

GRWD1のがん遺伝子としての機能の発見および臨床的意義の解明を目指した大規模臨床データベース解析

嘉山, 皓太

<https://hdl.handle.net/2324/7182407>

出版情報 : Kyushu University, 2023, 博士 (創薬科学), 課程博士
バージョン :

権利関係 : Public access to the fulltext file is restricted for unavoidable reason (3)



氏 名 : 嘉山 皓太

論文題名 : GRWD1 のがん遺伝子としての機能の発見および臨床的意義の解明
を目指した大規模臨床データベース解析

区 分 : 甲

論 文 内 容 の 要 旨

GRWD1 は、DNA 複製開始制御に重要な Cdt1 の新規結合タンパク質として同定され、ヒストンシャペロンとして MCM loading を促進することが明らかになっている。また、GRWD1 がリボソーム生合成やユビキチン化制御へ関与する可能性が示されている。以上の知見から、GRWD1 が未知の機能を持つことが予測され、マス解析による GRWD1 新規結合タンパク質の探索が行われた。その結果、核小体ストレス応答時に p53 安定化を誘導するリボソームタンパク質である RPL11 が同定された。核小体ストレスとは、低用量アクチノマイシン D 処理や低栄養状態時に核小体が崩壊し、RPL11 等が核質へと放出されることで p53 経路を活性化させる、細胞の恒常性維持に重要なストレス応答である。RPL11 はリボソームの構成因子の一つであり、核小体ストレス時にユビキチンリガーゼ MDM2 の酸性ドメイン近傍に結合することでその機能を抑制し、p53 の安定化に寄与している。よって、がん細胞で過剰発現していることが知られ酸性ドメインを持つ GRWD1 が、RPL11 と MDM2 の結合を競合的に阻害することで核小体ストレス時の p53 誘導に抑制的に働くという作業仮説のもと解析を進めた。

まずは免疫沈降実験等によって GRWD1-RPL11 が *in vivo*、*in vitro* において結合していることを明らかにした。また、GRWD1 を発現抑制した後に低用量アクチノマイシン D 処理により p53 経路の活性化を誘導したところ、コントロールの細胞と比べて p53 量の上昇が観察された。逆に、GRWD1 の過剰発現は p53 量の上昇を阻害した。更に、GRWD1 の p53 誘導に対する抑制効果は、プロテアソーム阻害剤により回復することがわかった。また、シクロヘキシミドを用いて p53 の半減期を測定すると、GRWD1 を発現抑制した細胞において、p53 の半減期が延長していた。これらの結果から、GRWD1 が p53 の安定性を負に制御していることが示唆された。さらなる検討の結果、GRWD1 は RPL11 と MDM2 の結合を競合的に阻害し、RPL11 による p53 の安定化に対し抑制的に働くことも確認された。また、p53 に対する GRWD1 の抑制的効果は、RPL11 による MDM2 のユビキチンリガーゼ活性抑制の解除によることが示された。GRWD1 のがん化への寄与を調べるため、GRWD1 とがん遺伝子である HPV(ヒトパピローマウイルス)16 E7 および活性型 KRas を安定発現させた正常線維芽細胞を樹立し、軟寒天コロニー形成試験を行った。その結果、E7,KRas,GRWD1 発現が E7,KRas 発現よりも細胞の足場非依存性増殖を促進することが明らかとなった。また、これらの細胞を用いてヌードマウスにおける腫瘍形成試験を行ったところ、GRWD1 発現細胞の腫瘍形成能が促進されていることがわかった。以上の結果

から、GRWD1 は p53 に対する抑制的機能を持つがん遺伝子であることが示唆された。

GRWD1 のがん遺伝子様機能が、臨床レベルにおいてがん患者の予後にどのように関係するのか、更には GRWD1 ががん細胞において過剰発現するメカニズムを調べることは、その臨床的意義の解明のために重要である。そこでまずは、臨床検体のデータベースであるがんゲノムアトラス(TCGA)の情報を用いて、がん患者の予後と GRWD1 の発現量の相関を網羅的に解析した。GRWD1 と類似した p53 に対する抑制的な機能が報告されている PICT1 および SPIN1 についても同様に解析を行った。その結果、GRWD1 の高発現は p53 野生型の低悪性度神経膠腫、皮膚黒色腫および腎明細胞がん患者の予後不良と相関があることが示された。PICT および SPIN1 ではそのような相関は認められず、GRWD1 が臨床的にもがん化への寄与が強い重要な因子であることが示唆された。

次に、がんにおける GRWD1 の発現制御機構の解明のために、これら 3 つのがん種における GRWD1 遺伝子のコピー数変化と発現量の関係を調査した。その結果、GRWD1 遺伝子増幅または欠失が GRWD1 の発現量と有意に相関していることが明らかになった。また、がん患者の予後との相関はないものの、GRWD1 の腫瘍組織での発現が正常組織に比べて高いことが報告されている結腸腺癌、多形膠芽腫、膵臓腺癌、胃腺癌、精巣胚細胞腫瘍でも同様の結果が確認された。このことから、GRWD1 の発現量制御には、GRWD1 遺伝子のコピー数変化が関係していることが示唆された。

一方、ほとんどのがん種では GRWD1 のコピー数が正常な患者数が多く、低悪性度神経膠腫、皮膚黒色腫および腎明細胞がん患者においても、コピー数が正常な患者群のみでも GRWD1 高発現と予後不良に相関関係があることが示された。この結果からコピー数変化以外のメカニズムによって GRWD1 の発現制御が行われている可能性も検討し、まずは転写に着目して解析を行った。GRWD1 のプロモーター領域に結合配列をもつ転写因子を探索し、それらの転写因子と GRWD1 の相関関係を調査したところ、複数のがん種にて共通して GRWD1 の発現量と正または負の相関関係を持つ転写因子を同定することができた。また、面白いことに GRWD1 が抑制的に制御する p53 もその中に含まれていた。このことから、GRWD1 発現制御には、転写因子の発現制御も関与していることが示唆された。

本研究によって GRWD1 が RPL11 との相互作用を介して p53 に対して抑制的に働き、腫瘍形成を促進する重要ながん遺伝子であることが明らかとなった。また、その過剰発現は GRWD1 遺伝子座を含む遺伝子領域の増幅や転写因子の量的変化などの要因によって引き起こされていることが示唆された。特定のがん種においては GRWD1 は予後決定因子となる可能性もあることから、GRWD1 が創薬ターゲットとなることは勿論、がん種、GRWD1 遺伝子のコピー数変化および制御に関する転写因子の情報等を用いたオーダーメイド治療の設計にも本研究内容は応用できる可能性がある。