

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)

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

医薬細胞生化学分野 3PS19001E 嘉山 皓太

第 1 部 新規がん遺伝子 GRWD1 の発見

GRWD1(Glutamate rich WD repeat containing 1)は新たな DNA 複製開始制御因子として当研究室にて同定された。リボソーム生合成やユビキチン化制御への関与も示されており、未知の機能を持つことが予測されていたことから、更なる機能解明を目的にマス解析による GRWD1 新規結合タンパク質の探索が行われた。同定された GRWD1 新規結合タンパク質の内、リボソームタンパク質 RPL11(Ribosomal Protein Large 11)に着目した。RPL11 はリボソーム生合成障害等に起因する核小体ストレス応答時にユビキチンリガーゼである MDM2(Mouse Double Minute 2)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。解析の結果、MDM2 同様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、核小体ストレス応答時の RPL11 による p53 安定化に対して抑制的に働くことが示された。また、その p53 に対する抑制的効果は 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。また、がん細胞で過剰発現していることが知られる GRWD1 のがん化への寄与を調べたところ、ヒトパピローマウイルスである E7 と活性化型変異体である KRAS を組み合わせて発現させた際、GRWD1 はヒト正常線維芽細胞を悪性化へと導くことを軟寒天コロニー形成試験およびヌードマウスを用いた腫瘍形成試験にて明らかにした。本研究結果は、EMBO Reports 誌にて論文発表している (発表論文 1)。

第 2 部 新規がん遺伝子 GRWD1 の臨床的意義解明を目指した大規模データベース解析

【序論】

第 2 部では GRWD1 の臨床的意義解明を目的として、多様ながん種の網羅的遺伝子解析データを集約した公共データベースである TCGA(The Cancer Genome Atlas)を用いて、様々ながん種における GRWD1 の発現量と予後の相関やがんにおける GRWD1 の発現メカニズムを解析することとした。本データベースは、現在 33 のがん種かつ 11000 例を超える症例の遺伝子発現量、変異解析および予後データ等が集約されており、新規治療ターゲットの発見や特定のがん特異的な遺伝子変異同定を目的に公開されている。また、がん化への寄与を比較する因子として、GRWD1 と同様に RPL11-MDM2-p53 経路を介して p53 を負に制御することが知られている PICT1(Protein Interacting with Carboxyl Terminus 1)や SPIN1(Spindin 1)についてもその発現量と患者の予後がどのように相関するのか解析することとした。

【方法】

・ 遺伝子発現量とがん患者の予後の相関解析

cBioPortal for cancer genomics (<http://www.cbioportal.org/public-portal/>)から遺伝子発現プロフィール、生存期間データ、TP53 遺伝子の変異の有無の情報を得た。GRWD1、PICT1、SPIN1 の発現レ

ベルの平均値を算出し、平均値以上の群を高発現群、平均値以下の群を低発現群とした。生存曲線は Kaplan-Meier 法を用いて描き、TP53 遺伝子の変異の有無でデータを類別した後、それぞれ各因子の高発現群/低発現群に分けて log-rank test で 2 群の差を(p 値)を検出した。このとき、Benjamini-Hochberg(BH)法によって p 値の偽陽性率(FDR)を補正し、得られた値(q 値)が 0.05 未満の場合を有意差ありと評価した。生存曲線の描画および統計値の算出は、R (<http://cran.r-project.org>)の「survival」パッケージを用いて行った。

・GRWD1 の発現量と発現が相関する遺伝子解析

cBioPortal の「Co-Expression」機能を用いて GRWD1 と発現量が相関する遺伝子一覧を取得した。データの中には、GRWD1 と発現が相関する因子をスピアマンの順位相関係数を用いて示したもの (Spearman's Correlation)、該当因子名(Correlated Gene)、該当因子のコードされている染色体領域 (Cytoband)が含まれる。

・遺伝子コピー数と発現量の相関解析

上述の機能を用いて、遺伝子発現プロファイルおよびコピー数変異の情報を取得した。GRWD1 遺伝子のコピー数により遺伝子増幅が生じている患者群は Gain(>2)、正常なコピー数の患者群は Diploid(=2)、遺伝子欠損が生じている患者群は Deletion(<2)として分類した。その後、各患者群における GRWD1 の mRNA 発現量をプロットした。各群の遺伝子発現量の差は Mann-Whitney の u 検定によって検出し、 $p < 0.05$ を有意として評価した。

・TFBIND を用いた GRWD1 プロモーターに結合する転写因子の探索

TFBIND(<https://tfbind.hgc.jp/>)に GRWD1 の転写開始点から上流 1.2kbp の配列を入力し、配列の相同性を示す値である Similarity が 0.8 以上の結合コンセンサス配列を有する転写因子を同定した。

【結果】

・GRWD1 の高発現は複数のがん種において予後不良と相関しており、類似機能が知られる SPIN1 および PICT1 では、GRWD1 で認められたような予後不良との相関は認められない

TCGA を用いて GRWD1 の発現量とがん患者の予後の相関関係を網羅的に解析した。計 30 データセットを解析した結果、低悪性度神経膠腫(Brain Lower Grade Glioma：以下 LGG)、皮膚黒色腫(Skin Cutaneous Melanoma：以下 SKCM)および腎明細胞がん(Kidney Renal Clear Cell Carcinoma：以下 KIRC)の p53 野生型患者群において、GRWD1 の高発現が予後の不良と相関があることが示された (図 1)。

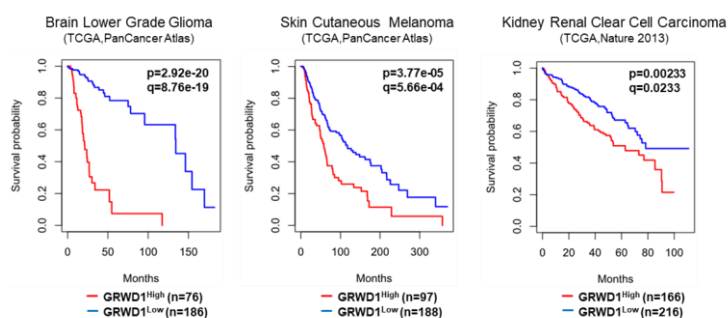


図1.GRWD1の高発現は複数のp53野生型のがん種において予後不良と相関している

また、GRWD1 のがん患者の予後への寄与を比較するために、他の研究グループにより GRWD1 と同様に RPL11 を介

して p53 抑制的に働くことが報告されている PICT1 および SPIN1 の発現量と予後の相関についても図 1 と同様な方法にて解析することにした。各因子の高発現と予後不良に相関がある場合は赤色、高発現と予後良好に相関が見られた場合を緑色でプロットしている (図 2)。結果を見ると、p53 野生型患者群

において PICT1 あるいは SPIN1 の高発現が予後不良と相関しているがん種は認められなかった。よって、LGG、SKCM および KIRC の p53 野生型患者群での GRWD1 の高発現と予後不良との相関が認められた結果と比べると、これら PICT1 および SPIN1 のヒトがんにおける予後不良への寄与は小さいことが推測される。

・GRWD1 の高発現は GRWD1 遺伝子座を含む染色体領域の増幅によって引き起こされる

次に、GRWD1 ががんで高発現しているメカニズムを調べるため、LGG、SKCM、KIRC において、GRWD1 の発現量と発現が相関している遺伝子を調べた。その結果、特に LGG や SKCM では 19 番染色体の長腕 13 番目の領域にコードされる因子が多く同定され、これらの因子は GRWD1 の発現と正の相関があった。GRWD1 遺伝子座も 19 番染色体の長腕 13 番目の領域にあることから、これらのがんでは、GRWD1 遺伝子座を含む染色体領域が増幅したことで、GRWD1 の高発現が引き起こされたのではないかと仮説を立て、LGG、SKCM、KIRC における GRWD1 遺伝子のコピー数と GRWD1 の発現量の関係について調べた (図 3)。その結果、これら 3 つのがん種において、GRWD1 遺伝子のコピー数が正常ながんに比べ、増幅している群で GRWD1 の mRNA 発現量が有意に増加していることが明らかとなった。

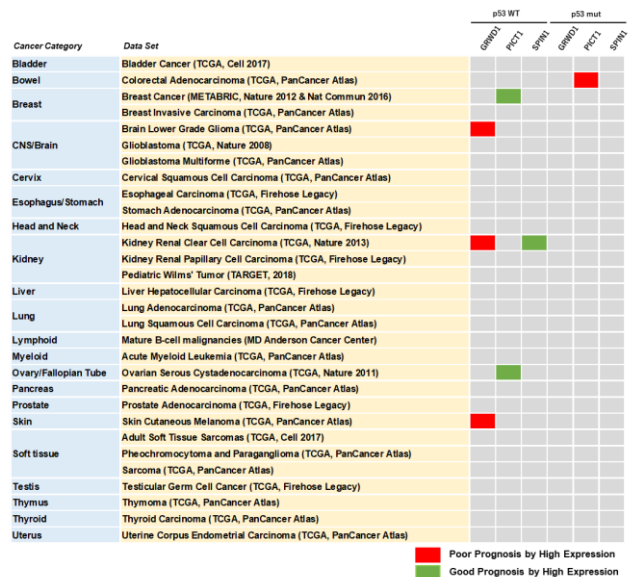


図2.SPIN1やPICT1ではGRWD1で認められたp53野生型患者群での予後不良との相関は認められない

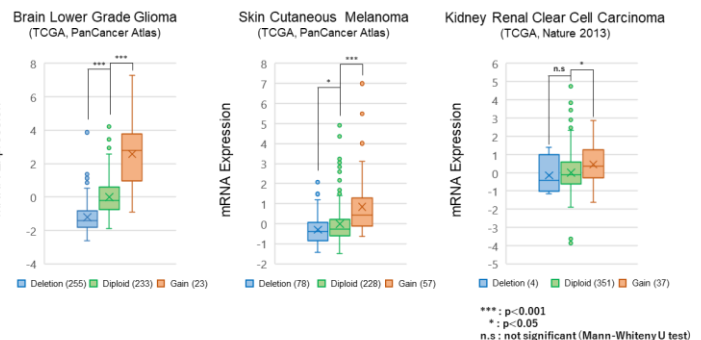


図3.GRWD1遺伝子のコピー数増加によりGRWD1発現量は増加する

・GRWD1 遺伝子コピー数が正常な p53 野生型患者群においても、いくつかのがんでは GRWD1 の高発現が予後不良と相関している

これまで GRWD1 遺伝子のコピー数変化により GRWD1 の高発現が引き起こされていることが示唆された。しかし、遺伝子のコピー数変化以外の要因により GRWD1 の高発現とそれによる予後不良への影響が引き起こされている可能性は否定できないため、遺伝子のコピー数が正常な患者群における GRWD1 の高発現の予後への影響を調べることにした。図 1 で用いたデータセットから GRWD1 遺伝子の

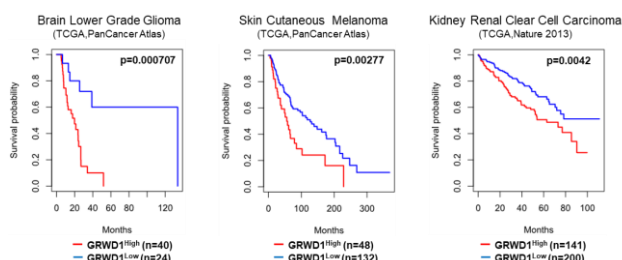


図4.GRWD1遺伝子のコピー数が正常なp53野生型患者群においても、GRWD1の高発現が予後不良と相関する

のコピー数が正常(Diploid)な患者群のデータのみを用いて、GRWD1 の発現量と予後の相関解析を行った(図 4)。その結果、LGG、SKCM および KIRC において、遺伝子コピー数が正常な p53 野生型患者群においても、GRWD1 の高発現が予後不良に寄与している可能性が示唆された。

・遺伝子のコピー数が正常ながん患者群において、いくつかの転写因子が GRWD1 の過剰発現を誘導している可能性がある

図 4 の結果から、GRWD1 遺伝子のコピー数が正常な患者群においても、GRWD1 の高発現によって予後不良への影響がある可能性が示唆された。このことから、GRWD1 遺伝子増幅以外の機構が GRWD1 高発現に寄与している可能性があると考え、転写に着目した。そこで、GRWD1 の発現を制御する転写因子を、転写因子結合領域検索プログラムである TFBIND を用いて探索した。これらの転写因子について、これまでの解析で用いた LGG、SKCM、KIRC の 3 つのがん種に加え、他の研究グループによって

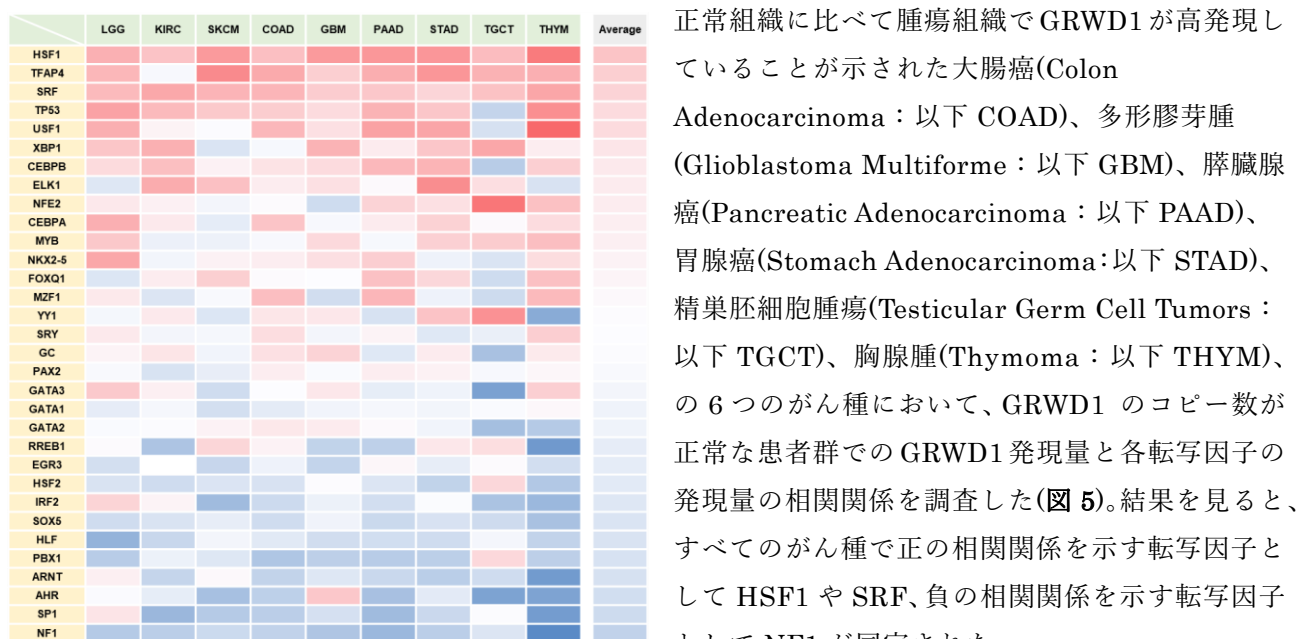


図5.いくつかの転写因子がGRWD1の過剰発現を誘導している可能性がある

【考察】

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、p53 変異の有無、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。

【発表論文】

1. Kayama K., et al. (2017) GRWD1 negatively regulates p53 via the RPL11-MDM2 pathway and promotes tumorigenesis. *EMBO Rep.*, 18: 123-127.
2. Takafuji T., Kayama K., et al. (2017) GRWD1, a new player among oncogenesis related ribosomal/nucleolar proteins. *Cell Cycle*, 16: 1397-1403.
3. Watanabe S., Fujiyama H., Takafuji T., Kayama K., et al. (2018) Glutamate-rich WD40 repeat containing 1 regulates ribosomal protein L23 levels via the ubiquitin proteasome system. *Journal of Cell Science*, 131: jcs213009.