

【要約】

Identification of *HNF1A* and its downstream genes as
pivotal factors in hepatoblastoma development

(肝芽腫の進展に寄与する *HNF1A* および
その下流遺伝子の同定)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：菱木 知郎教授)

工藤 渉

【目的】 肝芽腫は小児肝悪性腫瘍の中で最も頻度の高い腫瘍である。シスプラチンを軸とした大量化学療法と手術を組み合わせた治療により肝芽腫全体の予後は大きく改善したが、予後不良症例が一部存在する。また、聴力障害や心毒性など、化学療法による副作用は長期的に患児の QOL を低下させる。予後不良症例に対して治療効果を発揮し、副作用を軽減しながらも治療効果を維持できる新たな治療戦略の確立が求められている。肝芽腫ゲノムの特徴としてほとんどの症例で *CTNGB1* 遺伝子に変異を認めるものの、遺伝子変異総数は他のがん種に比べて極端に少ない。こういった背景のもと、肝芽腫の発生及び悪性度の規定因子の一つとして、エピゲノム異常が重要であることが示唆されているが、その全容は未解明である。本研究は、肝芽腫のエピゲノム異常についてヒストン修飾解析を用いて解明し、新規治療標的を同定することを目的とした。

【方法】 肝芽腫細胞株（HUH6、HepG2）に対するヒストン修飾解析を ChIP-seq、遺伝子発現を RNA-seq を用いて解析した。正常肝組織のデータは公共データより取得した。H3K4me3 および H3K27ac が存在し転写開始点から 3kb 以内を活性化プロモーター、H3K27ac が存在し転写開始点から 3kb 以遠を活性化エンハンサーと定義した。標

的遺伝子の発現抑制は siRNA によるノックダウン、CRISPR-Cas9 システムによるノックアウトを用いた。HNF1A 結合領域の解析は ChIP-seq を用いて解析した。WST-8 を用いてシスプラチンの薬剤感受性試験を施行した。

【結果・考察】 ChIP-seq の結果から、正常肝組織、HUH6、HepG2 の活性化プロモーター、活性化エンハンサーを同定した。次に、正常肝組織と比較し、肝芽腫細胞特異的な活性化プロモーター、活性化エンハンサーを抽出した。また HUH6、HepG2 の RNA-seq を施行し、正常肝の RNA-seq と比較した。HUH6、HepG2 において、それぞれの特異的な活性化プロモーターに対応する遺伝子の過半数で有意な発現上昇を認めた。発現上昇遺伝子のパスウェイ解析では細胞外マトリックスが最上位であった。活性化プロモーターに結合し得る転写因子を Motif 解析により推定し、正常肝組織と比較し肝芽腫細胞株で最も遺伝子発現が高い転写因子として HNF1A を同定した。活性化エンハンサーにおける Motif 解析においても、HNF1A に関連した Motif は上位であった。また、Gene Expression Omnibus に登録されている複数の肝芽腫コホート（臨床検体）において、正常肝組織と比較し肝芽腫組織で *HNF1A* は有意に発現が上昇していた。siRNA を用いて

HNF1A をノックダウンすると、両肝芽腫細胞株の増殖が抑制された。HepG2 において、CRISPR-Cas9 システムにより *HNF1A* をノックアウトし RNA-seq を施行した。発現低下した遺伝子のパスウェイ解析では Metabolism、Cell cycle 関連の遺伝子が濃縮していた。HUH6、HepG2 において *HNF1A* に対する ChIP-seq を行い、ゲノム上での結合領域をそれぞれ抽出した。両細胞株ともにプロモーターやエンハンサーに幅広く分布していた。*HNF1A* がプロモーターに結合し、*HNF1A* ノックアウトで遺伝子発現が低下した遺伝子を、臨床検体での発現変動、シスプラチンの感受性データを用いてスクリーニングし、*DDC* が治療標的候補として抽出された。siRNA で *DDC* をノックダウンすると、肝芽腫細胞株のシスプラチン感受性が増加した。

【結論】 活性化ヒストン修飾とトランスクリプトームの統合解析により肝芽腫のエピゲノム状態を特徴付ける *HNF1A* を同定した。*HNF1A* は肝芽腫細胞の増殖に重要な転写因子で、細胞周期関連および代謝関連遺伝子の発現を制御し、がん促進的に機能していた。*HNF1A* および下流遺伝子は肝芽腫の治療標的として有望である可能性を見出した。