

# 博士論文審査報告書

## 論 文 題 目

上皮細胞を用いたスクリーニングによる新規がん遺伝子  
*HNF1B* の同定とその機能解析

Identification and functional analysis of a novel oncogene  
*HNF1B* by screening with epithelial cells

申 請 者

松井	貴香
Atsuka	MATSUI

生命医科学専攻 細胞情報学研究

2016年6月

## 1. 論文内容の要旨

発がんは多段階の過程を経るが、その過程にはさまざまな遺伝子の異常が起きる。約 30% の乳癌で 17q12-21 の領域に遺伝子のコピー数が増加する遺伝子増幅が見られる。この領域には発がんの責任遺伝子として *ERBB2* が同定されているが、同領域に含まれるその他の遺伝子の発がんにおける機能の解析は十分ではない。そこで本研究では、マウス不死化乳腺上皮細胞株である NMuMG を用いて、*ERBB2* と協調的に NMuMG 細胞をトランスフォームする活性をもつ遺伝子をスクリーニングし、同定した遺伝子の機能を解析することを目的とした。

まず、NMuMG 細胞が野生型 *ERBB2* ではトランスフォームせず、活性化型 *ERBB2* (*ERBB2VE*) によってトランスフォームすることを確認した。そこで、野生型 *ERBB2* 発現 NMuMG 細胞を用いて 17q12-21 領域に存在する 52 遺伝子を対象にスクリーニングを行い、ホメオボックス遺伝子 *HNF1B* を新規がん遺伝子候補として同定した。*HNF1B* は単独でもフォーカスやコロニーを形成したが、*ERBB2* と共発現するとトランスフォーム効率が上がり、*HNF1B* と *ERBB2* に協調性があることが示唆された。さらに、*HNF1B* のフォーカス形成能は DNA 結合活性依存的であることがわかった。

次に、浸潤活性を評価するため、ヒト乳腺上皮細胞株である MCF10A に *HNF1B* を導入したところ、EMT (上皮間葉移行) を引き起こし、浸潤能を獲得した。real-time PCR によって、*HNF1B* が多くの EMT 誘導遺伝子の発現を正に制御していることを見出し、ChIP アッセイによって、*HNF1B* が *ZEB2* と  $\Delta Np63$  のプロモーター領域に結合することを示唆する結果を得た。さらに、RNAi による *ZEB2* のノックダウンを行ったところ、*HNF1B* による EMT や浸潤能が抑制された。

*HNF1B* 自身には腫瘍形成能力はないものの、*ERBB2VE* による造腫瘍能と転移能を促進することを見いだした。また、尾静脈移植で形成される肺転移巣の増大は移植後 14 日目から差がついたことから、*HNF1B* が転移先器官でのコロニー形成に関与している可能性が示唆された。また、*HNF1B* 発現細胞は肺だけではなく、脳や骨への転移も確認された。

最後に、臨床データの解析によって、*HNF1B* 高発現群は低発現群より転移しやすい傾向にあることが示された。

本研究より、*HNF1B* が単独でトランスフォーミング活性、EMT 誘導能、浸潤能を有すること、*ERBB2* による足場非依存的増殖能、造腫瘍能、転移能を促進することが示された。その機構として、*HNF1B* が様々な EMT 誘導因子、特に *ZEB2* の発現を制御することを通してこれらの現象を引き起こす可能性が考えられた。

## 2. 論文結果

2016 年 3 月 31 日に行われた公聴会では、論文内容の説明と質疑応答が行われた。その

概要を以下に記載する。

1) 本研究の *ERBB2* をあらかじめ発現させた細胞を用いたクローニング法ではこれまでどのような作用をもつ遺伝子が取られたかとの問いに対し、*HNF1B* (本研究) や *RARA* (土井ら) のように *ERBB2* とは独立に EMT を誘導する遺伝子や、*GRB7* (斉藤ら) のように *ERBB2* のシグナルを促進するものが取られているとの説明があった。

2) どのような機能あるいは作用を付与する遺伝子が動けば、*ERBB2* の過剰発現のもとで悪性化が進むのかとの質問に対し、*ERBB2* の増殖促進能に加え、*HNF1B* のように EMT を誘導する因子などが発現することによって、悪性化する可能性があげられた。

3) *HNF1B* の発現により、*ERBB2*VE (活性化型) のみでタンパク質量とリン酸化が亢進していることの理由が問われた。これに対し、分解されやすい活性型のみの分解に働く遺伝子の発現に対して *HNF1B* が関与している可能性があるとの説明があった。

4) *HNF1B* の下流で *p63* が機能する可能性を検証する実験において、E-cadherin 等の発現だけでなくフォーカスアッセイ等で表現型を見るべきだったのではないかとの指摘があった。これに対して、*p63* の発現抑制は MCF10A 細胞で観察されたが、NMuMG 細胞では観察されなかったこと、また、EMT が必ずしもフォーカス形成に相関しないため (Kochi *et al.*, unpublished data)、フォーカス形成については検討しなかったとの説明があった。

5) 図 16 の ChIP アッセイでは、 $\beta$  アクチン遺伝子 (陰性対照遺伝子) においても FLAG 抗体により免疫沈降された DNA がコントロール IgG に比べて増加傾向にある点が指摘されたが、実験は  $n=3$  で行って統計的に有意差はなかったとの説明があった。

6) ChIP アッセイでは *p63* と *ZEB2* に結合配列の候補を見いだしたが、この配列の重要性を示すにはどんな実験が考えられるかとの質問があった。これに対し、転写制御領域を用いての転写活性のアッセイ系が考えられるとの説明があった。

7) *STAT3* の活性化について、NMuMG が活性化 *STAT3* でトランスフォームするかをまず調べるべきではなかったかとの指摘があった。これに対し、活性化 *STAT3* の検討も行っていたが、先に *STAT3* のリン酸化阻害剤を用いた実験によって *STAT3* の関与が否定される結果が得られたため、この実験を断念したとの説明があった。

8) *ERBB2* は 30% の乳癌で増幅が見られるとのことだが、*HNF1B* の増幅はどの程度の頻度かとの質問に対して、*HNF1B* は当該増幅領域 (アンプリコン) 辺縁に位置しており、個々のがんにおける増幅領域は異なるために、30% よりも低くなるとの説明があった。

9) 図 6 から *HNF1B* と *ERBB2* は協調してがん化すると判断してよいので、最終版で文言を修正した。

10) *ZEB2* ノックダウンの実験 (公聴会版の論文には掲載していない) を載せたほうがよいとのコメントがあり、最終版に掲載した。

- 11) *HNF1B* 発現細胞の転移におけるリンパ管と血管の乳癌転移への関与についての議論があった。ヒト乳癌では切除手術の際に周辺リンパ節の廓清が広く行われていることから考えて、リンパ管転移が多くを占めているのではないかとのコメントがあった。
- 12) 転移巣で増殖を促進する可能性に加え、血管外浸潤・生着の段階での促進の可能性もあるとのコメントがあった。
- 13) t-test によりソフトアガーアッセイの有意差検定を行っているが、one-way ANOVA を用いるべきではないかとの指摘があった (one-way ANOVA でも  $p < 0.01$  となった)。
- 14) p63 と EMT との関連について着想した理由について質問があった。これに対し、本研究で用いた MCF10A 細胞において *p63 $\alpha$* 、*p63 $\beta$*  の発現抑制により EMT が誘導されるとの論文報告があったためとの説明があった。
- 15) 図 1 3 には p63 の TA タイプの標的も含まれているのではないかと、とのコメントがあり、 $\Delta N$  タイプの標的遺伝子の記述を加えた。
- 16) TGF $\beta$  から SMAD のリン酸化を介して *snail* の発現誘導が起きる EMT 経路について、*HNF1B* の関与を検討したのかとの質問があったが、この経路は検討していないとの説明があった。
- 17) モデル図 (図 2 5) には自分が明らかにした経路を実線とし、その他は点線として対比すべきことが指摘され、最終版に反映させた。

以上の研究内容の説明と質疑応答を通して、申請者が研究の意義と目的を理解し、本学問領域の十分な学識と考察力を備えていると判断された。本研究成果は転写因子 *HNF1B* に造腫瘍性と転移促進能を見いだした初めての報告であり、主査および副査は博士 (理学) の学位論文として相応しいと判断した。

2016 年 4 月

主査 早稲田大学教授 理学博士 東京大学 仙波憲太郎

早稲田大学教授 博士 (医学) 慶応義塾大学 合田亘人

早稲田大学客員准教授 博士 (理学) 東京大学 大木理恵子  
 国立がん研究センター研究所 主任研究員