaggagtaggc	mouse <i>Cebpg</i>	F R	agcaggttctcagctggt tgggtgagctcttttgctt
mouse <i>Hnf3b</i>	F R	ctgacgctgagcgagatctat gagtggcggatggagtct	mouse <i>Dbp</i>	F R	ctttgaccctcggagacac ccggctccagtacttctcat
mouse <i>Hnf3g</i>	F R	cacgccaaccacatatt atttcaactcagggcagcagc	mouse <i>Rara</i>	F R	ccagcttccagtcagtggt aggaggcctgggtactatc
mouse <i>Hnf4a</i>	F R	agaggttctgtcccagcagatc cgtctgtgatgttgcaatc	mouse <i>Rarb</i>	F R	agcccaccaggaaacctt cagaggccaagtccaatc
mouse <i>Hnf4g</i>	F R	aaaagaagcgggtcacaatg cgcttgtgccagagtggtta	mouse <i>Rarg</i>	F R	cagccaacctacatgttcc gggttatagccctttctgctc
mouse <i>Hnf6a</i>	F R	agaccttccgaggatgtg ttgctcttccggttgcag	mouse <i>Rxra</i>	F R	gtccgccccttctgtcat cggcttgatctcctcagtc
mouse <i>Hnf6b</i>	F R	gaccttccgaggatgtg gggtcttctcttgcgttt	mouse <i>Rxrb</i>	F R	gccactggcatgaaaagg gtccacaggcatctcctcag
mouse <i>Cebpa</i>	F R	tggacaagaacagcaacgag tcaactggtcaactccagcac	mouse <i>Rxrg</i>	F R	cagaagtgcctgtgcatgg cctcactctctgctcgtct

4. タンパク質試料の作製

肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスにおける、HNF4 γ タンパク質の発現変動を確認するため、核タンパク質のタンパク質試料を作製した。

肝臓粉末を約 20mg に 450 μ L の Buffer A { 20 mM Hepes-KOH (pH 7.9), 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0.1% NP-40, 10% glycerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT , 1 \times Compete Ultra (Roche)} を添加して、5 分ごとにピペッティングをしながら氷上で 15 分インキュベーションをした。その後、2 krpm、5 分の遠心を 4 $^{\circ}$ Cで行い、上清と沈殿に分離し、上清を除去した。沈殿に Buffer B { 20 mM Hepes-KOH (pH 7.9), 400 mM NaCl, 20% glycerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT , 1 \times Compete Ultra (Roche)} を 200 μ L 加えてピペッティングで沈殿をリンスし、2 krpm、5 分の遠心を 4 $^{\circ}$ Cで行い、上清と沈殿に分離した後に上清を除去した。さらに残った沈殿に 40 μ L の Buffer C { 20 mM Hepes-KOH (pH 7.9), 20% glycerol, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT , 1 \times Compete Ultra (Roche)} を添加してピペッティングで混合、氷上で 10 分おきにピペッティングをしながら 30 分間のインキュベーションを行い核の溶解を行った。13 krpm、20 分の遠心を 4 $^{\circ}$ Cで行い、上清と沈殿に分離し、上清を別の 1.5 mL チューブに回収した。この画分を核タンパク質 (Nuclear Extract; N.E) とした。その後、Bradford 法でタンパク定量を行った。同時に肝細胞がん由来である H4IIE、Hepa1-6、HepG2、ヒト子宮頸がん由来細胞である Hela 細胞を 10cm シャーレで培養した細胞を回収し、同様の手法で核タンパク質を抽出した。

5. タンパク質試料の泳動と転写

タンパク質の泳動には分離ゲルを 10% SDS 含有のアクリルアミド:Bis-アクリルアミド (29:1)の混合溶液から作成した。濃縮ゲルには 4% SDS 含有のポリアクリルアミドゲルを用いた。サンプルを同量アプライした後に、泳動 Buffer (25 mM Tris, 186 mM Glycine, 0.1% SDS を混合して pH 8.3 に調整)を用いて 75V~100V で泳動を行った。泳動後、ゲルを取り出し、Mini-Trans-Blot Cell (Bio-Rad)を用いて、Transfer Buffer (20 mM Tris, 20% メタノール, 153mM Glycine)により、室温、40mV で 12 時間の条件下で Immobilon-P (Merck Millipore)への転写を行った。

6. Western Blot

転写したメンブレンを Blocking Buffer {5% スキムミルク in PBST (0.1% Tween 20 を含む PBS)} で室温、1 時間の条件で振盪し、抗体の非特異的結合を防いだ。その後、一次抗体として 1 μ g/ μ L の Anti-human- HNF4 γ mouse mAb (B6502A,PPMX)を 5 mL の 1% スキムミルク in PBST で 5,000 倍希釈し、室温で 1hr の反応を行った。抗体反応後のメンブ

レンを 10 mL の PBST で 15 分間振とうし、合計 3 回洗浄を行った。その後、二次抗体として 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (#7072,CST)を 5 mL の 1%スキムミルク in PBST で 10000 倍希釈を行い、室温で 45 分間反応を行った。抗体反応後のメンブレンを PBST で 15 分間、室温で振とうして 3 回洗浄を行った後、PBS で 10 分間洗浄を行った。抗体反応後のメンブレンを基質溶液 Western Lighting ultra (Perkin Elmer)に 1 分間浸し、Image Quant LAS4010 で化学発光を検出した。

(2) 5'-RACE

5'-Rapid Amplification of cDNA End (5'-RACE)法とは、mRNA の配列が一部分かっている条件下で、mRNA 上の 5'末端、つまり転写開始点を決定する手法である。転写開始点を決定することは、プロモーター領域を決定することや、複数のバリエーションが存在する時にそれぞれの存在を確認することが可能になるため、遺伝子の発現制御やバリエーション別の発現解析をしていく上で重要なことである。

本研究では、Emsembl Genome Browser で示された HNF4 γ の 2 つのバリエーション発現を確認した。本研究では肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスとヒト中皮腫由来の H28 細胞の mDNA を利用して 5'-RACE を行った。プライマー情報は [Table 2-2](#) に示した。

1. テンプレートの作成と逆転写 PCR

逆転写 PCR はテンプレートを、肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスとヒト中皮腫由来株である H28 から抽出した Total RNA を用いた。Total RNA の抽出は [2 章 第 3 節 \(1\)-2](#) に従った。5'-RACE を行うにあたり、5'-Full RACE Core Kit (TAKARA)を用いた。用意した Total RNA から 3,000 ng 分の Total RNA を使用し、逆転写反応の酵素は、AMV Reverse Transcriptase XL (TAKARA)を用いて行った。

Table 2-2. 5'-RACE 用のプライマー

位置/名称	方向	塩基配列(5'→3')	PCR 産物(bp)
mouse RT-Primer	AS	(P)-TTGGCCCATTCACCA	793nt (HNF4 γ 1) 696nt(HNF4 γ 2)
	SS	AGGGCAGCAACATCCCCTCCAT	634bp(HNF4 γ 1)
1st PCR	AS	GACTCTTCCGAATGCTGCGCCT	537bp(HNF4 γ 2)
	SS	TTCAGTCCCAAGCCCCAGTTCCA	529bp(HNF4 γ 1)
2nd PCR	AS	AGCCATCACAACTGGATGCCCC	432bp(HNF4 γ 2)
	AS	(P)-CTTCAGCTTGTGCCA	590nt (HNF4 γ 1) 555nt (HNF4 γ 2)
human RT-Primer	SS	GTCGGCAATGTGTTGTTGACA	514bp (HNF4 γ 1)
	AS	CTGTTGCTCTGTCCCCACA	479bp (HNF4 γ 2)
human 2nd PCR	SS (4 γ 1)	ACGTGACAGAATAAGCACCAGA	308bp (HNF4 γ 1)
	AS (4 γ 1)	CTGTTGCTCTGTCCCCACA	
	SS (4 γ 2)	ACGTGACAGAATAAGCACCAGA	218bp (HNF4 γ 2)
	AS (4 γ 2)	CCAAAGTTGTGTAAGTTGGGTCC	

2. RNase H 処理

逆転写反応で合成した cDNA との鋳型となる RNA を分解するために、Kit 同梱の RNase H による反応を 30°C、1 時間の条件で行った。その後、一本鎖 DNA を回収する為に、エタノール沈殿を行い、DNA を沈殿・精製した。一本鎖 DNA は 12 μ L の MiliQ に再溶解させることで次のコンカテマー化におけるテンプレートとした。

3. コンカテマー化

精製した一本鎖 DNA を 5'リン酸付加末端と 3'の結合させる、コンカテマー化を行う為、同じく Kit 同梱の buffer、PEG6000、T4 RNA Ligase を用いてコンカテマー化を行った。

4. PCR による 5'未知領域の増幅

コンカテマー化後に、1st PCR、2nd PCR は One Taq polymerase (NEB)を用いて行った。1st PCR 後に、PCR 産物を 1 μ L 使用して、2nd PCR を行った。

5. PCR 産物の精製と TA ベクタークローニング

2nd PCR 産物を 1.8% アガロースゲルを用いて電気泳動し、目的の位置のバンドを確認した。その産物部分のゲルから DNA を抽出し、TA クローニング専用ベクターである pMD20 (TAKARA)へ TA クローニングをした。

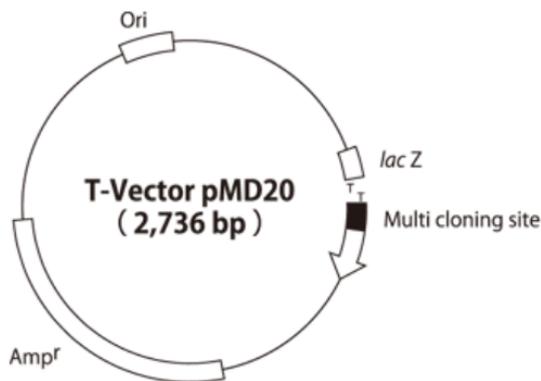


Fig. 2-1. pMD-20 vector の概略図

http://catalog.takara-bio.co.jp/PDFS/3270_DS_j.pdf より引用

25 ng の pMD20 と 2nd PCR 産物の精製物を 4.5 μ L 混合し、2 \times Ligation High ver.2 (TOYOBO)を 5 μ L 混合し、16 $^{\circ}$ Cで 2 時間インキュベートを行った。その後、大腸菌 DH5 α 株にトランスフォーメーションして、LB/Amp (X-Gal, IPTG) プレートで 37 $^{\circ}$ C培養を行い、コロニー形成を行った。その後、白色コロニーから培養を行い、発現ベクターの増幅後、アルカリ-SDS 法による精製を行い、遺伝子導入の有無はベクター上の制限酵素で切断後に、アガロース電気泳動で DNA の断片の長さで確認を行った。また、導入配列はサンガーシーケンスで確認した。

(3) HNF4 γ バリエーションの発現量の比較

1. マウス肝臓での相対定量と絶対定量による発現解析

コントロールマウスと肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスにおける、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の特異的プライマーを用いて相対発現量を比較した。各マウス肝臓からの RNA 抽出、cDNA 合成、qPCR までの実験手法は、第 2 章 第 3 節 (1)-2.3と同様に行った。使用したプライマーは、Table 2-3に記述した。

各バリエーションの発現量を相対定量で比較することは不可能なため、それぞれのコピー数を算出して、絶対定量を行った。絶対定量を行う際は、各コピー数での希釈系列を作成して Cp 値を測定、その Cp 値をもとに検量線を引くことで、サンプル Cp 値とコピー

数を算出することができる。一般的に、絶対定量で検量線を引く際は、特定の増幅プライマーからできる PCR 産物をプラスミドベクターに組み込み、その総塩基数から分子量を決定させることで、1 コピーごとの量を決定することができる。以下の計算式に従い、計算を行うことで希釈系列を作成した。

$$\text{コピー量} \left(\frac{\text{copies}}{\mu\text{g}} \right) = \frac{9.11 \times 10^{11}}{\text{ベクター長} (\text{kbp})}$$

$$\text{コピー濃度} \left(\frac{\text{copies}}{\mu\text{L}} \right) = \text{コピー量} \left(\frac{\text{copies}}{\mu\text{g}} \right) \times \text{ベクター溶液濃度} \left(\frac{\mu\text{g}}{\mu\text{L}} \right)$$

ベクター長はクローニング元のベクターと導入した qPCR 産物の合計値を用い、ベクター溶液濃度は、精製後のベクター濃度を使用する。クローニングに用いるベクターは TA クローニング用ベクターである pMD20 を用いた。クローニングを行った qPCR 産物はマウス HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2、そして補正用の GAPDH である。各産物の増幅に使用したプライマーは [Table 2-3](#) に記した。10 μ L の qPCR 産物を、10%PAGE で電気泳動後に産物バンドを回収した。産物バンドを精製後、pMD20 への導入を [同章・節の \(2\)-5](#) と同様に行い濃度測定まで行った。濃度測定後にコピー濃度を計算によって決定し、希釈系列を作成した。希釈系列の濃度は FLOX マウスと KO における各標的遺伝子の Cp 値の範囲を元に作成し、10² コピーから 10⁹ コピーまでの間で作成した。

Table 2-3. qPCR に用いたプライマー配列

Gene		Nucleotide sequence	Gene		Nucleotide sequence
mouse <i>Hnf4a</i>	F	agaggttctgtcccagcagatc	mouse <i>Hnf4g1</i>	F	ctgaacaccgctgtcactgt
	R	cgtctgtgatgttggaatc		R	gtggtctctggggcagaact
mouse <i>Gapdh</i>	F	gacttcaacagcaactcccac	mouse <i>Hnf4g2</i>	F	gctagcactactctgggtgtgtg
	R	tccaccacctgttgctgta		R	aacagttgacaccactgtctgt
human <i>HNF4A</i>	F	caggctcaagaaatgcttcc	human <i>HNF4G1</i>	F	cgttcctaccacagccta
	R	ggctgctgtcctcatagctt		R	ctggatccccatagtgtt
human <i>GAPDH</i>	F	agccacatcgtcagacac	human <i>HNF4G2</i>	F	atactggacatggacatggc
	R	gccaatagaccaaatec		R	actgtctctggggcagaac

2. マウス・ヒト各組織における HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 の定量比較

使用したマウスは2ヶ月齢でオスの C57BL/BL6 マウスを購入し、組織を回収した。回収した組織は脳、心臓、肺、肝臓、腎臓、十二指腸、結腸、回腸、大腸、胃、膵臓、脾臓、骨格筋、精巣である。回収後に 1 mL の ISOGEN に組織を加え、POLYTRON PT 1600E ホモジナイザー (Kinematica AG) で組織を破碎し、その後 RNA の精製から cDNA の合成を行った。RNA 抽出から cDNA の合成は [第2章 第3節 \(1\)-2](#) に準じて行った。

ヒト組織での発現確認は成人ヒト組織から回収した pooled cDNA のセットである MTC Panel I・II (TAKARA) を使用し、各 cDNA を 5 倍希釈したものをテンプレートとして使用した。

3. ヒト培養細胞株における HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 の定量比較

各組織で定量した HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 の発現量をヒト培養細胞株においても比較を行った。細胞種は様々な組織のがん由来の細胞株 23 種類用意し、培養後の細胞から GenElute mRNA Miniprep Kits (Sigma-Aldrich) を用いて、mRNA を抽出し、それぞれの mRNA から cDNA を合成した。cDNA の合成過程には ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover を用いて合成した。

4. Caco2 細胞における HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 の定量比較

Caco-2 の培養は Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM, Wako) に終濃度が 10% の Fetal bovine serum (FBS)、0.1 mg/mL ストレプトマイシン、100 units/mL ペニシリンを加えた培地 {以降は D-MEM (+/+) と表記、前半の+は 10%FBS を含む、後半の+はペニシリンとストレプトマイシンを含むという意味} で培養し、培養シャーレ内の細胞の充填度が 100% になったところを day 0 として、day 21 まで培地交換を行いながら培養した。未分化 Caco2 は培養シャーレ内の充填度が 70~80% の時に回収を行った。回収した Caco2 細胞は同じ手順で RNA 抽出、cDNA 合成 qPCR を行った。また、小腸分化マーカーとして Sucrase-Isomaltase のプライマー (F: aacaatggaatggctataactgg, R: acagatgtctgctccaacca) を作成し、ポジティブコントロールとして使用した (74)。

(4) HNF4 α -HNF4 γ タンパク質間の相互作用解析

1. 発現ベクターの作成

本実験では、融合タグタンパク質として、Halo-tag (Promega) と Myc-tag を使用した。Halo-tag は、融合タンパク質として発現させることで、タンパクの可溶化を促し、最終的な収量を増加させることが報告されている (75)。Myc-tag はヒト c-Myc のペプチド断片(EQKLISEEDL)の 10 アミノ酸で構成されるペプチドで、その大きさからタンパク質の相互作用に干渉することが少なく、さらに抗体反応によって検出できるという利点が存在する。Halo-tag 融合タンパク質を発現させる発現ベクターとして、pHTN-CMV-neo (Promega) を使用した。HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 の cDNA を増幅する際のテンプレートは当研究室が作成していた pcDNA3/ HNF4 α 、HNF4 γ 1 または HNF4 γ 2 を用いて行った。PCR 増幅産物をプライマーに付与した制限酵素で処理し、導入する発現ベクターも同

様に制限酵素で処理をした。各 DNA を精製した後に、Ligation High ver.2 と共に混合してライゲーションを行った。その後の処理は第 2 章 第 3 節 (2)-5 と同様に行った。次に、myc-tag をもつ発現ベクターとして、pCMViR-myc ベクターを使用した (76)。pCMViR-myc ベクターにもマウス HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 を導入したものを同様の手順で作成した。マウス HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2、pHTN-CMV-neo ベクターと pCMViR-myc ベクター作成時のプライマー配列に関しては、Table 2-4 に示した。

Table 2-4. 発現ベクター作成用のプライマー

※HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 は発現ベクターの AS は共通部分なので共通のプライマー

※Halo-tag は N 末端側に結合するため、開始コドン(ATG)は削られている

ベクター	名称	方向	塩基配列(5'→3')	RE
pHTN -CMV- neo	mouse	SS	GATCGAATTCGACTCTCTAAAACCCCTT	EcoRI
	<i>Hnf4a</i>	AS	GCATTCTAGACTAGATGGCTTCTTGCTT	XbaI
	mouse	SS (4G1)	ATATGAATTCGACAGTTCTGCCCCAGAGAC	EcoRI
	<i>Hnf4g1</i>	SS (4G2)	GCATGAATTCTGTGTCTCTCAATCGATGATGAG	EcoRI
	<i>Hnf4g2</i>	AS	GCATTCTAGATCACAGCTGCTTTTGCTTAGAGA	XhoI
pCMViR -myc	mouse	SS	ATTAGAATTCGCCACCATGCGACTCTCTAAAACCCCTT	EcoRI
	<i>Hnf4a</i>	AS	GCATAAGCTTGATGGCTTCTTGCTTGGTGATCGTTGG	HindIII
	mouse	SS (4G1)	GCATGAATTCGCCACCATGGACAGTTCTGCC	EcoRI
	<i>Hnf4g1</i>	SS (4G2)	GCATGAATTCGCCACCATGGGGTGTGTCTCTCAATCG	EcoRI
	<i>Hnf4g2</i>	AS	GCATCTCGAGCAGCTGCTTTTGCTT	XhoI

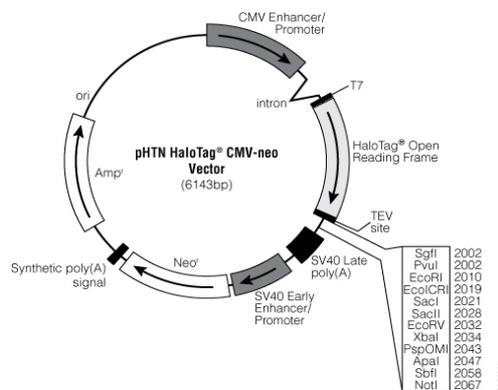


Fig. 2-2. pHTN-CMV-neo ベクターの概略図

(http://www.promega.com/~media/Images/Resources/Figures/9800-9899/9853MA_500px より引用)

2. HEK293T への遺伝子の共導入

2 種類の発現ベクターを作成し、HEK293T への遺伝子導入を行った。遺伝子導入方法は発現ベクターを、polyethylenimine Max (Polyscience)を導入試薬に用いたリポフェクション法での Forward Transfection での遺伝子導入を行った。Forward Transfection は、細胞播種後に 24 時間の培養をすることで、培養プレート底面に細胞を定着させた後に遺伝子導入をする手法であり、遺伝子導入効率の高い細胞株への導入をする際に利用される。

播種する 10 cm シャーレの底面に Cell Matrix Type IV (新田ゼラチン) でコラーゲンコーティングを施し、コーティング済みシャーレに HEK293T 細胞を 2.0×10^6 cells/8mL の播種を D-MEM (+/+) で行い、その後 24 時間培養を行った。24 時間培養した細胞の培地を D-MEM (終濃度 5% FBS のみを添加、D-MEM (+/-)と表記)に置換した。その後 2000 ng/ μ L の発現ベクターを合計 30 μ g (15 μ L)、1.5 mL チューブに分取し、900 μ L の D-MEM と 60 μ L の 1 mg/mL PEI (60 μ g)を混合し、室温で 15 分間静置した後に、10 cm シャーレの培地中に添加することで遺伝子導入を行った。遺伝子導入の 24 時間後に培地を再度 D-MEM (+/+)に置換した。

発現ベクターの導入パターンに関しては以下の [Table 2-5](#) に示した。また今回の実験では特異的な結合を確認するため発現パターンに以下の 3 通りを追加して行った。

- (1) 15 μ g pHTN-空ベクター + 15 μ g pCMViR-myc-*Hnf4* ベクター、
- (2) 15 μ g pHTN- *Hnf4* ベクター + 15 μ g pCMViR-myc-空ベクター、
- (3) 15 μ g pHTN- *Hnf4* ベクター + 15 μ gpCMViR-myc *Hnf4* ベクター

Table 2-5. Pull-down assay における発現パターン一覧

パターン	Halo-tag (pHTN)	myc-tag (pCMViR)
(A)	<i>Hnf4g1</i> or Empty	<i>Hnf4a</i> or Empty
(B)	<i>Hnf4g2</i> or Empty	<i>Hnf4a</i> or Empty
(C)	<i>Hnf4g1</i> or Empty	<i>Hnf4g2</i> or Empty
(D)	<i>Hnf4a</i> or Empty	<i>Hnf4g1</i> or Empty
(E)	<i>Hnf4a</i> or Empty	<i>Hnf4g2</i> or Empty
(F)	<i>Hnf4g2</i> or Empty	<i>Hnf4g1</i> or Empty

3. タンパク質の回収

HEK293T への遺伝子導入後 48 時間後に、細胞を 3 mL の PBS で 3 回洗浄し、1 mL の PBS を加えてセルクスレーパーでディッシュから剥がした。剥がした細胞は 1.5 mL チューブに移し、3 krpm、10 分間 4°C で遠心分離して上清を捨てた。その細胞を -80°C のディープフリーザーで 1 時間凍結保存し、Halo-tag の結合活性を最適化した。

凍結した細胞を氷上で解凍後に、細胞溶解溶液である 1 mL の M-PER (Mammalian Protein Extraction Reagent, Pierce) と、終濃度 1 mM で添加した AEBSF (Roche) の混合溶液を加え、ピペッティングによる細胞溶解を行った。その後、10 分おきにピペッティングを行いながら、合計 30 分のインキュベーションを行った。その後、12 krpm、30 分の、4°C で遠心分離後に上清を可溶化タンパク質画分として 1.5 mL チューブに回収し、Pull-down assay に用いた。

4. Pull-down assay

Pull-down assay を行う担体ビーズは、Halo-Link Resin (Promega) を用いた。TBST (TBS + 0.1% Tween20 混合溶液) で平衡化を済ませた 50 μ L (50% v/v) の Halo-Link Resin を 1.5 mL チューブに分注し、上記で得た可溶性タンパク質画分を混合し、4°C でローテーターによる転倒混和を行いながら 2 時間のインキュベーションを行った。

インキュベーション後のレジンを回収して、3 krpm、2 分の 4°C で遠心分離を行い、その後未反応タンパク質を含む上清画分を除去した。残ったレジんに 1 mL の TBST を加えて、転倒混和後に 3 krpm、2 分の 4°C で遠心分離を行うという洗浄過程を合計 5 回行った。その後、Resin に 100 μ L の Elution Buffer {50mM Tris-HCl (pH8.0)、1% SDS、1 \times cOmplete Protease inhibitor cocktail (Roche)} を加え、4°C でローテーターによる転倒混和を行いながら 30 分間のインキュベーションを行い、タンパク質の溶出を行った。

溶出したタンパク質は、Bradford 法により濃度測定を行った後に Sample Buffer を加えて、65°C、15 分の熱変性処理を行った。

5. Western Blot

タンパク質の泳動、及び Western Blot は、第 2 章 第 3 節 (1)-5,6 と同様に行った。使用した抗体は Table 2-6 に示す。

Table 2-6. Western Blot で使用した抗体一覧

標的	1st Antibody	2nd Antibody
pHTN or pCMV - <i>Hnf4a</i>	Anti-human- HNF4 α mouse mAb (PP-1415-00, PPMX)	Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (#7072,CST)
pHTN or pCMViR- <i>Hnf4g1/ Hnf4g2</i> (HNF4 α と反応時)	Anti-human- HNF4 γ mouse mAb (B6502A, PPMX)	
pCMViR- <i>Hnf4g1/ Hnf4g2</i> (pHTN- <i>Hnf4g1/ Hnf4g2</i> と反応時)	Anti-Myc Tag mouse mAb (9B11, CST)	

(5) Luciferase assay による HNF4 α /HNF4 γ の転写活性化能の比較

1. 発現ベクターの作成

本実験では、HNF4タンパク質の発現ベクターとして、pEB-Multi-puro、pEB-Multi-hygro、または pCMViR-myc ベクターを用いた。各発現ベクターの作成および精製は前述と同じ反応手順でクローニングから精製までを行った。各クローニング時に用いたプライマー情報は Table 2-7 に示した。

Table 2-7. クローニング用 Primer 配列

ベクター	名称	方向	塩基配列(5'→3')	RE
pEB -Multi -puro	mouse	SS	GATCGAATTCGACTCTCTAAAACCTT	EcoRI
	<i>Hnf4a</i>	AS	GCATTCTAGACTAGATGGCTTCTTGCTT	XbaI
	mouse	SS (4G1)	ATATGAATTCGACAGTTCTGCCCCAGAGAC	EcoRI
pCMViR -myc	<i>Hnf4g1</i>	SS (4G2)	GCATGAATTCTGTGTCTCTCAATCGATGATGAG	EcoRI
	<i>Hnf4g2</i>	AS	GCATTCTAGATCACAGCTGCTTTTGCTTAGAGA	XhoI
	human	SS	GCATGAATTCGCCACCATGCGACTCTCCAAAACC	EcoRI
pCMViR -myc	<i>HNF4A</i>	AS	GCATGGATCCGATAACTTCCTGC	BamHI
	human	SS (4G1)	GCATGAATTCGCCACCATGGGGAATACCACAGACAAC	EcoRI
	<i>HNF4G1</i>	SS (4G2)	GCATGAATTCGCCACCATGTGTGTTTCTAAA	EcoRI
	<i>HNF4G2</i>	AS	GCATCTCGAGCAATTGCTTTTGT	XhoI

2. レポーターベクターの作成

本実験では、既に HNF4 α の応答が知られている遺伝子のプロモーター領域を利用し、HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 の転写活性化能の評価を行った。使用したプロモーターは、pGL4.11/mouse *Otc* プロモーター(-235/-1) (41)、pGL4.11/human *APOC3* プロモーター(-3373/-73) (28,42)。さらに HNF4 α 結合部位である DR-1 配列を 3 つ持ち、その下流にチミジンキナーゼプロモーターの最小単位である TK-mini 配列を組み込んだ、完全に人工的なプロモーターである pGL4.11/(HNF4) $_3$ TK-mini の三つを使用した。

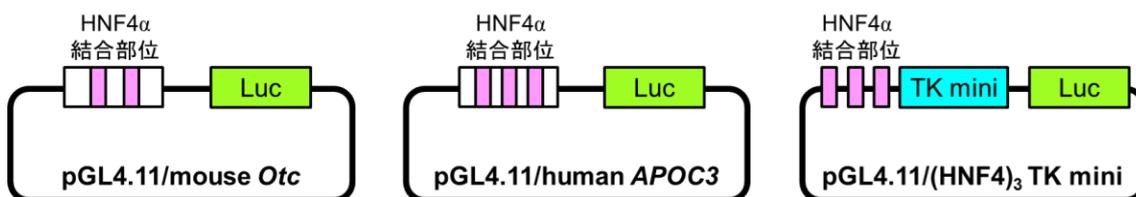


Fig. 2-3. pGL 4.11 プロモーターの配列

3. 遺伝子導入/解析

96 穴プレートに HEK293T 細胞を 2.0×10^4 cells/well in 100 μ L D-MEM (+/+) で播種し、翌日に D-MEM (+/-) に培地交換を行った後に、作成した導入したプロモーターの下流に、ホタルルシフェラーゼを有する 200 ng/well の pGL4.11 系列のレポーターベクターと、内部標準用に、遺伝子導入効率や細胞生存率、実験によるヒューマンエラー（細胞溶解率、ピペッティング誤差など）を補正するために HSV-TK（ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ）プロモーターによってウミシイタケルシフェラーゼ遺伝子が発現するように構築された 50 ng/well の pGL4.74、さらに発現用ベクターを混合させ、1 μ g/well の PEI と混合後に細胞導入を行った。遺伝子導入 24 時間後に D-MEM (+/+) への置換を行い、さらに 24 時間培養した後に培地の除去を行い、25 μ L/well の Glo Lysis 1 \times Buffer (Promega) を添加して 10 分室温のインキュベートで細胞溶解を行った。細胞溶解液を回収後に 12 krpm、5 分の遠心を 4 $^{\circ}$ C で行った。上清を 3 μ L 分取し、蛍光測定用の白色 384 穴プレートに加え、そこに Dual-Glo Luciferase Reagent (Promega) を 3 μ L/well 加えて混合後 5 分間室温でインキュベートし、ホタルルシフェラーゼの発光量を 2300 EnSpireTM Multimode Plate Reader (Perkin Elmer) で測定した。この時の測定値を DGlo の値とした。DGlo の測定後、3 μ L/well の Dual-Glo Stop&Glo Buffer (Promega) を添加、混合後に再度 5 分間室温でインキュベートしてウミシイタケルシフェラーゼの発光量を測定した。この時の測定値を SG とした。解析は、同サンプルにおける DGlo 値と SG 値の Dglo/SG 比を算出して活性値とした。その後、各 pGL4.11 ベクターの系において pEB-Multi-Hygro

の空ベクターを導入した活性を 1 として、mHNF4 α 発現ベクターを導入した時の活性の相対比を算出した。また、遺伝子導入パターンは HNF4 発現ベクターの単独発現時と共導入時の条件をそれぞれ **Table 2-8** に示し、共導入時は同時に単独導入も行った。

また、タンパク質の発現量の比を確認するため、タンパク質を回収して Western Blot を行った。Western Blot の抗体は 1 次抗体 Anti-His-tag mouse mAb (D291-3)、2 次抗体に Anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody を使用して **第 2 章 第 3 節 (1)-6** と同様に行った。

Table 2-8. Luciferase assay の遺伝子導入パターン

(1) 単独導入時

試薬名	使用量
pGL4.11 レポーターベクター (250 ng/ μ L) (<i>mOtc</i> , <i>hAPOC3</i> , (HNF4) ₃ -TK mini)	200 ng (1 μ L)
pGL4.74 (50 ng/ μ L)	50 ng (1 μ L)
pEB Multi puro or hygro-mouse <i>Hnf4a/4g1/4g2</i> or pCMViR-myc-human <i>HNF4A/4G1/4G2</i>	200ng (2 μ L)
PEI (1 μ g/ μ L)	1 μ g (1 μ L)
D-MEM (-/-)	10 μ L
Total Volume	15 μ L

(2) 共導入時

試薬名	使用量
pGL4.11 レポーターベクター (250 ng/ μ L) (<i>mOtc</i> , <i>hAPOC3</i>)	200 ng (1 μ L)
pGL4.74 (50 ng/ μ L)	50 ng (1 μ L)
pEB Multi puro-mouse <i>Hnf4a/4g1/4g2</i>	100 ng (1 μ L) 200 ng (2 μ L)
pEB Multi puro-mouse <i>Hnf4a/4g1/4g2</i>	100 ng (1 μ L) 0ng(0 μ L)
PEI (1 μ g/ μ L)	1 μ g (1 μ L)
D-MEM (-/-)	10 μ L
Total Volume	15 μ L

(6) Gel shift assay による HNF4 α /HNF4 γ の結合活性の比較

1. 無細胞タンパク質合成系による HNF4 タンパク質の合成

TnT T7 Transcription/Translation Systems (Promega)を使用し、タンパク質を合成した。発現させるタンパク質は、マウスの HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 である。このシステムでは T7 プロモーターを利用してタンパク質合成を行うため、マウスの HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 の全長配列を T7-IRES expression vector (Promega)に導入した、その際、各 HNF4 タンパク質には発現量比較を行うときに使用する His-tag を付加した。

まず、TnT T7 Transcription/Translation Systems に含まれる試薬類を、添付された推奨マニュアルに従って氷上で 1.5mL チューブに調整し、30°C、90 分間の条件でヒートブロックを用いてタンパク質合成を行った。その後、合成したタンパク質の一部を分取し、Sample Buffer と混合して、His-tag を用いた Western Blot で発現量の比較を行った。

His-tag 抗体を用いた Western Blot に関しては第 2 章 第 3 節 (1)-6 と同様に行った。

2. DNA プローブの作成

タンパク質と結合させる DNA プローブとして既知 HNF4 α 標的遺伝子である mouse OTC (41)と CYP8B1 (64)のプローブを作成した。SS プライマーと相補的な DNA プライマー (AS プライマー)を設計し、結合をより明確に見るため mouse OTC プローブ、mouse CYP8B1 プローブを構成する SS プライマー、AS プライマーの両方に Biotin 付加を行った。それぞれ 100 μ M の SS プライマーと AS プライマーの 2 本のプライマーを 20 μ L と 5 \times Annealing Buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM NaCl, 5 mM EDTA) 10 μ L を混合して 90°C、3 分の熱変性後に室温でゆっくり温度を下げていくことでアニーリングを行い、DNA プローブを作成した。使用したプライマー配列は [Table 2-9](#) に示す。アニーリングした DNA プローブを 15% PAGE によって分離し、ゲルのプローブ部分を切り出して透析膜を用いての電気泳動で、DNA プローブを回収した。その後フェノール/クロロホルム、クロロホルム、エタノール沈殿の過程で精製を行い、15 μ L の TE buffer にプローブを溶解して濃度測定を行った。ビオチン標識プローブは 25 fmol/ μ L、非標識プローブは 1.25 pmol/ μ L に調整を行った。

Table 2-9. mOTC と mCYP8B1 プローブの配列

プローブ	方向	塩基配列 (5'→3')	塩基数
Biotin	SS	Biotin- GTTAGGCTTAAAGTTCAAGTG	21bp
-mOtc	AS	Biotin- CACTTGAACTTTAAGCCTAAC	
competitor	SS	GTTAGGCTTAAAGTTCAAGTG	
-mOtc	AS	CACTTGAACTTTAAGCCTAAC	
Mut Competitor	SS	GTTACTCTTAAAGTTCAAGTG	
mOtc	AS	CACTGAAACTTTAAGCCTAAC	

プローブ	方向	塩基配列 (5'→3')	塩基数
Biotin	SS	Biotin-CTGAGCAAAGTCCAAGGGCAGGAACCT	27bp
-hCyp8b1	AS	Biotin- AGGTTCTGCCCTTGGACTTTGCTCAG	
competitor	SS	CTGAGCAAAGTCCAAGGGCAGGAACCT	
-hCyp8b1	AS	AGGTTCTGCCCTTGGACTTTGCTCAG	
Mut Competitor	SS	CTGAGCACTGTCCAAGGGCAGGAACCT	
-hCyp8b1	AS	AGGTTCTGCCCTTGGACAGTGCTCAG	

3. DNA-タンパク質複合体の形成

上記で調製したビオチン標識/未標識 DNA プローブと、合成タンパク質を用いて以下のような条件で Gel shift assay を行い、DNA-タンパク質複合体の形成を確認していった。Gel shift assay には Lightshift Chemiluminescent EMSA Kit (Thermo)を用いて行った。ビオチン標識プローブは f.c = 100 fmol/sample で使用し、Competitor probe も、50 倍濃度となる f.c = 5 pmol/sample とした。また、スーパーシフト実験に用いる抗体として 1 µg/µL Anti-HNF4α Antibody (PP-1415-00, PPMX)と 1 µg/µL Anti-HNF4γ Antibody (B6502A, PPMX)を使用した。

- ① Biotin-probe (100 fmol)
- ② 合成 HNF4 α タンパク質 5 μ L + Biotin-probe (100 fmol)
- ③ ② + competitor probe (5 pmol)
- ④ ② + Anti-HNF4 α Antibody (2 μ g)
- ⑤ 合成 HNF4 γ 1 タンパク質 5 μ L + Biotin-probe (100 fmol)
- ⑥ ⑤ + competitor probe (5 pmol)
- ⑦ ⑤ + Anti- HNF4 γ Antibody (2 μ g)
- ⑧ 合成 HNF4 γ 2 タンパク質 5 μ L + Biotin-probe (100 fmol)
- ⑨ ⑧ + competitor probe (5 pmol)
- ⑩ ⑧ + Anti-HNF4 γ Antibody (2 μ g)

①～⑩に記された核タンパク質と EMSA Mix { 10 mM Tris, 50 mM KCl, 1 mM DTT (pH 7.5), 2.5% glycerol, 5 mM MgCl₂, 0.05% NP-40, 50 ng/ μ L, 1 \times Compete Ultra} を 1.5 mL チューブ内で混合し、氷上で 10 分インキュベートした。その後、③、⑥、⑨の 3 サンプルに Competitor を表記通りの量加え、さらに氷上で 10 分インキュベートした。その後、全サンプルに Biotin-Megalin のプローブを加えて、氷上で 10 分インキュベートした。その後、抗体を加える④、⑦、⑩のサンプルに抗体を表記通りの量加えて氷上で 10 分インキュベートした。すべてのサンプルが揃った時、MiliQ でメスアップし、各チューブ 20 μ L にした。

4. 電気泳動とメンブレン転写

反応終了後に各サンプルに f.c = 5 \times dye {0.04% (w/v) Bromophenol blue, 0.04% (w/v) Xylene cyanol FF, 25 mM EDTA, 30% (w/v) glycerol} を 1 μ L 加えて、アクリルアミド : Bis-アクリルアミド (59:0.5) の混合溶液から作成した 7% ポリアクリルアミドゲルを用いて、低温室で 85V、135 分間の電気泳動を行い、その後、タンク式のマニトランスブロットセル (Bio-Rad) で 30V、13 時間を 4 $^{\circ}$ C で Hybond-N+ membrane (GE healthcare) に転写を行った。

5. 感光反応

転写後のメンブレンに 254 nm の UV を照射し、クロスリンクを行った。その後、15% 過酸化水素を含む 1 \times TBS にメンブレンの複合体が転写された面を 30 分浸して、Rabbit reticulocyte 由来のペルオキシダーゼの不活性化を行った。その後、TBS で 10 分の洗浄を合計 3 回行った。ビオチン標識プローブの検出には Chemiluminescent Nucleic Acid

detection Module (Thermo Fisher Scientific)を用いて検出した。メンブレンを 5 mL の Blocking Buffer で 15 分振盪し、Blocking した。その後、5 mL Blocking Buffer に 16.7 μ L の Stabilized Streptavidin-Horseradish Peroxidase Conjugate の混合液にメンブレンを浸して 15 分 振盪した。その後、10 mL の Wash Buffer でリンス後、新しい 10 mL の Wash Buffer で 5 分振盪での洗浄を行い、洗浄の工程は合計 4 回行った。洗浄後のメンブレンに Luminol / Enhancer solution / Stable Peroxidase Solution の 1:1 混合溶液を 1 mL を浸して、化学発光させた後に、ImageQuant LAS 4010 (GE HealthCare)を用いて検出した。

(7) HNF4 α /HNF4 γ による肝細胞マーカー遺伝子と EMT マーカーの発現解析

本実験では、培養細胞中に HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 のタンパク質を大量に発現させることが重要となるため、前節で作成された pEB-Multi-puro/HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 の発現ベクターを利用した。

pEB-Multi-puro ベクターは、その内部に複製開始点の OriP と複製制御因子である Epstein-Barr Virus Nuclear Antigen-1 (EBNA1)を有しているのが特徴となる。細胞内に導入されると、EBNA1 が発現し、OriP に結合する。この OriP-EBNA1 複合体が宿主細胞の染色体と結合し、宿主の複製機能を利用して細胞分裂後の娘細胞にもベクターが分配され、ベクターを含んだ細胞が増幅する。培養中の培地に抗生物質を混合しておくことで、発現ベクター未導入の細胞に関しては死滅する。このようなエピゾーマル型ベクターを使用することで発現安定株と同等の効果が得られることから、大量に遺伝子発現を必要な際に利用される。

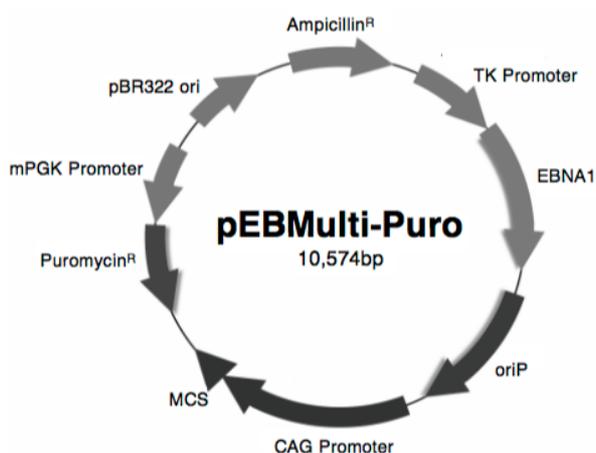


Fig. 2-4. pEB-Multi-Puro のベクターマップ

http://www.wako-chem.co.jp/siyaku/product/life/pEBMulti_Series/pdf/059-08331_pEBMulti-Puro.pdf より引用

本実験では肝臓由来の細胞株として、ヒト肝芽種由来の HepG2 細胞と、ヒト肝細胞がん細胞株由来の Huh7 細胞を用いて、pEB-Multi-puro ベクターを導入し、遺伝子発現を行った。

細胞を Cell Matrix Type I-C (新田ゼラチン)でコーティングした 6 cm シャーレに、HepG2 または Huh7 細胞 1.0×10^6 cells/dish で播種し、20 μ g PEI によるリポフェクション法で 10 μ g pEB-Multi-puro/Empty/ mHNF4 α / HNF4 γ 1/ HNF4 γ 2 をトランスフェクションした。遺伝子導入 24 時間後 (day1)、D-MEM (+)培地に終濃度 2 μ g/mL の puromycin を添加し、培地交換後 48 時間 (day3)で同条件培地での培地交換を行い、puromycin 添加後 72 時間後に細胞を PBS で Wash した後に 300 μ L の ISOGEN または 60 μ L の Urea Extraction で RNA とタンパク質を回収した。その後、RNA 抽出から cDNA 合成、qPCR を行った。qPCR で用いた標的遺伝子は既に HNF4 α の標的との報告がある肝細胞マーカー遺伝子や、その他肝機能維持に重要な遺伝子群を用いた。さらに HNF4 α が肝細胞において脱分化を抑制するという報告から、上皮間葉転換 (EMT)マーカー遺伝子についても同様に定量を行った (51,52)。プライマーの配列は [Table 2-10](#) に示し、実験手順には第 2 章第 3 節 (1)-3 に準じて行った。

タンパク質の回収は、180 μ L の Urea extraction buffer (8M Urea、2% Thio-Urea、0.1% Triton-X)で回収を行い、タンパク質用サンプルとした。Western Blot は、[第 2 章第 3 節 \(4\)-5, 6](#)に準じて行い、タンパク質の検出には Anti-His-tag mouse monoclonal mAb (D291-3) を使用した。

Table 2-10. qPCR プライマーの配列

Gene		Nucleotide sequence	Gene		Nucleotide sequence
human <i>OTC</i>	F R	gctccaggcttccaaggtt cttctggcttctctgggcaag	human <i>CYP7A1</i>	F R	gcttattcttgaattaggagaagg ttggcaccaaattgcagag
Human <i>APOC3</i>	F R	gccaaggatgcactgagc gaactgaagccatcggtcac	human <i>CYP8B1</i>	F R	gttctgccgaacctctct catctcccaaccaagttgc
human <i>PEPCK</i>	F R	attgatgctgcctgggagt ccccaaaagactccatgtt	human <i>CDH2</i>	F R	ctccatgtgccgatagc cgatttcaccagaagcctctac
human <i>G6PC</i>	F R	ccttgcctcatttctc ggctggcattatagatgctgt	human <i>ZEB1</i>	F R	ggaggatgacacaggaaagg tctgcatctgactcgattc
human <i>CYP1A2</i>	F R	ctacttggaggccttcatcct agcgtgtgtcccttgtgt	human <i>ZEB2</i>	F R	aggagctgtctcgcttg ggcaaaagcatctggagttc
human <i>ABCB11</i>	F R	gacataaaggagagccctga aggcaagcttggcatctt	human <i>TBP</i>	F R	gaacatcatggatcagaacaaca atagggattccgggagtc
human <i>GSTA1</i>	F R	gcttattcttgaattaggagaagg ttggcaccaaattgcagag			

(8) HNF4 α /HNF4 γ による細胞増殖抑制能と肝機能誘導能の比較

1. HNF4 α / γ による細胞増殖能の比較

本実験では 96 ウェルプレートに 5.0×10^3 cells/well で細胞を播種し、200 ng/well の pEB-Multi-puro/Empty/ mHNF4 α / HNF4 γ 1/ HNF4 γ 2 を 1 μ g/well の PEI を用いてトランスフェクションした。遺伝子導入 24 時間後(day1)に、測定を行う細胞は 1 μ L の Cell Counting Kit-8 試薬 (CCK-8, 同仁化学)と 100 μ L の D-MEM (+/)培地内を混合した培地で培地交換を行い、37°Cの 5% CO₂ インキュベーター内で 2 時間のインキュベートを行った。その後、2300 EnSpire™ Multimode Plate Reader (Perkin Elmer)で 450 nm の吸光度を測定し、その後 600 nm の吸光度を測定し、各ウェルにおける補正值として利用した。測定する以外の細胞は 100 μ L D-MEM (+/)で培地交換を行った。遺伝子導入から 24 時間ごとに同様の手順で測定し、遺伝子導入後 72 時間 (day3)まで測定を行った。

2. 肝機能解析用細胞の培養

肝臓は様々な機能を有するが、今回は尿素産生、糖新生、CYP1A2 の 3 つの活性を確認していった。これらの活性測定を行うにあたり、遺伝子発現までは同様の細胞条件での培養を行うため、培養条件を記す。

尿素産生、糖新生の測定では Cell Matrix Type1-C でコーティングした 6 cm プレートに 1.0×10^6 cells/well で細胞を播種し、10 μ g/dish の pEB-Multi-puro/Empty/mHNF4 α /mHNF4 γ 1/mHNF4 γ 2 をトランスフェクションした。遺伝子導入 24 時間後に終濃度 2 μ g/mL の Puromycin を含む D-MEM (+/)で培地交換を行い、48 時間の培養を行った。その後 D-MEM (+/)で 24 時間の培養を行った。

CYP1A2 活性の測定では Cell Matrix Type 1-C でコーティングした 96 well プレートに 2.0×10^4 cells/well で細胞を播種し、200 ng/well の pEB-Multi-puro/Empty/mHNF4 α /mHNF4 γ 1/mHNF4 γ 2 をトランスフェクションした。遺伝子導入 24 時間後に終濃度 2 μ g/mL の Puromycin を含む D-MEM (+/)で培地交換を行い、48 時間の培養を行った。その後 D-MEM (+/)で 24 時間の培養を行った。

(a) 尿素アッセイ

遺伝子導入を行った細胞に、3 mL の D-MEM (+/)に尿素回路の基質として終濃度 6 mM の NH₄Cl を添加した培地で培地交換を行い、その後 48 時間の培養を行った。培養後のサンプルから培地を 50 μ L 分取し、QuantiChrom Urea Assay Kit (BioAssay Systems) の色原体溶液と細胞培養用の 96 well プレート内で混合を行う。そのまま室温で 50 時間のインキュベートを行い、その後 2300 EnSpire™ Multimode Plate Reader (Perkin Elmer)

で 430 nm の測定を行った。また、細胞数による活性の違いを補正するため、培養していた 6 cm シャーレに、30 μ L の CCK-8 を添加して 2 時間のインキュベーションを 37°C 5% CO₂ インキュベーター内で行った。その後に、200 μ L の培地を細胞培養用の 96 well プレートに移して生細胞数の測定を行って活性値の補正に用いた。

(b) グルコースアッセイ

本実験では、培養した細胞を 1 mL の D-MEM (グルコース、フェノールレッド不含) で細胞を 2 回洗浄したのちに、3 mL の D-MEM (グルコース、フェノールレッド不含) に糖新生の基質として終濃度 2 mM のピルビン酸ナトリウムと終濃度 20 mM の乳酸ナトリウムを添加した培地に培地交換を行い、48 時間の培養を行った。培養後、100 μ L の培地とラボアッセイ グルコースキット (WAKO)内の発色溶液 200 μ L を混合して、37°C、5 分の条件でインキュベーションしたサンプルの吸光度を 2300 EnSpire™ Multimode Plate Reader を用いて 505 nm の波長を測定した。こちらも尿素アッセイと同様に残った細胞に対して CCK-8 での測定を行い、生細胞数を補正值とした。

(c) CYP1A2 アッセイ

CYP1A2 の酵素活性については P450-Glo™ CYP1A2 Induction /Inhibition Assay Kit (Promega)を用いて行った。

遺伝子導入を行った細胞に、3 mL の D-MEM (+/+)と CYP1A2 酵素の代謝基質として終濃度 100 μ M のオメプラゾールを添加した培地で培地交換を行い、その後 24 時間の培養を行った。培養後のサンプルから培地を 50 μ L 分取し、Kit の色原体溶液と細胞培養用の 96 well プレート内で混合を行う。そのまま室温で 50 分間のインキュベーションを行い、その後 2300 EnSpire™ Multimode Plate Reader で 430 nm の測定を行った。また、細胞数による活性の違いを補正するため、培養していた 6 cm シャーレに、30 μ L の CCK8 を添加して 2 時間のインキュベーションを 37°C の 5% CO₂ インキュベーター内で行った。その後に、200 μ L の培地を細胞培養用の 96 well プレートに移して生細胞数の測定を行って活性値の補正に用いた。

第4節 結果

(1) 肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスにおける転写因子の発現変動

HNF4 α は肝臓でも中心的な転写因子として働いていることが知られているため、発現減少などによって、他の転写因子に影響を及ぼすことが予想される。

そこで本実験では、KO マウスとコントロールマウスである FLOX の肝臓から RNA を抽出し、20 種類転写因子の発現変動を、qPCR を用いて比較した (Table 2-11)。

Table 2-11. KO マウスと FLOX マウス肝臓での転写因子の発現量の比較

(n=8, *, P<0.01, **P<0.001)

Gene	<i>Hnf4a</i> ^{fl/fl} mice	<i>Hnf4a</i> ^{ΔH} mice	Gene	<i>Hnf4a</i> ^{fl/fl} mice	<i>Hnf4a</i> ^{ΔH} mice
<i>Hnf1a</i>	1.00 \pm 0.12	0.45 \pm 0.06**	<i>Cebpb</i>	1.00 \pm 0.19	0.47 \pm 0.18**
<i>Hnf1b</i>	1.00 \pm 0.13	3.22 \pm 0.90**	<i>Cebpd</i>	1.00 \pm 0.26	0.55 \pm 0.08*
<i>Hnf3a</i>	1.00 \pm 0.17	1.74 \pm 0.42**	<i>Cebpg</i>	1.00 \pm 0.12	1.28 \pm 0.14**
<i>Hnf3b</i>	1.00 \pm 0.25	1.13 \pm 0.37	<i>Dbp</i>	1.00 \pm 0.61	0.62 \pm 0.49
<i>Hnf3g</i>	1.00 \pm 0.22	0.95 \pm 0.29	<i>Rara</i>	1.00 \pm 0.18	0.84 \pm 0.31
<i>Hnf4a</i>	1.00 \pm 0.14	0.03 \pm 0.01**	<i>Rarb</i>	1.00 \pm 0.47	2.63 \pm 0.76**
<i>Hnf4g</i>	1.00 \pm 0.50	12.73 \pm 3.77**	<i>Rarg</i>	1.00 \pm 0.16	1.58 \pm 0.35**
<i>Hnf6a</i>	1.00 \pm 0.54	1.14 \pm 0.48	<i>Rxra</i>	1.00 \pm 0.39	0.75 \pm 0.18
<i>Hnf6b</i>	1.00 \pm 0.40	1.06 \pm 0.21	<i>Rxrb</i>	1.00 \pm 0.46	1.15 \pm 0.26
<i>Cebpa</i>	1.00 \pm 0.26	0.61 \pm 0.14*	<i>Rxrg</i>	1.00 \pm 0.28	1.19 \pm 0.49

この結果、HNF1 α 、HNF4 α 、C/EBP- α 、C/EBP- β 、C/EBP- δ の遺伝子が KO マウス肝臓においてに顕著な減少 (半分以下) をしていることを確認した。一方で、HNF1 β 、HNF3 α 、HNF4 γ 、C/EBP- γ 、RAR β 、RAR γ は、発現量が上昇していた。

その中でも HNF4 γ の発現上昇は顕著であり、FLOX マウスと比較して約 13 倍の発現上昇が認められた。HNF4 γ は正常肝臓ではほとんど発現しておらず、肝臓における機能解析はなされていない。その一方で、HNF4 γ は HNF4 α とドメイン構造などが類似しており、KO マウスで減少した HNF4 α のリカバリーの役割をしているという可能性が示唆された。qPCR では mRNA での発現レベルしか比較できないため、タンパク質レベルでの発現解析が必要となった。そこで、Western Blot による HNF4 γ のタンパク質発現が解析を行った結果、発現上昇が認められた (Fig. 2-5)。この結果は、今回の HNF4 γ の mRNA の発現上昇と一致をした。

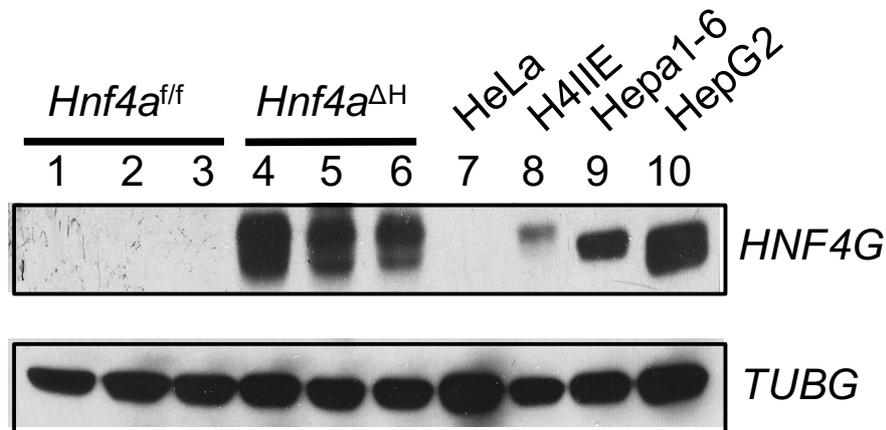


Fig. 2-5. FLOX/KO マウスにおける HNF4 γ の Western Blot

コントロールの肝臓由来細胞として H4IIE、Hepa1-6、HepG2 の三種類とネガティブコントロールとしてヒト子宮頸がん由来の HeLa から回収したタンパク質も同様に Western Blot で確認を行った。

(2) 5'-RACE

Western Blot による解析の結果、HNF4 γ のタンパク質バンドが 2 種類検出された。Emsembl Genome Browser では 2 種類の HNF4 γ バリエントの存在が示唆されている。また、2 種類の HNF4 γ は 5'末端の配列が異なる事がデータベースより予測できるため、本研究では、マウスとヒトにおいて、HNF4 γ に対する 5'-RACE 法による解析を行って、2 種類の HNF4 γ バリエントの存在を証明し、同時に各 HNF4 γ バリエントの転写開始点を決定した。

マウスの HNF4 γ に対する解析の結果、2 つの HNF4 γ バリエント由来の 5'未知領域を含む増幅バンドが検出された。その DNA 配列のシーケンス確認を行い、配列を比較すると、Exon1 の配列が異なっており、Exon2 以降の配列に関しては同様の配列を用いていることが明らかとなった。418 アミノ酸の既知 HNF4 γ は、「**HNF4 γ 1**」と呼称し、その Exon 1 は Exon 1A とした。一方で、462 アミノ酸の新規 HNF4 γ は「**HNF4 γ 2**」と呼称し、Exon 1 は Exon 1B とした。ヒトにおいても同様に 2 種類の HNF4 γ が存在することを示すため、ヒト由来の HNF4 γ 1/2 を発現するヒト中皮腫由来の H28 細胞から抽出した RNA を用いて、5'-RACE による 5'未知領域の同定を行った。その結果 300 bp と 200 bp 付近に、5'未知領域を含む増幅バンドを得たため、シーケンス確認を行った。その結果、300 bp の増幅バンドは、既知の HNF4 γ 1 で Exon 1A,B を含む配列だった。一方 200 bp の増幅バンドは新規 HNF4 γ 2 由来の配列であり、Exon 1C を含む配列だった。ヒト HNF4 γ 2 の配列を Browser の配列と比較すると、52 nt 短い配列であることが明らか

となった (Fig. 2-6)。

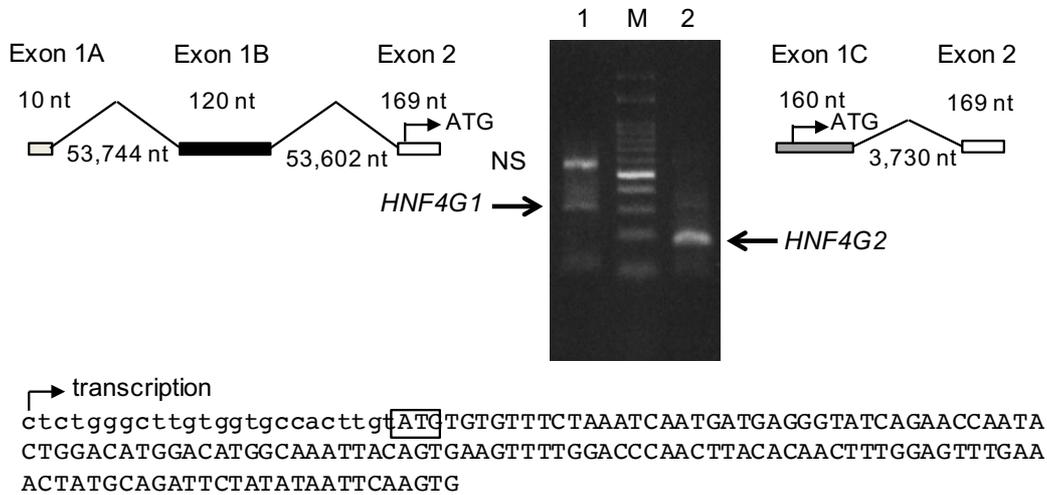


Fig. 2-6. ヒトでの 5'-RACE の結果と、HNF4 γ 2 の Exon1C の配列情報

NS; 非特異バンド (Non-specific band)

また、ヒト HNF4 γ 2 の翻訳開始点は Emsembl genome browser 上ではマウス HNF4 γ 2 よりも短い配列であったが、翻訳開始点の上流にはマウス HNF4 γ 2 と同じアミノ酸配列と開始コドンが保存されていた。そこで、ヒト・マウスを含む HNF4 γ 2 の N 末端配列を持つ動物種においてアライメント解析を行い、Emsembl genome browser 上のヒト HNF4 γ 2 の開始コドンが使用されている可能性を探った (Fig. 2-7)。

アライメント解析の結果、HNF4 γ 2 の N 末端のアミノ酸配列の保存性が高いことが分かった。このことから HNF4 γ 2 の本来の翻訳開始点は Browser が示すアミノ酸よりも 16 アミノ酸長いことが推測される。

さらに解析を進めていくと、HNF4 γ 2 の 17 番目のメチオニン(M)から、41 番目のロイシン(L)までの間の配列は、HNF4 α 上の転写活性化に重要で、コアクチベーターなどの転写共役調節因子(コファクター)との結合に参与する AF-1 ドメインとの相対性が高く、84%の相対性を有していた。さらに AF-1 ドメインに重要とされた Tyr6、Leu10、Tyr14、Leu17、Phe19 が HNF4 γ 2 でも保存されている (52)。このことから HNF4 γ 2 には転写活性化に重要な AF-1 ドメインが存在していることが示された。一方で、HNF4 γ 1 は HNF4 γ 2 より 46 アミノ酸短いため、AF-1 ドメインを欠如した領域から翻訳が開始されている。以上のことを踏まえ、マウスの HNF4 α /HNF4 γ 1/HNF4 γ 2 タンパク質の各ドメインの相対性を比較した (Fig. 2-8)。

マウス HNF4 γ 2 の配列は HNF4 γ 1 よりも 44 アミノ酸長い配列となっており、HNF4 α

(3) HNF4 γ バリエントの発現量の比較

1. KO マウス肝臓での HNF4 γ 1/ HNF4 γ 2 発現量の比較

KO マウス肝臓で発現していた HNF4 γ の解析の結果、スプライシングバリエントとして、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 を同定することができた。HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の KO マウス肝臓での発現量を比較するため、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 を特異的に認識する特異的なプライマーが作成し、qPCR による発現量の比較を行った。その結果、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 はともに約 10 倍の発現上昇していることが分かった (Fig. 2-9 B,C)。また、KO マウス肝臓では、HNF4 α は FLOX マウスと比較して約 2%まで発現低下をしていた (Fig. 2-9A)。

しかし、正常肝臓において HNF4 α は高発現するタンパク質であるため、約 2%までに低下しても発現量としては他の転写因子に比べて多い可能性がある。さらに、KO マウス肝臓で発現上昇をしている HNF4 γ はその構造などから HNF4 α のリカバリー因子として発現上昇していることが考えられたが、元々の発現量が低いところから 10 倍に発現上昇しても HNF4 α をリカバリーするまでの量には至っていない可能性がある。そこで、HNF4 α と HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 の発現量を相対的にではなく、コピー数という絶対量で比較を行うため、絶対定量を行った。

各コピー数での Cp 値を算出して検量線を引き、相対定量時に得られた Cp 値から各サンプルの絶対量を算出した。その結果、FLOX マウスでは HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の発現量は HNF4 α の 1/4000 の量という非常に低い発現量しかなかった (Fig. 2-10A)。KO マウス肝臓における HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の量は 2%にまで減少した HNF4 α との有意差は取れず、ほぼ同量であるということが明らかとなった (Fig. 2-10B)。

このことから、肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスで発現上昇している HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 は正常肝臓に存在する HNF4 α の量よりもはるかに少なく、肝機能をリカバリーしているということは考え難いということが明らかとなった。

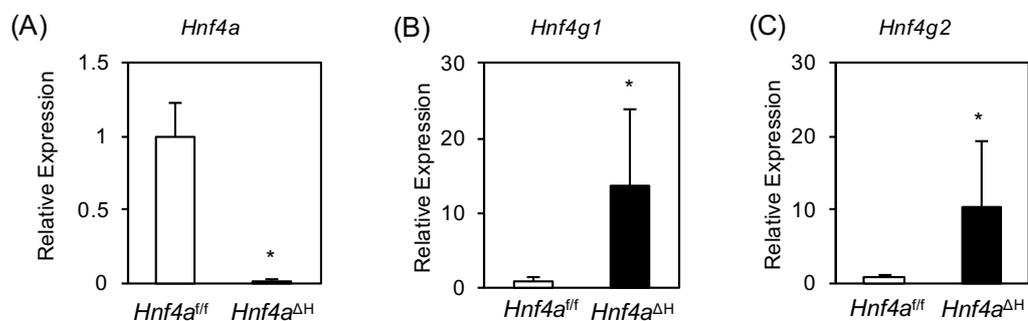


Fig. 2-9. FLOX/KO マウスにおける各 HNF4 遺伝子の mRNA 発現量の相対定量比較

*, p<0.05

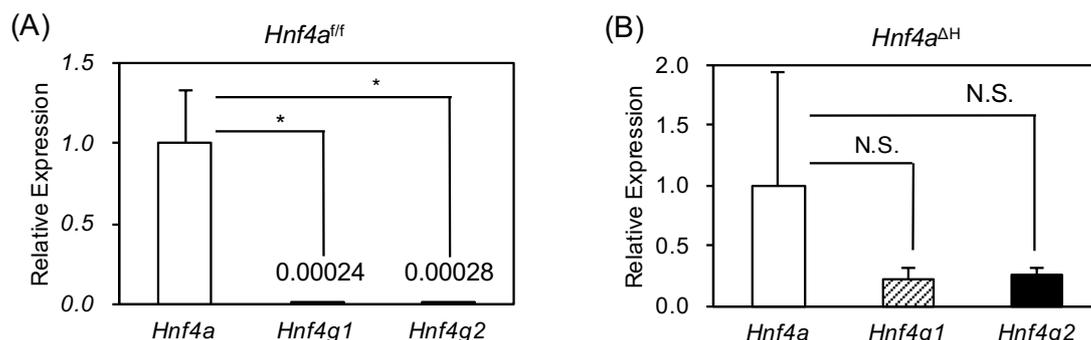


Fig. 2-10. FLOX/KO マウスにおける各 HNF4 遺伝子のコピー数の比較

(* , $p < 0.05$)

2. マウス・ヒト組織における HNF4 γ 1/ HNF4 γ 2 の発現分布

HNF4 α と HNF4 γ mRNA の組織分布は Northern Blot によって解析がなされており、HNF4 α は肝臓、腎臓、膵臓、小腸、大腸での高い発現が認められており、HNF4 γ はその発現量が低いものの膵臓、腎臓、大腸、小腸、精巣での発現が認められていた (65)。しかし、Northern blot は定量性に欠けるため、本実験では qPCR による定量的な発現量の比較を行った。さらに HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 を区別して発現量の比較を行い、マウスは野生型 C57BL6 マウスから抽出した組織、ヒトは複数人のヒト組織を合わせた RNA から cDNA を合成した Human MTC Panel I&II を用いた (Fig. 2-11)。

マウス HNF4 α の発現量は、参考文献 (65) とほぼ同一の発現を示していた (Fig. 2-11A)。一方で、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 では、肝臓での発現量を基準とすると、HNF4 γ 1 では腎臓、小腸、大腸、膵臓での発現が多かった (Fig. 2-11B)。HNF4 γ 2 では十二指腸、空腸、回腸の小腸での発現が局地的に高く、肺、大腸、膵臓、精巣でわずかな発現が認められた (Fig. 2-11C)。本研究の解析により、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 に共通して小腸での発現が肝臓に比べて顕著に多いということが判明した。

ヒト組織でも発現分布を確認したところ、HNF4 α はマウスと同様な結果を得ることができた (Fig. 2-11D)。HNF4 γ 1 は肝臓、腎臓、膵臓、小腸、大腸、精巣での発現が確認され、特に膵臓と精巣では肝臓以上の発現量を示した (Fig. 2-11E)。一方、HNF4 γ 2 はマウスと似た発現分布を示し、小腸での発現が最も高く、腎臓、大腸、膵臓での発現もわずかに確認された (Fig. 2-11F)。

ヒト HNF4 γ 2 はヒト小腸と腎臓、大腸、膵臓において発現が高かったため、絶対定量法を用いて、実際のコピー数を HNF4 γ 1 と比較をした。その結果、小腸では HNF4 γ 1 の約 13%、腎臓では約 35% となっており、他に発現が確認された大腸、膵臓でも非常に発現量の低い結果となった (Table 2-12)。

Table 2-12. ヒト組織における HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 のコピー数の比較

(100%表記で表示)

Tissue	<i>HNF4G1</i>	<i>HNF4G2</i>
Kidney	100	34.6
Small intestine	100	13.1
Colon	100	0.6
Pancreas	100	0.2

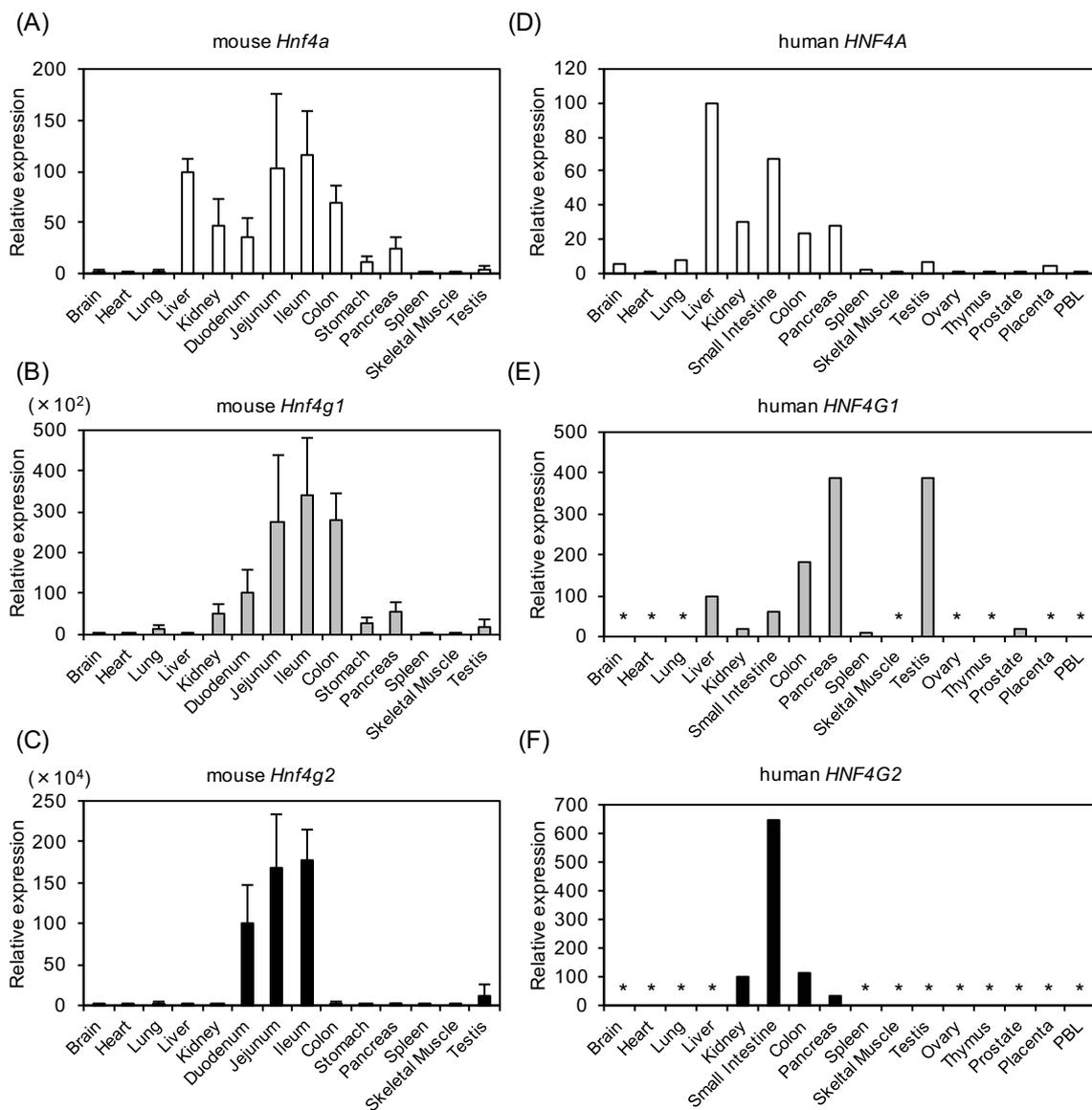


Fig. 2-11. マウス・ヒトにおける HNF4 α /HNF4 γ 1/ HNF4 γ 2 の組織別発現分布

(*、未検出)

次に、ヒト由来の培養細胞株における HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の発現量比較を行った。本実験には 23 種類のヒト由来培養細胞株を用いて行った (Fig. 2-12)。

HNF4 γ 1 の発現は肝細胞がん細胞株である Huh7、Hep3B、HepG2、PLC/PRF/5 での発現が非常に高く、HNF4 γ 2 ではヒト中皮腫由来である H28 での発現が顕著であり、肝細胞がん細胞株では発現量が低かった。また、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の両方を発現する細胞株において、それぞれのコピー数の絶対量定量を行った結果、HNF4 γ 1 と比較して HNF4 γ 2 は顕著に低いということが明らかとなった (Fig. 2-13)。

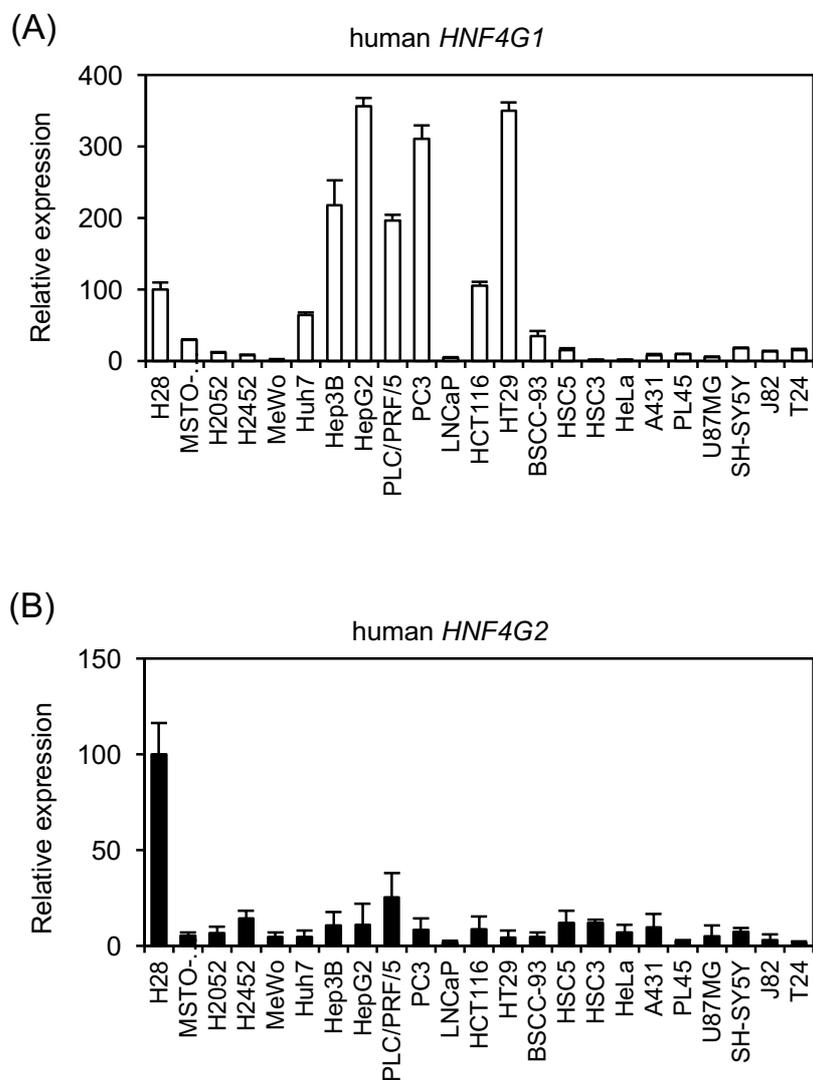


Fig. 2-12. ヒト由来細胞株における HNF4 γ 1/4 γ 2 の発現量比較

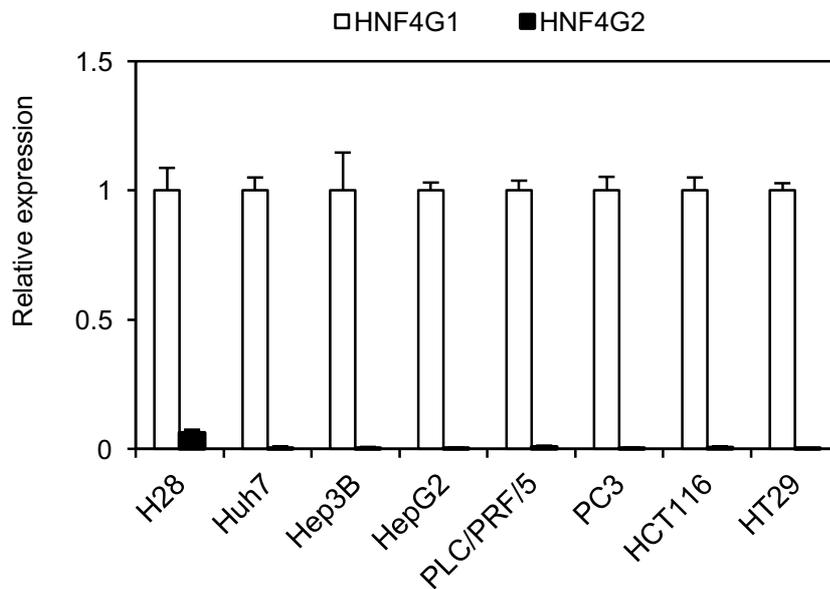


Fig. 2-13. ヒト由来細胞株における HNF4 γ 1/4 γ 2 のコピー数の比較

先行研究において、HNF4 α は小腸上皮細胞の分化に重要だという報告がなされている (77,78)。さらに、本実験の結果より小腸においての HNF4 γ 2 発現量がヒト・マウスにおいて多いということから、ヒト小腸上皮細胞における HNF4 γ 2 の発現量を、培養を続けることで結腸様上皮から小腸様上皮に分化をすることが知られているヒト由来細胞株 Caco2 で解析を行った (79)。

短期培養による未分化状態と長期培養による小腸分化状態の細胞から RNA を抽出して、HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 の発現量の比較を行った。また、小腸分化のマーカー遺伝子として Sucrase-Isomaltase (SI)をコントロールとして用いた (74) (Fig. 2-14)。

その結果、HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 の発現は小腸様分化によって発現上昇がみられたが、HNF4 γ 1 の発現上昇は顕著にあったものの、HNF4 γ 2 はゆるやかな発現上昇となった。未分化と小腸上皮分化後の HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の絶対量も比較した結果、HNF4 γ 2 の発現量は HNF4 γ 1 と比較して非常に低かった (Table 2-13)。

以上のことから、HNF4 γ を発現している組織、細胞株は存在するが HNF4 γ 1 と比較して HNF4 γ 2 の発現量は著しく低いことが明らかとなった。特にマウス・ヒト組織において HNF4 γ の発現が多い小腸においてもその発現量は HNF4 γ 1 よりも著しく低く、組織、細胞株 (Caco2)においても同様の傾向が得られた。

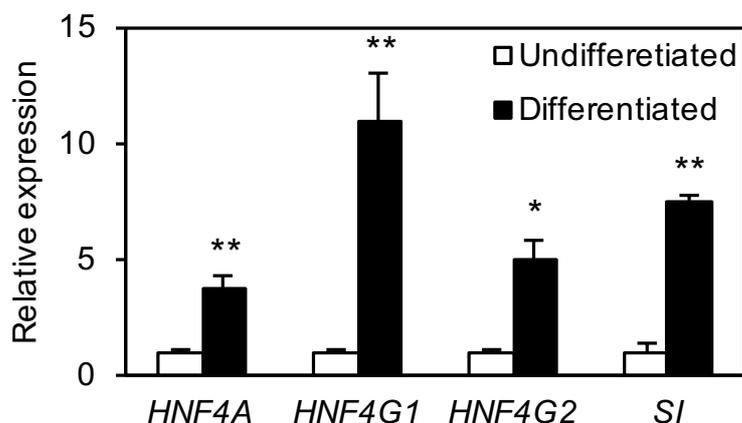


Fig. 2-14. 未分化および分化した Caco2 の HNF4 ファミリーの mRNA 発現量の比較
(*, $p < 0.005$; **, $p < 0.001$)

Table 2-13. 未分化と小腸様に分化した Caco2 の HNF4 γ 1/4 γ 2 のコピー数の比較
(*, $p < 0.001$)

Caco-2	HNF4G1	HNF4G2
Undifferentiated	100 \pm 6.44	0.06 \pm 0.02*
Differentiated	100 \pm 7.64	0.05 \pm 0.01*

(4) HNF4 α -HNF4 γ タンパク質間の相互作用解析

HNF4 α は HNF4 γ とヘテロダイマーを形成することが HepG2 細胞報告されている (80)。HepG2 細胞で発現している HNF4 γ の発現量比を考えると、この論文での報告がなされたのは、HNF4 γ 1 である可能性が高い。このことから、HNF4 γ 2 と HNF4 α との相互作用解析に関しては直接的な報告はされていなかった。

そこで、HNF4 α と HNF4 γ 2 の相互作用解析を行うため、HEK293T 細胞に HNF4 α と HNF4 γ 1/2 の強制共発現系を構築し、Pull-down assay による相互作用解析を行った。Pull-down を行うために、相互作用解析用のタンパク質は発現ベクターに Halo-tag (融合タンパクは HT-X と表記、bait タンパク質)、または myc-tag (融合タンパクは X-myc と表記、prey タンパク質)を含む発現ベクターを使用し、Halo-tag と結合する担体ビーズを用いて Pull-down Assay を行った。

コントロールとしてまず、HT- HNF4 γ 1 と HNF4 α -myc を強制発現させて、相互作用解析を行った。HNF4 α -myc のみを強制発現させた細胞では、Elution 画分には何も確認できなかった (Fig. 2-15A レーン 1)。HT- HNF4 γ 1 のみを強制発現させた細胞からは input

画分と Elution に HNF4 γ 抗体で Western Blot をした時のみタンパク質のバンドが確認できたため、HNF4 γ 1 はホモダイマーを形成していることが予測される (Fig. 2-15A レーン 2)。HT- HNF4 γ 1 と HNF4 α -myc を強制発現させた細胞からは HNF4 γ 抗体と HNF4 α 抗体で Western Blot をしたいずれの場合でも Elution 画分にタンパク質のバンドを検出できた (Fig. 2-15A レーン 3)。以上の結果から、HNF4 γ 1 と HNF4 α の相互作用が確認された。

また、HNF4 γ 1 と HNF4 α を発現するベクターに融合するタグタンパク質を入れ替えても (HT-HNF4 α と HNF4 γ 1-myc)、同様の結果を得ることができた (Fig. 2-15D)。

同様の実験を HNF4 α と HNF4 γ 2、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 でも行った結果、全てのタンパク質の組み合わせで相互作用の確認ができ、HNF4 α / HNF4 γ 1/HNF4 γ 2 は互いにヘテロダイマーを形成できることが明らかとなった (Fig. 2-15B-F)。

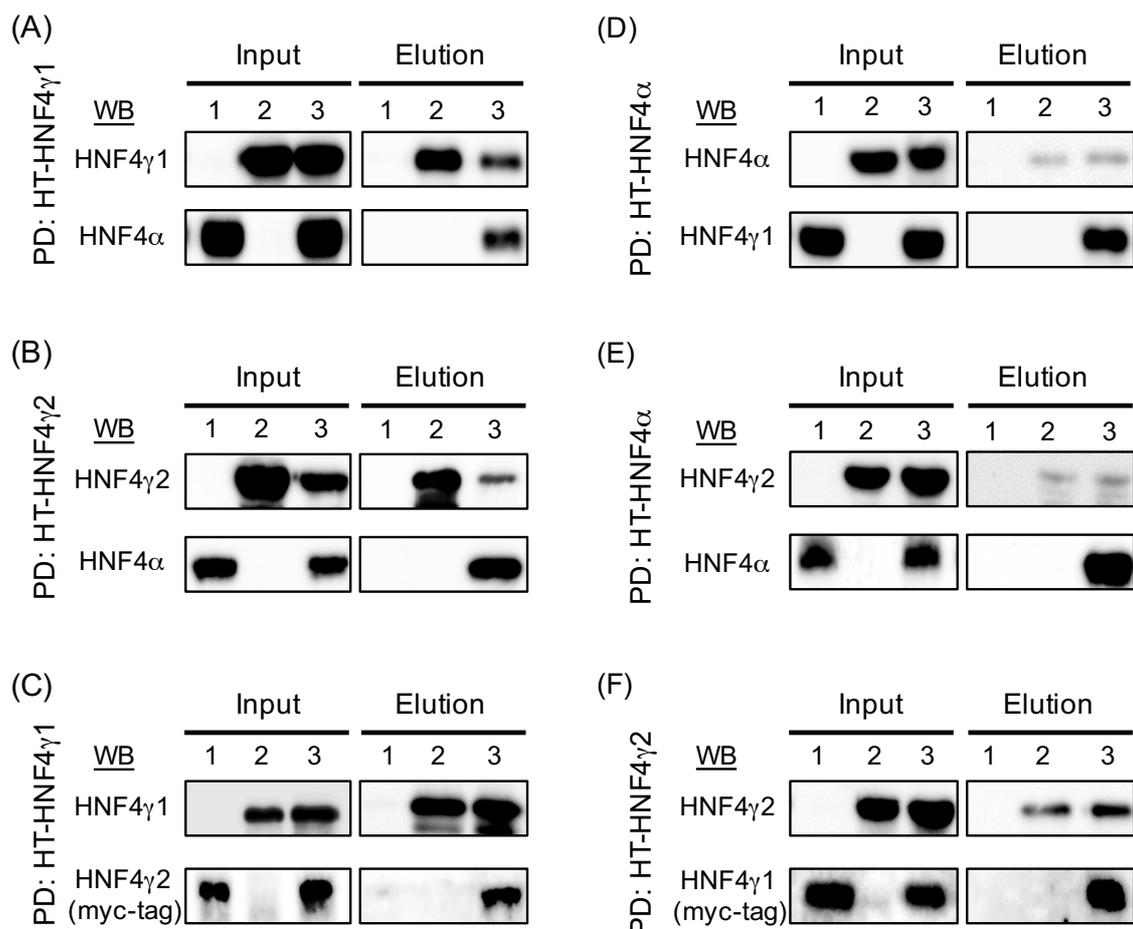


Fig. 2-15. Pull-down assay の結果

PD; pull-down に用いたタンパク質の名称 WB; 検出しているタンパク質 (抗体の名称)

1. Bait タンパク質のみ 2. pray タンパク質のみ 3. Bait と Pray タンパク質の共発現

(5) Luciferase assay による HNF4 α /HNF4 γ の転写活性化能の比較

先行研究において、ヒトの HNF4 α のバリエーションの中でも HNF4 α 2 が最も転写活性化能が高いということが報告されており (81)、ヒトの HNF4 γ が最も転写活性化能が低いという報告がなされた (65)。しかし、この時報告された HNF4 γ は誤った配列であったため、正確な転写活性化能の解析はなされていない。

そこで、HNF4 γ の転写活性化能の比較を行うため、既知の HNF4 α 結合領域をもつプロモーター領域を導入したレポーターベクターを用いて、Luciferase assay による転写活性化能の比較を行った。

既知の HNF4 α 応答遺伝子である、マウス *Otc* とヒト *APOC3* のプロモーターを導入したレポーターベクターで転写活性化能を比較した (Fig. 2-16A-D)。この時、肝細胞由来の HepG2 細胞で測定を行った場合、内在性の HNF4 α による影響も考えられたため、内在性の HNF4 α がない HEK293T 細胞でも同様に測定を行った。解析の結果、HNF4 α と比較して HNF4 γ 1 は低い転写活性化能を示した。一方、HNF4 γ 2 は HNF4 α 、HNF4 γ 1 よりも高い転写活性化能を示した。タンパク質の発現量に依存しての転写活性化能の優劣が発生していることが考えられるため、強制発現した HNF4 タンパク質のみ検出するように Anti-His-tag 抗体で Western Blot による発現量を比較した結果、発現量には大きな差は認められなかった。

本実験で使用した発現ベクターの N 末端と C 末端側に His-tag を有している。His-tag による影響がないことを示すため、His-tag を除去した発現ベクターで同様の実験を行い、転写活性化能への影響がないことが示された (Fig. 2-16E)。さらに、マウス *Otc* とヒト *APOC3* 上に存在する 2 つの天然プロモーター由来の配列に依存せず、HNF4 α 結合配列にのみ依存することを確認するため、HNF4 α を 3 つと TKmini プロモーターを合わせて作成した、人工プロモーター(HNF4)₃-TK mini でも同様の実験を行ったが結果は変化しなかった (Fig. 2-16F)。また、ヒト HNF4 α と HNF4 γ でも同様の実験を行い、同様の結果を得た (Fig. 2-16G,H)。

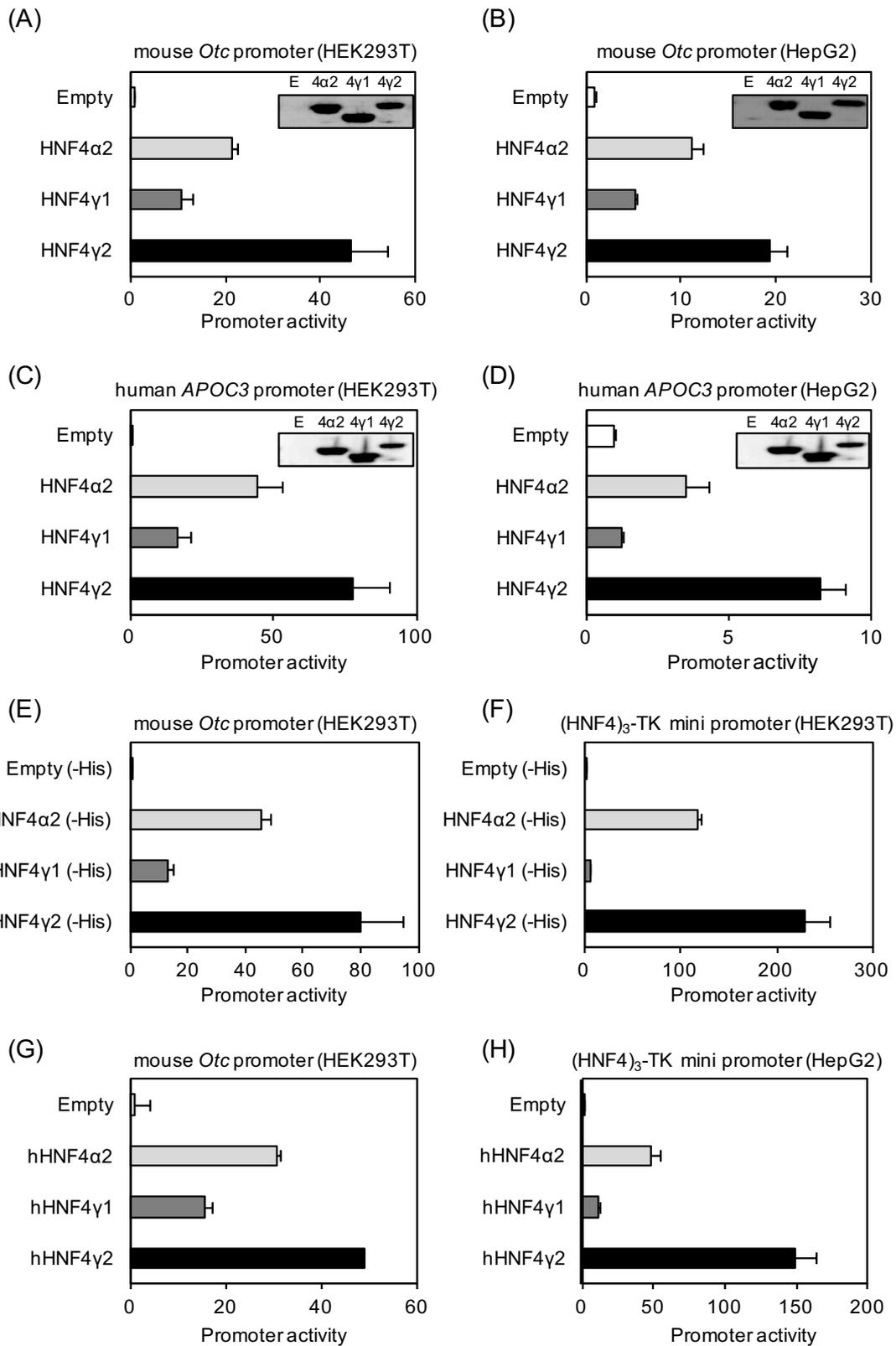


Fig. 2-16. HNF4α と HNF4γ の転写活性化能の比較

本研究の解析により、HNF4 α と HNF4 γ はヘテロダイマーを形成することが明らかとなった (Fig. 2-15)。そこで、HNF4 α と HNF4 γ 共発現させたときの転写活性化能の変動を同様の実験系を用いて確認した (Fig. 2-17)。

それぞれの HNF4 発現ベクターを 100 ng ずつ使用して合計 200 ng で活性測定を行った。また、導入した発現ベクターの量によって転写活性化能の優劣がでないことを示すため、各発現ベクター 100 ng 導入時での単独発現の転写活性化能も示した。

単独発現による転写活性化能の比較の結果、100 ng と 200 ng の同じ発現ベクターを単独導入時の転写活性化能とタンパク質発現量に差が認められず、ベクター量に依存した活性変動はなかった。

共発現による転写活性化能の比較の結果、HNF4 α 2 と HNF4 γ 1 を共発現すると、その中間の活性値を示すことがマウス *Otc* とヒト *APOC3* の両方のプロモーターで確認された。この結果は HNF4 α 2 と HNF4 γ 2、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の共発現においても同様の傾向が認められた。従って、HNF4 γ 1 は HNF4 α 2 と HNF4 γ 2 の転写を抑制し、HNF4 γ 2 は HNF4 α 2 による転写を促進することが明らかとなった。

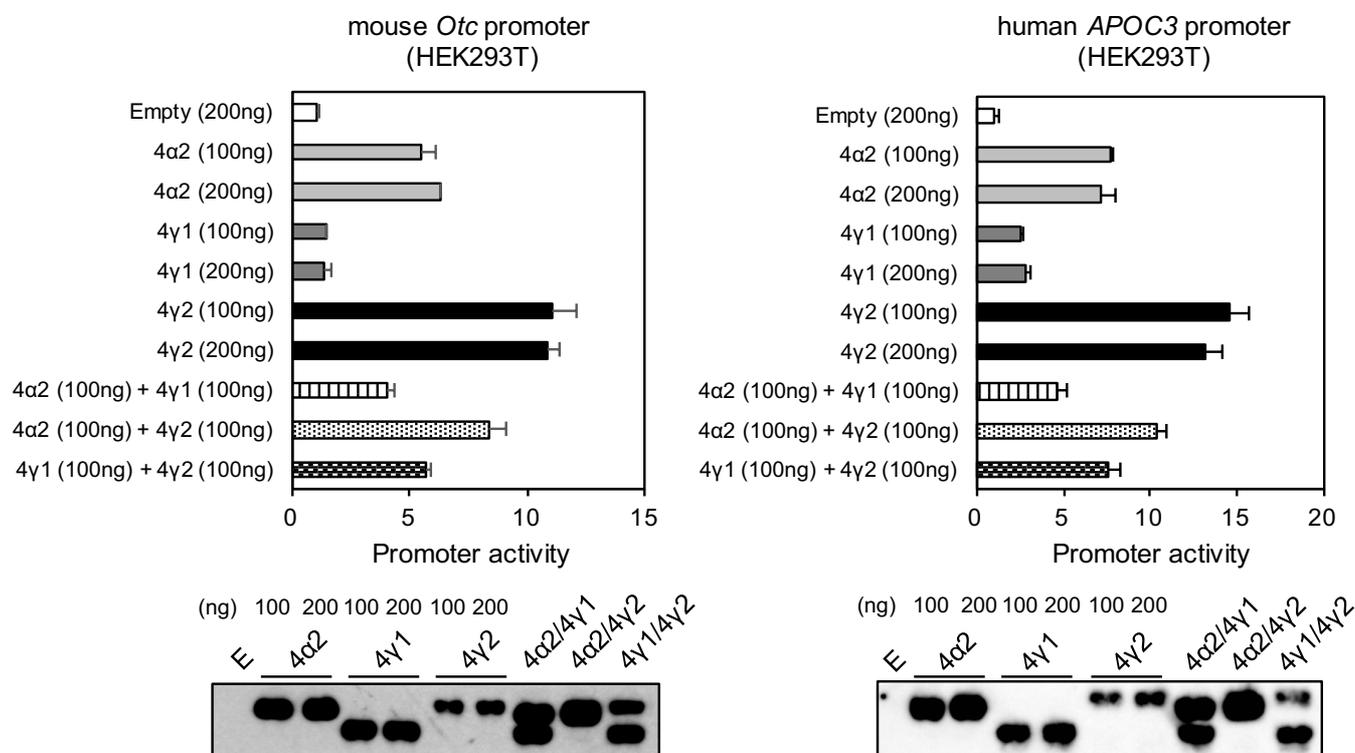


Fig. 2-17. HNF4 α と HNF4 γ 共発現の時の転写活性化能の比較

各グラフ下にはタンパク質発現量の比較を Western Blot で行った

(6) Gel shift assay による HNF4 α /HNF4 γ の結合活性の比較

Luciferase assay の結果、HNF4 γ 2 は HNF4 α 2 よりも転写活性化能が高く、HNF4 γ 1 は HNF4 α 2 よりも転写活性化能が低いことが明らかとなった。しかし HNF4 γ が HNF4 α 結合領域に直接結合して転写活性化を行っているかの確認はされていない。そこで、Gel shift assay による HNF4 α /HNF4 γ の結合活性の比較を行った (Fig. 2-18)。

HNF4 タンパク質は無細胞タンパク質合成系で合成したタンパク質を用いて、タンパク質と結合させる HNF4 α 結合領域を持つ DNA 配列は、既知 HNF4 α 標的遺伝子であるマウスの *Otc* と *Cyp8b1* 遺伝子のプロモーター中の HNF4 α 結合配列を用いた。ポジティブコントロールとして HNF4 α での複合体形成を確認した結果、ビオチン標識プローブ-タンパク質複合体のバンドをマウス *Otc* と *Cyp8b1* のビオチン標識プローブで確認できた(Fig. 2-18, レーン 2)。次に、この DNA-タンパク質の結合が特異的かどうかを、ビオチン未標識のコンペティタープローブを用いて検証した結果、ビオチン標識複合体の形成を阻害することが明らかとなった (レーン 3)。結合しているタンパク質が HNF4 α 特異的かを確認するため、スーパーシフト実験で検証した結果、結合しているタンパク質は HNF4 α 抗体特異的にスーパーシフトをしたため、HNF4 α 特異的な結合であることが明らかとなった(レーン 4)。同様の結果が、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 で確認できた(レーン 5-10)。さらに、Western Blot と各実験結果のバンド強度 (レーン 2、5、8)から、結合強度に関しても、HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 の間で大きな差がないことが示唆された。以上の結果から、HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 は同じ認識配列を認識しており、その結合強度に関しても同様の親和性を有していることが示唆された。

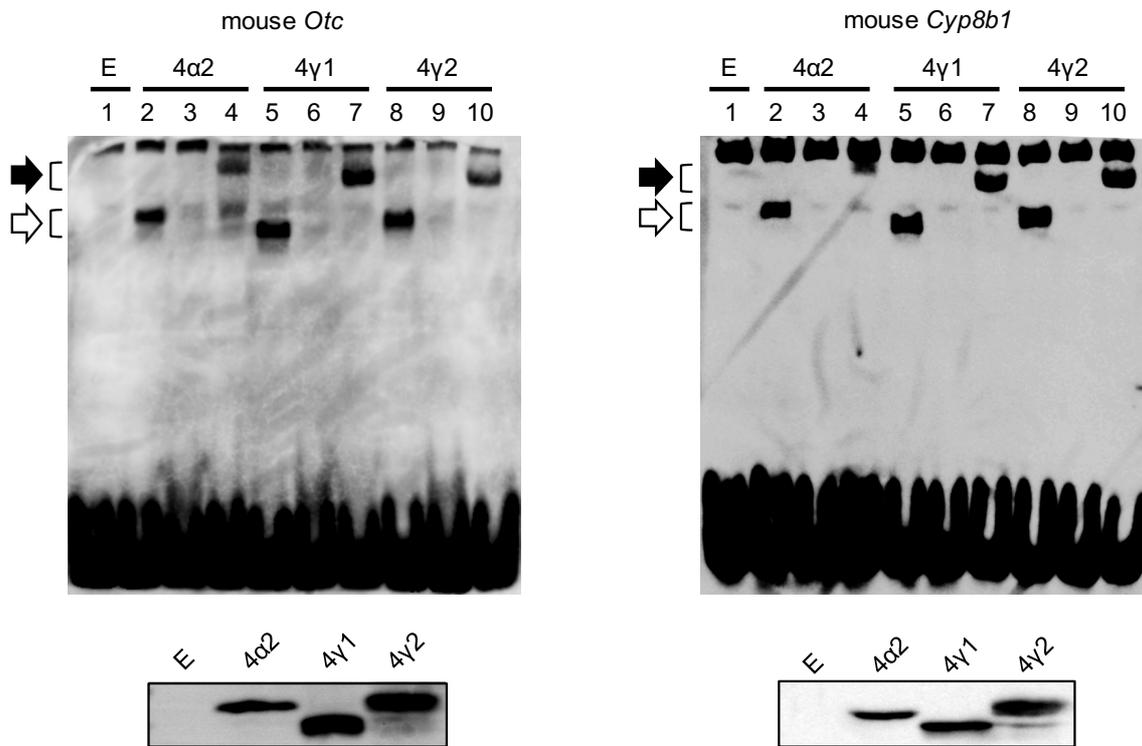


Fig. 2-18. Gel shift assay の結果

レーン 1: Biotin-probe のみ レーン 2、5、8: HNF4 タンパク + Biotin-probe

レーン 3、6、9: HNF4 タンパク + Competitor + Biotin-probe

レーン 4、7、10: HNF4 タンパク + Biotin-probe + HNF4 抗体

白矢印: DNA プローブ-HNF4 α タンパク質の複合体

黒矢印: スーパーシフト (DNA-タンパク-抗体 三者複合体)

各実験結果の下の図はタンパク質発現量の比較を行った Western Blot

(7) HNF4 α /HNF4 γ による肝細胞マーカー遺伝子と EMT マーカーの発現変動

Luciferase assay の結果から、HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 のそれぞれの転写活性化能が示され、HNF4 γ 1 は HNF4 α より弱く、HNF4 γ 2 は HNF4 α より強い転写活性化能を有していることが明らかとなった。そこで、HNF4 γ 1/HNF4 γ 2 の発現によって、*Otc* や *Cyp8B1* のような肝臓のマーカー遺伝子群や上皮間葉転換 (Epithelial-mesenchymal transition; EMT) マーカー遺伝子の発現変動を qPCR で比較した (Fig. 2-19)。タンパク質発現量を増加させるために、エピゾーマル型の発現ベクターを用いて実験を行った。HepG2 細胞では、遺伝子変異によって尿素回路に先天性失陥を及ぼし、高アンモニア血症を引き起こすことが知られている *OTC* (82) は、その mRNA の発現レベルが HNF4 γ 2 の強制発現によって HNF4 α 強制発現時の約 2 倍に発現上昇した。一方で、HNF4 γ 1 の強制発現

による発現上昇は HNF4 α 、HNF4 γ 2 よりも低かった。同様な結果が、VLDL の輸送に関連する *APOC3*、糖新生に関連するグルコース 6-フォスファターゼ (*G6PC*)とホスホエノールピルビン酸カルボキシラーゼ (*PEPCK*)、薬物代謝の第一反応に関連する *CYP1A2* と第二反応に関連するグルタチオン S-トランスフェラーゼ α 1 (*GSTA1*)、胆汁酸合成に関連する *CYP7A1* と *CYP8B1* と胆汁酸輸送ポンプ (*BSEP/ABCB11*)において確認された (Fig. 2-19A 左側)。ヒト肝細胞がん由来細胞株である Huh7 で同様の実験を行った結果、同様の発現上昇傾向が認められた (Fig. 2-19A 右側)。

さらに、EMT マーカー遺伝子の *CDH2*、*ZEB1*、*ZEB2*、において、HNF4 タンパク質強制発現による mRNA の発現変動を確認した。その結果、HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 によって共に発現減少が認められ、HNF4 α と同等の EMT マーカー抑制能が HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 にあることが明らかとなった。

以上の結果から、HNF4 γ 2 は脱分化した肝細胞がん由来細胞の肝細胞マーカー遺伝子の発現誘導と EMT マーカーの発現抑制によって、肝がん細胞を再分化させる機能を有しており、その能力は HNF4 α よりも強いことが示唆された。

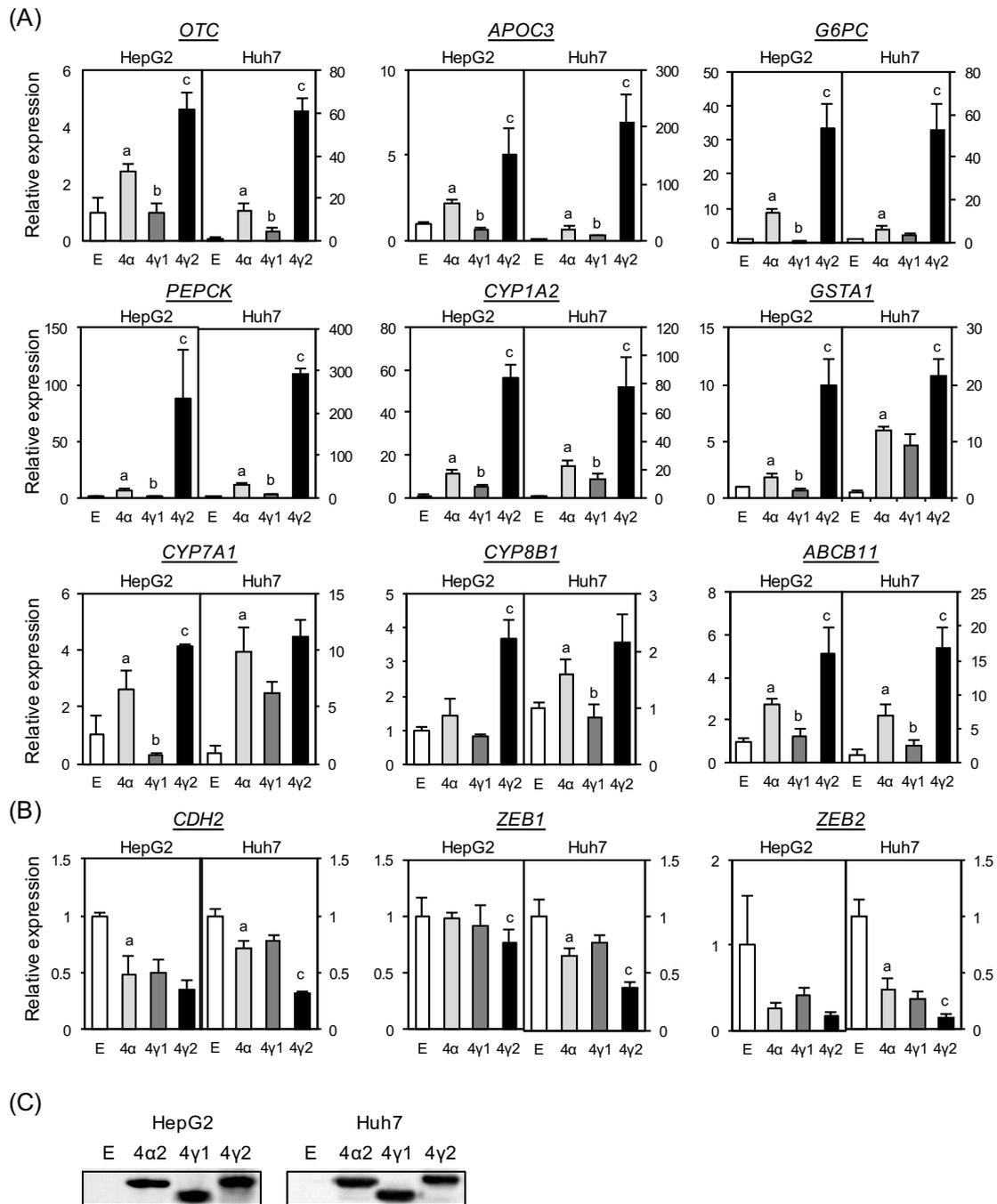


Fig. 2-19. HNF4 α /HNF4 γ による肝細胞マーカー遺伝子と EMT マーカーの発現変動の比較

(A) 肝細胞マーカーの遺伝子発現変動 (B) EMT マーカーの遺伝子発現変動

(C) Western Blot による HNF4 タンパク質発現量の比較

a, Empty (E) vs. 4 α 2、b, 4 α 2 vs. 4 γ 1、c, 4 α 2 vs. 4 γ 2 での有意差を表示

表記のあるものは全て P<0.05

(8) HNF4 α /HNF4 γ による細胞増殖抑制能と肝機能誘導能の比較

先行研究より、HNF4 α はヒト肝細胞がん由来細胞の細胞増殖を抑制することが報告されている (52)。本実験では、HNF4 γ 2 に同様な細胞増殖抑制能があるかを検証した。

HepG2 細胞に HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 タンパク質を発現させ、細胞増殖曲線を描いた結果、HNF4 タンパク質を発現させなかった細胞と比較して細胞増殖を抑制することが明らかとなった (Fig. 2-20A)。

次に、肝細胞がん由来の培養細胞に HNF4 タンパク質を発現させた時に、様々な肝機能マーカー遺伝子の mRNA の発現が上昇したため、実際の肝機能が亢進するのかを検証した。

糖新生能を比較するため、HNF4 を発現させた HepG2 細胞を糖新生の基質である乳酸とピルビン酸を含み、グルコースを含まない培地で培養を行って飢餓状態を作り出し、培養を行った。その結果、HNF4 α 2 と HNF4 γ 1 タンパク質を発現させた細胞と比較して、HNF4 γ 2 タンパク質を発現させた細胞が最も高いグルコース産生能を示した (Fig. 2-20B)。この結果は、糖新生関連遺伝子である *G6PC* と *PEPCK* の発現が上昇するためだと予測される。

次に、HNF4 タンパク質発現による尿素回路での尿素産生能を比較するために、HNF4 タンパク質を発現させた HepG2 細胞を尿素回路の基質であるアンモニア源として、塩化アンモニウム含む培地で培養した結果、HNF4 γ 2 タンパク質を発現させた細胞が最も高い尿素産性能を示し、*OTC* の mRNA の発現増加によるものだと予測された (Fig. 2-20C)。

さらに、CYP1A2 活性に関しても HNF4 γ 2 を導入した細胞が HNF4 α 、HNF4 γ 1 を導入した細胞よりも最も高い活性を示し、CYP1A2 の mRNA の発現増加によるものだと予測された (Fig. 2-20D)。

以上の結果から、HNF4 γ 2 は HNF4 α 、HNF4 γ 1 より高い肝機能誘導能を持つことが示唆された。

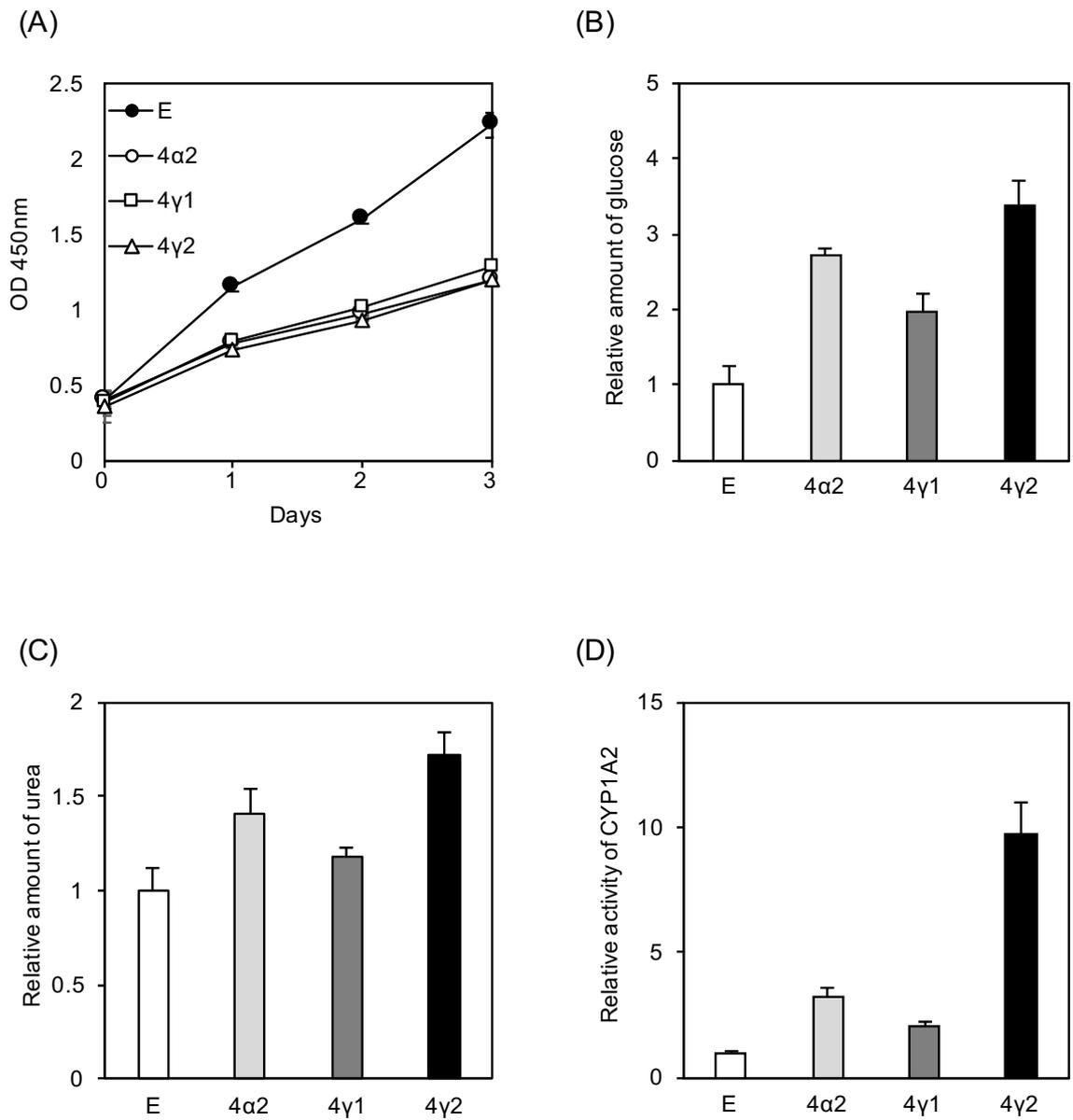


Fig. 2-20. HNF4α/HNF4γ による細胞増殖抑制能と肝機能誘導能の比較

(A) 細胞増殖アッセイ (B) 糖新生アッセイ

(C) 尿素アッセイ (D) CYP1A2 アッセイ

第5節 考察

本研究によって、新規の HNF4 γ である「HNF4 γ 2」が肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスで発現上昇していることが明らかとなった。既知の HNF4 γ であり肝臓で微量しか存在が確認されていない HNF4 γ 1 (67)と、新規バリエーション HNF4 γ 2 は、肝臓では HNF4 α と比較して非常に少ない発現量であることが分かった。このことから、正常肝臓において微量しか発現していない HNF4 γ の肝機能への影響はほとんどないことが予測される。また、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の発現がコントロールマウスと比較して約 10 倍の発現上昇をしていたが、肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスの肝臓において HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 の絶対量がほぼ同レベルであったため、減少した HNF4 α の機能を補完するものとは言えない。しかしながら、KO マウス肝臓で HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の発現上昇をした理由に関しては本研究では明らかとはならなかった。原因解明のために HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 のプロモーター解析などによって HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 それぞれの発現制御機構を解明する必要がある。

プロモーター解析をするためには転写開始点を決定する必要があるが、本研究の 5'-RACE の解析の結果、転写開始点を決定することができた。その結果、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 が異なるプロモーターによって発現制御をしていること、Exon 1 以外に関しては同一のエキソンを有していることが明らかとなった。HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の C 末端側に同じ 3'非翻訳領域 (3'-UTR)を有していることがわかっていた。また、正常肝臓では microRNA による mRNA の翻訳阻害が生じていたため、HNF4 γ 1/2 の発現が抑制された可能性が考えられるが、現状ではその機構は明らかではない。HNF4 γ の 3'UTR 領域に miR-30a-5p が結合して発現抑制をしているという報告が鎮癌ペプチド産生型化生を有する胃癌において報告されている (72)。しかし、KO マウス肝臓においては miR-30a-5p の発現は 1.3 倍しか上昇していないことから (46)、miR-30a-5p が KO マウス肝臓で HNF4 γ の発現制御に関わっているということは考え難い。

マウスにおいて、HNF4 γ 2 タンパク質のアミノ酸配列は HNF4 γ 1 タンパク質よりも 44 アミノ酸分長い構造をとっている。HNF4 α のアミノ酸構造と比較すると、HNF4 γ 2 タンパク質は N 末端に 7 アミノ酸分長い構造をとっている。一方、HNF4 γ 1 タンパク質はリガンド非依存的な転写活性化に重要な AF-1 配列を有していないことから (77,83)、HNF4 γ 2 や HNF4 α と比べて転写活性化能が低いことが予測され、Luciferase assay の結果はその予測と一致した。また、HNF4 γ 2 と HNF4 α の AF-1 配列は 60%という高い相同性を示しており、AF-1 の転写活性化に重要な Tyr6、Leu10、Tyr14、Leu17、Phe19 が完全に保存されていることから (52)、HNF4 γ 2 の転写活性化能が強いのは機能性 AF-1 ドメインが存在していることが一因であると予測される。

HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の A/B ドメイン、F ドメインと HNF4 α の相同性を確認すると、A/B ドメインは HNF4 γ 1 で 36%、HNF4 γ 2 で 46%、F ドメインは HNF4 γ 共通なので HNF4 α と 36%の相同性であるが、DNA 結合ドメインを持つ C ドメイン、ヒンジ領域の D ドメインと、リガンド結合、二量体形成、リガンド依存的な転写活性化ドメインを持つ E ドメインは HNF4 α と比較して 94%、100%、80%と HNF4 α と、HNF4 γ 1/2 の間で非常に高い相同性を持つことが分かった。各ドメインの相同性および本研究における実験結果から、HNF4 α 、HNF4 γ 1、HNF4 γ 2 の DNA 結合能に大きな差は認められなかった。しかし、HNF4 α と HNF4 γ の間には認識するコンセンサス配列に僅かな違いがあることも示唆されている (80)。このことから、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 は HNF4 α とは異なる、特異的な標的も持っていることが予測される。また、HNF4 γ 2 と HNF4 α の間で転写活性化能に違いが出たのは、A/B ドメインの配列が異なることが原因となり、異なるコファクターが結合することにより転写活性化能に違いが生じることが予測できる。また、もう一つの転写活性化ドメインとして知られている C ドメインから E ドメインに存在するリガンド依存的転写活性化ドメインは、HNF4 γ と HNF4 α の間で相同性が 100%であるため、転写活性化能の違いには寄与しないと考えられる。

一方で、相同性の低かった F ドメインに関しては大きな違いが存在する。HNF4 α においては、AF-2 ドメインの転写活性化を抑制するリプレッサー領域の存在が報告されている (84)。さらに、本実験に用いた HNF4 α 2 は HNF4 α 1 と比較して 10 アミノ酸が挿入されており、この配列はリプレッサー領域に隣接する形で挿入をされている。この HNF4 α 2 に挿入された 10 アミノ酸がこのリプレッサー領域による転写抑制能を弱めている可能性が報告されている (85)。一方で、HNF4 γ 1/2 にはこのリプレッサー領域自体が存在していない。つまり、HNF4 γ 1/2 には HNF4 α 2 に挿入されたアミノ酸や、リプレッサー領域の両方が存在していないことが分かる。

以上の結果から、HNF4 γ 2 の高い転写活性化能は HNF4 α とは異なる N 末端の 7 アミノ酸の挿入や、リプレッサー領域の欠失が原因となっていることが示唆される。

HNF4 α /HNF4 γ タンパク質を共発現させることによって、それぞれ単独の活性の中間の活性を示した。これは 2 種類の転写因子による転写活性化能の違いが正確にでていたためと考えられる。HNF4 が DNA に結合するときの形態として、2 種類のホモダイマーと 1 種類のヘテロダイマーの組み合わせがあるが、DNA 結合能は同じであることが明らかになったため、結合時の活性もその中間の活性を示す理由と考えられる。

組織における HNF4 α /HNF4 γ の発現分布を比較したが、HNF4 γ 1 は正常マウス肝臓でも非常に低いレベルで発現が確認された一方で、ヒト肝臓組織においては発現が認めら

れなかった。HNF4 γ 2 の発現もヒトとマウスの肝臓においては非常に発現量が低い、もしくは発現が確認できなかった。その一方で、小腸においては非常に高い発現量を示した。HNF4 α は小腸においても様々な遺伝子発現制御に関わっており、アルカリフォスファターゼ (*ALPI*)や、MeprinA (*Mep1a*)、クラウディン7 (*CLDN7*)、Caudal type homeobox2 (*CDX2*)、トレハラーゼ (*TREH*)、Cingulin (*CGN*)などの小腸上皮細胞の分化に関わっている遺伝子がHNF4 α によって発現制御を受けていることが報告されている (78,86-88)。

また、*Apoa4* 遺伝子は腸絨毛においてそのプロモーター上にHNF4 α とHNF4 γ が結合することが報告されており (89)、十二指腸の発生時にHNF4 γ の発現上昇が確認されることも報告されている (90)。本研究からHNF4 α /HNF4 γ は同じ配列に同じ親和性で結合することが示されたことから、分化誘導能の高いHNF4 γ 2 は小腸の分化や恒常性維持に重要な役割をしている可能性が示された。しかし、未分化または分化したCaco2細胞においてHNF4 γ 2 の発現量を比較した結果、HNF4 γ 2 の発現量はHNF4 γ 1 の0.1%以下という結果となったため、小腸におけるHNF4 γ 2 の分化への寄与があるとは考えにくい。しかしながら、正常ヒト小腸組織ではHNF4 γ 1 に比べて mRNA 発現量は13%程度ということから、正常組織において、分化には関わらないが、小腸組織の恒常性を維持するのに必須である可能性が示唆される。

また、クローン病と潰瘍性大腸炎の患者の小腸でHNF4 α の発現が減少し、HNF4 γ の mRNA 発現量が潰瘍性大腸炎の患者で減少していると報告がされた (61,91)。一方で、別の報告でも潰瘍性大腸炎のサンプルからもHNF4 γ の発現減少が報告されていたが、このHNF4 γ は検出に使用したDNAプローブの配列からHNF4 γ 2 であるということが明らかとなった (92)。

以上のことから、小腸においてHNF4 γ 2 は、HNF4 α 2 と同様に (61)、潰瘍性大腸炎から保護する役割をしている可能性があり、クローン病患者におけるHNF4 γ 2 の関与については、特異的なプローブや抗体を用いてさらなる調査が必要である。

HNF4 α の転写活性化能をHNF4 γ 1 は抑制、HNF4 γ 2 は活性化することが明らかになったため、HNF4 α /HNF4 γ 1/HNF4 γ 2 の発現量の比が小腸における遺伝子発現制御に重要である可能性が示唆される。

ヒト *HNF4G* 遺伝子の一塩基多型 (Single-nucleotide polymorphism; SNP)が、膵臓がんで認められており、HNF4 γ ががん抑制因子として働く可能性が示唆された (93)。一方で、膀胱がんや胃がんの腸上皮化生、肝がんにおいて、HNF4 γ が発現上昇しているという報告がある (70,72,94)。この矛盾は、先行研究におけるHNF4 γ を検出しているプライマーやプローブはHNF4 γ の共通部分の配列を認識していることもあり、どちらのHNF4 γ が発現上昇しているかということが区別できないことに起因していると考えられる。

胃がんにおける腸上皮化生においては、HNF4 α が腸管上皮細胞への分化に重要ということ (86,95)が報告されており、HCC 細胞では、HNF4 α を発現させることによって、HCC の減少や病状の進行を抑制する効果があることが報告されている (47)。以上のことから、HNF4 α はがんの抑制遺伝子であることが示唆されている。本研究の結果より、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 は正反対な働きをしていることが示されたため、膀胱がんや胃がん、HCC などの疾患においても HNF4 γ バリエント特異的プライマーなどを用いて、どちらの HNF4 γ が発現上昇しているかを検出していくことが重要である。仮に、HNF4 γ 1 が発現上昇していた場合、HNF4 α とヘテロダイマーを組むことで、HNF4 α の機能を阻害していく可能性が示唆される。そのため、HNF4 γ 1 の発現抑制をすることで HNF4 α の機能を維持し、胃がんや HCC の治療に役立てることができる可能性が高い。

逆に、HNF4 γ 2 は発現上昇させることで、HCC 治療への応用が期待される。先行研究において、ラットやの脱分化した肝細胞がんや不死化したヒト肝細胞に HNF4 α 強制発現させることで、再分化や細胞形態学的な面における改善がみられ、上皮マーカー遺伝子の発現誘導がなされた (96,97)。HCC の発症原因として、肝炎ウイルスである HBV や HCV などによる発症が多かったが、治療薬の開発などにより、ウイルス性の肝炎由来の HCC は減少傾向であり、現在は NALFD や NASH 由来の HCC が問題視されている。肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスの表現型に脂肪肝や繊維化などの表現型が確認されることから、NASH のモデルマウスとなる可能性があり、HNF4 α と NASH 発症機構の関係性が示唆された。本研究の結果から、HNF4 γ 2 は HNF4 α の標的遺伝子の発現を HNF4 α 以上に上昇させることから、肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスに HNF4 γ 2 の導入や発現誘導を行うことで HCC の治療に有用であることが示唆され、肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスへの HNF4 γ 2 の導入による HCC の改善効果の検証が期待される。

また、肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスの交尾後 18.5 日目胎児で形成された肝臓では、赤い病変が肝臓全体で見つかり、上皮マーカー遺伝子の発現量が減少するなど、正常な肝臓が形成されないことが明らかとなった (81)。このことから HNF4 α には肝細胞前駆細胞から肝細胞への分化を誘導するという機能も存在しており、実際に ES 細胞や iPS 細胞から肝芽細胞、そして肝細胞の成熟を行うために HNF4 α が利用されている (49)。さらに、HNF4 α と FOXA1-3 をマウス線維芽細胞に導入することで、肝細胞マーカー遺伝子が発現上昇し、肝細胞様細胞への転換をすることが報告されている (50)。本研究で HNF4 γ 2 は HNF4 α 以上に肝細胞マーカー遺伝子を発現上昇することが示されたため、HNF4 γ 2 は HNF4 α 以上に ES 細胞や iPS 細胞から肝細胞への分化を誘導する能力を持つ可能性もある。

結論として、HNF4 γ の新規バリエントである HNF4 γ 2 は、HNF4 α よりも高い転写活

性化能と肝細胞がんの脱分化能を有している。一方で、既知 HNF4 γ である HNF4 γ 1 は、HNF4 α よりも低い転写活性化能と肝細胞分化能を有している。このことから、HNF4 γ 2 は、HNF4 α 以上に効率よく、肝細胞の再分化をさせることが明らかとなった。今後の研究において、HNF4 γ 2 の発現上昇や誘導ができれば、HCC 治療戦略への大きな貢献や ES や iPS 細胞などの胚細胞から正常肝細胞を産生する効率の上昇が期待される。

【第3章 腎臓 HNF4 α の標的遺伝子の探索】

第1節 腎臓のトランスポーターについて

腎臓の近位尿細管では再吸収が最も活発に行われるため、トランスポーターの発現が非常に多い。トランスポーターには、溶液中のキャリアー物質 (ナトリウムイオンやカリウムイオンなど) 濃度勾配を利用して二次能動的に輸送を行う Solute carrier (SLC) ファミリーと、ATP と結合することで一次能動的に輸送を行う ATP-Binding Cassette (ABC) ファミリーの二つが存在しており、ヒトでは SLC ファミリーが 378 種類、ABC ファミリーは 49 種類が確認されている (98)。これらのトランスポーターの異常は様々な疾患への原因とされており、Sodium Glucose Cotransporter 2 (SGLT2、別名 SLC5A2) は近位尿細管で高発現しているが、SGLT2 を欠損したマウスでは、グルコースの再吸収能が低下することで、糖尿になることが報告されている (99)。このことから、SGLT2 阻害薬は分子標的薬として糖尿病治療に利用されている。

HNF4 α は近位尿細管で発現をしていることからトランスポーターを介して再吸収の機能維持をしていることが示唆される。実際に、大腸においては HNF4 α と HNF1 α によって中性アミノ酸トランスポーターである B⁰AT トランスポーター (別名 SLC6A19) の発現制御がなされているという報告 (100) や、ラットの腎臓において薬物輸送に関与する有機アニオン・カチオントランスポーターである Organic cation transporter 1 (OCT1、別名 SLC22A1)、Organic anion transporter 1 (OAT1、別名 SLC22A6)、OAT3 (別名 SLC22A8) のプロモーター部分に HNF4 α が結合するということが報告されている (56)。また、SLC トランスポーターは様々な疾患への直接的な関与や、疾患に対する薬の輸送において重要であり、創薬の際に非常に重要な要素の一つと考えられている (101)。以上のことから、近位尿細管における HNF4 α とトランスポーター遺伝子の直接的な制御がなされていることが予測できるが、腎臓特異的 HNF4 α 欠損マウスが作成できていなかったこと、HNF4 α による SLC の発現制御の報告が少ないなどの理由から、網羅的な解析はなされていなかった。そこで本研究では HNF4 α と腎臓近位尿細管との関係を解析するため、ヒト腎臓近位尿細管由来の細胞株を使用して、HNF4 α の新規標的遺伝子の同定を行った。

第2節 研究概説

本研究では、腎臓近位尿細管における HNF4 α の機能解析の為に、HNF4 α の直接的な標的遺伝子を探索・同定することを目的とした。ヒト腎臓の近位尿細管上皮細胞 (PTEC) 由来の HK-2 細胞とヒト胎児腎臓由来細胞株である HEK293T に HNF4 α 遺伝子を一過

性強制発現させ、トランスポーターを始めとする遺伝子群についての発現変動を qPCR にて確認した。

82 種類の遺伝子を解析した結果、いくつかの遺伝子で発現上昇が認められ、その中でも、慢性腎臓病の発症・進行と深く関わりとされる Megalin (LRP2, LDL Receptor Related Protein 2) の発現量が顕著に上昇することが明らかとなった。Luciferase assay による解析で Megalin プロモーターへの HNF4 α 結合によるプロモーター活性化能上昇を確認し、EMSA と CHIP による *in vitro/ vivo* での Megalin プロモーターに HNF4 α 結合部位に結合することが分かった。

以上の結果、PTEC において HNF4 α は再吸収や代謝に必須なトランスポーターなどを発現上昇させ、機能維持に重要だと示唆され、特に Megalin は HNF4 α の直接的な標的遺伝子であることが判明したことから、HNF4 α は PTEC の恒常性・機能維持に重要であるということが明らかとなった。

第3節 実験方法

(1) HK-2、HEK293T 細胞での遺伝子発現解析

1. 発現ベクターの作成

ヒト HNF4 α 発現ベクターとして、第2章 第3節 (5)-1 で作製した pCMViR-hHNF4 α -myc と pCMViR-myc (空ベクター)を使用した。

2. 発現ベクターの一過性発現と回収

pCMViR-hHNF4 α -myc と pCMViR-myc の発現ベクターを、ヒト腎臓近位尿細管由来細胞の HK-2 細胞には Fugene HD (Promega) を用いて Reverse Transfection で、内在性の HNF4 α が発現していないヒト胎児腎細胞由来の HEK293T には polyethylenimine Max (Polyscience)を導入試薬に用いたりポフェクション法での Forward Transfection での遺伝子導入を行った。

HK-2 細胞では、24 穴プレートに 5.0×10^4 cells/well の播種を 500 μ L 中の OPTI-MEM (Gibco)で行い、250 ng/ μ L pCMViR-myc、pCMViR-hHNF4 α -myc を各 500 ng (2 μ L)と 1.5 μ L の Fugene HD を 25 μ L OPTI-MEM 内で混合して、室温で 10 分間静置した後に、播種した細胞と混合して 24 時間の培養を行った。その後 D-MEM (+/+)で培地交換を行い、その後 24 時間培養を行った。遺伝子導入の 48 時間後に細胞を 500 μ L の PBS で洗浄後、100 μ L/well の Isogen II (Wako)で回収した。また、Isogen II での回収以外に、タンパク質レベルでの HNF4 α の発現を確認するため、同条件で培養した細胞を 60 μ L の Urea extraction buffer で回収を行い、タンパク質用サンプルとした。

HEK293T 細胞では、2000 ng/μL pCMViR-myc、pCMViR-hHNF4α-myc を各 30 μg (15 μL) を、第 2 章 第 3 節 (4)-2 と同様に行った。遺伝子導入の 48 時間後に細胞を 3 mL の cold PBS で洗浄後、1 mL の Isogen II で回収した。また HK-2 細胞と同様にタンパク質レベルの HNF4α の発現を確認するため、同条件で培養した細胞を 500 μL の Urea extraction buffer で回収を行い、タンパク質サンプルとした。

3. Total RNA の抽出精製と cDNA の合成

Isogen II で回収した HK-2 細胞と HEK293T 細胞の溶液に 120 μL または 400 μL の DEPC 水を加え、30 秒間ボルテックスをした後に氷上で 10 分静置、その後 12 krpm、10 分の遠心を 4°C で行った。上清を回収し、等量の 100% イソプロパノールを加えて氷上で 5 分静置した。その後 12 krpm、10 分の遠心を 4°C で行い、Total RNA の沈殿を得た。RNA 沈殿を 500 μL の 70% EtOH で 2 回リンスした後に、30 μL または 100 μL Nuclease Free Water で溶解した。cDNA の合成は 第 2 章 第 3 節 (1)-2 と同様に行った。

4. リアルタイム定量 PCR (qPCR)

qPCR の手順は 第 2 章 第 3 節 (1)-3 と同様に行った。

標的候補遺伝子として 82 種類のプライマーと HNF4α の発現量を比較するために HNF4α のプライマーで qPCR を行った。今回使用したプライマーの配列は Table 3-1 に示した。解析は qPCR の内部標準は TBP を用い、各遺伝子におけるキャリブレーターとして、pCMViR-Empty を導入した細胞から合成した cDNA の遺伝子量の相対を 1 として相対定量を行った。

Table 3-1. qPCR Primer の配列

Gene		Nucleotide sequence	Gene		Nucleotide sequence
human <i>SLC1A1</i>	F R	accctgatcattgctgctg ggagagctttccacaatgc	human <i>SLC16A2</i>	F R	agtgactccatccctggactt ggggaatcatcatggacatc
human <i>SLC2A1</i>	F R	gtcaacacggccttcaactg ggctcatgagtatggcacaacc	human <i>SLC16A3</i>	F R	gagtttgggatcggctacag cggttcacgcacacactg
human <i>SLC2A9</i>	F R	ttatctgcattggcgtgttc gcagggaccacaatcactc	human <i>SLC16A4</i>	F R	tctttgtgtgactatgggacttct gctgtagaagagccaatcggt
human <i>SLC3A1</i>	F R	tggaacgatggaagatttga cactcgtgtggtttggtatga	human <i>SLC16A5</i>	F R	aacggcccctgagatcat ccactcatggctggctct
human <i>SLC4A1</i>	F R	tcttcaggaacgtggagctt ggccactcgtcgtattcat	human <i>SLC16A6</i>	F R	tccaatagcaggatctcatgg gaaacgattgctcaggactgt
human <i>SLC4A7</i>	F R	gccaataattgcatttgtgaga ccgctggaccaataaca	human <i>SLC16A7</i>	F R	tgtggcccagttcttcttgg tgctgctaccacaatagccc
human <i>SLC5A1</i>	F R	gccattggagcctttaa caccaccccagccttaatatag	human <i>SLC16A8</i>	F R	ctgggtgtcctcgtggagg ccggccaggtagaagatgatc
human <i>SLC5A2</i>	F R	tgtgacatcctagtcattgct tgttggttctgcatatggac	human <i>SLC16A9</i>	F R	gcttggcctgatttcaaca gcatccatccagtccatagaa
human <i>SLC5A12</i>	F R	ccaggacttttggccttg aaaggctactgttccaagg	human <i>SLC16A10</i>	F R	ttgggctcatgtccagtctt accaatgaaggctggtatgc
human <i>SLC6A6</i>	F R	cgcttctgtgtagcatc gctgcatagtagtcaaagagctga	human <i>SLC16A11</i>	F R	cgatttcgggctctgac tcagcccataggccacag
human <i>SLC6A8</i>	F R	tgggaggtgacccttctg cgtagggggaatgtagcagtgga	human <i>SLC16A12</i>	F R	gcagtgccatacttggtag caaagccaagcaacacagaa
human <i>SLC6A19</i>	F R	tcccctacctgtgtcagagc gccaactccaggtagcagca	human <i>SLC16A13</i>	F R	tgcagatgatagagagcatcg gaagccgtgtagtgtgctgt
human <i>SLC7A7</i>	F R	ccagtgccttctctctctt agccccacaaagaaccagta	human <i>SLC16A14</i>	F R	ctatgctgcaaacgtgcatt gaaatacctgccaccatga
human <i>SLC7A9</i>	F R	catgaacgtgtcctacttcacc aacacggtcaccaaagtca	human <i>SLC17A1</i>	F R	acttgtgactggagtattctgtgaa agagaagacatacggcacagc
human <i>SLC9A1</i>	F R	tcttcaccgtcttgtgcag atggagcgtctctctctt	human <i>SLC17A3</i>	F R	gggtggcccttcttcttctt ggaaacggggtcatcataaa
human <i>SLC9A3</i>	F R	ctgaaggatgccatcagctac gaccacgttgcgggtgct	human <i>SLC19A1</i>	F R	cagtctctgtgcccac ggcaaagaacgtgttgacc
human <i>SLC9A3R1</i>	F R	caatggggagatacagaaggag ctcgtgtgtcactggag	human <i>SLC19A2</i>	F R	ccttctgaccccgctacc agcaccaggtaagagtaagtcca
human <i>SLC9A8</i>	F R	cccagtcaccagatcctc aggccaagaaatgcaaacac	human <i>SLC19A3</i>	F R	aaaacctgaccagtgcagaga ggacataatcgggtgaggacaa
human <i>SLC10A2</i>	F R	tgggtctcattataggatgctg gcagtgtggagcatgtggt	human <i>SLC20A2</i>	F R	catgggggaaggacctcact ggaggcgatcaccactgt
human <i>SLC11A2</i>	F R	ctcgaactggctgtggac ccccactgcccacaaatgta	human <i>SLC21A8</i>	F R	tcaagtgttataaaaagcatacagtg ttcaccacagtgctgagta
human <i>SLC13A1</i>	F R	tgtttacttatagggtgctattc gtggagagtaataaaagcaacaa	human <i>SLC21A20</i>	F R	ctggaggcttctgcttccac gcttctcaacagtggaaatgcta
human <i>SLC15A1</i>	F R	ctccatggccttgtggt aaccttaattggacttcgtttcc	human <i>SLC22A1</i>	F R	tcttctctgctctactactgg tggctcattatctttatgcttca
human <i>SLC15A2</i>	F R	caggctctgagtttctattctcag cgatgatattcccaactgcaa	human <i>SLC22A2</i>	F R	tgggctacatagcagacagg cgataggttggggaaatgg

human <i>SLC16A1</i>	F R	gggattggtgaccattgtg catgtcattgagccgacct	human <i>SLC22A5</i>	F R	gtgctgccactgtttgctta gggggactcagggatgaa
human <i>SLC22A6</i>	F R	gctggggaaggggtgtct attcccatgcctgtctgc	human <i>SLC34A3</i>	F R	gaaatccatgccgagtcc cctccaagactggagcagaa
human <i>SLC22A7</i>	F R	gatgggaaagcttttctga agccccatccctgtctgt	human <i>SLC34A3</i>	F R	gaaatccatgccgagtcc cctccaagactggagcagaa
human <i>SLC22A8</i>	F R	gctcgtgcttggagacct ccatgtagatggggaaggtg	human <i>SLC40A1</i>	F R	gctctagctgtgaaagctggtc agttccctccaggggttt
human <i>SLC24A3</i>	F R	gtgctgtgggctctttgct cgatcacagacagcgtgtagta	human <i>AQP11</i>	F R	ggctgcactcatcacctttt aatgtagcgaagtccaag
human <i>SLC25A8</i>	F R	tgaagccaacctcatgaca ctacaggggagggcatgac	human <i>KCNE1</i>	F R	tgtatccagaggaaatagccaag ggatcatcctgggcattaag
human <i>SLC26A1</i>	F R	gatgaccgggctttaccag ctgcgaggtcaggatggt	human <i>PKD1</i>	F R	agcctgaccgtgtggaag ggacacacactccaaggaca
human <i>SLC26A2</i>	F R	ggttggcagcactgtaacct gacagaacaaaaccactga	human <i>LRP2</i>	F R	atagaggggagcaccactga agcaatttctccgtgcat
human <i>SLC26A3</i>	F R	tggcacttccagacacata gcgatctgggactgctttt	human <i>BMP7</i>	F R	tccaagacgccaagaac acagctcgtgcttcttacagg
human <i>SLC26A4</i>	F R	cattgttaaatccatccaagg tgcaatagcataagccacca	human <i>ANG</i>	F R	cattgtcctgcccgttcc cagcacgaagaccaacaaca
human <i>SLC28A1</i>	F R	catgctgggaggcttgac cacaggtcctccgtgaaga	human <i>PDGFD</i>	F R	tgtggctaaacctggattcaa tcccagttggtctctgaagc
human <i>SLC28A2</i>	F R	caggggagctgaagctga ggttggtgccattcagaga	human <i>CUBN</i>	F R	ccgttagtgacgacaagggtg ccaggtagtcatgggagca
human <i>SLC29A1</i>	F R	ccttctccaacggctacct cacaggaagaaggccatgat	human <i>AMN</i>	F R	gtgctgtgacctctgtggag accaggaagggtgtccagta
human <i>SLC29A2</i>	F R	acggagcctgaccttactt gaagaggggcacgaacag	human <i>HNF4A</i>	F R	caggctcaagaaatgcttcc ggctgctcctcatagctt
human <i>SLC34A1</i>	F R	gctccagcacctccacat atgttggagcccatgatga	human <i>TBP</i>	F R	gaacatcatggatcagaacaaca atagggattccgggagtc

(2) Luciferase assay

1. レポーターベクターの作成

ヒト Megalin プロモーター上の-4000 から翻訳開始点のある+287 までの間の領域を PCR で増幅するため、Nested PCR を行った。PCR のプロトコールは 第2章 第3節 (4)-1 の遺伝子クローニングと同様に行い、伸長反応時間を2分半に延長して PCR を行った。PCR のテンプレートとしては、1st PCR ではヒト肺がん細胞株 A549 細胞から抽出した gDNA を使い、ヒト Megalin プロモーター上の -4557/+294 の領域を増幅した。2nd PCR では 2nd PCR set として、Megalin 遺伝子上の-3996/+200 の範囲を増幅し、NheI/XhoI の制限酵素部位を付加したプライマーを作成、使用した。テンプレートとしては 1st PCR 産物を 1 μ L 使用した。2nd PCR の産物は、第2章 第3節 (2)-5 と同様のクローニングと精製を行い、pGL4.11 への導入確認作業を行った。(このベクターを pGL4.11/Megalin

(-3996/+200)とした)さらに、各HNF4 α 結合予測部位を遺伝子上流側から削っていった、欠失変異体を作成した。欠失領域の作成は、遺伝子上流の増幅に関わるSS鎖プライマーを-3135、-2071、-104の位置で作成し、AS鎖はpGL4.11/Megalin(-3996/+200)で使用したのと同じものを使い、pGL4.11/Megalin(-3996/+200)をテンプレートとして、作成した。プライマー配列はTable 3-2に示した。

また、欠失変異体の作成で、翻訳開始点から上流1 kbと0.5 kb程度の位置までの欠失変異体を作成するにあたり、既存のpGL4.11/Megalin(-3996/+200)をテンプレートとして、PCR産物を-806の位置に存在する制限酵素部位KpnIと、-539の位置に存在する制限酵素BglIIと+200の位置にReverseプライマーで付加したXhoIとの同時消化で処理することによって、-806/+200と-539/+200のDNAフラグメントを作成し、それらもpGL4.11に組み込むことで、欠失変異体を得た。また、結合予測部位-1525/-1511と-6/+9の点変異体を作成するため、点変異を加えたプライマーを作成し、pGL4.11/Megalin(-3996/+200)をテンプレートとしてinverse PCRにて点変異導入を行った。変異導入後はシーケンス確認を行い、変異導入を確認した。プライマー配列はTable 3-2に示した。

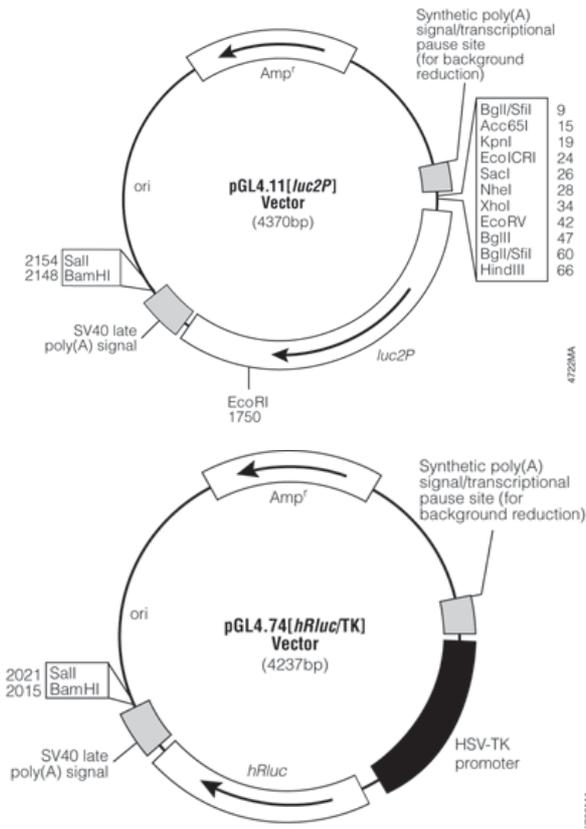


Fig. 3-1. レポーターベクターpGL4.11 (上) 及び内部標準ベクターpGL4.74 (下) の構造
(プロメガのサイトより引用 : http://www.promega.co.jp/cat/pGL4_vectors.html)

Table 3-2. クローニング 用プライマー配列

1. 欠失変異体作成用

※ 赤文字は制限酵素部位

位置/名称	方向	塩基配列(5'→3')	制限酵素
-4557/+294 1stPCR	SS	TCGAAGAACCAAGTGGAGGC	-
	AS	CGATCCATCTCCGCGACG	-
-3996/+200 2nd PCR	SS	ATATGCTAGCTGCTGCTGTGTCCTTCAGAG	NheI
	AS	ATATCTCGAGACGCTCCTTTAGGTCTGCAC	XhoI
-3135/+200	SS	ATATGCTAGCATCCTGCTGAGTTTGAGGCC	NheI
	AS	ATATCTCGAGACGCTCCTTTAGGTCTGCAC	XhoI
-2071/+200	SS	ATATCTCGAGGGCAACACTGGAGCACAAAG	XhoI
	AS	ATATAAGCTTACGCTCCTTTAGGTCTGCAC	HindIII
-104/+200	SS	AATTCTCGAGAGTGCATGCGCCTGTATGAG	XhoI
	AS	ATATAAGCTTACGCTCCTTTAGGTCTGCAC	HindIII

2. 点変異導入用

※赤色部分が変異導入部分

プローブ	方向	塩基配列 (5'→3')
-1525/-1511 変異導入用	SS	GGGCAGATTTCCCAATCCAG
	AS	GTCTGTGCTCTGGCCAAAGT
-6/+9 変異導入用	SS	AGGGTTGCAGGGGGCGGGCCGGGCG
	AS	CAGCGCGGGGAGGAGTGGGCACTCGAA

2. 遺伝子導入/解析

遺伝子導入と解析は、第2章 第3節 (5)-3と同様に行った。

また、遺伝子発現に用いた mHNF4 α の遺伝子を導入した pEB Multi Hygro は第2章 第3節 (5)-1で作製した発現ベクターを使用した。

Table 3-3. Transfection 条件

試薬名	使用量
pGL4.11/Megalin promoter (50 ng/ μ L)	200 ng (1 μ L)
pGL4.74 (50 ng/ μ L)	50 ng (1 μ L)
pEB Multi Hygro or pEB Multi Hygro-m <i>Hnf4a</i> (200 ng/ μ L)	200 ng (1 μ L)
PEI (1 μ g/ μ L)	1 μ g (1 μ L)
D-MEM (-/-)	10 μ L
Total Volume	14 μ L

(3) Western Blot

HEK293T または HK-2 細胞に pCMViR-Empty/hHNF4 α を導入したサンプルの HNF4 α タンパク質の発現量を確認した。タンパクサンプルの回収法は 60 μ L の Urea Extraction で、第 2 章 第 3 節 (7)と同様に行い、その後のタンパク質資料の泳動、転写、Western Blot は第 2 章 第 3 節 (1)-5, 6に従って行った。この時使用した抗体は一次抗体反として mouse anti-human HNF4 α (PP-1415-00, PPMX)、二次抗体として anti-mouse IgG, HRP-linked antibody (#7072, Cell Signaling Technology)を使用した。

(4) Gel shift assay**1. DNA プローブの作成**

HNF4 α の結合予測部位を含む領域 (-6/+9) をプライマーとして設計し、そのプライマーの(SS鎖) 5'末端に Biotin を付加した Biotin 標識プライマーと非標識を設計したプローブの作成方法は、第 2 章 第 3 節 (6)-2と同様に作成した。また、ポジティブコントロールとして、第 2 章で用いた mouse OTC の HNF4 α 結合配列を持つ Biotin 標識プローブと、未標識プローブ (OTC-Competitor)を用いた。Megalin のプローブ作成に用いたプライマー配列は Table 3-4 に示した。

2. 核タンパク質の調製

核タンパク質の調製は、第 2 章 第 3 節 (1)-4と同様に行い、タンパク質濃度の定量後に 2.5 μ g/ μ L になるように調整した。

Table 3-4. プローブ用プライマーの配列とアニーリング時の組成

(太字下線部は変異導入部位)

プローブ	方向	塩基配列 (5'→3')	塩基数
Biotin-Megalin	SS	Biotin-CTCCCCGCGCTGCAAAGTGCAGGGGGCGGG	30 bp
	AS	CCCGCCCCCTGCACTTTGCAGCGCGGGGAG	
Megalin-Competitor	SS	GGGCTTCCTGCCCTTCGAACCGCACTTGT	30 bp
	AS	ACAAGTGCAGTTTCGAAGGGCAGGAAGCCC	
Megalin-mut-Competitor	SS	CTCCCCGCGCTG <u>AGGGT</u> TGCAGGGGGCGGG	30bp
	AS	CCCGCCCCCTGCA <u>ACCCT</u> CAGCGCGGGGAG	

3. DNA-タンパク質複合体の形成

第2章 第3節 (6)-3と同様に手順で実験を行った。また、使用したビオチン標識プローブは f.c = 50 fmol/sample で使用し、Competitor probe もその 50 倍濃度となる f.c = 2.5 pmol/sample とした。また、スーパーシフト実験に用いる抗体として 1 µg/µL Anti-HNF4α Antibody (Santa cruz; sc-6556) と 1 µg/µL Anti-PPARβ Antibody (Santa cruz; sc-7197X) を使用した。また、泳動する各レーンの組成は以下の通りである。

- ① N.E (pCMViR/Empty) 5.0 µg + Biotin-Megalin/probe (50 fmol)
- ② N.E (pCMViR/hHNF4α) 5.0 µg + Biotin-Megalin/probe (50 fmol)
- ③ ② + OTC competitor (2.5 pmol)
- ④ ② + Megalin/competitor probe (2.5 pmol)
- ⑤ ② + Megalin-mut/competitor probe (2.5 pmol)
- ⑥ ② + Anti-HNF4α Antibody (1 µg)
- ⑦ ② + Anti-PPARβ Antibody (1 µg)

その後の反応は、第2章 第3節 (6)-4, 5と同様に行ったが、本実験ではペルオキシダーゼの不活性化が不要なため、クロスリンク後の過酸化水素処理は省略した。

(5) ChIP アッセイ

1. 細胞の調整・クロマチン固定化

本実験では SimpleChIP Plus Enzymatic IP Kit (Cell signaling Technology) を用いて、実験を行い、Protein G に関しては同キットに同梱されている ChIP-grade ProteinG magnetic beads を用いた。まず、HEK293T 細胞に pCMViR 発現ベクターで HNF4 α を強制発現させた細胞と、比較対象用の pCMRiR/Empty の発現ベクターを導入した HEK293T 細胞を使用した。遺伝子導入過程は第 3 章 第 3 節 (1)-2 と同様のプロトコールで行った。遺伝子導入 48 時間後のシャーレには 8 mL の D-MEM (++) 培地が存在するため、クロマチン固定 (クロスリンク) のために 216 μ L の 37%ホルムアルデヒド (Wako) を加えて (f.c =1%ホルムアルデヒド)、細胞シャーレを緩やかに振盪しながら室温で 10 分間インキュベーションを行った。その後、固定反応を停止させるため、キット同梱の 800 μ L の 10 \times グリシンバッファー (f.c=1 \times) を添加し、再度室温で緩やかに細胞シャーレを振盪することでクロスリンクの停止を行った。

2. クロマチンの断片化と回収

10 mL の PBS で細胞シャーレを 2 回洗浄し、最後にはアスピレーターで PBS を完全に除去した。その後 1 mL の PBS + Protease Inhibitor Cocktail (PIC) を加えて、セルスクレーパーで細胞を回収して 1.5 mL チューブに回収した。4.4 krpm、10 分、4 $^{\circ}$ C の条件で遠心を行い、上清の PBS を除去した。

回収した細胞ペレットに対してキット同梱の Buffer A を 500 μ L 添加し、3 分ごとに転倒混和による混合をしながら氷上で 10 分間のインキュベーションを行った。3 krpm、5 分、4 $^{\circ}$ C 条件の遠心後に上清のバッファーを除去した。次にキット同梱の Buffer B を 500 μ L 加えてピペッティングを行い混合した。クロマチンの断片化を行うために、キット同梱の Micrococcal Nuclease を 0.25 μ L 添加し、ピペッティングで緩やかに混合した。その後、3 分ごとにタッピングによる混合をしながら 37 $^{\circ}$ C の温浴で 20 分間のインキュベーションを行い、5 μ L の 0.5 M EDTA (f.c =1 mM) を添加して酵素反応を停止した。その後、13 krpm、10 分、4 $^{\circ}$ C の遠心を行い、上清を除去した。残ったペレットにキット同梱の 1 \times ChIP Buffer を 50 μ L 加えて、氷上で 10 分間のインキュベーションを行った。その後、Handy Sonic を用いて 20 秒の超音波、30 秒の停止の間隔で 3 回のソニケーションを氷上でを行い、DNA のさらなる断片化をした。10krpm、10 分、4 $^{\circ}$ C の遠心の後に上清を回収し、その内 20 μ L は免疫沈降をせずに Input 画分として回収した。Input 画分をキット同梱の DNA 精製スピカラムで精製後、濃度測定を行って、溶液中の DNA 濃度を測定した。算出された濃度から未精製 DNA 溶液中の DNA 量を算出した。

3. クロマチン免疫沈降

1.5 mL チューブに、200 μ L の 1 \times ChIP Buffer を分注し、未精製 DNA 溶液を 10 μ g 添加する。この時、同じクロマチン溶液を含むチューブを各 2 本ずつ用意した。抗体反応用に anti-goat IgG (SantaCruz: SC-2028) または anti-HNF4 α antibody (SantaCruz: SC-6556) を 2 μ g /tube で添加し、4 $^{\circ}$ C でローテーターによる転倒混和をしながら 13 時間のインキュベーションを行った。インキュベーション終了後、各チューブに ChIP-grade Protein G magnetic beads を 15 μ L/tube で添加し、ビーズと抗体を結合させるために、4 $^{\circ}$ C でローテーターによる転倒混和をしながら 2 時間のインキュベーションを行った。インキュベーション終了後、マグネティックスタンドを用いてビーズを磁気吸着させ、溶液を除去した。その後、キット同梱の Low salt Buffer を 500 μ L とビーズを混合し、4 $^{\circ}$ C でローテーターによるビーズの洗浄を行い、再度マグネティックスタンドでビーズを固定、溶液を除去した。この洗浄過程を合計 3 回行った。次に、バッファーをキット同梱の High salt Buffer を 500 μ L とビーズを混合し、再度洗浄を 1 回行った後に、キット同梱の 1 \times ChIP Elution Buffer を 75 μ L/tube でビーズを加えて混合する。その後、サーモミキサーを用いて 65 $^{\circ}$ C、1,200rpm の条件で 30 分間振盪しながらインキュベーションを行い、クロマチンの脱クロスリンクを行い溶出した。その後、ビーズをマグネティックスタンドで固定し、溶液を回収し DNA スピнкаラムを用いた精製をした後に 50 μ L の ChIP 後の DNA サンプルを得た。

4. リアルタイム PCR と補正法

HEK293T に pCMViR/Empty または pCMViR/hHNF4 α を導入した細胞から ChIP assay の過程で得た、Input サンプルが 2 サンプルと IgG 抗体または HNF4 α 抗体で免疫沈降したサンプルが 4 サンプル得られた。合わせて 6 サンプルを Megalin の HNF4 α 結合予測領域 (-6/+9) を増幅するプライマー(hMegalin-Posi)を作成し、qPCR を行った。使用したプライマーの配列は [Table 3-5](#) に示す。さらに、同じ Megalin 遺伝子上で HNF4 α 結合予測領域と離れた領域を増幅するネガティブコントロールプライマー (hMegalin-Nega) も作成し、非特異的な増幅でないことを示した。また、本実験のポジティブコントロールとして、既知の HNF4 α 結合領域を持つ OTC のプライマーと、その領域を持たないプライマーを OTC がコードしている遺伝子上で作成し、使用した。qPCR におけるテンプレートとして、Input サンプルは 50 ng/ μ L に調整して 2 μ L を使用し、ChIP サンプルは精製後のサンプルをそのまま 2 μ L 使用した。それ以外の試薬や実験手法に関しては [第 2 章 第 3 節 \(1\)-3](#) と同様に行った。

解析は、pCMViR-Empty または pCMViR/hHNF4 α を導入した細胞ごとの input と IgG

抗体または HNF4 α 抗体で免疫沈降 (IP)したサンプル間での定量を行う。まず Input を 1 として HNF4 α IP サンプルと IgG 抗体を使用した IP サンプルの増幅領域の相対量を出した後、IgG 抗体を使用した IP サンプルを 1 とした HNF4 α IP サンプルの値を算出する。これで抗体非特異的に回収してしまった DNA 分の値を消すことが出来る。次に、上記のように算出した標的としているポジティブコントロール (今回は hMegalín-Posi)、ネガティブコントロール (hMegalín-Nega)の値について、ネガティブコントロールを 1 としたポジティブコントロールの値を算出する。この時のポジティブコントロールの値が 1 を超える場合、結合が確認され、その数値が大きいほど標的のタンパク質 (今回は HNF4 α)が標的の DNA 配列に結合していたことを示す。この計算を pCMViR/Empty または pCMViR/hHNF4 α を導入した細胞ごとに行い、比較した。

Table 3-5. ChIP 用プライマー

位置/名称	方向	塩基配列(5'→3')	増幅領域
hMegalín -Posi	SS	GGGGTTCAGTAATCGGAAGA	-33/ +62
	AS	GTGACAGGACAGCGAGGTG	
hMegalín -Nega	SS	GGGGTTCAGTAATCGGAAGA	+37875
	AS	GTGACAGGACAGCGAGGTG	/+37958
hOTC -Posi	SS	AAATGAGGAGGCCAGGCAA	-117/-1
	AS	GGTTAGAGATACTGCAGGGCA	
hOTC -Nega	SS	TGGCAATACCACACTGTTTAGT	+50081
	AS	CTGAACCACAAGGACCCCAA	/+50204

第 4 節 実験結果

(1) 近位尿管上皮細胞で発現する遺伝子の HNF4 α による発現誘導

HNF4 α は肝臓や腎臓、小腸、大腸において様々な遺伝子を発現制御していることが報告されている (28,43-46,55,61)。HNF4 α は腎臓の近位尿管上皮細胞 (PTEC) において高発現をしているが、その機能については詳細な解析がなされていない。これは、PTEC 特異的な HNF4 α 欠損マウスが作成されていないのが大きな要因である。そこで、PTEC における HNF4 α の標的遺伝子の探索を行った。ヒト腎臓近位尿管由来細胞の HK-2 とヒト胎児由来の HEK293T に HNF4 α を強制発現させ、トランスポーター遺伝子および腎臓で発現している遺伝子 82 種類に関する発現変動を比較した。

まず、サンプル中の HNF4 α の発現を mRNA レベルとタンパク質レベルで確認を行った。その結果、空ベクターを導入した細胞と比較して HK-2 は約 400 倍、HEK293T では約 70,000 倍以上の mRNA の発現上昇が確認され、タンパク質レベルでも両細胞ともに顕著な発現上昇が確認された (Fig. 3-2)。また、培養細胞株はその細胞種によって遺伝子導入効率に変化する。mRNA の発現に差があるのは、HEK293T は発現ベクターが入りやすく、HK-2 は入りにくいことが原因と考えられる。

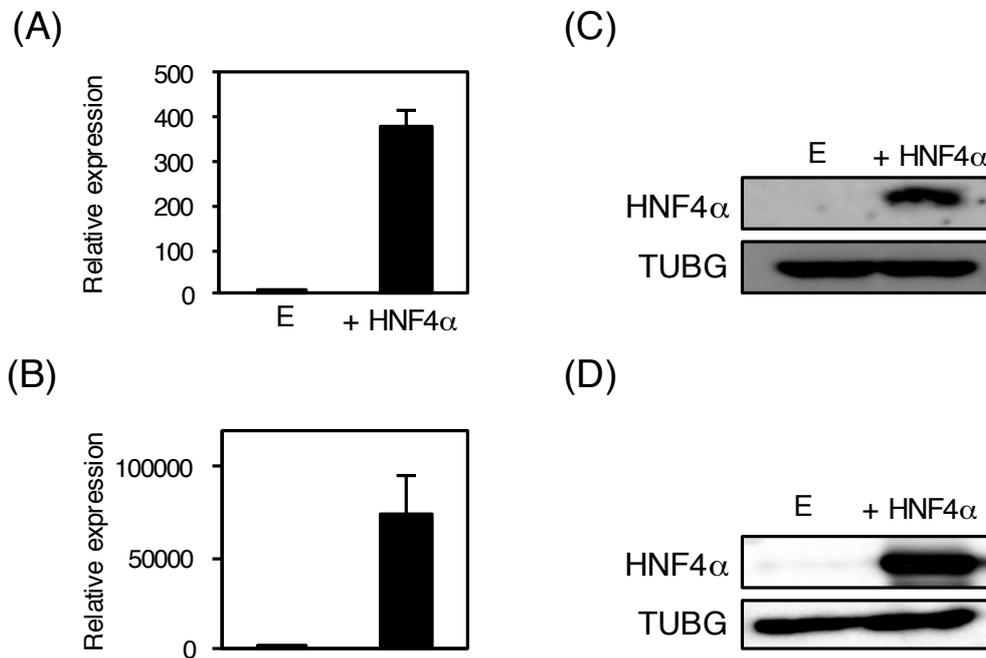


Fig. 3-2. HNF4 α の発現量確認

(A,B) qPCR による HNF4 α mRNA 発現量の比較 (A) HK-2 (B) HEK293T

(C,D) Western Blot による HNF4 α タンパク質の発現量の比較 (C) HK-2 (D) HEK293T

TUBG : γ -tubulin

HNF4 α の発現が確認できたため、近位尿細管上皮細胞で発現が認められる 82 種類の遺伝子の発現変動を qPCR によって定量した。解析結果は空ベクターを導入した細胞での遺伝子発現量と比較して、2 つの細胞に共通して HNF4 α 発現ベクターを導入した細胞で 1.5 倍以上の発現上昇、または 0.5 倍以上の発現減少 (発現量が 50%減少)した標的の中から選出した。発現変動率が 0.5~1.5 倍の遺伝子に関しては [Table 3-6](#) に結果を示した。その結果、4 種類の標的候補遺伝子で HNF4 α の導入により、有意に発現上昇していた (Fig. 3-3)。その中でも、Megalin が HK-2 で約 5 倍、HEK293T で約 13 倍の発現

上昇をしており、もっとも顕著な発現上昇を示した。ラット腎臓では HNF4 α が SLC22A1、SLC22A6、SLC22A8 のプロモーターに結合することが報告されているが (56)、SLC22A1、SLC22A6、SLC22A8 の発現は未検出または HNF4 α による 1.5 倍以上の変動は認められなかった。

発現上昇した 4 種類の遺伝子のうち、3 種類は SLC トランスポーターであり、それらが輸送する基質としては塩化物イオンや重炭酸塩を輸送する SLC4A1 (102)、カチオン性アミノ酸や中性アミノ酸を輸送する SLC7A7 (103)、不特定なモノカルボン酸を輸送する SLC16A4 (104)であった。もっとも顕著な発現増加をした Megalin は、アルブミンや低分子量のタンパク質をエンドサイトーシスによって輸送するタンパク質であり (44)、近年、メタボリックシンドロームや糖尿病の原因の一つとなる慢性腎臓病 (Chronic kidney disease; CKD) の発症・進行に関連があるということが報告された (45)。このことから、Megalin は腎機能に重要な因子であることが予測されたため、HNF4 α による直接的な転写制御があるかどうかを解析した。

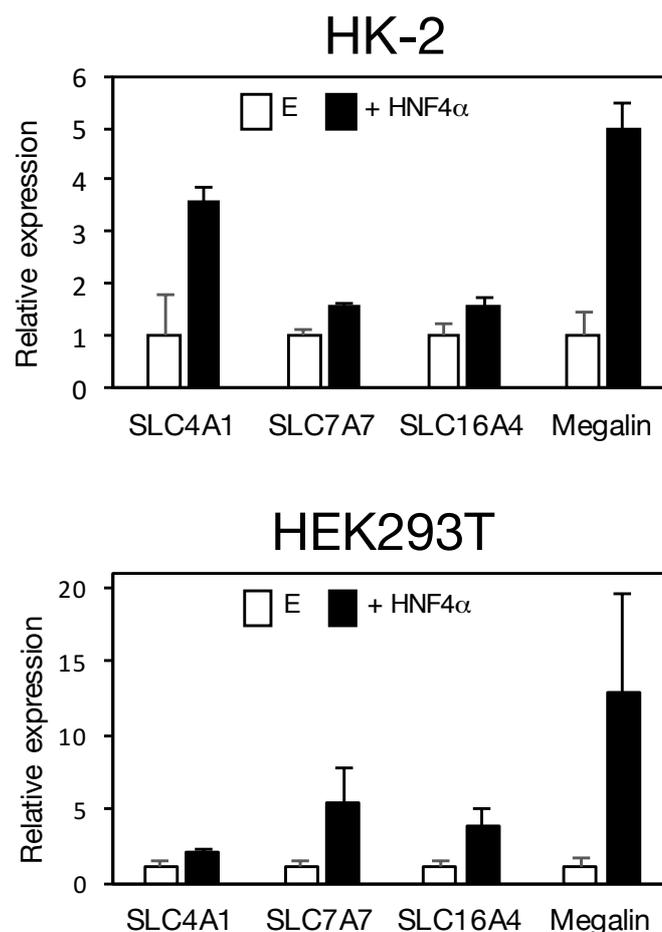


Fig. 3-3. HNF4 α によって発現上昇した遺伝子

Table 3-6. HNF4α による遺伝子の発現

(1) HK-2 の結果 N.D ;未検出

Gene	Empty	+HNF4α	Gene	Empty	+HNF4α	Gene	Empty	+HNF4α
SLC1A1	1.00 ± 0.37	1.17 ± 0.12	SLC16A7	1.00 ± 0.09	0.86 ± 0.14	SLC24A3	N.D	N.D
SLC2A1	1.00 ± 0.18	1.11 ± 0.04	SLC16A8	N.D	N.D	SLC25A8	1.00 ± 0.20	1.00 ± 0.08
SLC2A9	1.00 ± 0.05	1.06 ± 0.05	SLC16A9	1.00 ± 0.24	1.08 ± 0.29	SLC26A1	1.00 ± 0.18	1.31 ± 0.44
SLC3A1	1.00 ± 0.68	0.80 ± 0.25	SLC16A10	1.00 ± 0.23	1.05 ± 0.04	SLC26A2	1.00 ± 0.10	0.92 ± 0.16
SLC4A7	1.00 ± 0.10	0.96 ± 0.06	SLC16A11	1.00 ± 0.45	1.24 ± 0.14	SLC26A3	N.D	N.D
SLC5A1	N.D	N.D	SLC16A12	1.00 ± 0.34	1.09 ± 0.10	SLC26A4	N.D	N.D
SLC5A2	N.D	N.D	SLC16A13	1.00 ± 0.17	1.16 ± 0.11	SLC26A6	1.00 ± 0.08	1.24 ± 0.06
SLC5A12	N.D	N.D	SLC16A14	1.00 ± 0.45	0.59 ± 0.19	SLC28A1	N.D	N.D
SLC6A6	1.00 ± 0.03	0.97 ± 0.08	SLC17A1	1.00 ± 0.21	0.87 ± 0.52	SLC28A2	N.D	N.D
SLC6A8	1.00 ± 0.19	1.07 ± 0.10	SLC17A3	1.00 ± 0.04	1.01 ± 0.31	SLC29A1	1.00 ± 0.16	1.13 ± 0.04
SLC6A19	N.D	N.D	SLC19A1	1.00 ± 0.20	1.05 ± 0.09	SLC29A2	1.00 ± 0.27	1.08 ± 0.16
SLC7A9	1.00 ± 0.54	0.87 ± 0.31	SLC19A2	1.00 ± 0.17	1.16 ± 0.08	SLC34A1	N.D	N.D
SLC9A1	1.00 ± 0.15	1.08 ± 0.12	SLC19A3	N.D	N.D	SLC34A3	1.00 ± 0.27	0.74 ± 0.18
SLC9A3	1.00 ± 0.40	0.63 ± 0.24	SLC20A2	1.00 ± 0.06	1.23 ± 0.06	SLC40A1	1.00 ± 0.11	1.13 ± 0.35
SLC9A3R1	1.00 ± 0.20	1.33 ± 0.05	SLC21A8	N.D	N.D	MATE1	1.00 ± 0.59	0.90 ± 0.46
SLC9A8	1.00 ± 0.06	0.97 ± 0.19	SLC21A20	N.D	N.D	MATE2K	1.00 ± 0.10	0.93 ± 0.49
SLC10A2	N.D	N.D	SLC22A1	1.00 ± 0.02	1.30 ± 0.22	AQP1	N.D	N.D
SLC11A2	1.00 ± 0.06	1.15 ± 0.07	SLC22A2	1.00 ± 0.44	1.36 ± 0.28	AQP7	1.00 ± 0.50	1.33 ± 0.13
SLC13A1	N.D	N.D	SLC22A5	1.00 ± 0.07	1.22 ± 0.06	AQP11	1.00 ± 0.05	1.07 ± 0.04
SLC15A1	1.00 ± 0.64	0.95 ± 0.53	SLC22A6	N.D	N.D	KCNE1	N.D	N.D
SLC15A2	1.00 ± 0.30	0.99 ± 0.30	SLC22A7	N.D	N.D	PKD1	1.00 ± 0.08	0.86 ± 0.21
SLC16A1	1.00 ± 0.31	1.16 ± 0.15	SLC22A8	1.00 ± 0.41	0.86 ± 0.21	BMP7	1.00 ± 0.50	1.20 ± 0.41
SLC16A2	1.00 ± 0.08	1.34 ± 0.18	SLC22A11	N.D	N.D	ANG	1.00 ± 0.21	0.99 ± 0.05
SLC16A3	1.00 ± 0.24	0.72 ± 0.09	SLC22A12	N.D	N.D	PDGFD	N.D	N.D
SLC16A5	1.00 ± 0.17	1.10 ± 0.03	SLC22A13	1.00 ± 0.09	0.63 ± 0.48	CUBN	1.00 ± 0.10	0.91 ± 0.22
SLC16A6	1.00 ± 0.63	0.85 ± 0.14	SLC23A3	1.00 ± 0.06	1.43 ± 0.34	AMN	1.00 ± 0.47	1.02 ± 0.36

(2) HEK293T の結果 N.D ;未検出

Gene	Empty	+HNF4 α	Gene	Empty	+HNF4 α	Gene	Empty	+HNF4 α
SLC1A1	1.00 \pm 0.48	1.34 \pm 0.70	SLC16A7	N.D	N.D	SLC24A3	1.00 \pm 0.67	1.15 \pm 0.98
SLC2A1	1.00 \pm 0.50	2.10 \pm 0.92	SLC16A8	N.D	N.D	SLC25A8	1.00 \pm 0.20	2.26 \pm 0.85
SLC2A9	1.00 \pm 0.68	1.42 \pm 0.57	SLC16A9	1.00 \pm 0.61	1.85 \pm 1.20	SLC26A1	N.D	N.D
SLC3A1	1.00 \pm 0.52	0.38 \pm 0.14	SLC16A10	1.00 \pm 0.62	1.74 \pm 0.93	SLC26A2	1.00 \pm 0.62	1.70 \pm 0.94
SLC4A7	1.00 \pm 0.36	1.79 \pm 0.60	SLC16A11	1.00 \pm 0.57	0.80 \pm 0.53	SLC26A3	1.00 \pm 0.87	1.11 \pm 0.11
SLC5A1	1.00 \pm 0.68	3.72 \pm 0.43	SLC16A12	1.00 \pm 0.64	2.61 \pm 1.12	SLC26A4	1.00 \pm 0.53	2.51 \pm 1.16
SLC5A2	N.D	N.D	SLC16A13	1.00 \pm 0.63	1.50 \pm 0.98	SLC26A6	1.00 \pm 0.59	2.21 \pm 1.22
SLC5A12	N.D	N.D	SLC16A14	1.00 \pm 0.68	1.17 \pm 0.68	SLC28A1	1.00 \pm 0.89	2.59 \pm 1.86
SLC6A6	1.00 \pm 0.58	1.75 \pm 0.76	SLC17A1	1.00 \pm 1.73	1.46 \pm 2.54	SLC28A2	N.D	N.D
SLC6A8	1.00 \pm 0.61	1.30 \pm 0.47	SLC17A3	N.D	N.D	SLC29A1	1.00 \pm 0.61	1.86 \pm 1.15
SLC6A19	1.00 \pm 0.90	3.28 \pm 0.24	SLC19A1	1.00 \pm 0.70	1.14 \pm 0.62	SLC29A2	1.00 \pm 0.65	1.75 \pm 1.12
SLC7A9	1.00 \pm 0.41	0.40 \pm 0.22	SLC19A2	1.00 \pm 0.58	1.75 \pm 0.85	SLC34A1	N.D	N.D
SLC9A1	1.00 \pm 0.58	1.19 \pm 0.51	SLC19A3	1.00 \pm 0.59	2.20 \pm 0.88	SLC34A3	1.00 \pm 0.13	0.45 \pm 0.01
SLC9A3	N.D	N.D	SLC20A2	1.00 \pm 0.47	1.59 \pm 0.62	SLC40A1	N.D	N.D
SLC9A3R1	1.00 \pm 0.31	3.58 \pm 1.36	SLC21A8	N.D	N.D	MATE1	1.00 \pm 0.59	4.20 \pm 1.56
SLC9A8	1.00 \pm 0.48	0.87 \pm 0.43	SLC21A20	1.00 \pm 0.75	2.42 \pm 1.36	MATE2K	1.00 \pm 0.67	2.83 \pm 1.58
SLC10A2	N.D	N.D	SLC22A1	1.00 \pm 0.39	1.06 \pm 0.59	AQP1	1.00 \pm 0.67	0.75 \pm 0.67
SLC11A2	1.00 \pm 0.05	0.54 \pm 0.05	SLC22A2	N.D	N.D	AQP7	1.00 \pm 2.13	2.13 \pm 3.14
SLC13A1	1.00 \pm 0.98	0.40 \pm 0.41	SLC22A5	1.00 \pm 0.45	2.52 \pm 0.31	AQP11	1.00 \pm 0.52	2.30 \pm 1.27
SLC15A1	1.00 \pm 0.35	3.10 \pm 1.79	SLC22A6	1.00 \pm 0.45	2.52 \pm 0.31	KCNE1	1.00 \pm 0.65	1.95 \pm 1.56
SLC15A2	1.00 \pm 0.56	1.79 \pm 0.91	SLC22A7	N.D	N.D	PKD1	1.00 \pm 0.65	1.95 \pm 1.56
SLC16A1	1.00 \pm 0.64	2.32 \pm 1.54	SLC22A8	N.D	N.D	BMP7	1.00 \pm 0.64	2.13 \pm 1.34
SLC16A2	1.00 \pm 0.69	1.57 \pm 1.10	SLC22A11	N.D	N.D	ANG	1.00 \pm 0.62	2.32 \pm 1.42
SLC16A3	1.00 \pm 0.87	3.60 \pm 1.19	SLC22A12	N.D	N.D	PDGFD	1.00 \pm 0.58	2.04 \pm 1.23
SLC16A5	N.D	N.D	SLC22A13	1.00 \pm 0.48	0.19 \pm 0.01	CUBN	1.00 \pm 0.18	0.45 \pm 0.01
SLC16A6	1.00 \pm 0.63	1.40 \pm 0.81	SLC23A3	1.00 \pm 0.30	3.29 \pm 0.12	AMN	1.00 \pm 0.47	1.02 \pm 0.36

(2) Megalin のプロモーター解析

プロモーターの解析を行うため、まず、結合予測検索データベース JASPAR (<http://jaspar.genereg.net>)での結合予測部位を同定し、転写開始点から上流 4,000 bp と下流 200 bp の範囲で HNF4 α 結合部位の検索を行ったところ、5 つの結合予測部位を同定した (Table 3-7)。その領域での転写活性化能を Megalin プロモーターの欠失変異体を用いてルシフェラーゼアッセイで解析した (Fig. 3-4)。

Table 3-7. JASPAR での結合予測部位検索結果

Number	position(5'→3')	Sequence	Score(%)
1	-3910/-3896	gttgactttgattcc	84.1
2	-3633/-3619	atacactttgttcta	85.3
3	-3462/-3448	ttgccctctgcttcc	85.4
4	-1525/-1511	cagacctctggattt	86.3
5	-6/+9	cgctgcAAAGTGCAG	87.7

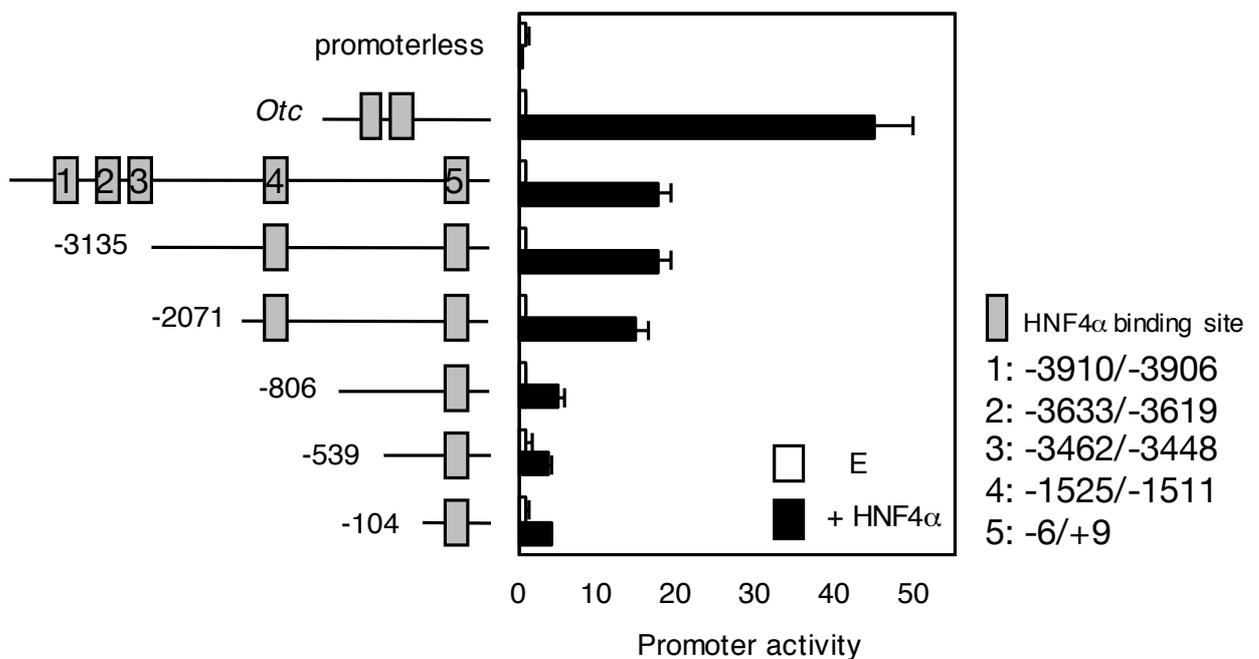


Fig. 3-4. 欠失変異体による Luciferase assay の結果

ポジティブコントロールとして mOTC プロモーター{-235/-1, 参考文献 (41)}では、HNF4 α による 40 倍以上のプロモーター活性の上昇が確認できた。

また、Megalín プロモーター上に存在する結合予測部位の-3910/-3896、-3633/-3619、-3462/-3448、-1525/-1511、-6/+9 を含むベクター (-3996/+200、-3135/+200、-2071/+200) では空ベクターを導入した時に比べて、HNF4 α の導入で約 15~20 倍の転写活性化能を示した。一方で、結合予測部位の-1525/-1511 を欠損した pGL4.11 ベクター(-806/+200、-539/+200、-104/+200)での転写活性化能は、コントロールと比較して約 5 倍程度の転写活性化能を示した。このことから、-1525/-1511 の領域と-6/+9 の領域に HNF4 α の結合によるプロモーター活性化が予測されるため、どちらの領域がより強力に転写活性化に寄与するかを解析するため、この 2 つの領域に点変異を導入したベクター (-3996/+200) を作成し、転写活性化能を比較した (Fig. 3-5)。

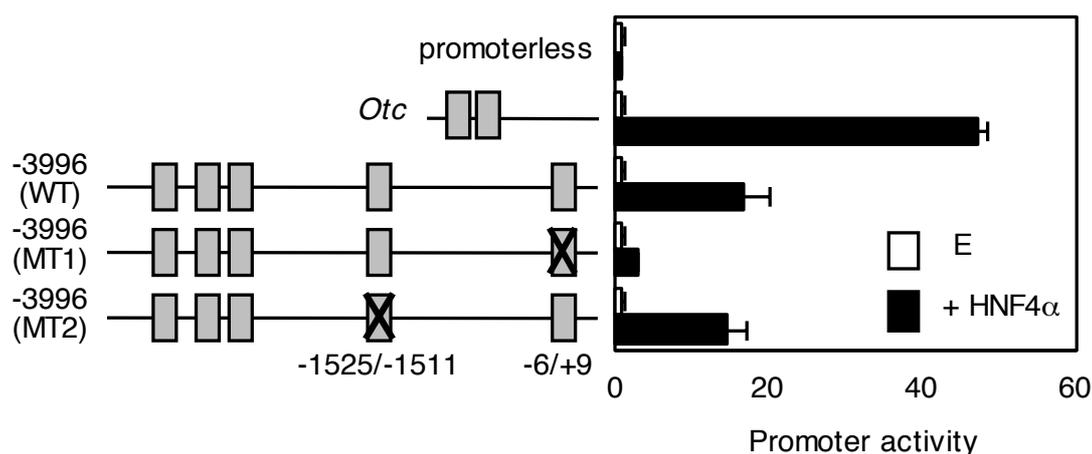


Fig. 3-5. 点変異体による Luciferase assay の結果

その結果、-6/+9 に変異導入したベクター (MT1)では野生型 (WT)の活性に比べて、約 80%の活性低下が示された。一方で-1525/-1511 に変異導入をしたベクター (MT2)では、活性変動は認められなかった。以上の結果から、Megalín プロモーター上の-6/+9 の HNF4 α 予測部位が、HNF4 α による Megalín 発現制御に重要であるということが示唆された。

(3) Megalín プロモーターの種間での保存性と HNF4 α の結合

転写因子が結合する部位は生物種が異なっても保存されている場合が多い。その保存性の高さは、分子標的薬の開発時にも非常に重要になってくる。そのため、本研究

においても、Megalin プロモーターの種間での保存性を確認した (Fig. 3-6)。各生物種のプロモーター配列は Emsembl Genome browser 94 (<https://asia.ensembl.org/index.html>)から引用し、各生物種の ID を下記に示した。相同性の確認は DNA Data Bank of Japan (DDBJ) センターが公開している、配列比較ウェブソフトウェアの Clustal W (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp>)を用いた。今回比較した生物種はヒト (ENST00000263816.7)、チンパンジー (ENSPTRT00000023363.5)、マーモセット (ENSCJAT00000012617.3) など、比較的ヒトに遺伝系統学的に近い霊長類、さらに実験動物として広く用いられる、マウス (ENSMUST00000080953.11)、ラット (ENSRNOT00000082624.1)、オポッサム (ENSMODT00000010152.3) の合計 6 つで比較を行った。

Species	position			*			*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	position
Human	-5	C	C	C	C	G	C	G	C	T	G	C	A	A	A	G	T	G	C	A	+14
Chimpanzee	-84	C	C	C	C	G	C	G	C	T	G	C	A	A	A	G	T	G	C	A	-60
Opossum	-336	T	T	C	A	A	A	G	C	T	G	A	A	A	A	G	T	A	C	A	-312
Marmoset	-297	C	C	C	C	G	G	G	C	T	G	C	A	A	A	G	T	G	C	A	-273
Mouse	-128	C	C	C	A	G	A	G	T	C	G	C	A	A	A	G	T	G	C	A	-104
Rat	-111	C	C	C	A	G	A	G	T	C	G	C	A	A	A	G	T	G	C	A	-87

Fig. 3-6. HNF4α 結合予測部位の相同性の比較

比較の結果、6 つの生物種で HNF4α 結合予測部位は非常に保存性が高いことが分かった。この保存性が高い領域に HNF4α が直接結合するかどうかを実験的に確認するため、Gel shift assay (Fig. 3-7) と ChIP アッセイ (Fig. 3-8) で *in vitro/ in vivo* の双方から解析した。

Gel shift assay での HNF4α の Megalin プロモーターへの結合を解析した結果、結合が確認された (lane 1 は Biotin プローブのみ、lane 2 は Biotin プローブ + HNF4α タンパク質)。次に、この DNA-タンパク質の結合が特異的かどうかを、ビオチン未標識のコンペティタープローブを用いて検証した結果、ポジティブコントロールの OTC と Megalin の両方でビオチン標識複合体の形成を阻害することが明らかとなった (lane 3,4)。Megalin の未標識プローブの HNF4α の結合部位に変異を導入したところ、阻害効果がなくなったことから、プローブの HNF4α の結合部位特異的に結合していることが確認された (lane 5) また、結合しているタンパク質が HNF4α 特異的かどうかを確認するため、スーパーシフト実験で検証した結果、結合しているタンパク質は HNF4α 抗体特異的にスーパーシフトをしたため、HNF4α 特異的な結合であることが明らかとなった (lane 6 は HNF4α 抗体、lane 7 は PPARβ 抗体を使用)。

次に、ChIP アッセイでの解析を行った (Fig. 3-8)。その結果、ポジティブコントロールの OTC と Megalin の両方で HNF4 α 抗体を用いて ChIP した時の方がプロモーターへの結合は強く、*in vivo* においても HNF4 α は Megalin プロモーターの -6/+9 の領域に強く結合していることが明らかとなった。

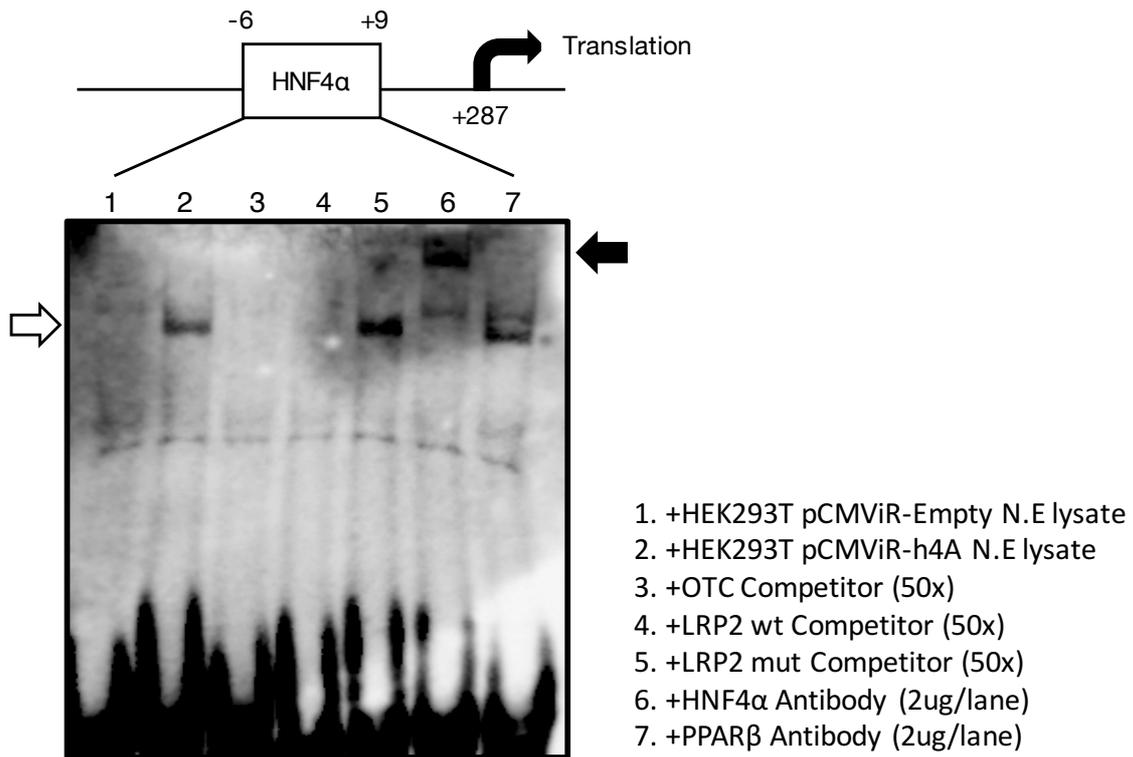


Fig. 3-7. Gel shift assay

白矢印 : DNA プローブ-HNF4 α タンパク質の複合体
 黒矢印 : スーパーシフト (DNA-タンパク-抗体 三者複合体)

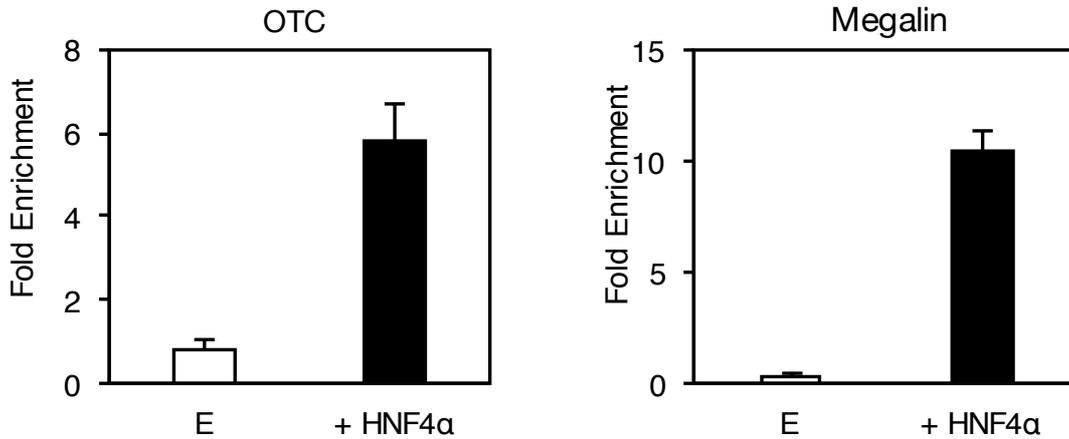


Fig. 3-8. ChIP assay の結果

(左) OTC での結果 (ポジティブコントロール) (右) Megalin での結果

第5節 考察

本章の研究によって、HNF4α を高発現しているのにも関わらず、網羅的な遺伝子解析がなされていない近位尿細管上皮細胞において、物質輸送の重要な役割を担う Megalin の HNF4α による発現制御機構を解析することができた。

ヒト腎臓近位尿細管由来の HK-2 とヒト胎児腎細胞由来の HEK293T 細胞に HNF4α を強制発現させることで、4 種類の近位尿細管上皮細胞で発現される遺伝子の発現量が上昇した。これらの遺伝子のうち 3 種類は SLC トランスポーターであり、それらが輸送する基質としては塩化物イオンや重炭酸塩を輸送する SLC4A1 (102)、カチオン性アミノ酸や中性アミノ酸を輸送する SLC7A7 (103)、不特定なモノカルボン酸を輸送する SLC16A4 (104)であった。このことから、近位尿細管においても HNF4α は肝臓などと同様に、多岐にわたる機能維持に関わる転写因子として働く可能性が示唆された。トランスポーター遺伝子は、SLC ファミリーでヒトでは SLC1 から SLC51 までの 51 ファミリーまで分類されており、その合計は 378 遺伝子となっており、ABC ファミリーはヒトでは ABCA から ABCG までの 7 ファミリーで合計 49 遺伝子が存在している (98)。本研究で取り扱った 82 遺伝子以外にも多くのトランスポーターが近位尿細管上皮に存在していることが知られている。これらトランスポーターや、腎臓特異的遺伝子を含めた解析を進めることによって、近位尿細管における HNF4α による機能維持機構が明らかになる可能性があり、今後の研究課題となる。

本研究においては、標的候補遺伝子の中でも特に Megalin が HNF4α による顕著な発現上昇が認められた。Megalin はヘイマン腎症から病理学的抗原として発見がなされて

gp330 と命名され、ラット近位尿細管上皮からクローニングがなされた膜貫通型巨大タンパク質であり、LDL 受容体スーパーファミリーに属している (105,106)。その後の研究で、Megalin はカルシウムイオンや、レチノール結合タンパク質、ビタミン D 結合タンパク質、アルブミン、トランスサイレチン、肝臓型脂肪酸結合タンパク質 (L-FABP) など多くの基質と結合することが明らかとなっている (107)。

Megalin の解析のために作成された全身ノックアウトマウスでは、血清中のレチノール結合タンパク質やビタミン D 結合タンパク質が尿中に排出される、ファンコーニ症候群と類似した低分子尿症を発症した (108)。さらに、腎臓特異的 Megalin 欠損マウスではビタミン D 結合タンパク質である 25-OH ビタミン D₃ 複合体によるビタミン D の取り込みが減少したことが原因で、低カルシウム血症や骨疾患を発症することが報告されている (109)。また、Megalin 遺伝子への変異によって、家族性の Donnai-Barrow 症候群や facio-oculo-acoustico 腎症候群を発症するという報告がされている (110)。

以上のことから、Megalin は血中に存在する多くの物質の輸送に非常に重要であることが示唆される。また、メタボリックシンドロームモデルマウスでは細胞傷害性物質がメガリンにより再吸収され、ネフロン全体に障害がおこり、CKD を進行させることが報告されている (111)。糖尿病性腎症や AKI、CKD の患者では Megalin が発現する事により腎毒性物質の輸送も行ってしまうため、腎機能低下が起こり、糖尿病性腎症や AKI、CKD の進行に関わってきてしまう。そのため、Megalin の発現抑制することが糖尿病性腎症や AKI、CKD 治療への応用が期待される。

CKD 治療法の開発において、Megalin の働きを抑制する場合、考えられる方法として、一つ目は Megalin の発現制御を行う HNF4 α の発現を抑制する方法、二つ目は Megalin 特異的な抑制をする 2 通りの方法が考えられる。HNF4 α の発現抑制によって Megalin の発現は抑制が期待されるが、本研究の解析によって SLC トランスポーターの発現制御にも関わる可能性が示唆された。このことから、HNF4 α の抑制により SLC トランスポーターや腎機能に重要な遺伝子の発現量が減少する事が考えられ、それによって CKD などの疾患の悪性化が予測される。一方、Megalin 特異的な抑制を行う場合は、HNF4 α による転写活性化は阻害できないが、Megalin タンパク質の発現量を抑制することで、Megalin による腎毒性物質の取り込みを阻害することができる。さらに、HNF4 α の発現誘導を行うことで、SLC トランスポーターなどの腎機能維持に関与する遺伝子の発現上昇を誘導し、腎機能の亢進が期待される。以上のことから、CKD 治療薬の開発の際には、Megalin 阻害薬を作製し、同時に HNF4 α の発現誘導することで CKD の治療法の確立ができるのではないかと考えられる。

また、Megalin の発現転写制御機構に関する研究は少なく、PPAR α と PPAR γ によって Megalin の発現上昇をするという報告がなされている (112)。しかしながら、PPAR α と PPAR γ による Megalin の発現上昇は約 2 倍程度と発現上昇量は非常に低く、他の転写因子と協奏的に働いていることが予測された。本研究の結果から、Megalin の発現量を最大で 15 倍にも増加させた HNF4 α は PTEC での Megalin 発現に非常に重要であるということが示唆され、PPAR と共に Megalin の発現制御に関わっている可能性がある。幾つかの先行研究において HNF4 α と PPAR α はプロモーター上の結合配列を共有するという報告がある。Acyl-Coa thioesterase1 (*Acot1*) は HNF4 α と PPAR α は同じ配列に結合することが報告され、さらにこの報告において *Acot1* の発現量は PPAR α によって発現の活性化、HNF4 α によって発現の抑制が行われていることが判明した (113,114)。

しかし、本研究における HNF4 α の応答領域と PPAR α の応答領域 (112) は共有されておらず、PPAR α の応答領域を欠如した配列でも転写活性化能は変化がなかった。従って、以上のことより、近位尿細管の HNF4 α と PPAR α は Megalin プロモーター上で異なる応答配列に結合して、転写制御を行っていることが示唆される。また、PPAR α は飽和脂肪酸や非飽和脂肪酸の遊離脂肪酸を内在性リガンドとして使用するという (115)、Megalin がアルブミン結合性の脂肪酸を PTEC に取り込むことから、PTEC において PPAR α は Megalin 介して得た脂肪酸によって転写活性化をしている可能性が存在する。さらに、HNF4 α は PPAR α の発現を正に制御することから (116)、HNF4 α は Megalin の発現をプロモーターに結合することで直接的に制御する方法と、PPAR α の発現制御による間接的な発現制御をおこなっている可能性が示唆される。

本研究によって、HNF4 α の強制発現によっていくつかのトランスポーター遺伝子と Megalin の遺伝子の mRNA 発現量が上昇した。その中でも、顕著な発現上昇をした Megalin は、プロモーター上に HNF4 α が結合することが明らかとなった。トランスポーターや Megalin の機能異常は CKD を発症する原因となりうることから、HNF4 α は PTEC における機能維持に重要であるということが本研究によって示された。

【第4章 総括】

本研究では、肝臓・腎臓の恒常性維持に関与する核内受容体 HNF4 ファミリーの同定と機能解明を行った。これまでの実験結果を以下にまとめる。

【新規 HNF4 γ の肝臓における機能解析】

- 肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスでは既知 HNF4 γ である HNF4 γ 1 と、新規 HNF4 γ ある HNF4 γ 2 が発現上昇をしていたが、その発現量は正常マウスにおける HNF4 α と比べて、ごく微量であることを明らかにした。
- ヒトの HNF4 γ 1/2 の転写開始点を決定し、HNF4 γ 2 には HNF4 α と同様に転写活性化に重要な AF-1 が含まれることが示された。
- HNF4 γ 1/2 の発現分布を解析した結果、正常組織において HNF4 γ 1/2 共に小腸での発現量が多かったが、HNF4 γ 2 の発現量は HNF4 γ 1 と比較して非常に少なかった。
- HNF4 α と HNF4 γ 1/2 の転写活性化能を比較した結果、HNF4 γ 1 は HNF4 α より転写活性化能が低く、HNF4 γ 2 は HNF4 α よりも高い転写活性化能を有していた。
- HNF4 α と HNF4 γ 1/2 を共導入した時の転写活性化能は、HNF4 α による転写活性化を HNF4 γ 1 は抑制、HNF4 γ 2 は活性化の働きすることが明らかとなった。
- HNF4 α と HNF4 γ 1/2 における DNA 結合活性に有意な差は認められなかった。
- HNF4 γ 1/2 を肝がん由来細胞に導入することで、HNF4 γ 1 では HNF4 α 導入時と比較して肝機能マーカーと肝機能の誘導は弱く、HNF4 γ 2 では HNF4 α 以上の肝機能マーカーと肝機能を誘導した。
- HNF4 α と HNF4 γ 1/2 を肝がん由来細胞に導入することで EMT マーカー遺伝子の抑制を行うことができた。

以上の結果より、既知バリエント HNF4 γ 1 は HNF4 α 存在下だと HNF4 α の機能を抑制することが考えられるため、HNF4 γ 1 が発現上昇しているがん組織で発現抑制や阻害を行うことで、HNF4 α の機能回復を行えることが示唆された。従って、HNF4 γ 1 は、新たな HCC 治療標的となる可能性を秘めている。

一方、新規バリエントである HNF4 γ 2 は HNF4 α 以上の転写活性化能、肝分化や機能維持の機能を持つ。HNF4 α は未分化肝細胞の肝細胞への誘導や、脱分化細胞したがん細胞を正常細胞に再分化させることが報告されているため、肝臓での HNF4 γ 2 の発現の活性化や外部からの導入は、HCC の新たな治療法の開発に有用であると期待される。

さらに、iPS や ES 細胞といった幹細胞への HNF4 γ 2 の導入による人工肝細胞への分化誘導系の確立に有用であると期待される (Fig. 4-1)。

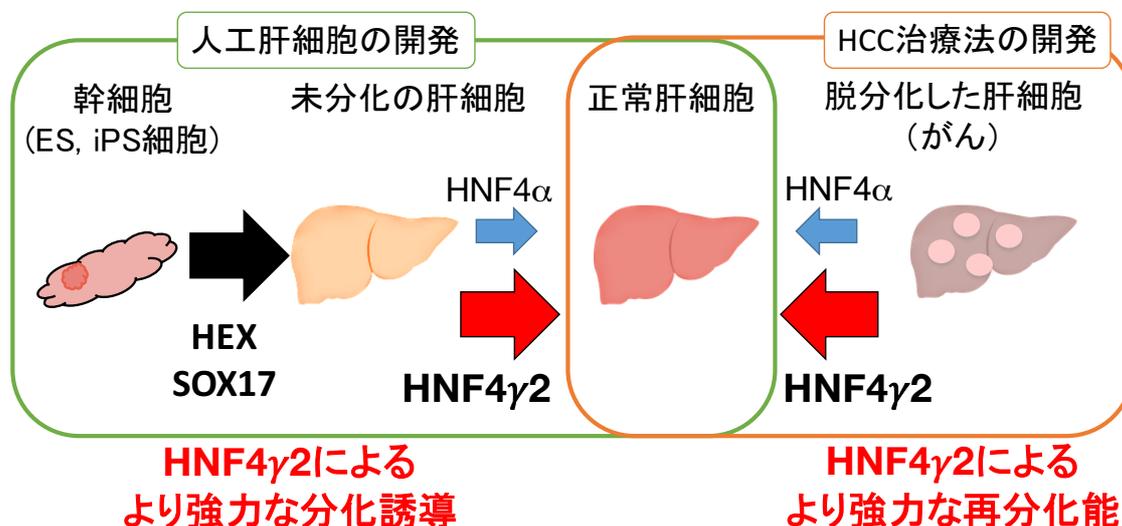


Fig. 4-1. 本研究から予測される肝臓における HNF4 α と HNF4 γ 2 の機能予測

【腎臓 HNF4 α の標的遺伝子の探索】

- ヒト腎臓近位尿細管由来培養細胞に HNF4 α を発現させると、3 つのトランスポーター遺伝子と Megalin 遺伝子の発現量が増加した。
- HNF4 α は Megalin のプロモーター上の HNF4 α 結合予測部位に結合して、転写活性化を行うことが明らかになった。

以上の結果により、腎近位尿細管における HNF4 α は SLC トランスポーターや ABC トランスポーター、Megalin の転写制御を介した再吸収や代謝に関与している可能性が示唆された (Fig. 4-2)。

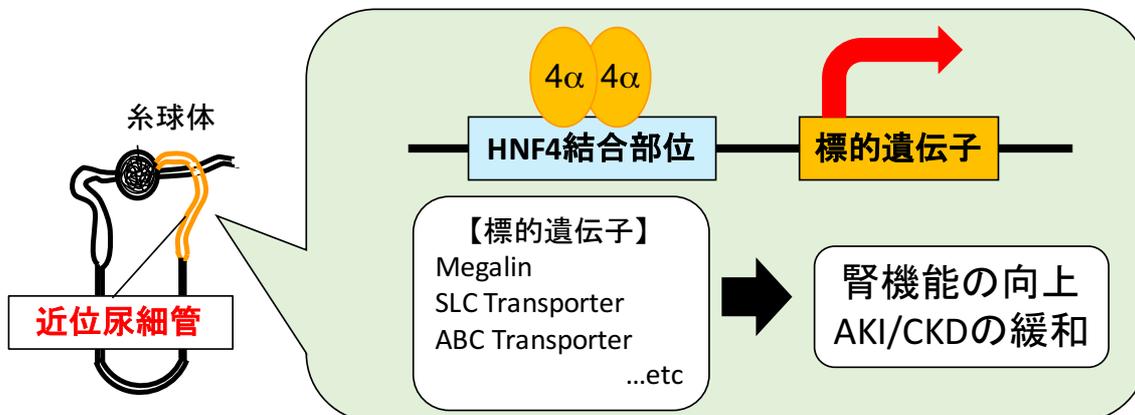


Fig. 4-2. 本研究から予測される腎臓近位尿細管での HNF4 α の機能予測

本研究での研究結果を踏まえ、以下に今後の研究課題を記す。

1. HNF4 γ 1 および HNF4 γ 2 の転写活性化機構の解明

本研究によって、HNF4 γ には HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の 2 つのバリエントが存在することが判明した。2 種類の HNF4 γ は Exon 1 が異なるため、その位置を Exon 2 の位置から計算すると、マウスの HNF4 γ 1 を認識する Exon 1A 転写開始点の位置は Exon 2 から上流 130 kbp 上流である。一方、HNF4 γ 2 の Exon1 B はわずか 3.8 kbp に位置していた。この傾向はヒトでも同様で、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 は全く異なるプロモーターによって発現制御されていることが予測される (Fig. 2-6)。

以上のことから、HNF4 γ の転写活性化による発現制御機構には異なる転写因子が関与している可能性が示唆される。プロモーター解析を行うにより、それぞれの HNF4 γ バリエントの転写調節が可能となれば、HNF4 γ バリエントごとの発現制御が可能となり、それぞれの HNF4 γ の機能解析や、HNF4 γ 2 による分化誘導をより円滑に行える可能性がある。

また、HNF4 γ の 3' UTR は共通の配列を持ち、肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスの肝臓において HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の両方が同程度の発現上昇をしたことから、miRNA による翻訳時の発現抑制を受けている可能性が示唆される。実際に、膀胱がんでは miR-34a によって発現抑制を受けており、胃がんでは miR-30a によって発現抑制を受けているという報告がある (71,72)。肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスの肝臓では、miRNA の発現変動も多く見られるため (46)、新規の microRNA 標的遺伝子として HNF4 γ の 3'UTR 配列に結合する microRNA を探索することも、今後の研究課題として残る。以上のことより、HNF4 γ は転写時や翻訳前という様々な段階での発現調節を受けていることが示唆されるため、包括的な研究が必要とされる (Fig. 4-3)。

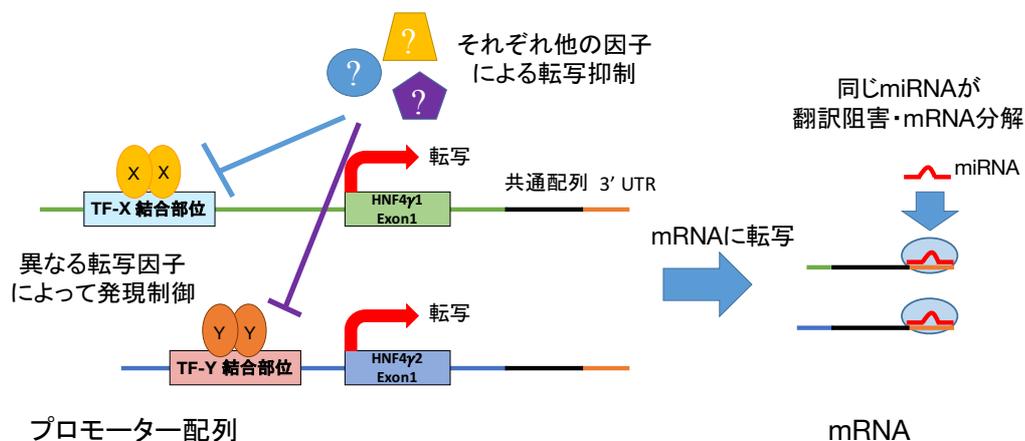


Fig. 4-3. HNF4 γ の発現制御機構の予測図

2. HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の特異的コファクターおよびリガンドの探索

核内受容体を含む転写因子による転写制御を行う際には、コファクターが結合することで、転写活性化能を調節することが広く知られている。HNF4 α も PGC-1 α や PC4 といったコアクチベーターが結合することによって、転写制御に関わることが報告されている (117)。このようなコアクチベーターは HNF4 γ にも存在することが考えられる。さらに HNF4 γ 1/2 は N 末端の転写活性化部位に差が生じることから、異なるコアクチベーターが結合することが予測される。実際に、HNF4 γ のコファクター候補の探索が当研究室によってなされているが、現在発見されているコファクター候補タンパク質は HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 に共通して結合することから、HNF4 γ の共通した配列に結合していることが示唆される。

今後は HNF4 γ バリエーションに特異的なコファクターを探索するため HNF4 γ 間で異なる N 末端領域を用いた Pull-down assay や HNF4 γ を発現している KO マウス肝臓を用いた共免疫沈降法によるコファクターの探索が必要と考えられる。

また、HNF4 γ は HNF4 α と同様にリガンドの同定されていないオーファン受容体である。リガンドは核内受容体の構造を変化させることで、転写活性化能などを向上させることができる。同じ核内受容体の PPAR ファミリーは合成された人工リガンドによる創薬研究が進んでいる (118)。さらに、結合するリガンドにより、異なるコファクターをリクルートすることが報告されている (119,120) (Fig. 4-4)。

以上のことから、HNF4 γ に対する特異的なコファクターやリガンドを同定することで、HNF4 γ の機能解析や創薬において非常に有用になると期待される。

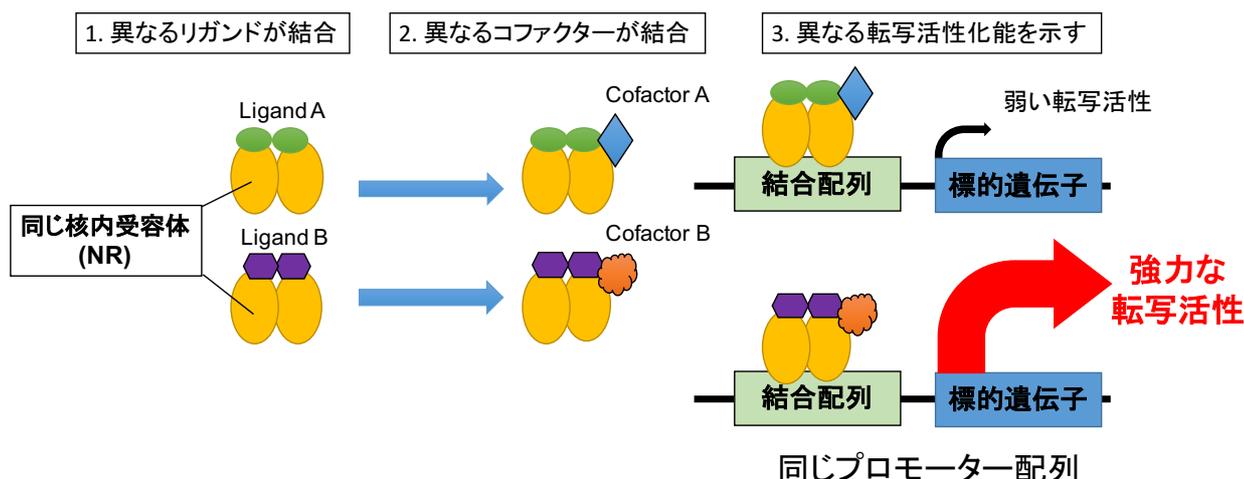


Fig. 4-4. コファクター・リガンドのリクルートメントによる活性の差

3. 肝臓以外での HNF4 γ 2 導入による、組織の恒常性維持

本研究より、HNF4 γ 2 は HNF4 α 以上の転写活性化能や、肝機能誘導能を有していることが明らかとなった。HNF4 α の機能は、肝臓の分化誘導や脱分化の抑制 (96,97)であるが、それらの機能が HNF4 γ 2 によって、HNF4 α よりも強力に誘導されることが期待される。HNF4 α は肝臓以外にも本研究で取り上げた腎臓をはじめとする膵臓、小腸、大腸などの組織においても発現している。それぞれの組織で HNF4 α は、恒常性の維持に重要であることが報告されている。HNF4 γ 2 は本研究の結果から、HNF4 α と同じ標的を認識するため、肝臓以外の組織での恒常性維持機能も亢進する可能性を秘めている。特に、小腸では HNF4 γ 2 の発現比率が多いことから、HNF4 γ 2 の発現上昇することによって、HNF4 α 以上に分化誘導をする可能性がある。以上のことから、HNF4 γ 2 の発現誘導や外部からの導入は、肝臓以外の組織でも有用だということも予測できる。

先行研究によって HNF4 γ が、がん組織において発現上昇しているという報告がされているが (70,72)、これらの HNF4 γ は既知の HNF4 γ 1 のみを研究対象としているため、プライマーなどは HNF4 γ 1/2 に共通する部分などで作成されており、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 のどちらが発現上昇しているかは未解明である。しかし、HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の正常組織やヒト由来培養細胞における発現量比から考察すると、これらのがん組織において HNF4 γ 1 のほうが発現上昇している可能性が高い。さらに、潰瘍性大腸炎においては、検出に用いたプローブの配列などから HNF4 γ 2 が減少していることが報告されている (92)。

そこで、HNF4 γ の変動が認められている組織または細胞における HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の発現変動解析し、HNF4 γ 1 の発現が高い時や、今回の肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスのように HNF4 γ 1 と HNF4 γ 2 の量が同程度の場合には、HNF4 γ 2 を導入することにより、正常細胞への再分化の誘導などが可能ではないかと期待される。そのため、腎臓を始めとする HNF4 α の機能が未解析な組織において、機能解析を行う上で、HNF4 γ 2 は強力なツールとして使用できる可能性があり、今後の研究への応用が期待される (Fig. 4-5)。

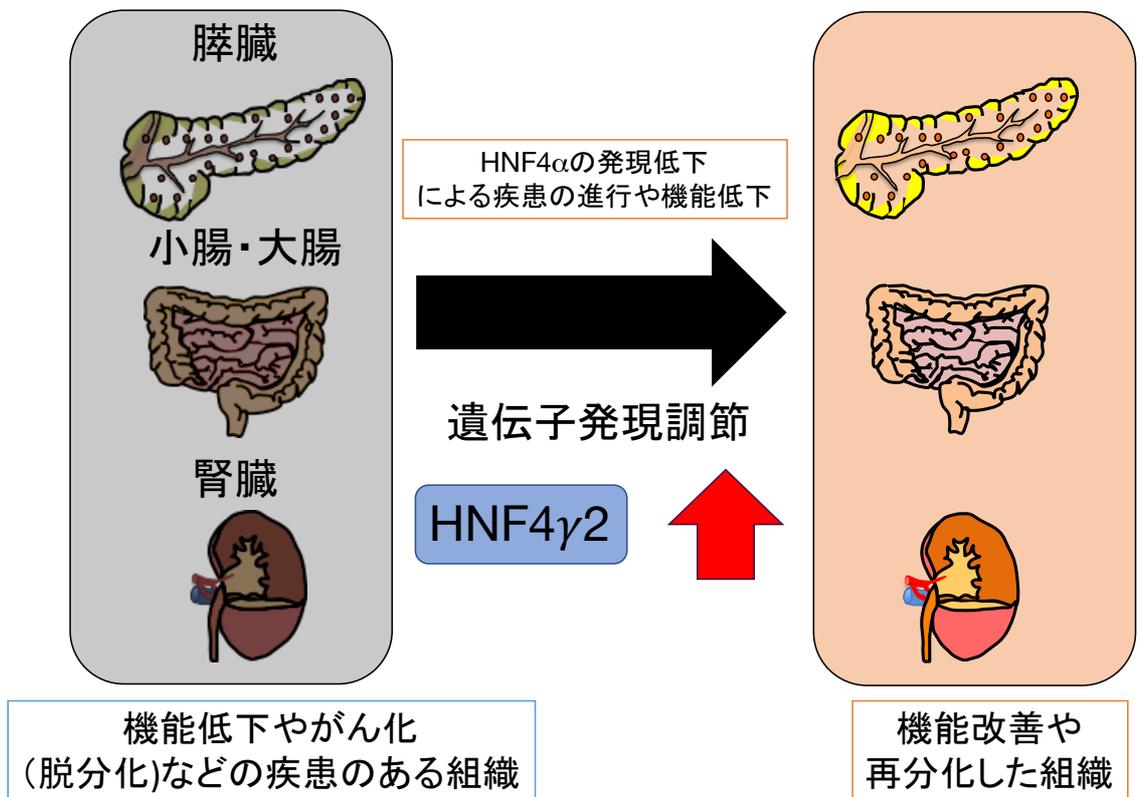


Fig. 4-5. 肝臓以外で HNF4 γ 2 の発現誘導によって期待される効果

4. 腎近位尿細管における HNF4 α 標的遺伝子のさらなる探索

本研究では HNF4 α の標的として、もっとも発現上昇が顕著であった Megalin に着目して HNF4 α による発現制御機構の解明を行った。その一方で、HNF4 α によって発現上昇した 3 種類の SLC トランスポーター遺伝子が確認された。本研究ではその 3 種類を含め 71 種類の SLC トランスポーター遺伝子についての HNF4 α による発現誘導の検証を行ったが、ヒトの SLC トランスポーターは現在までに 378 遺伝子が存在し、他のトランスポーターとして、49 種類の ATP-binding-cassette family (ABC family) が存在していることが知られている。これらの遺伝子についても HNF4 α の強制発現系において発現が誘導されるかを検討し、腎近位尿細管上皮細胞における HNF4 α の標的遺伝子となるトランスポーター遺伝子を同定することによって、HNF4 α の重要性を解析することが重要である。

さらに、SLC/ABC トランスポーター以外の遺伝子についても、HNF4 α 強制発現系での ChIP-Seq などを組み合わせることで、より網羅的な HNF4 α の標的遺伝子の同定などができると考えられる。さらに、近位尿細管上皮特異的な HNF4 α 欠損マウスを作成す

ることにより、近位尿細管における HNF4 α の機能が解明されると期待され、このマウスを現在作成中である。

結語

本研究では、HNF4 α の機能解析を行う上で有用なツールとして HNF4 γ の新規バリエーションである HNF4 γ 2 を同定し、機能解析を行った。その結果、HNF4 γ 2 は、HNF4 α よりも優れた人工肝細胞の作製や肝細胞がんの治療への利用が期待されることが明らかとなった。しかしながら、肝臓の HNF4 α 欠損によって発現上昇した HNF4 γ の発現制御機構は未解明のままである。そのため今後 HNF4 γ 1 および HNF4 γ 2 の発現制御機構を解析していくことが重要になる。

HNF4 γ の研究は先行研究も少なく、核内受容体 HNF4 ファミリーの肝臓や腎臓をはじめとする HNF4 が発現する組織における機能の全容解明のために、さらなる研究が必要である。

さらに、肝臓、膵臓、大腸に加え、新たに HNF4 α が恒常性維持に関わる組織として、腎臓、特に腎近位尿細管について、その標的遺伝子として **Megalin** を同定した。今後のさらなる研究によって、再吸収の調節機構や CKD を始めとする疾患への治療ツールとして、HNF4 α が有用であることを検証していく必要がある。

謝辞

本研究の遂行、および本論文の執筆にあたり、配属からの7年間に渡って素晴らしい環境を与えてくださるだけでなく、実験指導を始めとする多岐にわたるご指導、ご鞭撻頂きました井上裕介准教授に厚く御礼申し上げます。

また、実験機器を貸与していただき、様々なご助言やご支援をいただきました若松馨教授、行木信一准教授に心から御礼申し上げます。

本論文の審査の労を賜るとともに、博士論文執筆のご助言をいただきました篠塚和夫教授、尾崎広明教授、粕谷健一教授、吉原利忠准教授に心より感謝申し上げます。

肝臓で発現する転写因子の発現解析のデータの解析等にご協力いただいた理化学研究所オミックス基盤研究領域の鈴木正則博士と外丸靖浩博士に感謝いたします。また、論文執筆にあたりご協力いただいた岡山大学大学院医歯薬総合研究科の阪口政清教授、NIH/NCI, Laboratory of Metabolism の Frank J. Gonzalez 博士にも感謝申し上げます。

本論文の内容からは逸脱しますが、超遠心機の使用法の指導や、実験上でのご助言、ご支援をいただきました本学の機器分析センターの林史夫准教授、LC-MS-MS によるタンパク質の同定に関する実験手法のご指導や解析における助言を頂いた本学大学院医学系研究科生化学講座の大嶋紀安助教授と、本学医学系研究科教育研究支援センター共同利用機器部門の平野瞳子博士に厚く御礼申し上げます。

本研究を行うにあたり、分子生命科学研究室の後輩や、卒業されていった先輩方には、様々な実験協力や私の成長を支えてくださったことを感謝致します。

また、公私問わず支えていただき、卒業後も変わらない関係で私を支えてくれた同期学友である有賀長透氏に感謝申し上げます。

最後に、私の進路に理解を示し、10年間という長きに渡る学生生活を、経済的や精神面で支えてくださった、父 佐々木正孝ならびに母 佐々木洋子、姉 佐々木綾乃、そして、共働きの両親にかわり、私の成長を支えてくださり、平成30年10月18日に永眠した祖母 佐々木千枝に心より感謝申し上げます。

参考文献

1. Watson, J. D., et al., and 中村桂子監訳 (2010) *ワトソン遺伝子の分子生物学 第6版*, 東京電気大学出版局
2. Yang, C., Bolotin, E., Jiang, T., Sladek, F. M., and Martinez, E. (2007) Prevalence of the initiator over the TATA box in human and yeast genes and identification of DNA motifs enriched in human TATA-less core promoters. *Gene* **389**, 52-65
3. Uchiumi, F., Miyazaki, S., and Tanuma, S. (2011) The possible functions of duplicated ets (GGAA) motifs located near transcription start sites of various human genes. *Cell Mol Life Sci* **68**, 2039-2051
4. Yamagata, K., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Furuta, H., Vaxillaire, M., Southam, L., Cox, R. D., Lathrop, G. M., Boriraj, V. V., Chen, X., Cox, N. J., Oda, Y., Yano, H., Le Beau, M. M., Yamada, S., Nishigori, H., Takeda, J., Fajans, S. S., Hattersley, A. T., Iwasaki, N., Hansen, T., Pedersen, O., Polonsky, K. S., and Bell, G. I. (1996) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-1alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY3). *Nature* **384**, 455-458
5. Sasaki, H., and Hogan, B. L. (1993) Differential expression of multiple fork head related genes during gastrulation and axial pattern formation in the mouse embryo. *Development* **118**, 47-59
6. Monaghan, A. P., Kaestner, K. H., Grau, E., and Schütz, G. (1993) Postimplantation expression patterns indicate a role for the mouse forkhead/HNF-3 alpha, beta and gamma genes in determination of the definitive endoderm, chordamesoderm and neuroectoderm. *Development* **119**, 567-578
7. Nakamura, T., Mura, T., Saito, K., Ohsawa, T., Akiyoshi, H., and Sato, K. (1998) Adenovirus-transferred HNF-3 gamma conserves some liver functions in primary cultured hepatocytes of adult rats. *Biochem Biophys Res Commun* **253**, 352-357
8. Yamagata, K., Furuta, H., Oda, N., Kaisaki, P. J., Menzel, S., Cox, N. J., Fajans, S. S., Signorini, S., Stoffel, M., and Bell, G. I. (1996) Mutations in the hepatocyte nuclear factor-4alpha gene in maturity-onset diabetes of the young (MODY1). *Nature* **384**, 458-460
9. Landry, C., Clotman, F., Hioki, T., Oda, H., Picard, J. J., Lemaigre, F. P., and Rousseau, G. G. (1997) HNF-6 is expressed in endoderm derivatives and nervous system of the mouse embryo and participates to the cross-regulatory network of liver-enriched transcription factors. *Dev Biol* **192**, 247-257
10. Wang, N. D., Finegold, M. J., Bradley, A., Ou, C. N., Abdelsayed, S. V., Wilde, M. D., Taylor, L. R., Wilson, D. R., and Darlington, G. J. (1995) Impaired energy homeostasis in C/EBP alpha knockout mice. *Science* **269**, 1108-1112

11. Schmidt, E. E., and Schibler, U. (1995) Cell size regulation, a mechanism that controls cellular RNA accumulation: consequences on regulation of the ubiquitous transcription factors Oct1 and NF-Y and the liver-enriched transcription factor DBP. *J Cell Biol* **128**, 467-483
12. Schrem, H., Klempnauer, J., and Borlak, J. (2002) Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: the hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression. *Pharmacol Rev* **54**, 129-158
13. Bunce, C. M., Campbell, M. J., and SpringerLink (Online service). (2010) Nuclear Receptors Current Concepts and Future Challenges. in *Proteins and Cell Regulation 8*, Springer Science+Business Media B.V., Dordrecht
14. Overington, J. P., Al-Lazikani, B., and Hopkins, A. L. (2006) How many drug targets are there? *Nat Rev Drug Discov* **5**, 993-996
15. 渡辺純夫 (2011) 肝臓病-治る時代の基礎知識, 岩波新書
16. Jeon, K. W. (2007) A survey of cell biology. in *International review of cytology 259*, Elsevier Academic Press,, Amsterdam ; Boston
17. Forner, A., Reig, M., and Bruix, J. (2018) Hepatocellular carcinoma. *Lancet* **391**, 1301-1314
18. 飯島尋子 他 (2015) 肝がん白書, 一般社団法人 日本肝臓学会
19. Kim, S. R., and Kim, K. I. (2016) [An Overview of NAFLD/NASH in Japan]. *Yakugaku Zasshi* **136**, 565-572
20. Day, C. P., and James, O. F. (1998) Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology* **114**, 842-845
21. Tilg, H., and Moschen, A. R. (2010) Evolution of inflammation in nonalcoholic fatty liver disease: the multiple parallel hits hypothesis. *Hepatology* **52**, 1836-1846
22. Nakae, D., Yoshiji, H., Maruyama, H., Kinugasa, T., Denda, A., and Konishi, Y. (1990) Production of both 8-hydroxydeoxyguanosine in liver DNA and gamma-glutamyltransferase -positive hepatocellular lesions in rats given a choline-deficient, L-amino acid-defined diet. *Jpn J Cancer Res* **81**, 1081-1084
23. Matsumoto, M., Hada, N., Sakamaki, Y., Uno, A., Shiga, T., Tanaka, C., Ito, T., Katsume, A., and Sudoh, M. (2013) An improved mouse model that rapidly develops fibrosis in non-alcoholic steatohepatitis. *Int J Exp Pathol* **94**, 93-103
24. Reilly, R. F., and Perazella, M. A. (2013) Nephrology in 30 days. in *McGraw Hill ebook library Medical Primary care*, 2nd Ed., McGraw Hill Professional,, New York
25. Takaori, K., Nakamura, J., Yamamoto, S., Nakata, H., Sato, Y., Takase, M., Nameta, M., Yamamoto, T., Economides, A. N., Kohno, K., Haga, H., Sharma, K., and Yanagita, M. (2016)

- Severity and Frequency of Proximal Tubule Injury Determines Renal Prognosis. *J Am Soc Nephrol* **27**, 2393-2406
26. Chevalier, R. L. (2016) The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: role of the glomerulotubular junction. *Am J Physiol Renal Physiol* **311**, F145-161
 27. Grgic, I., Campanholle, G., Bijol, V., Wang, C., Sabbisetti, V. S., Ichimura, T., Humphreys, B. D., and Bonventre, J. V. (2012) Targeted proximal tubule injury triggers interstitial fibrosis and glomerulosclerosis. *Kidney Int* **82**, 172-183
 28. Sladek, F. M., Zhong, W. M., Lai, E., and Darnell, J. E. (1990) Liver-enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily. *Genes Dev* **4**, 2353-2365
 29. Holewa, B., Zapp, D., Drewes, T., Senkel, S., and Ryffel, G. U. (1997) HNF4beta, a new gene of the HNF4 family with distinct activation and expression profiles in oogenesis and embryogenesis of *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol* **17**, 687-694
 30. Sladek, F. M. (2001) Hepatocyte nuclear factor 4 alpha. in *Nuclear Receptors and Genetic Disease* (Burris, T. P., and McCabe, E. eds.), Academic Press, London.
 31. Costa, R. H., Grayson, D. R., and Darnell, J. E. (1989) Multiple hepatocyte-enriched nuclear factors function in the regulation of transthyretin and alpha 1-antitrypsin genes. *Mol Cell Biol* **9**, 1415-1425
 32. Hertz, R., Magenheimer, J., Berman, I., and Bar-Tana, J. (1998) Fatty acyl-CoA thioesters are ligands of hepatic nuclear factor-4alpha. *Nature* **392**, 512-516
 33. Dhe-Paganon, S., Duda, K., Iwamoto, M., Chi, Y. I., and Shoelson, S. E. (2002) Crystal structure of the HNF4 alpha ligand binding domain in complex with endogenous fatty acid ligand. *J Biol Chem* **277**, 37973-37976
 34. Odom, D. T., Zizlsperger, N., Gordon, D. B., Bell, G. W., Rinaldi, N. J., Murray, H. L., Volkert, T. L., Schreiber, J., Rolfe, P. A., Gifford, D. K., Fraenkel, E., Bell, G. I., and Young, R. A. (2004) Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science* **303**, 1378-1381
 35. Rowley, C. W., Staloch, L. J., Divine, J. K., McCaul, S. P., and Simon, T. C. (2006) Mechanisms of mutual functional interactions between HNF-4alpha and HNF-1alpha revealed by mutations that cause maturity onset diabetes of the young. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**, G466-475
 36. Huang, J., Levitsky, L. L., and Rhoads, D. B. (2009) Novel P2 promoter-derived HNF4alpha

- isoforms with different N-terminus generated by alternate exon insertion. *Exp Cell Res* **315**, 1200-1211
37. Ribeiro, A., Archer, A., Beyec, J. L., Cattin, A.-L., Saint-Just, S., Pinçon-Raymond, M., Chamber, J., Lacasa, M., and Cardot, P. (2007) *Hepatic Nuclear Factor-4, a Key Transcription Factor at the Crossroads Between Architecture and Function of Epithelia, Metabolic & Immune Drug Discovery*
38. Bailly, A., Briançon, N., and Weiss, M. C. (2009) Characterization of glucocorticoid receptor and hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha) binding to the hnf4alpha gene in the liver. *Biochimie* **91**, 1095-1103
39. Tanaka, T., Jiang, S., Hotta, H., Takano, K., Iwanari, H., Sumi, K., Daigo, K., Ohashi, R., Sugai, M., Ikegame, C., Umezumi, 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. (2006) Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4alpha in the pathogenesis of human cancer. *J Pathol* **208**, 662-672
40. Dean, S., Tang, J. I., Seckl, J. R., and Nyirenda, M. J. (2010) Developmental and tissue-specific regulation of hepatocyte nuclear factor 4-alpha (HNF4-alpha) isoforms in rodents. *Gene Expr* **14**, 337-344
41. Inoue, Y., Hayhurst, G. P., Inoue, J., Mori, M., and Gonzalez, F. J. (2002) Defective ureagenesis in mice carrying a liver-specific disruption of hepatocyte nuclear factor 4alpha (HNF4alpha). HNF4alpha regulates ornithine transcarbamylase in vivo. *J Biol Chem* **277**, 25257-25265
42. Vergnes, L., Taniguchi, T., Omori, K., Zakin, M. M., and Ochoa, A. (1997) The apolipoprotein A-I/C-III/A-IV gene cluster: ApoC-III and ApoA-IV expression is regulated by two common enhancers. *Biochim Biophys Acta* **1348**, 299-310
43. Bonzo, J. A., Ferry, C. H., Matsubara, T., Kim, J. H., and Gonzalez, F. J. (2012) Suppression of hepatocyte proliferation by hepatocyte nuclear factor 4a in adult mice. *J Biol Chem* **287**, 7345-7356
44. Matsuo, S., Ogawa, M., Muckenthaler, M. U., Mizui, Y., Sasaki, S., Fujimura, T., Takizawa, M., Ariga, N., Ozaki, H., Sakaguchi, M., Gonzalez, F. J., and Inoue, Y. (2015) Hepatocyte Nuclear Factor 4a Controls Iron Metabolism and Regulates Transferrin Receptor 2 in Mouse Liver. *J Biol Chem* **290**, 30855-30865
45. Yin, C., Wang, P. Q., Xu, W. P., Yang, Y., Zhang, Q., Ning, B. F., Zhang, P. P., Zhou, W. P., Xie, W. F., Chen, W. S., and Zhang, X. (2013) Hepatocyte nuclear factor-4a reverses malignancy of hepatocellular carcinoma through regulating miR-134 in the DLK1-DIO3 region. *Hepatology* **58**,

1964-1976

46. Morimoto, A., Kannari, M., Tsuchida, Y., Sasaki, S., Saito, C., Matsuta, T., Maeda, T., Akiyama, M., Nakamura, T., Sakaguchi, M., Nameki, N., Gonzalez, F. J., and Inoue, Y. (2017) An HNF4 α -microRNA-194/192 signaling axis maintains hepatic cell function. *J Biol Chem* **292**, 10574-10585
47. Hatziaepostolou, M., Polyarchou, C., Aggelidou, E., Drakaki, A., Poultsides, G. A., Jaeger, S. A., Ogata, H., Karin, M., Struhl, K., Hadzopoulou-Cladaras, M., and Iliopoulos, D. (2011) An HNF4 α -miRNA inflammatory feedback circuit regulates hepatocellular oncogenesis. *Cell* **147**, 1233-1247
48. Ning, B. F., Ding, J., Liu, J., Yin, C., Xu, W. P., Cong, W. M., Zhang, Q., Chen, F., Han, T., Deng, X., Wang, P. Q., Jiang, C. F., Zhang, J. P., Zhang, X., Wang, H. Y., and Xie, W. F. (2014) Hepatocyte nuclear factor 4 α -nuclear factor- κ B feedback circuit modulates liver cancer progression. *Hepatology* **60**, 1607-1619
49. Takayama, K., Inamura, M., Kawabata, K., Katayama, K., Higuchi, M., Tashiro, K., Nonaka, A., Sakurai, F., Hayakawa, T., Furue, M. K., and Mizuguchi, H. (2012) Efficient generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells by HNF4 α transduction. *Mol Ther* **20**, 127-137
50. Sekiya, S., and Suzuki, A. (2011) Direct conversion of mouse fibroblasts to hepatocyte-like cells by defined factors. *Nature* **475**, 390-393
51. Lazarevich, N. L., Cheremnova, O. A., Varga, E. V., Ovchinnikov, D. A., Kudrjavitseva, E. I., Morozova, O. V., Fleishman, D. I., Engelhardt, N. V., and Duncan, S. A. (2004) Progression of HCC in mice is associated with a downregulation in the expression of hepatocyte nuclear factors. *Hepatology* **39**, 1038-1047
52. Yin, C., Lin, Y., Zhang, X., Chen, Y. X., Zeng, X., Yue, H. Y., Hou, J. L., Deng, X., Zhang, J. P., Han, Z. G., and Xie, W. F. (2008) Differentiation therapy of hepatocellular carcinoma in mice with recombinant adenovirus carrying hepatocyte nuclear factor-4 α gene. *Hepatology* **48**, 1528-1539
53. Kanazawa, T., Konno, A., Hashimoto, Y., and Kon, Y. (2009) Expression of hepatocyte nuclear factor 4 α in developing mice. *Anat Histol Embryol* **38**, 34-41
54. Kanazawa, T., Konno, A., Hashimoto, Y., and Kon, Y. (2010) Hepatocyte nuclear factor 4 α is related to survival of the condensed mesenchyme in the developing mouse kidney. *Dev Dyn* **239**, 1145-1154
55. 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. (2003) Expression and localization of P1 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF4 α) isoforms in human and rats. *Nucl Recept* **1**, 5
56. Gallegos, T. F., Martovetsky, G., Kouznetsova, V., Bush, K. T., and Nigam, S. K. (2012) Organic anion and cation SLC22 "drug" transporter (Oat1, Oat3, and Oct1) regulation during development and maturation of the kidney proximal tubule. *PLoS One* **7**, e40796
57. Chen, W. S., Manova, K., Weinstein, D. C., Duncan, S. A., Plump, A. S., Prezioso, V. R., Bachvarova, R. F., and Darnell, J. E. (1994) Disruption of the HNF-4 gene, expressed in visceral endoderm, leads to cell death in embryonic ectoderm and impaired gastrulation of mouse embryos. *Genes Dev* **8**, 2466-2477
58. Duncan, S. A., Nagy, A., and Chan, W. (1997) Murine gastrulation requires HNF-4 regulated gene expression in the visceral endoderm: tetraploid rescue of Hnf-4(-/-) embryos. *Development* **124**, 279-287
59. Hayhurst, G. P., Lee, Y. H., Lambert, G., Ward, J. M., and Gonzalez, F. J. (2001) Hepatocyte nuclear factor 4 α (nuclear receptor 2A1) is essential for maintenance of hepatic gene expression and lipid homeostasis. *Mol Cell Biol* **21**, 1393-1403
60. Miura, A., Yamagata, K., Kakei, M., Hatakeyama, H., Takahashi, N., Fukui, K., Nammo, T., Yoneda, K., Inoue, Y., Sladek, F. M., Magnuson, M. A., Kasai, H., Miyagawa, J., Gonzalez, F. J., and Shimomura, I. (2006) Hepatocyte nuclear factor-4 α is essential for glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic beta-cells. *J Biol Chem* **281**, 5246-5257
61. Ahn, S. H., Shah, Y. M., Inoue, J., Morimura, K., Kim, I., Yim, S., Lambert, G., Kurotani, R., Nagashima, K., Gonzalez, F. J., and Inoue, Y. (2008) Hepatocyte nuclear factor 4 α in the intestinal epithelial cells protects against inflammatory bowel disease. *Inflamm Bowel Dis* **14**, 908-920
62. Darsigny, M., Babeu, J. P., Dupuis, A. A., Furth, E. E., Seidman, E. G., Lévy, E., Verdu, E. F., Gendron, F. P., and Boudreau, F. (2009) Loss of hepatocyte-nuclear-factor-4 α affects colonic ion transport and causes chronic inflammation resembling inflammatory bowel disease in mice. *PLoS One* **4**, e7609
63. Inoue, Y., Peters, L. L., Yim, S. H., Inoue, J., and Gonzalez, F. J. (2006) Role of hepatocyte nuclear factor 4 α in control of blood coagulation factor gene expression. *J Mol Med (Berl)* **84**, 334-344
64. Inoue, Y., Yu, A. M., Yim, S. H., Ma, X., Krausz, K. W., Inoue, J., Xiang, C. C., Brownstein, M. J., Eggertsen, G., Björkhem, I., and Gonzalez, F. J. (2006) Regulation of bile acid biosynthesis

- by hepatocyte nuclear factor 4alpha. *J Lipid Res* **47**, 215-227
65. Drewes, T., Senkel, S., Holewa, B., and Ryffel, G. U. (1996) Human hepatocyte nuclear factor 4 isoforms are encoded by distinct and differentially expressed genes. *Mol Cell Biol* **16**, 925-931
 66. Plengvidhya, N., Antonellis, A., Wogan, L. T., Poleev, A., Borgschulze, M., Warram, J. H., Ryffel, G. U., Krolewski, A. S., and Doria, A. (1999) Hepatocyte nuclear factor-4gamma: cDNA sequence, gene organization, and mutation screening in early-onset autosomal-dominant type 2 diabetes. *Diabetes* **48**, 2099-2102
 67. Taraviras, S., Mantamadiotis, T., Dong-Si, T., Mincheva, A., Lichter, P., Drewes, T., Ryffel, G. U., Monaghan, A. P., and Schütz, G. (2000) Primary structure, chromosomal mapping, expression and transcriptional activity of murine hepatocyte nuclear factor 4gamma. *Biochim Biophys Acta* **1490**, 21-32
 68. Gerdin, A. K., Surve, V. V., Jönsson, M., Bjursell, M., Björkman, M., Edenro, A., Schuelke, M., Saad, A., Bjurström, S., Lundgren, E. J., Snaith, M., Fransson-Steen, R., Törnell, J., Berg, A. L., and Bohlooly-Y, M. (2006) Phenotypic screening of hepatocyte nuclear factor (HNF) 4-gamma receptor knockout mice. *Biochem Biophys Res Commun* **349**, 825-832
 69. Ozeki, T., Takahashi, Y., Kume, T., Nakayama, K., Yokoi, T., Nunoya, K., Hara, A., and Kamataki, T. (2001) Co-operative regulation of the transcription of human dihydrodiol dehydrogenase (DD)4/aldo-keto reductase (AKR)1C4 gene by hepatocyte nuclear factor (HNF)-4alpha/gamma and HNF-1alpha. *Biochem J* **355**, 537-544
 70. Okegawa, T., Ushio, K., Imai, M., Morimoto, M., and Hara, T. (2013) Orphan nuclear receptor HNF4G promotes bladder cancer growth and invasion through the regulation of the hyaluronan synthase 2 gene. *Oncogenesis* **2**, e58
 71. Sun, H., Tian, J., Xian, W., Xie, T., and Yang, X. (2015) miR-34a inhibits proliferation and invasion of bladder cancer cells by targeting orphan nuclear receptor HNF4G. *Dis Markers* **2015**, 879254
 72. Sousa, J. F., Nam, K. T., Petersen, C. P., Lee, H. J., Yang, H. K., Kim, W. H., and Goldenring, J. R. (2016) miR-30-HNF4 γ and miR-194-NR2F2 regulatory networks contribute to the upregulation of metaplasia markers in the stomach. *Gut* **65**, 914-924
 73. Litchfield, L. M., and Klinge, C. M. (2012) Multiple roles of COUP-TFII in cancer initiation and progression. *J Mol Endocrinol* **49**, R135-148
 74. Natoli, M., Leoni, B. D., D'Agnano, I., Zucco, F., and Felsani, A. (2012) Good Caco-2 cell culture practices. *Toxicol In Vitro* **26**, 1243-1246
 75. Ohana, R. F., Hurst, R., Vidugiriene, J., Slater, M. R., Wood, K. V., and Urh, M. (2011)

- HaloTag-based purification of functional human kinases from mammalian cells. *Protein Expr Purif* **76**, 154-164
76. Sakaguchi, M., Watanabe, M., Kinoshita, R., Kaku, H., Ueki, H., Futami, J., Murata, H., Inoue, Y., Li, S. A., Huang, P., Putranto, E. W., Ruma, I. M., Nasu, Y., Kumon, H., and Huh, N. H. (2014) Dramatic increase in expression of a transgene by insertion of promoters downstream of the cargo gene. *Mol Biotechnol* **56**, 621-630
 77. Lussier, C. R., Babeu, J. P., Auclair, B. A., Perreault, N., and Boudreau, F. (2008) Hepatocyte nuclear factor-4alpha promotes differentiation of intestinal epithelial cells in a coculture system. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **294**, G418-428
 78. Stegmann, A., Hansen, M., Wang, Y., Larsen, J. B., Lund, L. R., Ritié, L., Nicholson, J. K., Quistorff, B., Simon-Assmann, P., Troelsen, J. T., and Olsen, J. (2006) Metabolome, transcriptome, and bioinformatic cis-element analyses point to HNF-4 as a central regulator of gene expression during enterocyte differentiation. *Physiol Genomics* **27**, 141-155
 79. Pinto, M. (1983) Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biol. Cell* **47**, 323-330
 80. Daigo, K., Kawamura, T., Ohta, Y., Ohashi, R., Katayose, S., Tanaka, T., Aburatani, H., Naito, M., Kodama, T., Ihara, S., and Hamakubo, T. (2011) Proteomic analysis of native hepatocyte nuclear factor-4 α (HNF4 α) isoforms, phosphorylation status, and interactive cofactors. *J Biol Chem* **286**, 674-686
 81. Parviz, F., Matullo, C., Garrison, W. D., Savatski, L., Adamson, J. W., Ning, G., Kaestner, K. H., Rossi, J. M., Zaret, K. S., and Duncan, S. A. (2003) Hepatocyte nuclear factor 4alpha controls the development of a hepatic epithelium and liver morphogenesis. *Nat Genet* **34**, 292-296
 82. Gordon, N. (2003) Ornithine transcarbamylase deficiency: a urea cycle defect. *Eur J Paediatr Neurol* **7**, 115-121
 83. Green, V. J., Kokkotou, E., and Ladias, J. A. (1998) Critical structural elements and multitarget protein interactions of the transcriptional activator AF-1 of hepatocyte nuclear factor 4. *J Biol Chem* **273**, 29950-29957
 84. Iyemere, V. P., Davies, N. H., and Brownlee, G. G. (1998) The activation function 2 domain of hepatic nuclear factor 4 is regulated by a short C-terminal proline-rich repressor domain. *Nucleic Acids Res* **26**, 2098-2104
 85. Sladek, F. M., Ruse, M. D., Nepomuceno, L., Huang, S. M., and Stallcup, M. R. (1999) Modulation of transcriptional activation and coactivator interaction by a splicing variation in the F domain of nuclear receptor hepatocyte nuclear factor 4alpha1. *Mol Cell Biol* **19**, 6509-6522

86. Boyd, M., Bressendorff, S., Møller, J., Olsen, J., and Troelsen, J. T. (2009) Mapping of HNF4alpha target genes in intestinal epithelial cells. *BMC Gastroenterol* **9**, 68
87. Olsen, L., Bressendorff, S., Troelsen, J. T., and Olsen, J. (2005) Differentiation-dependent activation of the human intestinal alkaline phosphatase promoter by HNF-4 in intestinal cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G220-226
88. Farkas, A. E., Hilgarth, R. S., Capaldo, C. T., Gerner-Smidt, C., Powell, D. R., Vertino, P. M., Koval, M., Parkos, C. A., and Nusrat, A. (2015) HNF4 α regulates claudin-7 protein expression during intestinal epithelial differentiation. *Am J Pathol* **185**, 2206-2218
89. Sauvaget, D., Chauffeton, V., Citadelle, D., Chatelet, F. P., Cywiner-Golenzer, C., Chambaz, J., Pinçon-Raymond, M., Cardot, P., Le Beyec, J., and Ribeiro, A. (2002) Restriction of apolipoprotein A-IV gene expression to the intestine villus depends on a hormone-responsive element and parallels differential expression of the hepatic nuclear factor 4alpha and gamma isoforms. *J Biol Chem* **277**, 34540-34548
90. Li, X., Udager, A. M., Hu, C., Qiao, X. T., Richards, N., and Gumucio, D. L. (2009) Dynamic patterning at the pylorus: formation of an epithelial intestine-stomach boundary in late fetal life. *Dev Dyn* **238**, 3205-3217
91. Wu, F., Dassopoulos, T., Cope, L., Maitra, A., Brant, S. R., Harris, M. L., Bayless, T. M., Parmigiani, G., and Chakravarti, S. (2007) Genome-wide gene expression differences in Crohn's disease and ulcerative colitis from endoscopic pinch biopsies: insights into distinctive pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis* **13**, 807-821
92. Bueno-Hernández, N., Sánchez-Muñoz, F., Barreto-Zuñiga, R., Dominguez-López, A., and Yamamoto-Furusho, J. K. (2011) Expression of HNF4 γ is downregulated in patients with active ulcerative colitis (UC) compared to UC patients in remission and healthy controls. *Inflamm Bowel Dis* **17**, E91
93. Li, D., Duell, E. J., Yu, K., Risch, H. A., Olson, S. H., Kooperberg, C., Wolpin, B. M., Jiao, L., Dong, X., Wheeler, B., Arslan, A. A., Bueno-de-Mesquita, H. B., Fuchs, C. S., Gallinger, S., Gross, M., Hartge, P., Hoover, R. N., Holly, E. A., Jacobs, E. J., Klein, A. P., LaCroix, A., Mandelson, M. T., Petersen, G., Zheng, W., Agalliu, I., Albanes, D., Boutron-Ruault, M. C., Bracci, P. M., Buring, J. E., Canzian, F., Chang, K., Chanock, S. J., Cotterchio, M., Gaziano, J. M., Giovannucci, E. L., Goggins, M., Hallmans, G., Hankinson, S. E., Hoffman Bolton, J. A., Hunter, D. J., Hutchinson, A., Jacobs, K. B., Jenab, M., Khaw, K. T., Kraft, P., Krogh, V., Kurtz, R. C., McWilliams, R. R., Mendelsohn, J. B., Patel, A. V., Rabe, K. G., Riboli, E., Shu, X. O., Tjønneland, A., Tobias, G. S., Trichopoulos, D., Virtamo, J., Visvanathan, K., Watters, J., Yu, H.,

- Zeleniuch-Jacquotte, A., Amundadottir, L., and Stolzenberg-Solomon, R. Z. (2012) Pathway analysis of genome-wide association study data highlights pancreatic development genes as susceptibility factors for pancreatic cancer. *Carcinogenesis* **33**, 1384-1390
94. Xu, L., Hui, L., Wang, S., Gong, J., Jin, Y., Wang, Y., Ji, Y., Wu, X., Han, Z., and Hu, G. (2001) Expression profiling suggested a regulatory role of liver-enriched transcription factors in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* **61**, 3176-3181
95. Babeu, J. P., Darsigny, M., Lussier, C. R., and Boudreau, F. (2009) Hepatocyte nuclear factor 4alpha contributes to an intestinal epithelial phenotype in vitro and plays a partial role in mouse intestinal epithelium differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **297**, G124-134
96. Späth, G. F., and Weiss, M. C. (1997) Hepatocyte nuclear factor 4 expression overcomes repression of the hepatic phenotype in dedifferentiated hepatoma cells. *Mol Cell Biol* **17**, 1913-1922
97. Inoue, Y., Miyazaki, M., Tsuji, T., Sakaguchi, M., Fukaya, K., Huh, N. H., and Namba, M. (2001) Reactivation of liver-specific gene expression in an immortalized human hepatocyte cell line by introduction of the human HNF4alpha2 gene. *Int J Mol Med* **8**, 481-487
98. 安西尚彦 (2012) トランスポーター:腎臓からの全身制御を目指して, 日本小児腎臓病学会誌
99. Vallon, V., Platt, K. A., Cunard, R., Schroth, J., Whaley, J., Thomson, S. C., Koepsell, H., and Rieg, T. (2011) SGLT2 mediates glucose reabsorption in the early proximal tubule. *J Am Soc Nephrol* **22**, 104-112
100. Tümer, E., Bröer, A., Balkrishna, S., Jülich, T., and Bröer, S. (2013) Enterocyte-specific regulation of the apical nutrient transporter SLC6A19 (B(0)AT1) by transcriptional and epigenetic networks. *J Biol Chem* **288**, 33813-33823
101. Lin, L., Yee, S. W., Kim, R. B., and Giacomini, K. M. (2015) SLC transporters as therapeutic targets: emerging opportunities. *Nat Rev Drug Discov* **14**, 543-560
102. Alper, S. L. (2009) Molecular physiology and genetics of Na⁺-independent SLC4 anion exchangers. *J Exp Biol* **212**, 1672-1683
103. Fotiadis, D., Kanai, Y., and Palacín, M. (2013) The SLC3 and SLC7 families of amino acid transporters. *Mol Aspects Med* **34**, 139-158
104. Halestrap, A. P. (2013) The SLC16 gene family - structure, role and regulation in health and disease. *Mol Aspects Med* **34**, 337-349
105. Kerjaschki, D., and Farquhar, M. G. (1982) The pathogenic antigen of Heymann nephritis is a membrane glycoprotein of the renal proximal tubule brush border. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**,

5557-5561

106. Saito, A., Pietromonaco, S., Loo, A. K., and Farquhar, M. G. (1994) Complete cloning and sequencing of rat gp330/"megalin," a distinctive member of the low density lipoprotein receptor gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 9725-9729
107. Christensen, E. I., Verroust, P. J., and Nielsen, R. (2009) Receptor-mediated endocytosis in renal proximal tubule. *Pflugers Arch* **458**, 1039-1048
108. Leheste, J. R., Rolinski, B., Vorum, H., Hilpert, J., Nykjaer, A., Jacobsen, C., Aucouturier, P., Moskaug, J. O., Otto, A., Christensen, E. I., and Willnow, T. E. (1999) Megalin knockout mice as an animal model of low molecular weight proteinuria. *Am J Pathol* **155**, 1361-1370
109. Nykjaer, A., Dragun, D., Walther, D., Vorum, H., Jacobsen, C., Herz, J., Melsen, F., Christensen, E. I., and Willnow, T. E. (1999) An endocytic pathway essential for renal uptake and activation of the steroid 25-(OH) vitamin D3. *Cell* **96**, 507-515
110. Kantarci, S., Al-Gazali, L., Hill, R. S., Donnai, D., Black, G. C., Bieth, E., Chassaing, N., Lacombe, D., Devriendt, K., Teebi, A., Loscertales, M., Robson, C., Liu, T., MacLaughlin, D. T., Noonan, K. M., Russell, M. K., Walsh, C. A., Donahoe, P. K., and Pober, B. R. (2007) Mutations in LRP2, which encodes the multiligand receptor megalin, cause Donnai-Barrow and facio-oculo-acoustico-renal syndromes. *Nat Genet* **39**, 957-959
111. Kuwahara, S., Hosojima, M., Kaneko, R., Aoki, H., Nakano, D., Sasagawa, T., Kabasawa, H., Kaseda, R., Yasukawa, R., Ishikawa, T., Suzuki, A., Sato, H., Kageyama, S., Tanaka, T., Kitamura, N., Narita, I., Komatsu, M., Nishiyama, A., and Saito, A. (2016) Megalin-Mediated Tubuloglomerular Alterations in High-Fat Diet-Induced Kidney Disease. *J Am Soc Nephrol* **27**, 1996-2008
112. Cabezas, F., Lagos, J., Cespedes, C., Vio, C. P., Bronfman, M., and Marzolo, M. P. (2011) Megalin/LRP2 expression is induced by peroxisome proliferator-activated receptor -alpha and -gamma: implications for PPARs' roles in renal function. *PLoS One* **6**, e16794
113. Chamouton, J., and Latruffe, N. (2012) PPAR α /HNF4 α interplay on diversified responsive elements. Relevance in the regulation of liver peroxisomal fatty acid catabolism. *Curr Drug Metab* **13**, 1436-1453
114. Dongol, B., Shah, Y., Kim, I., Gonzalez, F. J., and Hunt, M. C. (2007) The acyl-CoA thioesterase I is regulated by PPAR α and HNF4 α via a distal response element in the promoter. *J Lipid Res* **48**, 1781-1791
115. Krey, G., Braissant, O., L'Horsset, F., Kalkhoven, E., Perroud, M., Parker, M. G., and Wahli, W. (1997) Fatty acids, eicosanoids, and hypolipidemic agents identified as ligands of peroxisome

- proliferator-activated receptors by coactivator-dependent receptor ligand assay. *Mol Endocrinol* **11**, 779-791
116. Pineda Torra, I., Jamshidi, Y., Flavell, D. M., Fruchart, J. C., and Staels, B. (2002) Characterization of the human PPARalpha promoter: identification of a functional nuclear receptor response element. *Mol Endocrinol* **16**, 1013-1028
117. Gonzalez, F. J. (2008) Regulation of hepatocyte nuclear factor 4 alpha-mediated transcription. *Drug Metab Pharmacokinet* **23**, 2-7
118. Grygiel-Górniak, B. (2014) Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications--a review. *Nutr J* **13**, 17
119. Delage-Mourroux, R., Martini, P. G., Choi, I., Kraichely, D. M., Hoeksema, J., and Katzenellenbogen, B. S. (2000) Analysis of estrogen receptor interaction with a repressor of estrogen receptor activity (REA) and the regulation of estrogen receptor transcriptional activity by REA. *J Biol Chem* **275**, 35848-35856
120. Docquier, A., Garcia, A., Savatier, J., Boulahtouf, A., Bonnet, S., Bellet, V., Busson, M., Margeat, E., Jalaguier, S., Royer, C., Balaguer, P., and Cavallès, V. (2013) Negative regulation of estrogen signaling by ER β and RIP140 in ovarian cancer cells. *Mol Endocrinol* **27**, 1429-1441

論文目録

関連論文

1. Shota Sasaki, Mizuho Urabe, Tsukasa Maeda, Junko Suzuki, Ryota Irie, Masanori Suzuki, Yasuhiro Tomaru, Masakiyo Sakaguchi, Frank J. Gonzalez, Yusuke Inoue (2018) Induction of Hepatic Metabolic Functions by a novel variant of hepatocyte nuclear factor 4 γ . *Molecular and Cellular Biology* **38** (24), e00213-18.
2. Shota Sasaki, Ayami Hara, Masakiyo Sakaguchi, Masaomi Nangaku, Yusuke Inoue, Hepatocyte nuclear factor 4 α regulates megalin expression in proximal tubular cells. *Biochemistry and Biophysics Reports* **17** 87-92, 2019.

参考論文

1. Aoi Morimoto, Mana Kannari, Yuichi Tsuchida, Shota Sasaki, Chinatsu Saito, Tsuyoshi Matsuta, Tsukasa Maeda, Megumi Akiyama, Takahiro Nakamura, Masakiyo Sakaguchi, Nobukazu Nameki, Frank J. Gonzalez, Yusuke Inoue (2017) An HNF4 α -microRNA-194/192 signaling axis maintains hepatic cell function. *Journal of Biological Chemistry* **292**, 10574–10585.
2. Shunsuke Matsuo, Masayuki Ogawa, Martina U. Muckenthaler, Yumiko Mizui, Shota Sasaki, Takafumi Fujimura, Masayuki Takizawa, Nagayuki Ariga, Hiroaki Ozaki, Masakiyo Sakaguchi, Frank J. Gonzalez, Yusuke Inoue (2015) Hepatocyte nuclear factor 4 α controls iron metabolism and regulates transferrin receptor 2 in mouse liver. *Journal of Biological Chemistry* **290**, 30855-30865.

学会発表

【ポスター発表 (国内学会)】

1. 佐々木翔太、浦部瑞穂、前田つかさ、鈴木淳子、入江亮太、阪口政清、Frank J. Gonzalez、井上裕介「新規 HNF4 γ バリエーションによる肝機能の誘導」第 41 回 日本分子生物学会 2018 年 11 月
2. 秋山萌、守本葵、神成真名、土田雄一、松田強志、齊藤千夏、佐々木翔太、前田つかさ、阪口政清、Frank J. Gonzalez、井上裕介「肝臓における miRNA を介した新規 HNF4 α ネットワークの解明」第 40 回 日本分子生物学会 2017 年 12 月
3. 浦部瑞穂、佐々木翔太、前田つかさ、鈴木淳子、入江亮太、阪口政清、Frank J. Gonzalez、井上裕介「核内受容体 HNF4 γ による肝がん細胞の再分化誘導」第 40 回 日本分子生物学会 2017 年 12 月
4. 佐々木翔太、浦部瑞穂、前田つかさ、鈴木淳子、入江亮太、阪口政清、Frank J. Gonzalez、井上裕介「肝臓における核内受容体 HNF4 γ の機能解析」第 24 回肝細胞研究会 2017 年 7 月
5. 佐々木翔太、浦部瑞穂、前田つかさ、鈴木淳子、入江亮太、阪口政清、Frank J. Gonzalez、井上裕介「核内受容体 HNF4 γ の機能解析」第 39 回 日本分子生物学会 2016 年 11 月
6. 秋山萌、守本葵、神成真名、土田雄一、松田強志、齊藤千夏、佐々木翔太、前田つかさ、阪口政清、Frank J. Gonzalez、井上裕介、「HNF4 α による miRNA を介した遺伝子発現制御機構の解析」第 39 回日本分子生物学会 2016 年 11 月
7. 佐々木翔太、前田つかさ、浦部瑞穂、鈴木淳子、入江亮太、阪口政清、Frank J. Gonzalez、井上裕介「HNF4 γ の転写活性化能の解析と相互作用タンパク質の探索」第 38 回 日本分子生物学会 2015 年 12 月
8. 守本葵、神成真名、土田雄一、松田強志、齊藤千夏、佐々木翔太、前田つかさ、阪口政清、行木信一、Frank J. Gonzalez、井上裕介「HNF4 α は miR-194/192 を介して肝細胞の脱分化を抑制する」第 38 回日本分子生物学会 2015 年 12 月

9. 佐々木翔太、前田つかさ、鈴木淳子、入江亮太、阪口政清、Frank J. Gonzalez、井上裕介 「HNF4 γ の機能解析」 平成 27 年度 日本生化学会関東支部例会 2015 年 6 月
10. 守本葵、神成真名、土田雄一、松田強志、齊藤千夏、佐々木翔太、前田つかさ、井上裕介 「miR-194/192 を介した新規 HNF4 α ネットワークの解明」 第 37 回 日本分子生物学会 2014 年 11 月
11. 佐々木翔太、前田つかさ、鈴木淳子、入江亮太、阪口政清、Frank J. Gonzalez、井上裕介 「肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスにおける HNF4 γ の機能解析」 第 37 回 日本分子生物学会 2014 年 11 月
12. 守本葵、神成真名、土田雄一、齊藤千夏、松田強志、前田つかさ、佐々木翔太、行木信一、井上裕介 「miR-194/192 を介した新規 HNF4 α ネットワークの解明」 第 16 回日本 RNA 学会 2014 年 11 月
13. 前田つかさ、佐々木翔太、鈴木淳子、入江亮太、外丸靖浩、鈴木正則、Frank J. Gonzalez、阪口政清、行木信一、井上裕介 「肝臓特異的 HNF4 α 欠損マウスにおける HNF4 γ の機能解析」 第 36 回日本分子生物学 2013 年 12 月

【ポスター発表 (国際学会)】

1. Shota Sasaki, Mizuho Urabe, Tsukasa Maeda, Junko Suzuki, Ryota Irie, Satoru Kakizaki, Frank J. Gonzalez, Yusuke Inoue “Induction of hepatocyte-specific gene expression by a novel nuclear receptor” 4th International Symposium of Gunma University Medical Innovation 2017 年 11 月
2. Shota Sasaki, “Application of hepatocyte nuclear factor 4 γ for establishment of differentiated hepatocytes” 4th International Conference on Pharmaceutical and Biomedical Engineering 2017 年 10 月
3. Megumi Akiyama, Aoi Morimoto, Mana Kannari, Yuichi Tsuchida, Tsuyoshi Matsuta, Chinatsu Saito, Shota Sasaki, Tsukasa Maeda, Frank J. Gonzalez, Yusuke Inoue “Positive Regulation of Hepatic miRNA by HNF4 α ” 3rd International Symposium of Gunma University Medical Innovation 2016 年 12 月

4. Aoi Morimoto, Mana Kannari, Yuichi Tsuchida, Tsuyoshi Matsuta, Chinatsu Saito, Shota Sasaki, Tsukasa Maeda, Frank J. Gonzalez, Yusuke Inoue “Hepatic HNF4 α cascade through modulation of miR-194/192” 2nd International Symposium of Gunma University Medical Innovation 2015年12月
5. Aoi Morimoto, Mana Kannari, Yuichi Tsuchida, Tsuyoshi Matsuta, Chinatsu Saito, Shota Sasaki, Tsukasa Maeda, Frank J. Gonzalez, Yusuke Inoue “Investigation of a novel HNF4 α network through miR-194/192” 1st International Symposium of Gunma University Medical Innovation 2014年12月
6. Tsukasa Maeda, Shota Sasaki, Junko Suzuki, Ryota Irie, Frank J. Gonzalez, Yusuke Inoue “Investigation of the role of hepatic HNF4 γ ” International Symposium on Homeostasis through Develo~~ment~~, Life, and Diseases 2014年11月