

学位論文

in vitro および *in silico* 解析を組み合わせた
p53 経路を介するがん生存因子の単離技術
の開発

2018 年 9 月

鹿児島大学大学院 理工学研究科

博士後期課程 システム情報科学専攻

上條 陽平

目次

要旨.....	1
第 1 章 研究背景	2
1-1. がん抑制遺伝子 <i>TP53</i>	2
1-2. バイオインフォマティクスのがん研究への応用	5
1-3. 研究の目的.....	6
第 2 章 shRNA ライブラリーを用いた p53 制御遺伝子のスクリーニング	7
2-1. 小序論	7
2-2. 材料と方法.....	9
2-2-1. 細胞培養.....	9
2-2-2. shRNA ライブラリーのトランスフェクションに用いるレンチウイルスの作製.....	9
2-2-3. U2OS 細胞へのレンチウイルス感染効率 (Multiplicity of infection, MOI) の検討.....	9
2-2-4. ActD 50%阻害濃度 (50% inhibitory concentration, IC ₅₀) の検討.....	11
2-2-5. shRNA ライブラリー導入と ActD によるアポトーシスの誘導.....	11
2-2-6. ハイスループットシーケンシングによる shRNA 配列の解析.....	11
2-2-7. 候補 shRNA が標的とする遺伝子の機能解析.....	11
2-3. 結果と考察.....	11
2-3-1. MOI 測定結果とレンチウイルス感染条件.....	11
2-3-2. ActD IC ₅₀ の検討.....	12
2-3-3. ActD 処理群とコントロール群における shRNA 挿入頻度の正規化.....	13
2-3-4. ActD 処理群と無刺激群における shRNA 挿入頻度の検討.....	16
2-3-5. 候補 shRNA が標的とする遺伝子の機能解析結果.....	17
2-4. 小括.....	19
第 3 章 バイオインフォマティクス解析技術を用いたヒト大腸がん検体の生存時間解析による p53 経路関連遺伝子の同定手法の確立とその評価.....	20
3-1. 小序論	20
3-2. 材料と方法.....	20
3-2-1. ヒト大腸がん検体を用いた DNA マイクロアレイデータの取得.....	20
3-2-2. MAS5.0 アルゴリズムを用いたシグナル強度変換と Quality Control 計算.....	21
3-2-3. ヒト大腸がん検体の生存時間解析	22
3-2-4. 生存時間解析結果と shRNA ライブラリースクリーニング結果との統合.....	22
3-2-5. shRNA ライブラリースクリーニングと生存時間解析を組み合わせた p53 経路関連遺伝子の抽出と機能解析.....	25

3-3. 結果と考察.....	25
3-3-1. 大腸がん検体の遺伝子発現解析と QC の検討.....	25
3-3-2. 大腸がん検体の生存時間解析.....	25
3-3-3. log rank 検定結果と shRNA ライブラリースクリーニング結果との統合.....	25
3-3-4. ActD 感受性とがん患者の生存予後に寄与する遺伝子群の機能解析.....	62
3-4. 小括.....	63
第 4 章 結語.....	64
参考論文.....	66
謝辞.....	71

要旨

本論文は、約 5,000 遺伝子を標的とする short hairpin RNA (shRNA) ライブラリーを用いた *in vitro* な手法とデータベースを利用した *in silico* な手法を組み合わせ、がん抑制機構である p53 経路を介したがん生存因子を探索する方法についてまとめたものである。

ヒト骨肉腫細胞株 U2OS に shRNA ライブラリーを導入して遺伝子の発現を抑制し、アクチノマイシン D (Actinomycin D, ActD) を用いてアポトーシスを誘導した。ActD 感受性および耐性遺伝子を、遺伝子抑制による細胞の生存性の変化を指標にスクリーニングした結果、ActD 感受性遺伝子として *TP53* を含む 161 遺伝子、ActD 耐性遺伝子として 161 遺伝子が選択された。これらの遺伝子には、薬剤に対する反応性や DNA 障害への応答、細胞周期、DNA 修復といった、p53 経路との関連が考えられる機能を持つ遺伝子が含まれており、スクリーニングによって選択された遺伝子に、p53 経路の制御遺伝子や p53 の標的遺伝子が含まれることが示唆された。

Gene Expression Omnibus から取得した p53 野生型大腸がん患者の遺伝子発現プロファイルを解析し、遺伝子発現が大腸がん患者の生存予後に影響する 5974 遺伝子を見出した。これらの遺伝子と、スクリーニングで選択された遺伝子では、ActD 感受性の 161 遺伝子のうち 43 遺伝子、ActD 耐性の 161 遺伝子のうち 47 遺伝子が共通することが判明した。これらの遺伝子が p53 経路に依存してがん患者の生存予後に影響するならば、p53 変異型の大腸がん患者の生存予後への影響は見られなくなると予想された。また、ActD 感受性遺伝子の場合、遺伝子が高発現の患者は予後良好であり、ActD 耐性遺伝子の場合、遺伝子が高発現の患者は予後不調であると考え、生存性の傾向を検討した。その結果、ActD 感受性の 43 遺伝子のうち 7 遺伝子、ActD 耐性の 47 遺伝子のうち 33 遺伝子が、p53 変異型大腸がん患者では生存予後に影響しないと見出された。これらの遺伝子は細胞の生存性、細胞周期チェックポイント、薬剤耐性などの機能を有することが示唆され、本手法によって選択された遺伝子群には p53 経路を介したがん患者の生存因子が含まれることが示唆された。

shRNA ライブラリースクリーニングとバイオインフォマティクスを組み合わせで選択された 40 遺伝子には、p53 の制御との関連が報告されている *CCNB1*¹⁾, *ANKHD1*²⁾, *NCOA3*³⁾, *SIPAI*⁴⁾, *IKBKB*⁵⁾, *LITAF*⁶⁾ が含まれていた。また、がん患者の生存因子として報告されている *NCOA3*^{7,8)}, *HOXA1*⁹⁾, *FOLR1*¹⁰⁾, *SOCS1*¹¹⁾ および *PI4KA*¹²⁾ も選択されていた。特に *NCOA3* は、発現が抑制されると p53 が安定化し³⁾、がん患者において発現が高い場合において予後不良であることが報告されていた^{7,8)}。以上のことから本論文では約 5,000 遺伝子を標的とする shRNA ライブラリーを用いたスクリーニングとバイオインフォマティクスによる解析を組み合わせることで、p53 経路で機能して予後と関連する新規遺伝子を探索できる可能性を示した。

第1章 研究背景

1-1. がん抑制遺伝子 TP53

細胞のがん化は、正常細胞の遺伝子に変異が生じ、正常な機能を失うことで起こる。細胞のがん化を抑制する主要な遺伝子のひとつに p53 タンパク質をコードする TP53 がある。p53 は、アポトーシスを誘導する *BAX*¹³⁾や *PUMA*¹⁴⁾、細胞周期の停止を誘導する *p21*¹⁵⁾、*14-3-3σ*¹⁶⁾、DNA 修復を誘導する *GADD45*^{17,18)}等の遺伝子の転写を促す。細胞が、放射線や薬剤による DNA 損傷や RNA の合成障害¹⁹⁻²¹⁾、がん遺伝子による発がんストレス²²⁾、栄養飢餓²³⁾等のストレスに曝されると、p53 によって細胞周期の停止やアポトーシスが誘導され、がん細胞は生体から除去される。以上のような p53 を中心とした遺伝子群による異常細胞の修復・除去機構を、p53 経路という (図 1-1)。

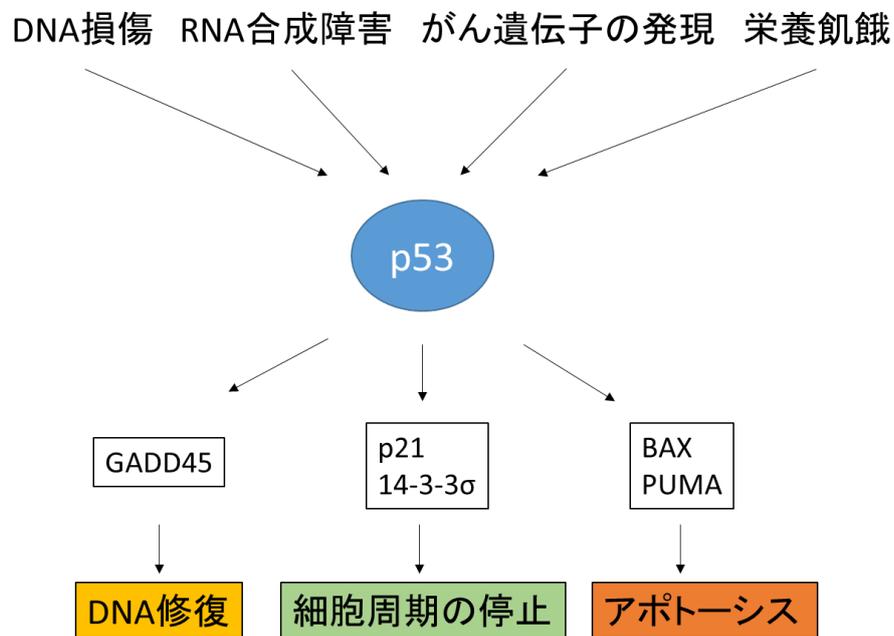


図 1-1 p53 経路を介した異常細胞の修復・除去機構

細胞核内に常に発現している p53 は E3 ユビキチンリガーゼである MDM2 によってユビキチン化され、プロテアソームによって分解されているので、その機能は抑制されている (図 1-2)。

細胞がストレスに曝されると、MDM2 や p53 がリン酸化され、MDM2 と p53 の結合が阻害される。そのことによって p53 が蓄積して活性化²⁴⁾、また、安定化^{25,26)}が起こる。その他には、MDM2 がリボソームタンパク質 (ribosome proteins, RPs) L11 や RPL5 の結合によって阻害され、p53 が安定化する²⁷⁾。通常、RPs は核内に存在する核小体に局在している。この RPs の核小体への局在化を制御するタンパク質が PICT1 である。PICT1 の活性が失われると、RPs は核小体から核全体へと局在変化を起こし、RPs が MDM2 と結合することでその活性を阻害し、p53 が作動する。この経路は核小体ストレス応答と呼ばれ、近年になって報告された新たな p53 経路制御機構である²⁸⁻³¹⁾。

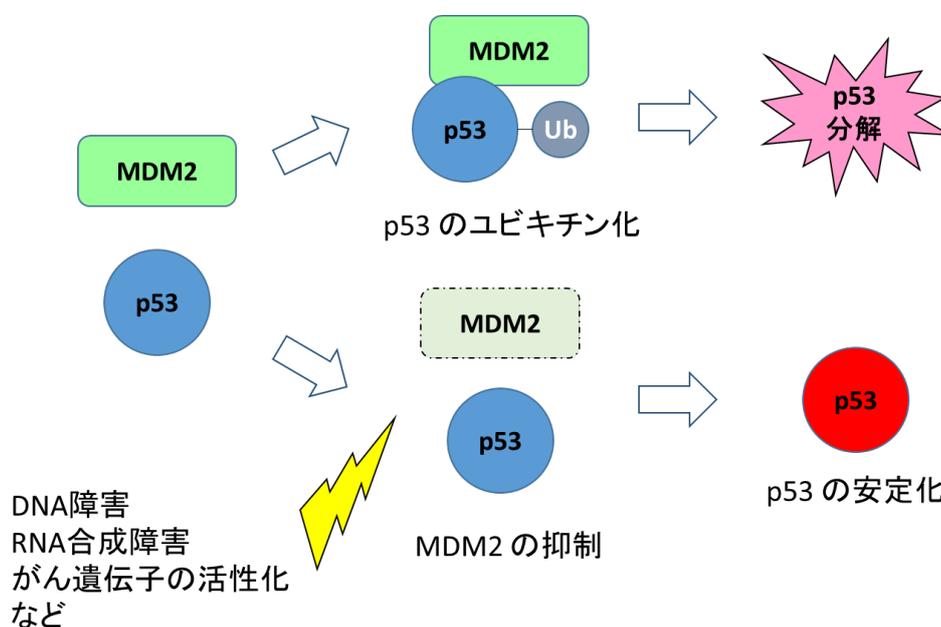
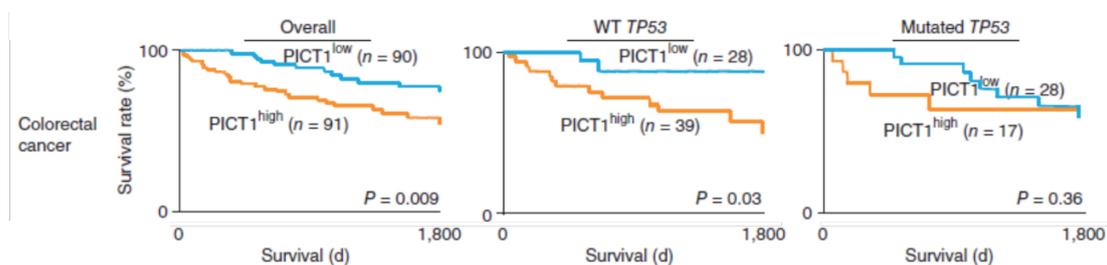


図 1-2 MDM2 を介した p53 の制御

生体内において、p53は異常細胞を除去するゲートキーパーの役割を担っている。p53の遺伝子変異によってその活性が失われているがん患者は全体の約半数に及ぶ³²⁾。p53の変異はがん患者の生存性にも大きく影響し、TP53変異型のがん患者は野生型のがん患者に比べて予後不良となる傾向にある^{33,34)}。また、PICT1のようにTP53野生型の大腸がんなどのがん患者の生存性に寄与するが、TP53変異型の場合はその傾向を失う遺伝子も報告されている²⁸⁾ (図1-3)。

以上のように、p53はがん治療標的の候補であるため、多くの研究がなされてきた。しかしながら、近年になって核小体ストレス応答のような新たなp53の制御機構が明らかになりつつあり²⁷⁾、未だp53経路の全体像は十分に解明されているとは言えない。p53経路が明らかになれば、がんの新規治療法の確立へつながると考えられ、全貌の解明が期待される。



Sasaki, M. *et al. Nat. Med.* **17**, 944–951 (2011) 改変

図1-3 p53制御遺伝子であるPICT1発現による大腸がん患者生存予後への影響

1-2. バイオインフォマティクスのがん研究への応用

近年、次世代シーケンサーやDNA マイクロアレイを利用したハイスループットな解析方法が発達し、大量のがんゲノム情報が得られるようになった。これらのゲノム情報は The Cancer Genome Atlas (TCGA) や Gene Expression Omnibus (GEO) 等のサイトで公開されている。通常、このようなゲノム情報は膨大なデータ量であり、そのまま利用することは困難である。そのような膨大なデータの中から、がんの遺伝的特徴や治療標的を探索するためにバイオインフォマティクスを用いることで、初期のルミナルサブタイプ (エストロゲン受容体陽性) の乳がんにおける新規の遺伝子変異や、過剰変異を起こしていない大腸や直腸がんのゲノム変異には差がないことなど、がんの部位やサブタイプごとの遺伝的バックグラウンドについて明らかになりつつある^{35,36)}。さらに、そのような報告では、既知のがん遺伝子やがん抑制遺伝子が腫瘍化に重要であることが改めて提示されており、がんの遺伝的バックグラウンドの研究に対するバイオインフォマティクスの手法の有効性が示されている。また、これまでの分子生物学的手法では発見が困難であったがん遺伝子やがんの治療標的遺伝子が報告されている。以上のことから、従来の実験手法とバイオインフォマティクスを用いてがんのゲノム情報を解析することで、p53 制御遺伝子や p53 標的遺伝子または p53 経路を介した治療標的となる遺伝子の探索が可能であると考えられた (図 1-4)。

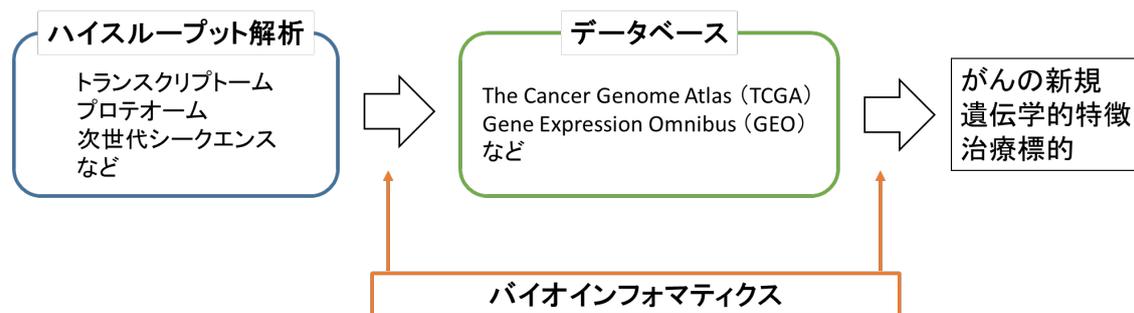


図 1-4 バイオインフォマティクスによるがん研究の進展

1-3. 研究の目的

p53 経路の全貌は不明だが、p53 経路の制御や p53 の標的となる遺伝子を解明できれば、新たながん治療標的となりうる。p53 経路に関連する遺伝子を、*in vitro* や *in vivo* な手法で検討する方法は、細胞やモデル生物の表現型の変化を個別に調べなければならず、遺伝子改変動物の作製や解析システムの構築に実験費用や時間が必要である。また、データベースを利用して、膨大な遺伝子発現情報から、p53 経路で機能する予後因子を選択する場合にも、同様の *in vitro* や *in vivo* での検討が必要となる。また、急速に発展するハイスループットな解析法を利用した遺伝子スクリーニングでは、多数の疑陽性遺伝子が選択されることが問題となる。そこで、本論文では、ハイスループットな遺伝子スクリーニングとバイオインフォマティクスを組み合わせることで、個別の検討を行わずに疑陽性遺伝子を排除し、効率よく p53 経路を介した生存因子を同定する方法を確立することを目指した。まず、プール型 shRNA ライブラリーを用いた RNA interference (RNAi) スクリーニングを行い、p53 経路に関連する可能性のある遺伝子を選択した。次に、p53 経路を介してがん患者の生存予後に影響する遺伝子を調べるために、GEO において報告されている大腸がん患者の DNA マイクロアレイデータを解析し、TP53 野生型では生存予後に影響するが、TP53 変異型では影響を示さない遺伝子を探索した。両方の解析に共通して選択された遺伝子は、p53 経路の制御に関連し、がん患者の生存因子であると考えられた。

第 2 章 shRNA ライブラリーを用いた p53 制御遺伝子のスクリーニング

2-1. 小序論

近年、次世代シーケンサー (Next generation sequencer, NGS) に代表されるハイスループットな解析技術が発達し、様々な実験技術に応用されている。そのひとつがプール型 shRNA ライブラリー (Collecta) を用いた遺伝子スクリーニングである (図 2-1)。この shRNA ライブラリーは、約 5,000 遺伝子に対応する約 27,000 種類の shRNA 発現ベクターで構成される。この発現ベクターはレンチウイルスを用いて細胞に導入される。shRNA 配列は細胞のゲノム DNA に挿入されるため、形質導入された細胞は永続的に RNAi が誘導される。そして、細胞の薬剤感受性の増減に代表される表現型の変化を誘導する shRNA を同定することで、その表現型を制御する遺伝子を特定できる。導入された shRNA を個別に特定するために、各 shRNA 配列には各々に特有のバーコード配列が付随している。shRNA 配列が挿入された細胞から回収したゲノム DNA を鋳型にして、PCR 法を用いてバーコード配列を増幅し、NGS を用いてリード数を解析することで、表現型を変化させた shRNA を特定することができる。

本章では、shRNA ライブラリーを用いた p53 経路に関連する p53 制御遺伝子のスクリーニングについて論じる。TP53 野生型であるヒト骨肉腫細胞株 U2OS に shRNA ライブラリーを導入し、p53 を作動させる薬剤であるアクチノマイシン D (Actinomycin D, ActD) にて細胞を刺激した。この刺激に応答して、細胞内では p53 の安定化が起こり、アポトーシスや細胞周期の停止が誘導される。p53 の制御に関連する遺伝子を標的とした shRNA が挿入された細胞は、遺伝子発現抑制によって p53 の安定化もしくは不安定化を起こし、その結果、p53 制御遺伝子の発現抑制を起こしていない細胞に比べて、生存性の低下もしくは上昇が起こることが想定された。そこで本研究では、ActD 刺激細胞の生存性を変化させる shRNA から、p53 経路を制御する遺伝子を同定することを目指した。

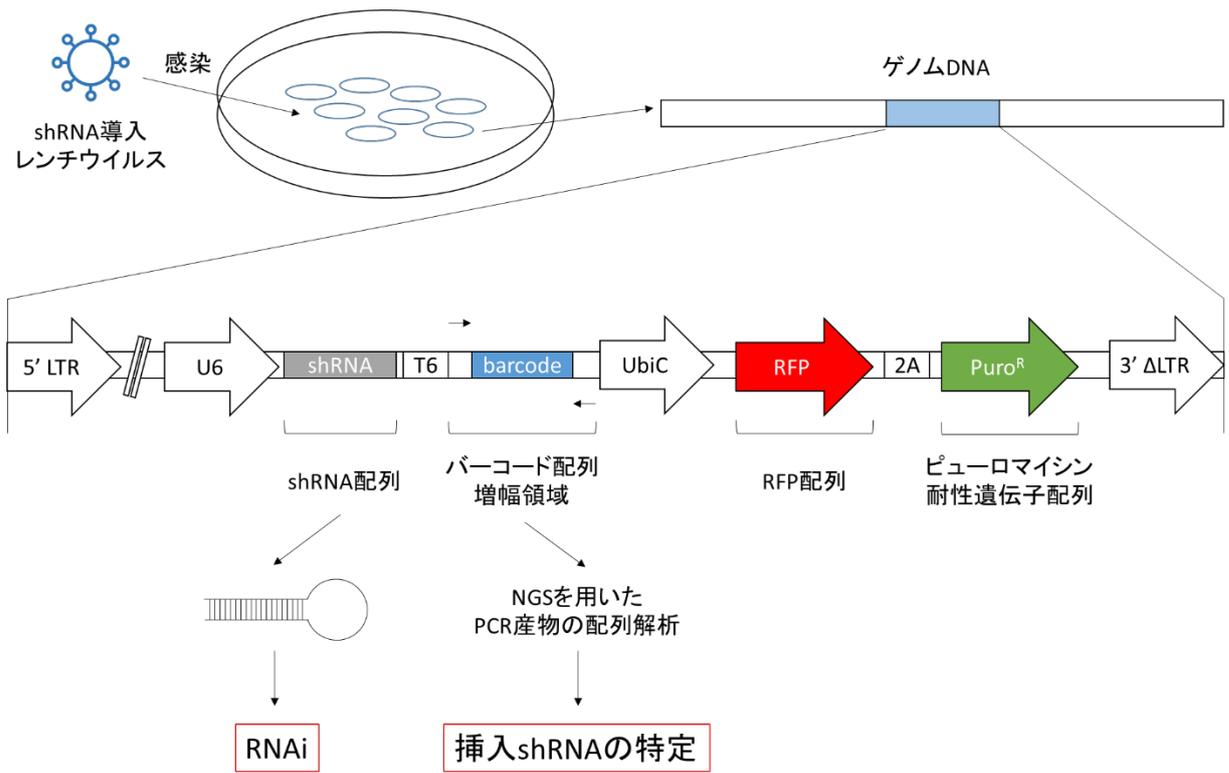


図 2-1 Collecta shRNA ライブラリーの概要

2-2. 材料と方法

2-2-1. 細胞培養

レンチウイルスの作製と shRNA を導入した細胞として、ヒト胎児腎細胞株 HEK293FT とヒト骨肉腫細胞株 U2OS (ATCC) (Thermo Fisher Scientific) をそれぞれ用いた。ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum, FBS) を 10%含有した Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) を用いて、37°C, 5% CO₂, 湿度 100%下で培養した。

2-2-2. shRNA ライブラリーのトランスフェクションに用いるレンチウイルスの作製

shRNA ライブラリーとして、シグナル伝達経路に関連する遺伝子を標的とした DECIPHER Pooled Lentiviral shRNA Libraries Human module 1 (Collecta) を用いた。10 cm ディッシュに HEK293FT 細胞 を 6.0×10^6 cells となるように播種し、24 時間培養した。そこに DECIPHER Pooled Lentiviral shRNA Libraries Human module 1 (2.5 µg), pHPL8/pRE (6.5 µg), pRSV-Rev (2.5 µg), pMD2.G (3.5 µg) を無血清 DMEM 500 µL に加えて攪拌した。また、別途準備した無血清 DMEM 500 µL にリポフェクタミン 2000 (20 µL) を加えて攪拌し、20 分インキュベートした。上記の 2 液を攪拌し、培養した U2OS に加えた後、36 時間インキュベートした。培地を回収し、3,500 rpm で 5 分間遠心分離した。上清を回収した上清は -80°C で保存した。

2-2-3. U2OS 細胞へのレンチウイルス感染効率 (Multiplicity of infection, MOI) の検討

作製したレンチウイルスは、段階希釈法で希釈して U2OS 細胞に感染させた。レンチウイルスの力価は、shRNA の導入による RFP 発現細胞と、4',6-Diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride (DAPI) により核染色された細胞の割合から評価した (図 2-2)。U2OS 細胞を 6 well プレートに 5.0×10^5 cells/well になるように播種した。作製したレンチウイルス原液は DMEM で 2 倍になるように段階希釈して終量 500 µL とし、培養細胞に加えて 2 日間培養した。その後、PBS で 4,000 倍希釈した DAPI (DOJINDO) を加えて 10 分間インキュベートし、PBS で 3 回洗浄した。この細胞を共焦点レーザー顕微鏡 LSM700 (Carl Zeiss) で観察して、DAPI で染色された細胞数と RFP を発現した細胞数を、それぞれ全体の細胞数と shRNA が挿入された細胞数とし、その比を算出した。算出された比が 10%に近い希釈倍率を MOI 0.1 とした。

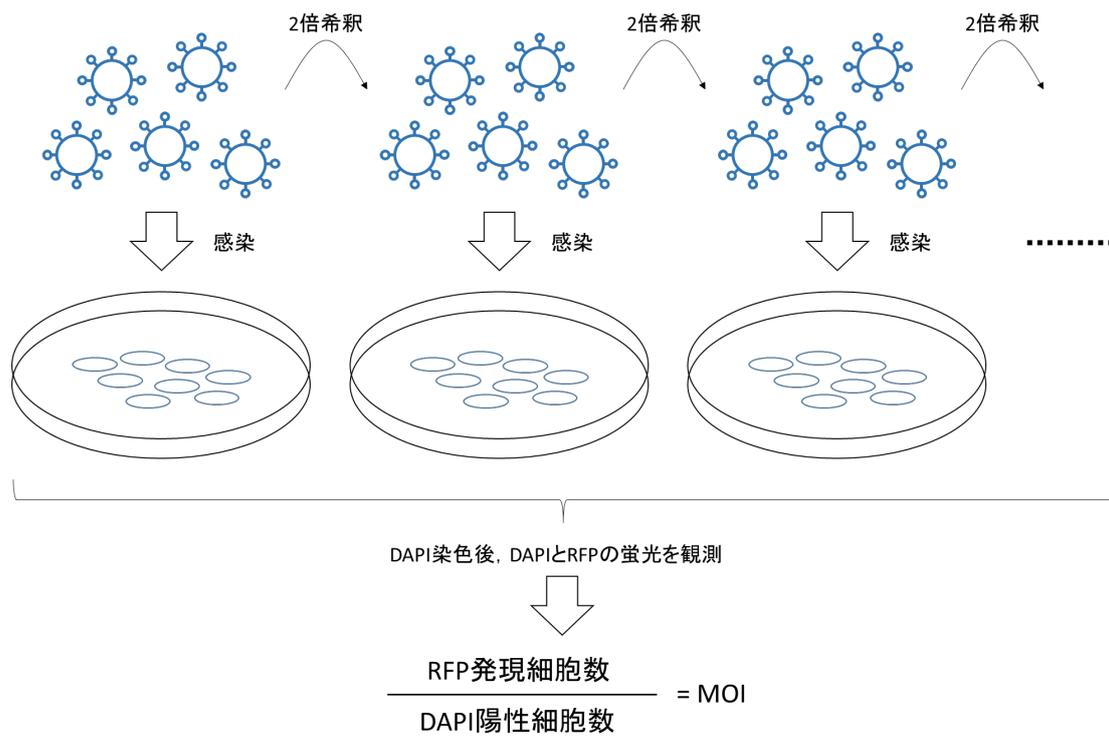


図 2-2 レンチウイルスの MOI 測定方法

2-2-4. ActD 50%阻害濃度 (50% inhibitory concentration, IC₅₀) の検討

U2OS 細胞は 96 well プレートに 2.0×10^4 cells/well になるように播種し、作製したレンチウイルスを MOI 0.1 で感染させた。24 時間後、レンチウイルスを感染させた U2OS 細胞にピューロマイシンを添加した DMEM (終濃度 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加え、48 時間培養した。培養液に ActD を添加した DMEM (終濃度 10 μM から 0.0188 nM まで 3 倍ずつ段階希釈) を加え 72 時間刺激し、3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) 試薬 (1 mg/mL) を加えて 4 時間インキュベートした。培養液を破棄して、dimethylsulfoxide (DMSO, WAKO) を 100 μL 加えて振とうし、A₅₇₀ を Sunrise remote (TECAN) で測定した。ActD の代わりに DMSO を用いたものを対照とし、ActD 刺激後の A₅₇₀ を対照の A₅₇₀ で割った値を細胞の生存率とした。生存率が 50% のときの ActD 濃度を IC₅₀ とした。

2-2-5. shRNA ライブラリー導入と ActD によるアポトーシスの誘導

U2OS 細胞を 10 cm ディッシュ 20 枚 (3.0×10^6 cells/dish), 合計で 6.0×10^7 cells となるように播種し、レンチウイルス (MOI 0.1) を加えて培養した。24 時間後、ピューロマイシンを添加した DMEM (終濃度 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を加え、48 時間培養した。その後、各ディッシュに ActD を添加した DMEM (終濃度 7.5 nM) を加え、さらに 72 時間培養した。ActD の代わりに DMSO を用いたものを対照とした。細胞数を数えた後、遠心チューブに移して 3,500 rpm で 5 分間遠心分離し、細胞を回収した。回収した細胞を -80°C で保存した。

2-2-6. ハイスループットシーケンシングによる shRNA 配列の解析

回収した細胞のゲノム DNA 抽出やバーコード配列部位の PCR 反応、Illumina ハイスループットスクリーニングは Collecta 社に依頼し、各バーコード配列のリード数を数えた。ActD 処理群と対照群の shRNA のリード数をすべて log₂ 値変換した。正規化には Quantile normalization 法³⁷⁾を用いた。ActD 処理群と対照群の shRNA のリード数の比を算出した。

2-2-7. 候補 shRNA が標的とする遺伝子の機能解析

スクリーニングされた遺伝子の機能解析は、GeneCodis3 (<http://genecodis.cnb.csic.es/>) を用いて行った。生物種は「Homo Sapiens」、アノテーションは「GO Biological Process」に設定して、Modular Enrichment Analysis を行った。ActD 感受性を増加させる遺伝子と感受性を減少させる遺伝子それぞれで機能を解析した。

2-3. 結果と考察

2-3-1. MOI 測定結果とレンチウイルス感染条件

複数の shRNA が 1 つの細胞に挿入される場合、その細胞の薬剤感受性変化がどの遺伝子の抑制により生じたものであるかを判別することは困難であるため、単一の shRNA が挿入されるようなレンチウイルスの感染条件を設定する必要がある。感染効率が 10 %

のとき、1 個の細胞につき 1 個のレンチウイルスが感染し、1 種類の shRNA が挿入される頻度が高いことが報告されている³⁸⁾。この条件下で U2OS にレンチウイルスを感染させるために、段階希釈法によりレンチウイルスの感染効率を調べた。レンチウイルス原液を DMEM で 2 倍ずつ段階希釈して U2OS 細胞に感染させ、DAPI で核を染色し、DAPI 陽性細胞数および RFP 発現細胞数を蛍光顕微鏡下で数えた。その細胞数の比を感染効率とした (表 2-1)。感染効率が 10% に最も近いのは、ウイルス原液を 32 倍に希釈して使用した場合であった。したがって、以降のスクリーニングに用いるレンチウイルスは、ウイルス原液を 32 倍に希釈して使用した。

表 2-1 作成したレンチウイルスの MOI

Dilution ratio	Rate of infection (%)
1:8	44.2
1:16	29.5
1:32	7.4

2-3-2. ActD IC₅₀ の検討

ウイルス感染した U2OS の生存率が 50% になるような ActD 濃度を検討した (図 2-3)。その結果、ActD の IC₅₀ は終濃度 18.7 nM であると仮定した。しかし、実際には、shRNA ライブラリースクリーニング時の ActD の IC₅₀ は終濃度 7.5 nM だった。

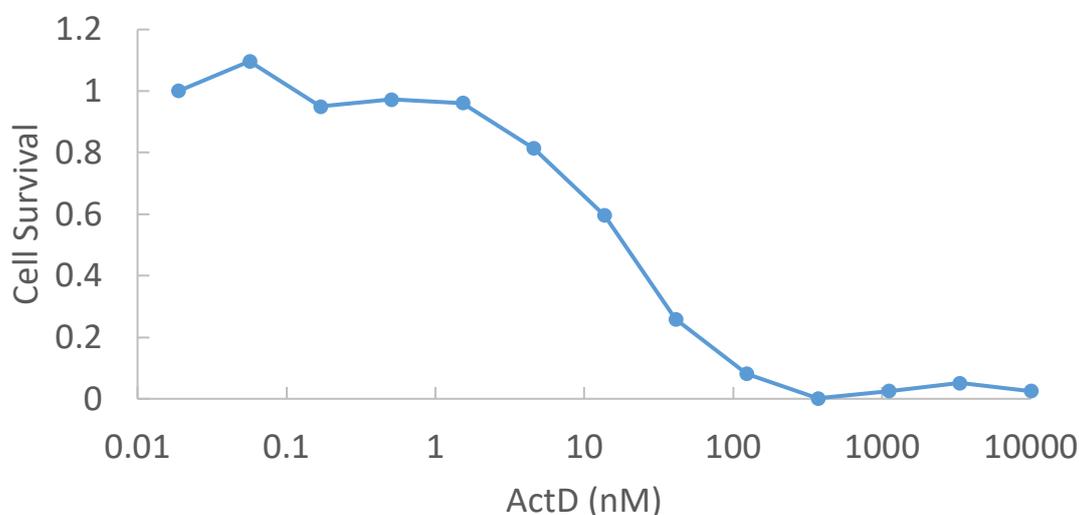


図 2-3 IC₅₀ 決定のための ActD 濃度の検討結果

2-3-3. ActD 処理群とコントロール群における shRNA 挿入頻度の正規化

次世代シーケンサーを用いて増幅したバーコード配列を解析し、ActD 処理群と対照群の shRNA のリード数を調べた。読み取り回数はすべて \log_2 値変換を行った。変換値から散布図を描き、正規化の必要性を調べた (図 2-4)。図 2-4 の結果から、プロットの上方向への偏りが見られ、ActD 処理群側へ移行する傾向がみられた。そのため、サンプル間での shRNA 挿入頻度を過大もしくは過小評価する可能性が考えられた。そこで、新たに Quantile normalization 法³⁷⁾を用いて正規化を行った (図 2-5)。

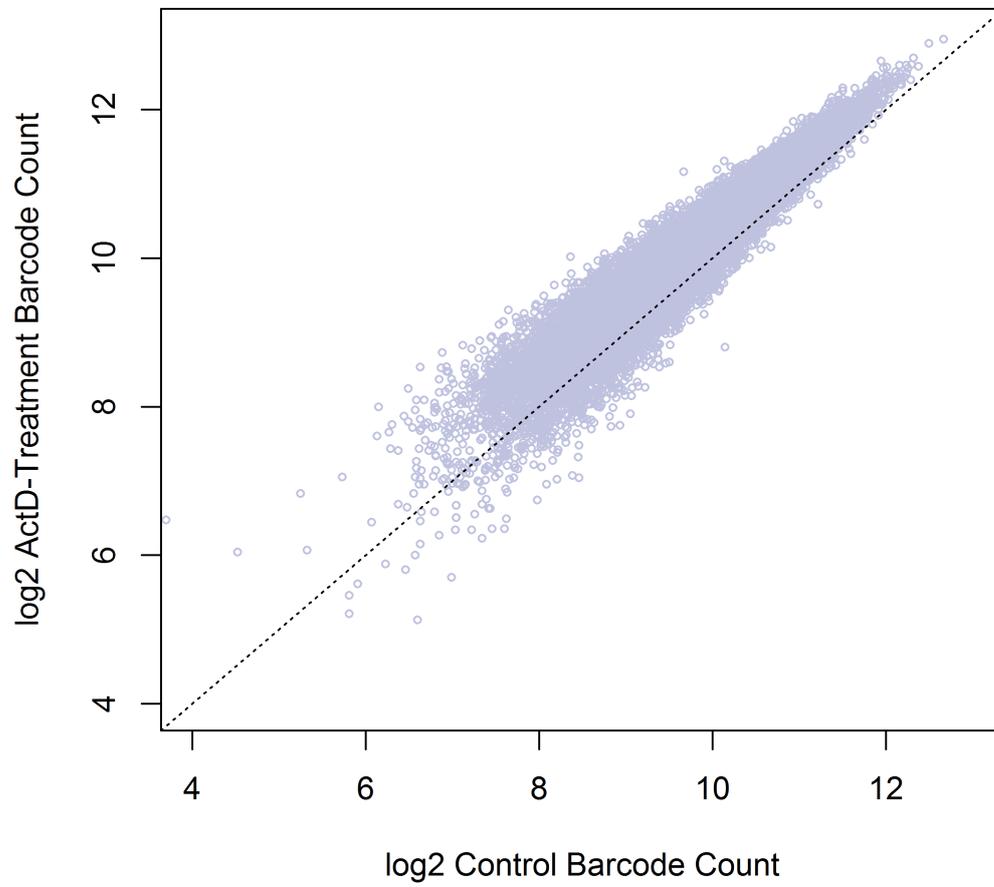


図 2-4 正規化前の shRNA バーコード配列の読み取り回数の分布

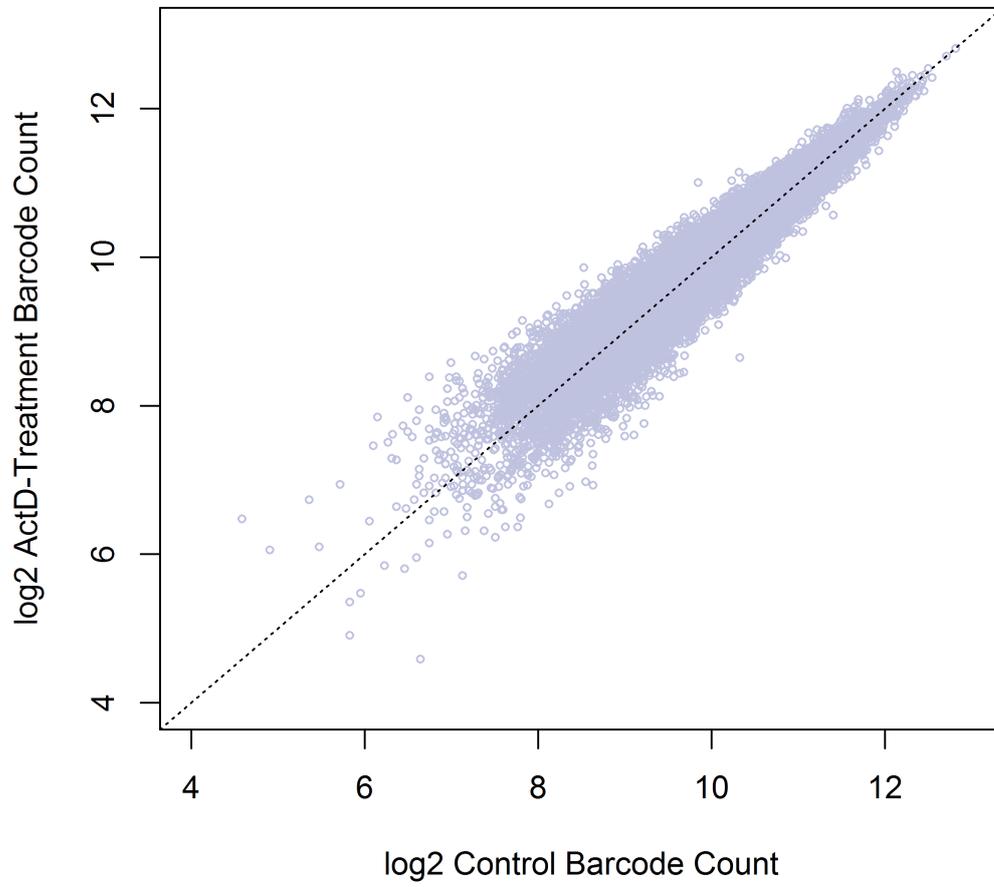


図 2-5 正規化後の shRNA バーコード配列の読み取り回数の分布

2-3-4. ActD 処理群と無刺激群における shRNA 挿入頻度の検討

正規化した shRNA の読み取り回数の倍率変化 (Fold Change 値, 以下 FC 値もしくは FC) が 1.750 倍以上に増加もしくは 1/1.750 倍 (0.57 倍) 以下に減少したものを調べると, FC 値が 1.750 倍以上になった shRNA は 164, 0.57 倍以上になったものは 163 で, 合計 327 種類であった (図 2-6)。また, それぞれの shRNA が標的とする遺伝子は, 重複を除いてそれぞれ 161 遺伝子ずつ, 合計で 322 遺伝子であった。この中には *TP53* を標的とする shRNA が FC 値を増加させるような候補に含まれていた。このことから, 今回の実験系が p53 経路制御遺伝子のスクリーニングに適することが示唆された。

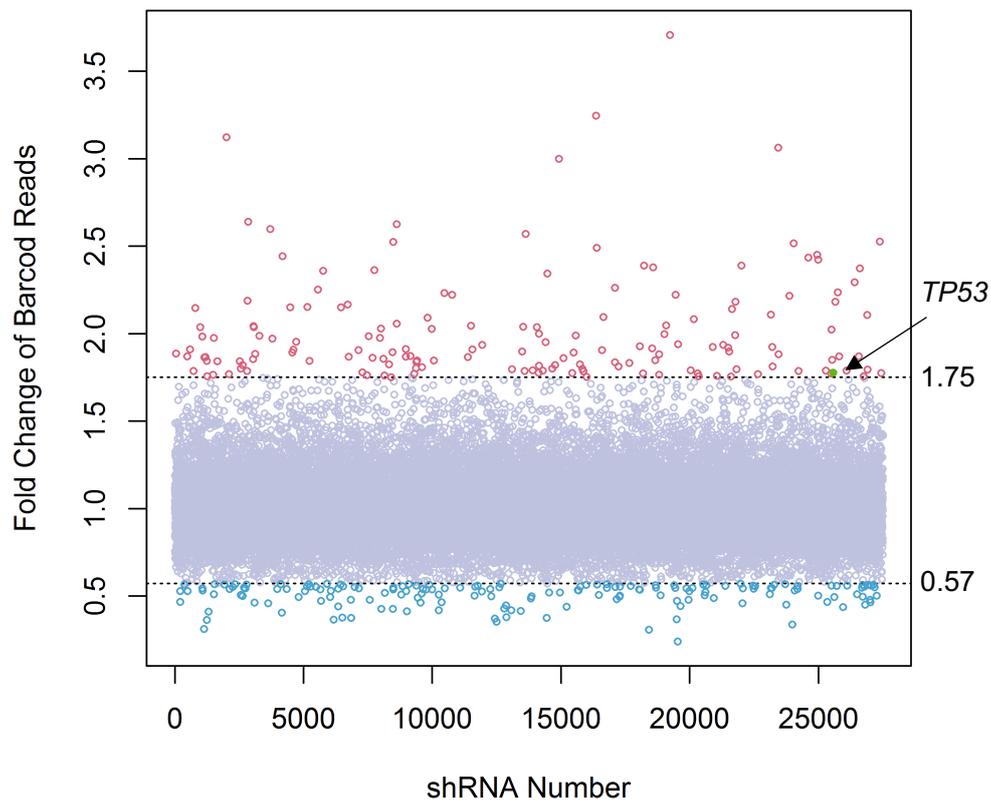
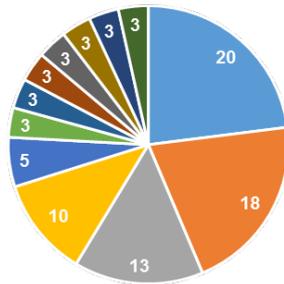


図 2-6 各 shRNA に対応するバーコード配列のリード比
各 shRNA の FC 値を示した。赤○は $FC \geq 1.75$ となった shRNA。青○は $FC \leq 0.57$ となった shRNA。緑○は *TP53* shRNA。

2-3-5. 候補 shRNA が標的とする遺伝子の機能解析結果

ActD 感受性を増加させる 161 遺伝子 (ActD 感受性遺伝子群) および ActD 感受性を減少させる 161 遺伝子 (ActD 耐性遺伝子群) の機能について, GeneCodies3 の Modular Enrichment Analysis を用いて解析した。解析する GO term として「Biological Process」を用いた。ActD 感受性遺伝子群では, 薬剤に対する反応性や DNA 障害への応答や細胞周期に関する遺伝子が選択されていることが示唆された (図 2-7A)。ActD 耐性遺伝子群には, 薬剤に対する反応性や有糸分裂細胞周期, DNA 修復などに関する遺伝子が含まれることが示唆された (図 2-7B)。

A



Gene No.	GO term	p Value
20	signal transduction (BP)	1.51E-05
18	multicellular organismal development (BP)	1.39E-05
13	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (BP)	4.71E-05
10	response to drug (BP)	2.76E-05
5	cellular response to hypoxia (BP)	1.78E-05
3	multicellular organismal development (BP),cell differentiation (BP),regulation of apoptotic process (BP)	4.53E-05
3	in utero embryonic development (BP),cell cycle (BP)	3.12E-05
3	DNA damage response, signal transduction by p53 class mediator resulting in induction of apoptosis (BP),cell aging (BP)	1.96E-05
3	cell cycle (BP),double-strand break repair (BP),response to X-ray (BP),response to gamma radiation (BP),chromosome organization (BP)	1.58E-05
3	spermatogenesis (BP),cellular response to hypoxia (BP)	1.57E-05
3	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (BP),negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter (BP),negative regulation of transcription, DNA-dependent (BP),cellular response to hypoxia (BP)	1.57E-05
3	vasculogenesis (BP),neural tube closure (BP)	1.57E-05

B



Gene No.	GO term	p Value
11	response to drug (BP)	1.39E-05
6	mitotic cell cycle (BP),S phase of mitotic cell cycle (BP)	0.000169
5	DNA repair (BP),nucleotide-excision repair (BP),transcription-coupled nucleotide-excision repair (BP)	4.47E-05
5	mitotic cell cycle (BP),S phase of mitotic cell cycle (BP),cell cycle checkpoint (BP),DNA replication (BP)	1.13E-05
4	positive regulation of proteasomal ubiquitin-dependent protein catabolic process (BP)	0.000225
4	mitotic cell cycle (BP),G1/S transition of mitotic cell cycle (BP),S phase of mitotic cell cycle (BP),M/G1 transition of mitotic cell cycle (BP),cell cycle checkpoint (BP),DNA replication (BP)	4.58E-05
4	mitotic cell cycle (BP),S phase of mitotic cell cycle (BP),cell cycle checkpoint (BP),DNA replication (BP),DNA strand elongation involved in DNA replication (BP)	2.73E-05
3	mitotic cell cycle (BP),G1/S transition of mitotic cell cycle (BP),S phase of mitotic cell cycle (BP),M/G1 transition of mitotic cell cycle (BP),cell cycle checkpoint (BP),DNA replication (BP),DNA strand elongation involved in DNA replication (BP)	0.000217
3	response to drug (BP),positive regulation of NF-kappaB transcription factor activity (BP)	0.000106
3	response to drug (BP),cell-cell signaling (BP),aging (BP)	3.35E-05

図 2-7 shRNA ライブラリースクリーニングによる候補遺伝子の機能解析結果

ActD 感受性を変化させた遺伝子の GO 解析結果。A) $FC \geq 1.75$ となった shRNA が標的とする遺伝子 ($p \leq 4.70713 \times 10^{-5}$)。B) $FC \leq 0.57$ となった shRNA が標的とする遺伝子 ($p \leq 2.24936 \times 10^{-4}$)。Gene No.はその GO term を持つ遺伝子数、GO term は遺伝子の Biological Process。

2-4. 小括

shRNA ライブラリースクリーニングで選択された 322 遺伝子には p53 経路の制御に関連する遺伝子が含まれることが期待された。選択された遺伝子の機能を調べると、p53 経路との関連が考えられる、薬剤への反応性や DNA 障害への応答、細胞周期、DNA 修復などの機能をもつ遺伝子が選択されており、これらの遺伝子群に p53 経路の制御遺伝子や p53 の標的遺伝子に関連する遺伝子が含まれることが示唆された。

一方で、候補となった遺伝子には疑陽性であるものを含むことが予想されたため、真に p53 経路の制御に関連する遺伝子の絞り込みを行う必要があった。

第3章 バイオインフォマティクス解析技術を用いたヒト大腸がん検体の生存時間解析による p53 経路関連遺伝子の同定手法の確立とその評価

3-1. 小序論

近年、ゲノミクス解析やトランスクリプトミクス解析、プロテオミクス解析といったオミクス解析技術の急速な進展によって、病態関連因子の解析が試みられるようになった。オミクス解析技術の解析データは National Center for Biotechnology Information (NCBI) の Gene Expression Omnibus (GEO) や European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI) 等の公共のデータベース上に登録されている。また、病態関連遺伝子の解析では人種や年齢、治療歴、特定の遺伝子変異などの情報とともに報告された例が増加している。これらの解析技術の進展と解析結果の共有化によって、従来の研究方法では発見が難しかったがん遺伝子やがん抑制遺伝子を、膨大なオミクス解析データのなかからコンピュータを用いて探索する研究が盛んに行われるようになった^{39,40)}。

オミクス解析技術の中でも、病態関連因子の解析に頻繁に用いられるものが DNA マイクロアレイを用いたトランスクリプトミクス解析である。DNA マイクロアレイのチップ上には様々な遺伝子の塩基配列に相補的な DNA プローブが固定化されている。チップ上の DNA プローブと細胞から回収して合成した標識 RNA をハイブリダイズさせて蛍光強度を測定することで、その細胞中の数万の遺伝子の発現レベルを一度に確認できる。

本章では、公共データベースに報告されたヒト大腸がん検体の遺伝子発現と検体の生存性との相関関係を網羅的に解析することで、p53 依存的に生存予後と関連する遺伝子を特定した。その後、第2章で p53 経路の制御に関連することが示唆された遺伝子の中から、ノックダウンによる ActD 感受性変化の傾向と大腸がん患者の生存予後に一致するものを p53 経路関連遺伝子として同定した。

3-2. 材料と方法

3-2-1. ヒト大腸がん検体を用いた DNA マイクロアレイデータの取得

ヒト大腸がん検体の遺伝子の発現量を解析した DNA マイクロアレイのデータセットを GEO より取得した。GEO の Repository Browser を用いて、「Platforms」タブを選択して GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) を指定する Accession ID である「GPL570」を検索した。GPL570 に登録された「Series」を選択し、検索ワード「colon cancer」もしくは「colorectal cancer」でデータセットを絞り込んだ。この中から、全生存期間と死亡イベント、p53 変異の有無の記載のあるデータセット GSE39084⁴¹⁾と GSE39582⁴²⁾を取得した。合計で 636 検体 (p53 野生型 : 200 検体, p53 変異型 : 221 検体, p53 変異不明検体 : 215 検体) の DNA マイクロアレイデータである CEL ファイルを得た。

3-2-2. MAS5.0 アルゴリズムを用いたシグナル強度変換と Quality Control 計算

ExpressionConsole (Affymetrix) を使用して、MAS5.0 アルゴリズムによる CEL ファイルの正規化シグナル強度と、Quality Control (QC) に関するデータを計算した。その際、Affymetrix の MSK ファイル (http://www.affymetrix.com/support/technical/mask_files.affx) を用いて正規化を行った。QC のパラメータを表 3 に示した (表 3-1)。R-3.1.2 (<http://cran.r-project.org/bin/windows/base/old/>, R) を用いて、QC を満たすマイクロアレイデータのみを抽出し、正規化したシグナル強度を底 2 の対数に変換した。対数変換前のシグナル強度が 1 以下のものはシグナル強度が 1 となるように置き換え、対数値が 0 以上の数値となるようにした。以上の操作を p53 野生型検体と p53 変異型検体それぞれで行った。

表 3-1 Quality Control のパラメータと設定スコア

Parameter	Score
Background	< 120
RawQ	< 10
Percent present calls	< 55
Scaling Factor	< 3
GAPDH 3' to 5' ratio	< 5
Beta-actin 3' to 5' ratio	< 5

3-2-3. ヒト大腸がん検体の生存時間解析

各 DNA マイクロアレイプローブに対応する遺伝子の発現量と大腸がん検体の生存性との相関を調べるため、Kaplan-Meier 法による生存時間解析を行った。R と R パッケージ「survival」を用いて、各 DNA マイクロアレイプローブのシグナル強度の中央値で大腸がん検体を 2 群に分けた場合の Kaplan-Meier 推定量を算出した。有意差検定は log rank 検定法で行い、有意水準は 5%とし、有意と判定された DNA プローブを抽出した。以上の操作を p53 野生型検体と p53 変異型検体それぞれで行った。

3-2-4. 生存時間解析結果と shRNA ライブラリースクリーニング結果との統合

第 2 章において p53 経路との関連が予想された遺伝子と、3-2-3 で得られた p53 野生型検体の生存予後と有意に相関した遺伝子の中から共通する遺伝子を抽出するため、それぞれで選択された遺伝子群の中から、R を用いて「Gene Symbol」が一致する遺伝子の DNA プローブを抽出した。それらの DNA プローブのうち、p53 変異型検体では有意な相関を示さないものを抽出した。さらに、各プローブが指定する遺伝子の発現量の中央値で 2 群に分けた場合の Kaplan-Meier 生存曲線を描画し、shRNA ライブラリースクリーニングの傾向と一致するものを抽出した。(図 3-1, 図 3-2)。

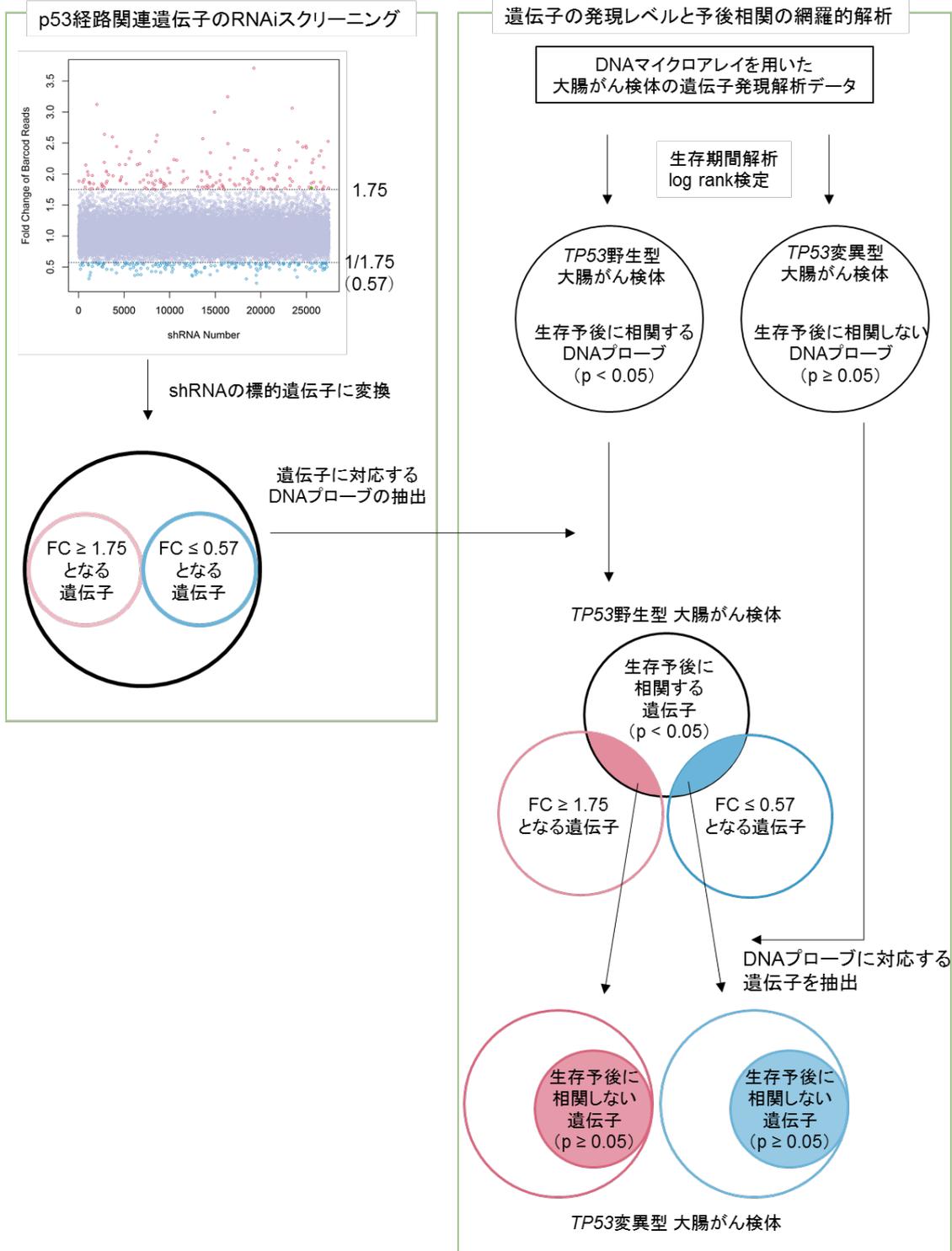
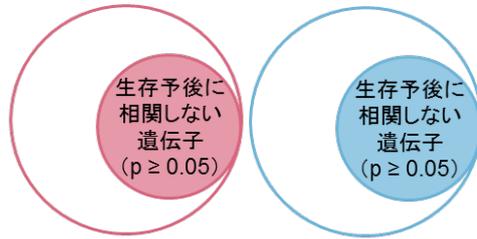


図 3-1 RNAi スクリーニングと大腸がん患者の生存性解析を組み合わせた p53 経路

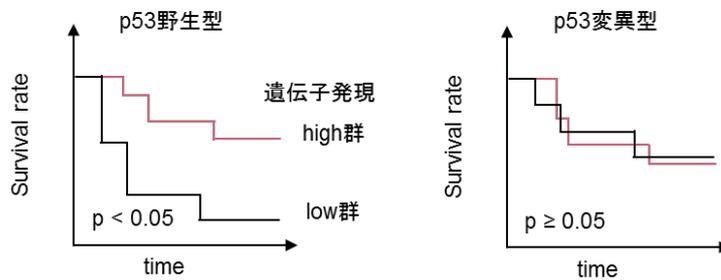
Kaplan-Meier plotによる生存性の傾向の解析

TP53変異型 大腸がん検体

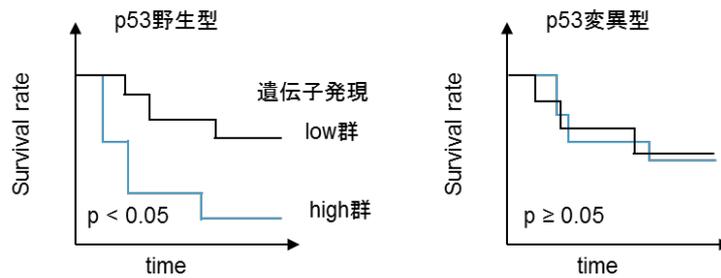


Kaplan-Meier plotによる
大腸がん患者の生存性傾向の確認

FC ≥ 1.75 となる遺伝子の発現レベルに対応する大腸がん患者の生存性傾向



FC ≤ 0.57 となる遺伝子の発現レベルに対応する大腸がん患者の生存性傾向



FC ≥ 1.75

遺伝子をノックダウンすると、ActD感受性が低く、p53活性が低い。
⇒ 遺伝子が高発現のがん細胞はp53の活性が高く、がん患者の生存予後は良好であると想定

FC ≤ 1 / 1.75

遺伝子をノックダウンすると、ActD感受性が高く、p53活性が高い。
⇒ 遺伝子が高発現のがん細胞はp53の活性が低く、がん患者の生存予後は不良であると想定

図 3-2 p53 経路関連遺伝子の生存時間と生存傾向解析の概略図

3-2-5. shRNA ライブラリースクリーニングと生存時間解析を組み合わせた p53 経路関連遺伝子の抽出と機能解析

3-2-4 で選択された遺伝子の機能を、Gene Ontology (GO) 解析により調べた。GO 解析には GeneCodis3 を用いた。生物種は「Homo Sapiens」、アノテーションは「GO Biological Process」に設定して、Modular Enrichment Analysis を行った。

3-3. 結果と考察

3-3-1. 大腸がん検体の遺伝子発現解析と QC の検討

CEL ファイルを MAS5.0 でシグナル強度に変換して QC を確認したところ、p53 野生型 200 検体のうち 197 検体、p53 変異型 221 検体のうちすべてが QC を満たした。したがって、これらの検体の遺伝子発現解析のデータをその後の実験に使用した。

3-3-2. 大腸がん検体の生存時間解析

p53 野生型および変異型検体それぞれについて、各 DNA プローブのシグナル強度の中央値で、遺伝子高発現群 (High 群) と低発現群 (Low 群) の 2 群に分けて、Kaplan-Meier 推定量を算出し log rank 検定を行った。その際、全検体でシグナル強度が 0 であるために、2 群に分けることができない DNA プローブに関しては検定を行わなかった。その結果、5974 遺伝子 (9258 プローブ) について p53 野生型で 2 群間の生存予後に有意な相関が確認された。

3-3-3. log rank 検定結果と shRNA ライブラリースクリーニング結果との統合

先の検定の候補遺伝子が p53 経路に関連しているならば、p53 が正常に機能しているがん検体でのみ、その遺伝子の発現が生存性に影響すると考えられる。そこで、p53 野生型検体では遺伝子発現量と生存予後が有意な相関を示し、かつ p53 変異型検体では遺伝子発現量と生存性に有意な相関が見られない遺伝子は、p53 経路に関連すると想定した。shRNA ライブラリーを用いた遺伝子発現の抑制による ActD 感受性変化の傾向と、p53 野生型検体における遺伝子の発現量の高発現群と低発現群の生存曲線の傾向の相関が一致し、かつ p53 変異型検体では生存予後に有意な相関を示さない遺伝子のデータを探索した (

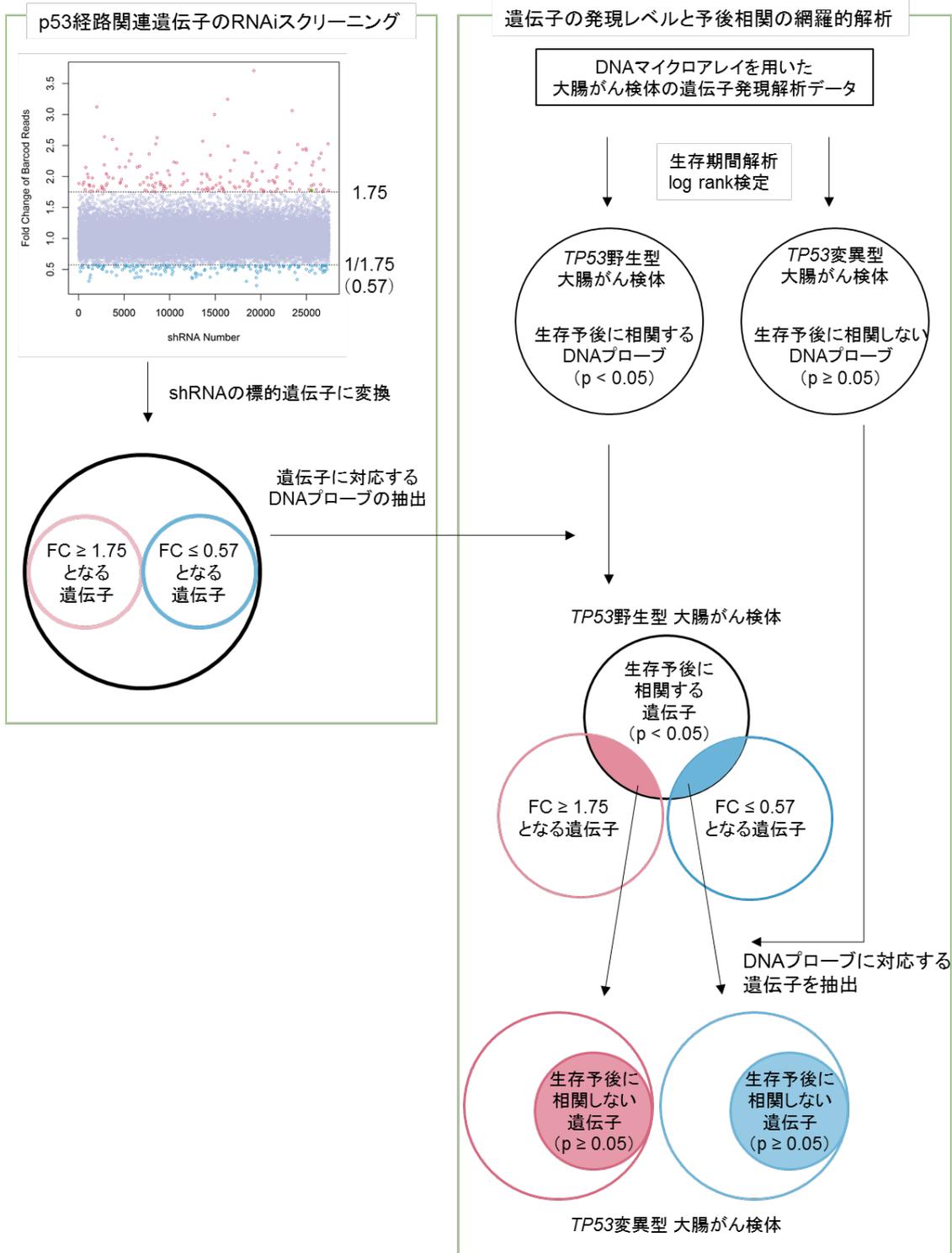


図 3-1 RNAi スクリーニングと大腸がん患者の生存性解析を組み合わせた p53 経路 (図 3-2)。

p53 野生型検体において生存予後に有意な相関を示し、かつスクリーニングで得られた結果の相関が予想と一致した遺伝子のうち、ActD 感受性を増加させたものは 43 遺伝子 (48 プ

ローブ), 減少させたものは 47 遺伝子 (62 プローブ) であった (図 3-3)。次に, これらの遺伝子の p53 変異型検体における生存性への影響と, p53 変異型検体における生存性の影響を調べた (表 3-2, 表 3-3, 図 3-4, 図 3-5)。p53 野生型検体における生存曲線の傾向の相関が一致し, p53 変異型検体では生存予後に有意な相関を示さない遺伝子として, ActD 感受性を増加させるものは 7 遺伝子, 減少させるものは 33 遺伝子が選択された。(表 3-2, 表 3-3, 図 3-4, 図 3-5, 図 3-6)。1 遺伝子に対して複数のプローブの対応する場合は遺伝子数を 1 として数えた。このとき, *API5*, *RFC5*, *IKBKB* および *ADRA1A* は, プローブによって p53 変異型検体の生存性への影響の有無や生存曲線の傾向が異なるが, すべて p53 変異型における生存性へは影響せず, かつ生存曲線の傾向が一致した遺伝子として扱った。

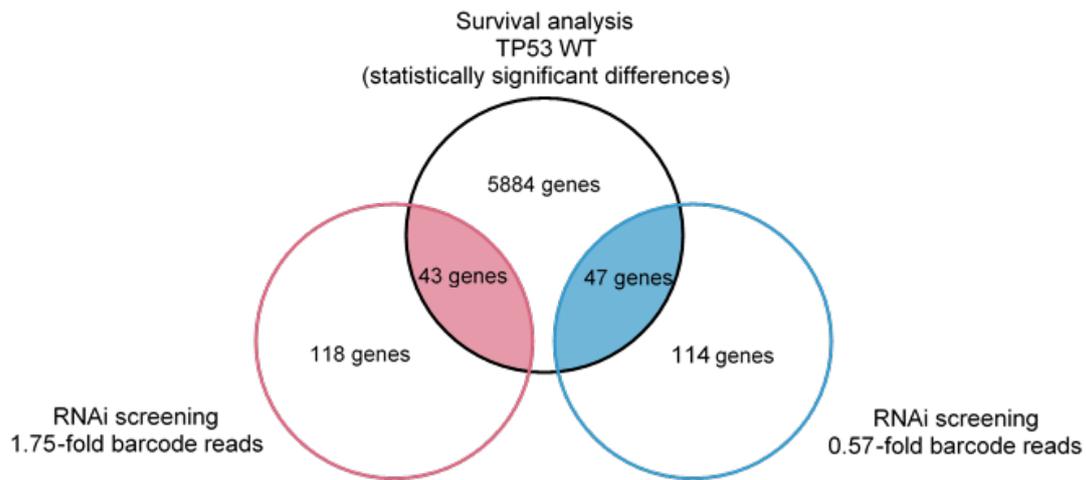


図 3-3 ActD 感受性遺伝子および耐性遺伝子と TP53 野生型大腸がん患者の生存性に有意に影響する遺伝子の重複

p53 野生型検体において，発現量が有意に生存性へ影響する遺伝子群（黒），ActD 感受性遺伝子群（赤），ActD 耐性遺伝子群（青）において重複する遺伝子の個数。

表 3-2 大腸がん検体におけるスクリーニング遺伝子の生存予後の相関

Gene Symbol	Affymetrix Probe ID	p value		Fold Change
		TP53 WT	TP53 Mut	≥ 1.75
DCT	216512_s_at	0.0001	0.999	2.0370
AMOTL1	235277_at	0.0006	0.5471	2.0578
MAP2K5	216765_at	0.0006	0.1053	2.5251
CPSF1	201638_s_at	0.0014	0.2039	3.7083
SIN3B	242129_at	0.0016	0.0273	1.7730
LRRK1	219441_s_at	0.0024	0.3062	2.1081
CEBPD	213006_at	0.0029	0.0546	1.8709
RUVBL2	1559946_s_at	0.0031	0.005	2.6389
PLIN1	205913_at	0.0032	0.6617	2.3784
TUBG1	201714_at	0.0043	0.7609	1.8980
PIWIL2	217421_at	0.0061	0.5431	2.0914
CBL	225234_at	0.0082	0.8576	2.3894
STMN2	203001_s_at	0.0089	0.3243	1.7904
NEK1	1564093_at	0.0101	0.7743	1.7989
PIGT	1568986_x_at	0.0104	0.4975	3.0637

Gene Symbol	Affymetrix Probe ID	p value		Fold Change
		TP53 WT	TP53 Mut	≥ 1.75
EPAS1	200879_s_at	0.0108	0.0047	1.8918
RUVBL2	201459_at	0.0120	0.0046	2.6389
EPAS1	200878_at	0.0121	0.347	1.8918
EIF2AK2	204211_x_at	0.0121	0.654	1.8639
CBL	225231_at	0.0126	0.2025	2.3894
RBL2	212331_at	0.0140	0.057	1.7746
LIG4	206235_at	0.0147	0.0657	2.0952
NFATC3	210556_at	0.0180	0.1327	2.2218
EPHB3	204600_at	0.0180	0.3312	1.7960
C3AR1	209906_at	0.0184	0.3515	2.3636
TP53	201746_at	0.0188	0.8353	1.7759
ARF6	224788_at	0.0191	0.8147	1.9880
CASP4	213596_at	0.0203	0.2497	1.7554
KCNJ3	233059_at	0.0206	0.6344	1.8465
API5	233078_at	0.0224	0.7878	1.8249
AKAP1	210626_at	0.0227	0.293	1.7598
PAFAH1B1	211547_s_at	0.0246	0.0296	2.0428
API5	201687_s_at	0.0247	0.2533	1.8249
KRT7	1558393_at	0.0255	0.8766	1.9232
CYP2R1	207786_at	0.0268	0.541	1.7734
TCERG1	229706_at	0.0282	0.9376	1.9235
EIF3A	200596_s_at	0.0303	0.9395	2.5263
CHRNA1	211039_at	0.0323	0.9151	1.7688
AQP1	207542_s_at	0.0324	0.719	2.0000
PI4KA	207081_s_at	0.0333	0.8502	1.9834
CFH	213800_at	0.0393	0.0104	2.0833
CDC37	209953_s_at	0.0450	0.0923	3.0000
CCNB1	228729_at	0.0455	0.4415	1.7860
ALB	214837_at	0.0456	0.4885	1.9717
SP1	1553685_s_at	0.0459	0.3181	2.3429
SPRY4	221489_s_at	0.0474	0.2739	1.8020
TRAFD1	242497_at	0.0476	0.4656	2.1875

Gene Symbol	Affymetrix Probe ID	p value		Fold Change
		TP53 WT	TP53 Mut	≤ 0.57
WNT9B	1552973_at	0.0002	0.7812	0.5295
MAPK10	204813_at	0.0004	0.3661	0.4790
MAP2K5	216765_at	0.0006	0.1053	0.5473
RFC5	203209_at	0.0010	0.0198	0.4973
FCER1A	211734_s_at	0.0010	0.8083	0.5603
ASAH1	213902_at	0.0013	0.2706	0.5604
CHRNA5	206533_at	0.0014	0.1776	0.4184
ANKHD1	208773_s_at	0.0019	0.5153	0.5674
MTHFS	1559069_at	0.0021	0.0239	0.5479
LRRK1	219441_s_at	0.0024	0.3062	0.5464
EZH1	239197_s_at	0.0026	0.203	0.3750
DMD	234752_x_at	0.0029	0.0224	0.5051
MCM5	201755_at	0.0032	0.3219	0.5106
MCM5	216237_s_at	0.0034	0.0422	0.5106
COQ2	213379_at	0.0040	0.1627	0.5107
ELOVL6	210868_s_at	0.0040	0.4824	0.4936
DAB2	232898_at	0.0041	0.2961	0.5478
AFMID	240318_at	0.0046	0.5082	0.4717
RFC5	203210_s_at	0.0051	0.0168	0.4973
RFC5	213734_at	0.0055	0.7821	0.4973
NCOA3	209060_x_at	0.0067	0.6695	0.3703
PHKA2	209439_s_at	0.0075	0.7789	0.5435
ADH1B	209613_s_at	0.0080	0.4633	0.4864
HOXA1	214639_s_at	0.0082	0.405	0.5592
CD1E	208592_s_at	0.0083	0.0976	0.5389
SIPA1	204164_at	0.0088	0.3788	0.5373
SELPLG	209879_at	0.0090	0.0709	0.4875
NDST2	203916_at	0.0091	0.6322	0.5251
ITSN1	210713_at	0.0123	0.4015	0.4813
CDC14A	210742_at	0.0137	0.0697	0.4783
ELOVL6	204256_at	0.0157	0.6038	0.4936
DAB2	201278_at	0.0157	0.9335	0.5478
KCNJ12	208567_s_at	0.0157	0.5291	0.4658
IKBKB	209342_s_at	0.0160	0.1602	0.5326

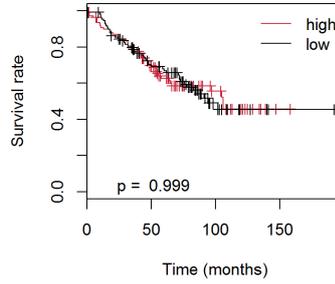
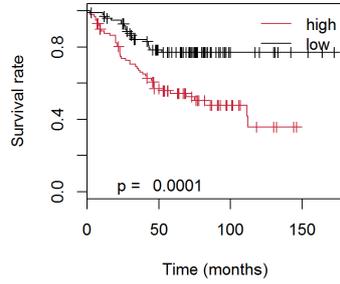
Gene Symbol	Affymetrix Probe ID	p value		Fold Change
		TP53 WT	TP53 Mut	≤ 0.57
IKBKB	211027_s_at	0.0161	0.0405	0.5326
ITSN1	209298_s_at	0.0168	0.6135	0.4813
ADRA1A	211491_at	0.0190	0.5482	0.4728
FOLR1	204437_s_at	0.0199	0.8428	0.5391
ADH1B	209612_s_at	0.0209	0.6042	0.4864
ITPR1	240052_at	0.0216	0.3676	0.5022
CLDN23	228706_s_at	0.0217	0.3573	0.5582
ATXN1	1559249_at	0.0225	0.8701	0.5369
CSNK1E	226858_at	0.0245	0.7598	0.4385
ITPR1	211323_s_at	0.0306	0.1852	0.5022
ALDH7A1	208950_s_at	0.0306	0.1347	0.5217
LITAF	200704_at	0.0309	0.9246	0.5666
GIPR	208105_at	0.0321	0.9222	0.5648
ADRA1A	211489_at	0.0328	0.0217	0.4728
NCOA3	209062_x_at	0.0328	0.894	0.3703
PI4KA	207081_s_at	0.0333	0.8502	0.5327
IL12A	207160_at	0.0335	0.1397	0.5369
SOCS1	210000_s_at	0.0348	0.6716	0.4103
MAPK10	237413_at	0.0354	0.1519	0.4790
TCEA3	226388_at	0.0357	0.9865	0.5333
INPP5K	202781_s_at	0.0378	0.8334	0.3763
MCM3	201555_at	0.0388	0.4895	0.3793
ATXN1	203232_s_at	0.0410	0.4759	0.5369
MSTN	207145_at	0.0458	0.00000423	0.5643
CDC14A	205288_at	0.0465	0.2792	0.4783
ITSN1	35776_at	0.0475	0.6957	0.4813
WIF1	204712_at	0.0489	0.1498	0.5659
ATP2B3	242036_x_at	0.0491	0.0375	0.4952

TP53 野生型

TP53 変異型

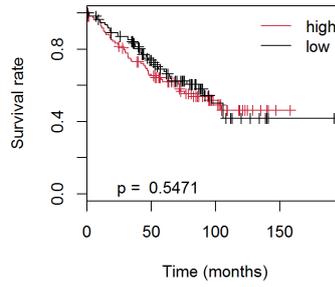
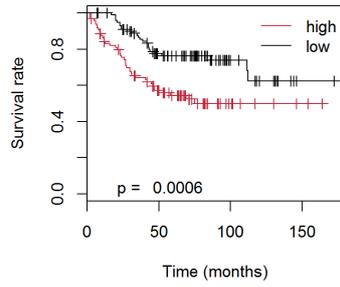
DCT_(216512_s_at)

DCT_(216512_s_at)



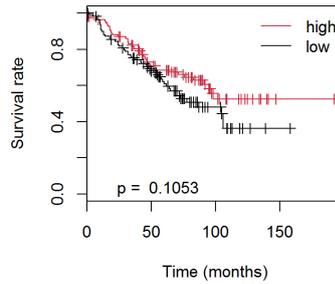
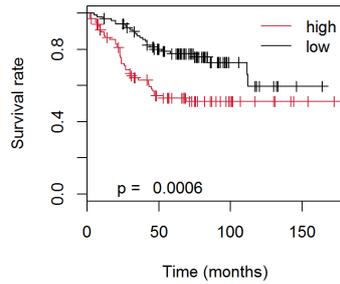
AMOTL1_(235277_at)

AMOTL1_(235277_at)



MAP2K5_(216765_at)

MAP2K5_(216765_at)



CPSF1_(201638_s_at)

CPSF1_(201638_s_at)

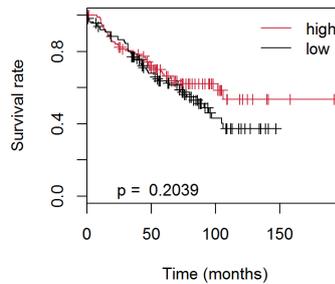
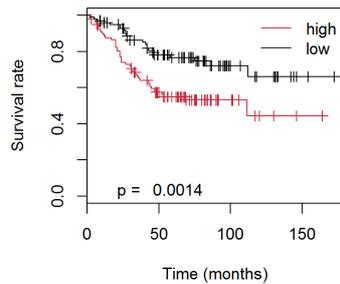


図 3-4 大腸がん検体の生存曲線 (FC \geq 1.75)

TP53 野生型

TP53 変異型

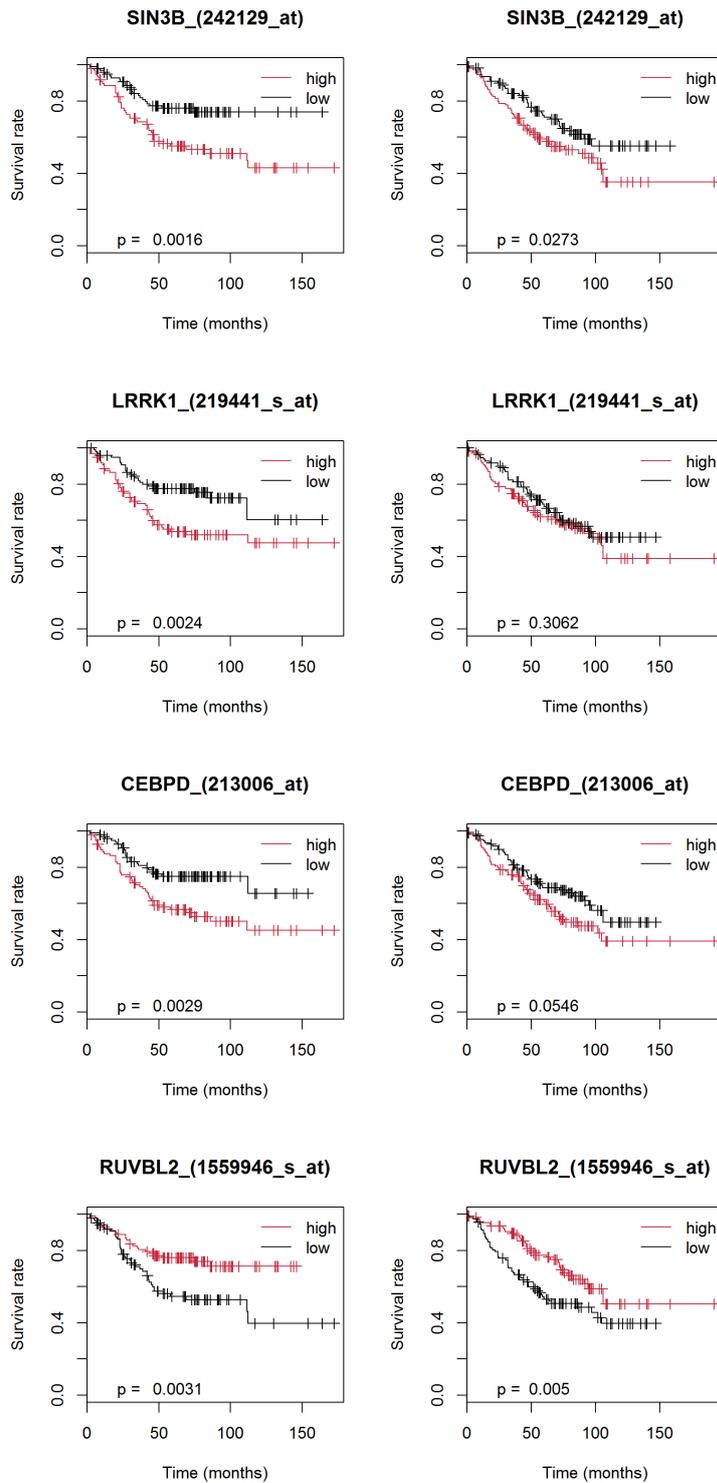


図 3-4 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≥ 1.75) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

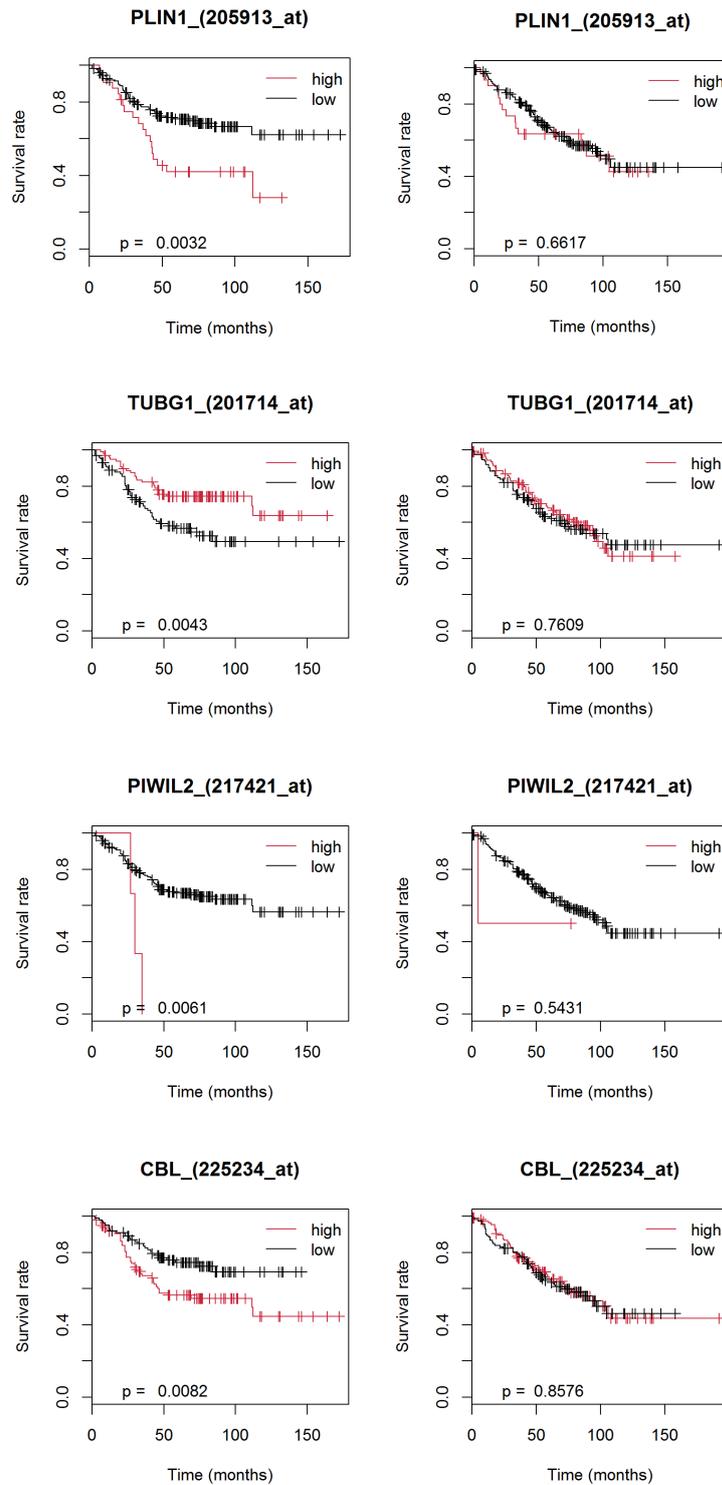


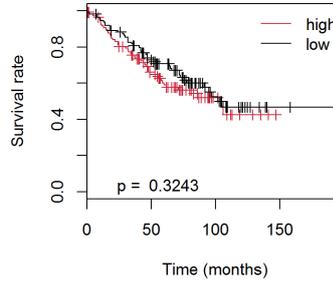
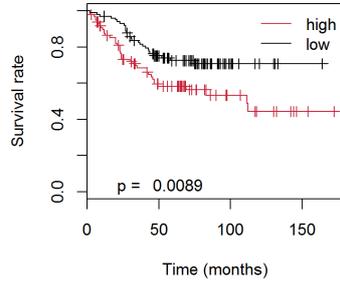
図 3-4 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≥ 1.75) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

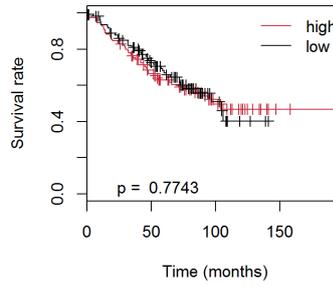
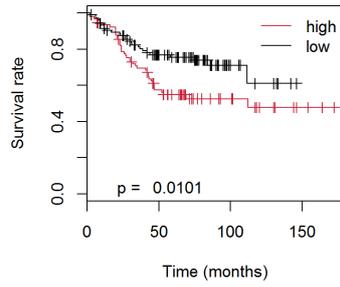
STMN2_(203001_s_at)

STMN2_(203001_s_at)



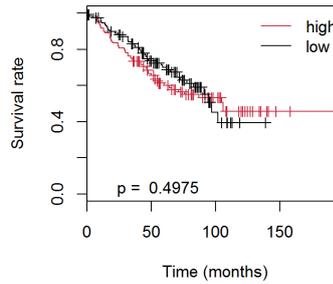
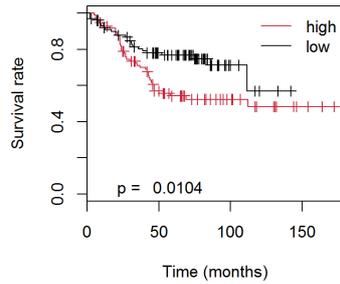
NEK1_(1564093_at)

NEK1_(1564093_at)



PIGT_(1568986_x_at)

PIGT_(1568986_x_at)



EPAS1_(200879_s_at)

EPAS1_(200879_s_at)

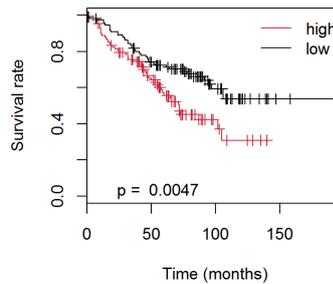
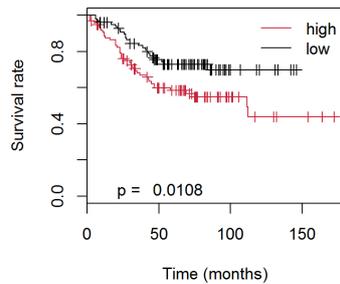


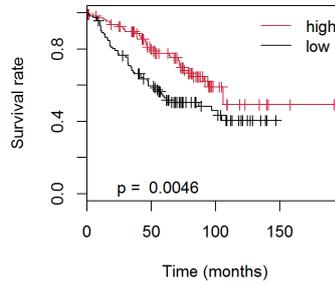
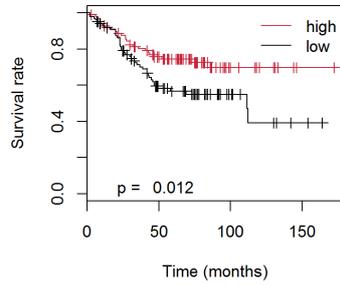
図 3-4 大腸がん検体の生存曲線 (FC \geq 1.75) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

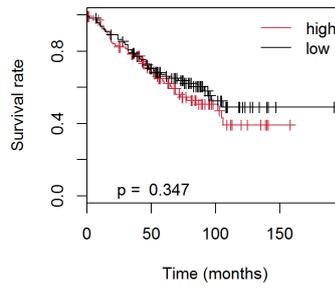
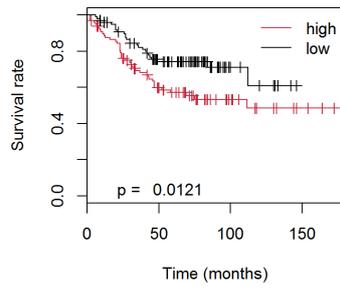
RUVBL2_(201459_at)

RUVBL2_(201459_at)



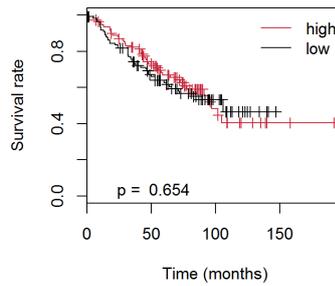
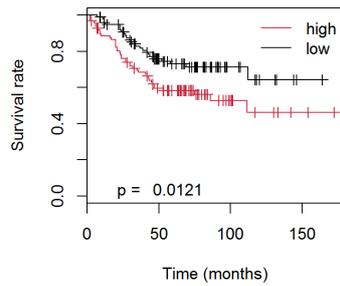
EPAS1_(200878_at)

EPAS1_(200878_at)



EIF2AK2_(204211_x_at)

EIF2AK2_(204211_x_at)



CBL_(225231_at)

CBL_(225231_at)

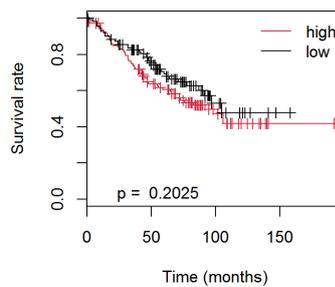
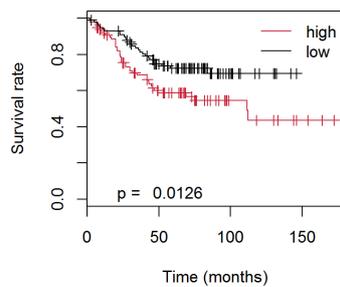


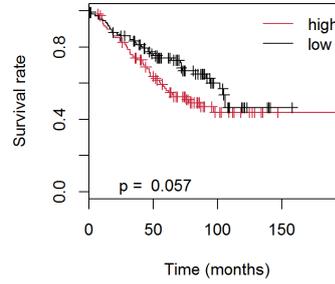
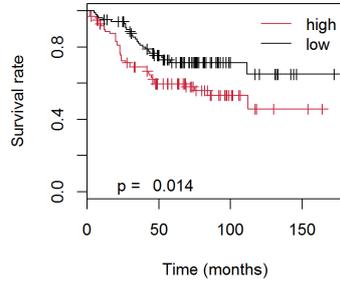
図 3-4 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≥ 1.75) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

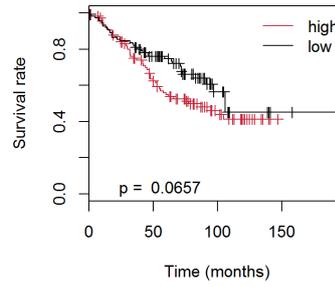
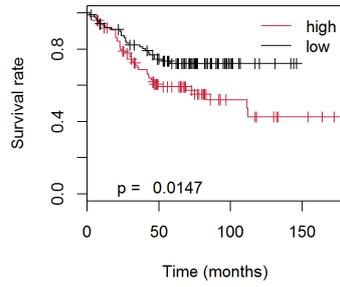
RBL2_(212331_at)

RBL2_(212331_at)



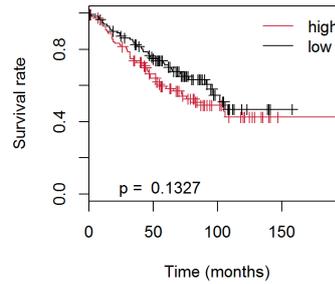
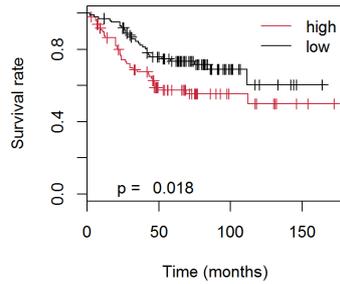
LIG4_(206235_at)

LIG4_(206235_at)



NFATC3_(210556_at)

NFATC3_(210556_at)



EPHB3_(204600_at)

EPHB3_(204600_at)

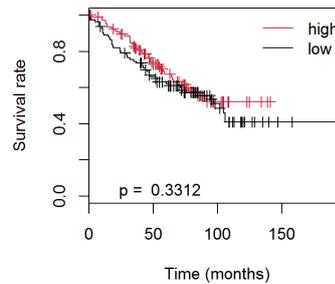
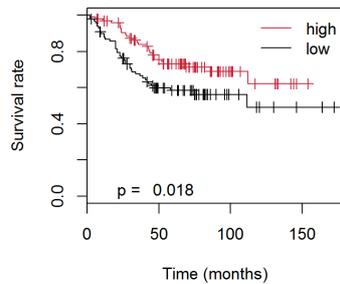


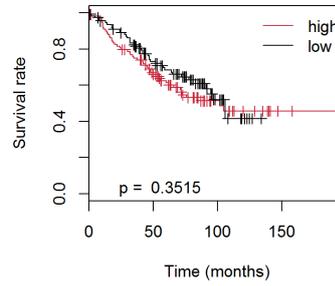
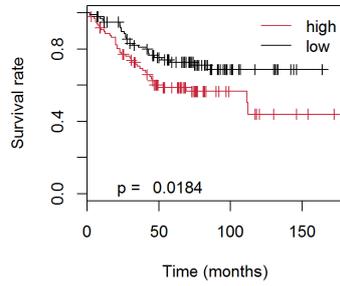
図 3-4 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≥ 1.75) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

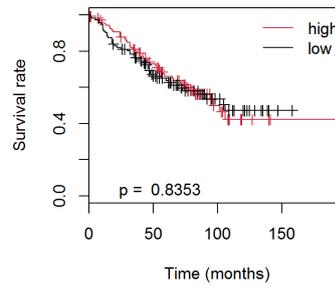
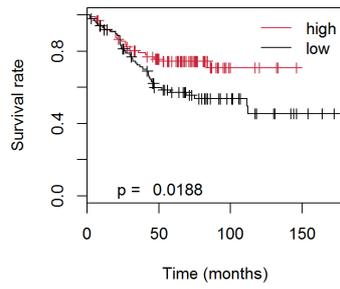
C3AR1_(209906_at)

C3AR1_(209906_at)



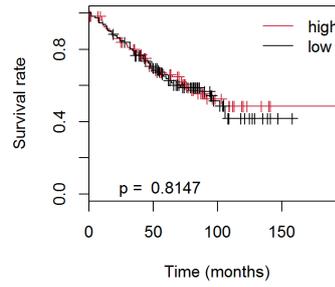
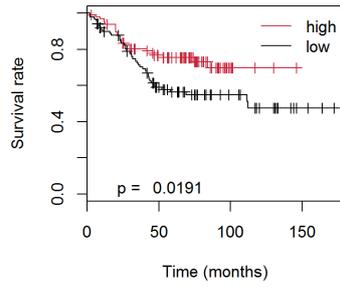
TP53_(201746_at)

TP53_(201746_at)



ARF6_(224788_at)

ARF6_(224788_at)



CASP4_(213596_at)

CASP4_(213596_at)

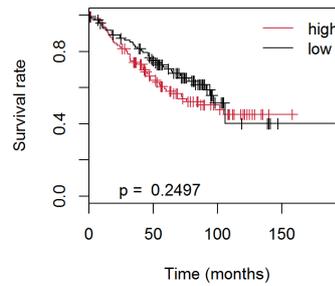
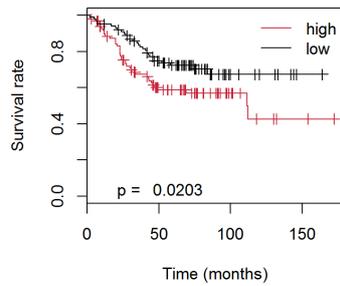


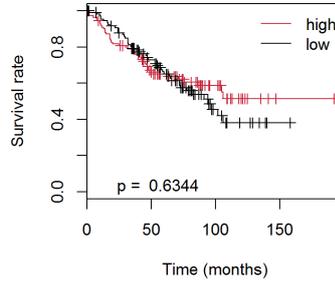
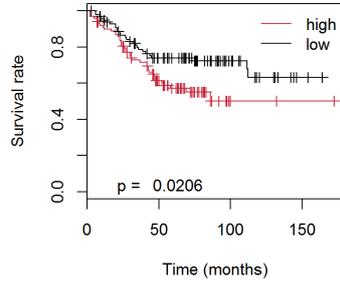
図 3-4 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≥ 1.75) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

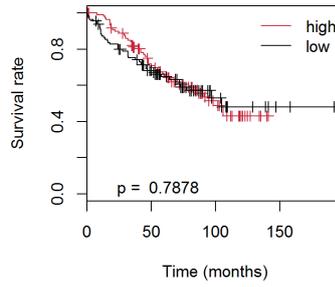
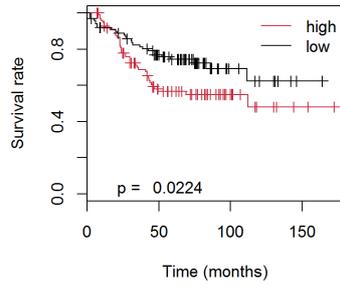
KCNJ3_(233059_at)

KCNJ3_(233059_at)



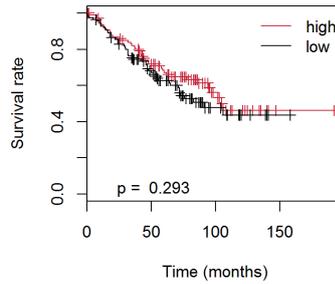
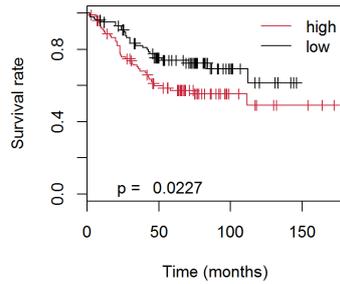
API5_(233078_at)

API5_(233078_at)



AKAP1_(210626_at)

AKAP1_(210626_at)



PAFAH1B1_(211547_s_at)

PAFAH1B1_(211547_s_at)

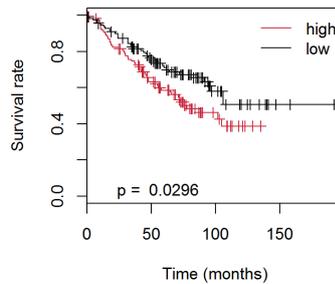
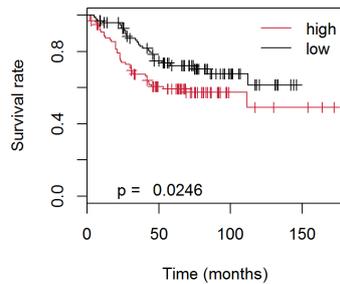


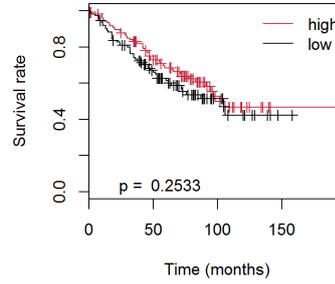
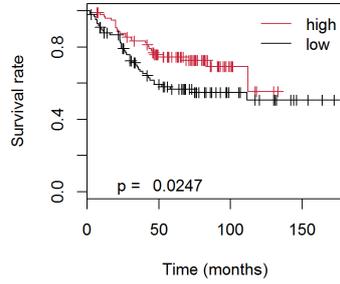
図 3-4 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≥ 1.75) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

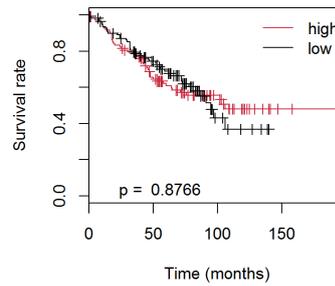
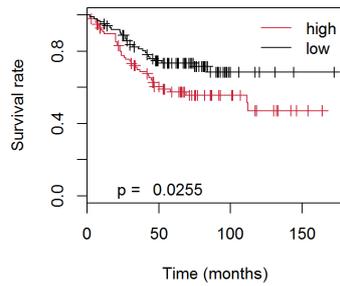
API5_(201687_s_at)

API5_(201687_s_at)



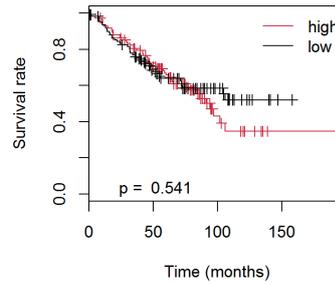
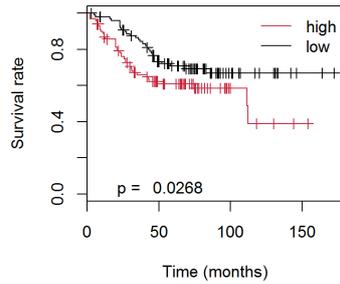
KRT7_(1558393_at)

KRT7_(1558393_at)



CYP2R1_(207786_at)

CYP2R1_(207786_at)



TCERG1_(229706_at)

TCERG1_(229706_at)

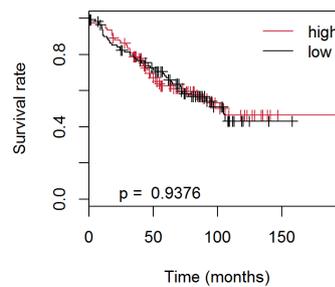
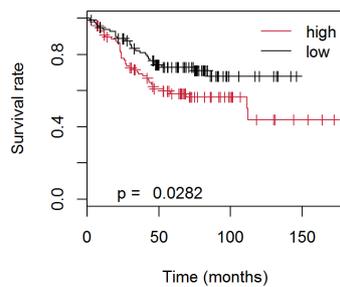


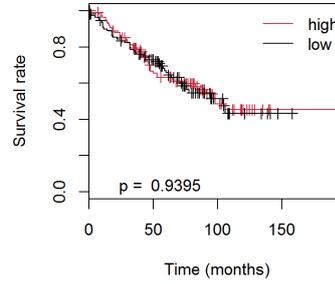
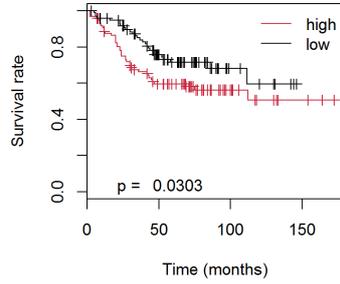
図 3-4 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≥ 1.75) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

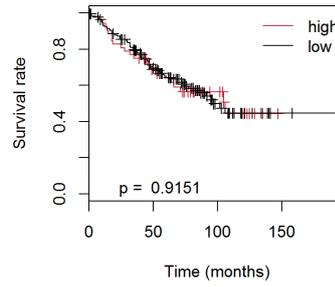
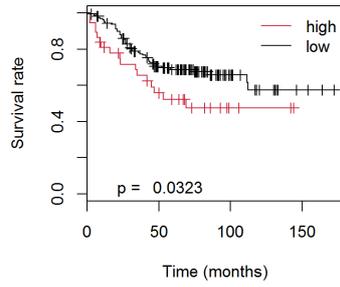
EIF3A_(200596_s_at)

EIF3A_(200596_s_at)



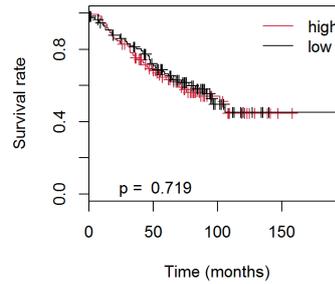
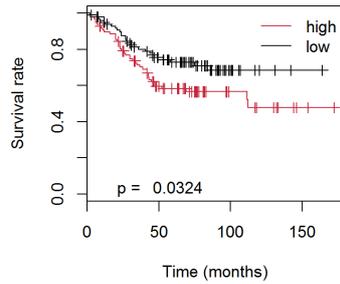
CHRNA1_(211039_at)

CHRNA1_(211039_at)



AQP1_(207542_s_at)

AQP1_(207542_s_at)



PI4KA_(207081_s_at)

PI4KA_(207081_s_at)

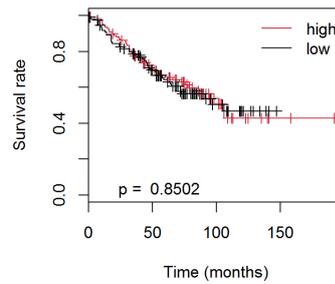
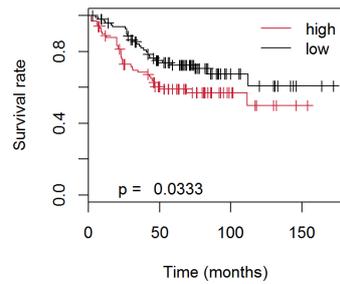


図 3-4 大腸がん検体の生存曲線 (FC \geq 1.75) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

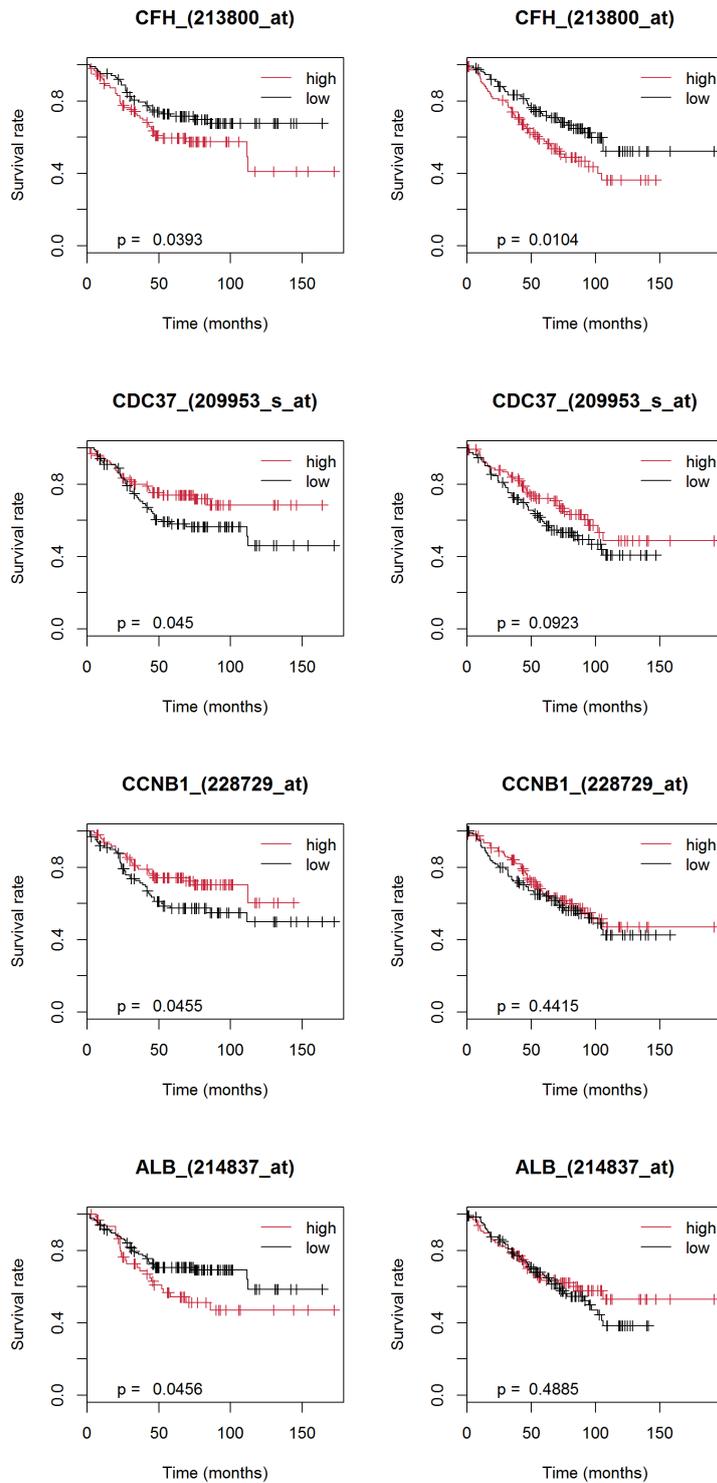


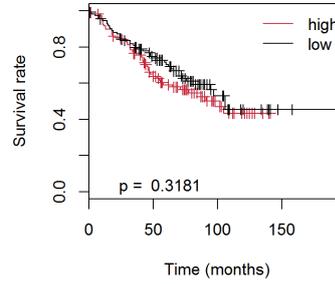
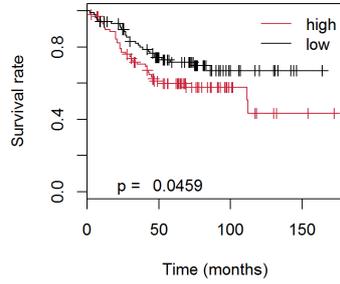
図 3-4 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≥ 1.75) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

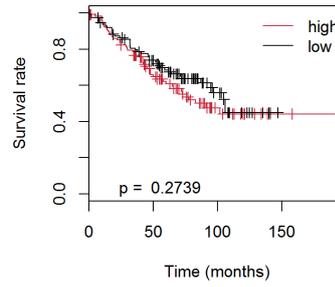
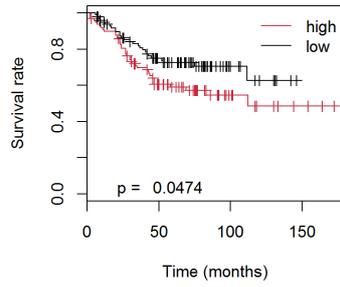
SP1_(1553685_s_at)

SP1_(1553685_s_at)



SPRY4_(221489_s_at)

SPRY4_(221489_s_at)



TRAFD1_(242497_at)

TRAFD1_(242497_at)

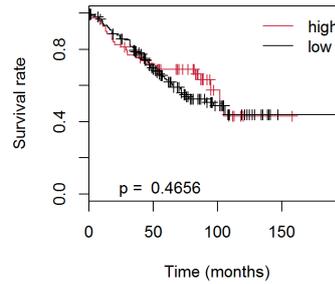
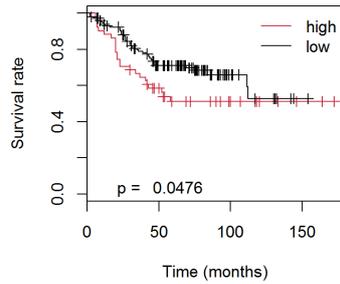


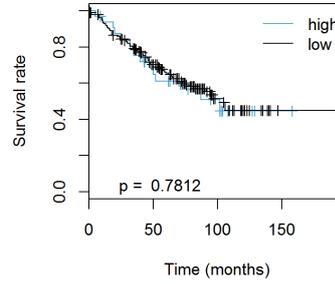
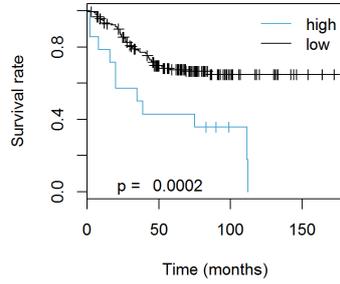
図 3-4 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≥ 1.75) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

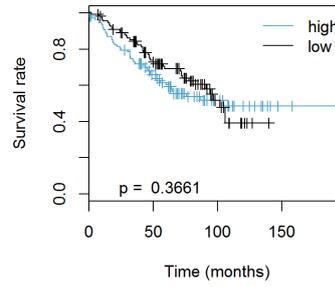
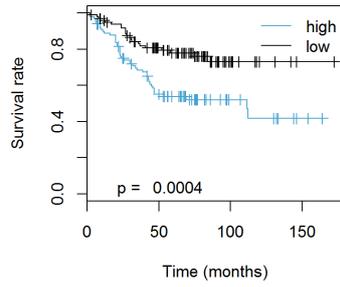
WNT9B_(1552973_at)

WNT9B_(1552973_at)



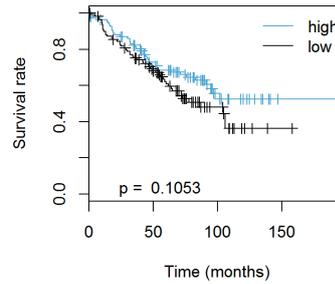
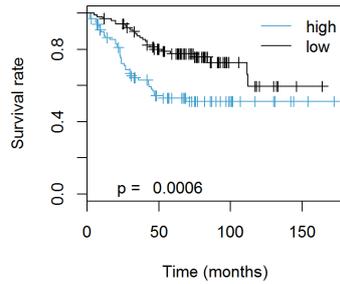
MAPK10_(204813_at)

MAPK10_(204813_at)



MAP2K5_(216765_at)

MAP2K5_(216765_at)



RFC5_(203209_at)

RFC5_(203209_at)

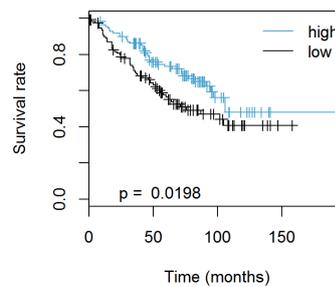
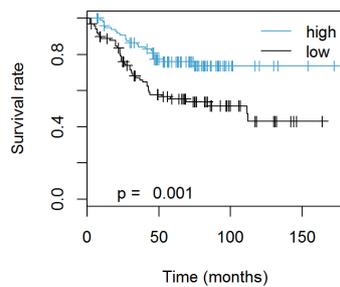


図 3-5 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≤ 0.57)

TP53 野生型

TP53 変異型

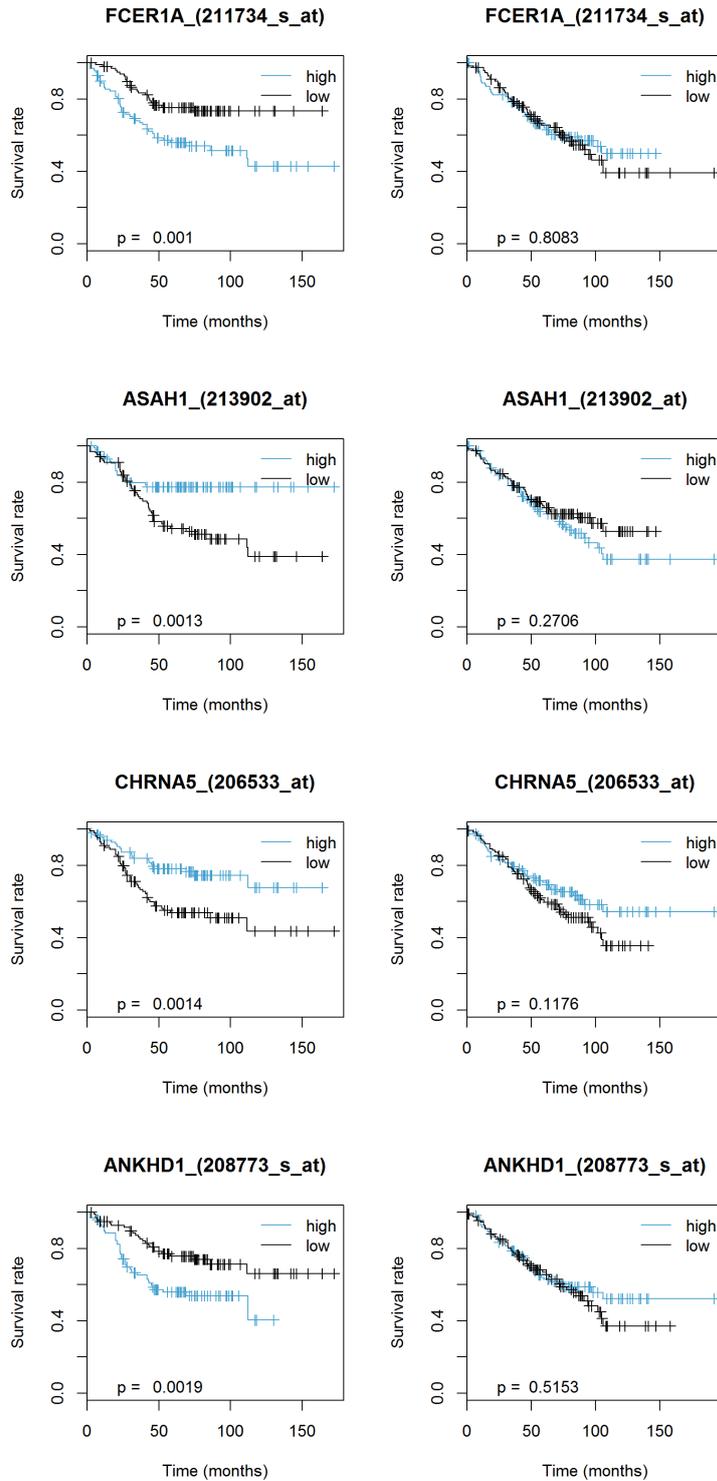


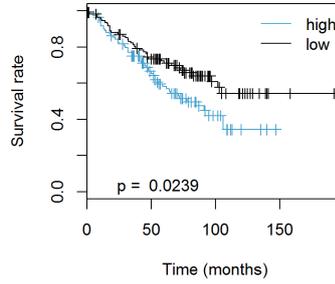
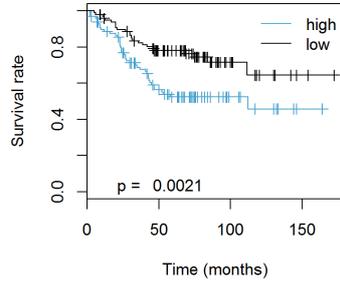
図 3-5 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≤ 0.57) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

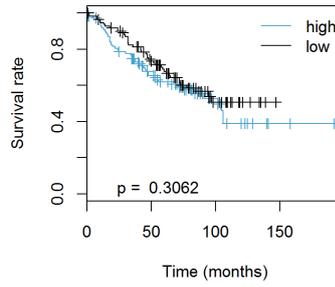
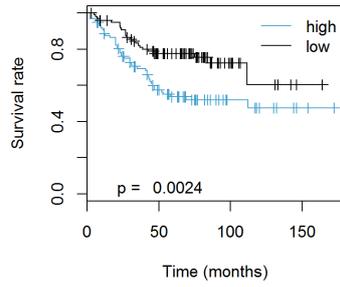
MTHFS_(1559069_at)

MTHFS_(1559069_at)



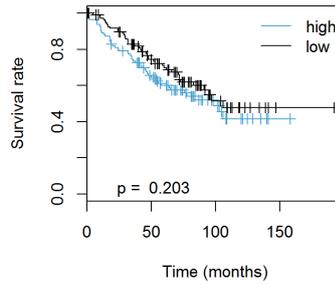
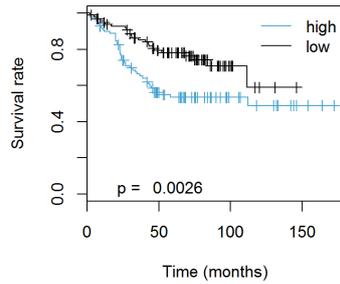
LRRK1_(219441_s_at)

LRRK1_(219441_s_at)



EZH1_(239197_s_at)

EZH1_(239197_s_at)



DMD_(234752_x_at)

DMD_(234752_x_at)

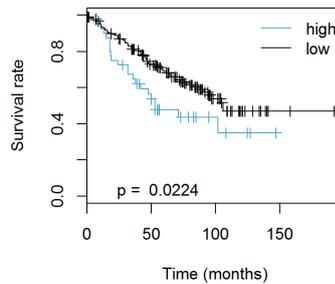
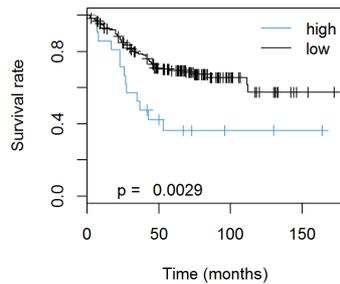


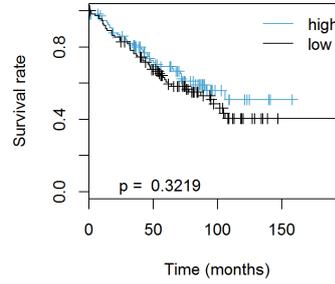
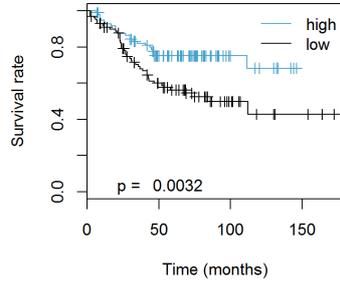
図 3-5 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≤ 0.57) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

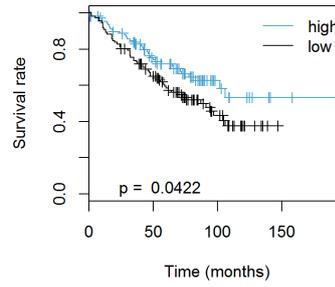
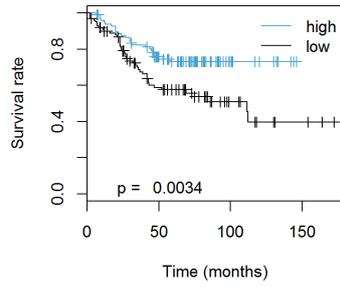
MCM5_(201755_at)

MCM5_(201755_at)



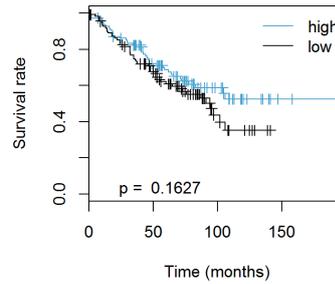
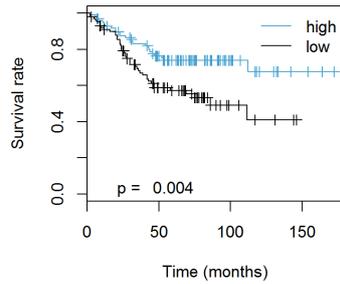
MCM5_(216237_s_at)

MCM5_(216237_s_at)



COQ2_(213379_at)

COQ2_(213379_at)



ELOVL6_(210868_s_at)

ELOVL6_(210868_s_at)

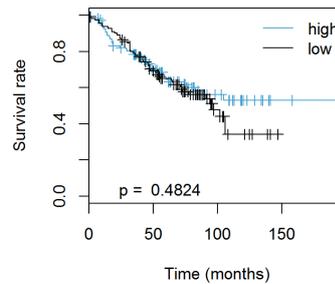
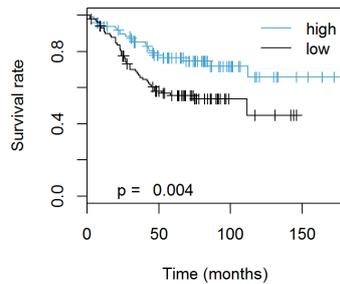


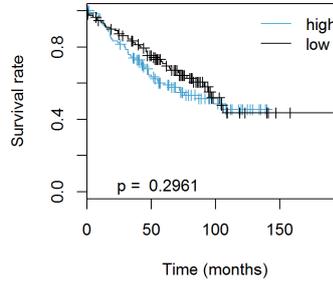
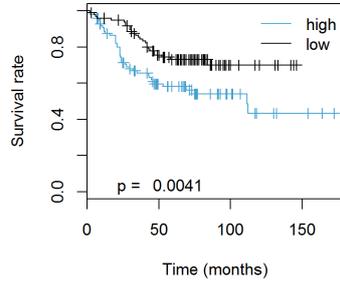
図 3-5 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≤ 0.57) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

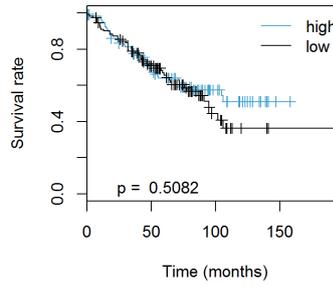
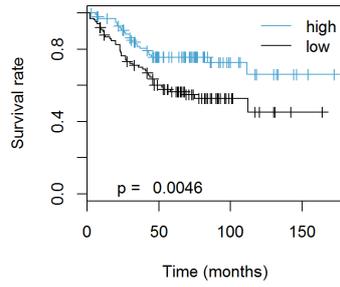
DAB2_(232898_at)

DAB2_(232898_at)



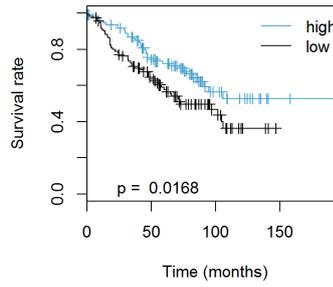
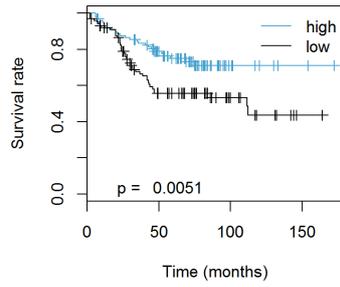
AFMID_(240318_at)

AFMID_(240318_at)



RFC5_(203210_s_at)

RFC5_(203210_s_at)



RFC5_(213734_at)

RFC5_(213734_at)

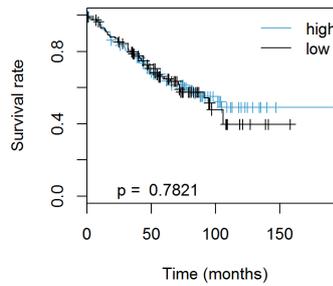
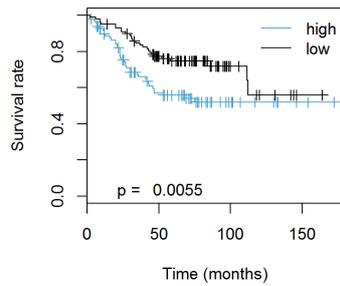


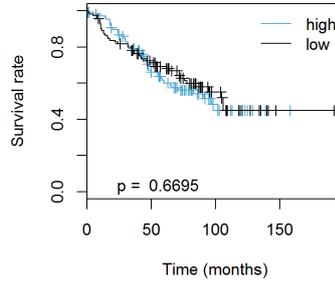
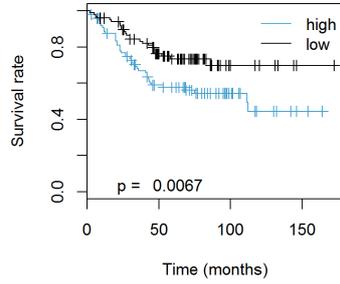
図 3-5 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≤ 0.57) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

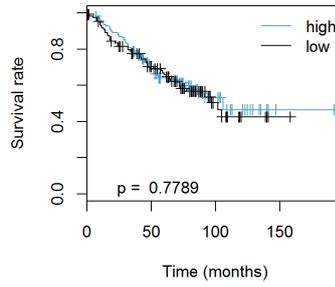
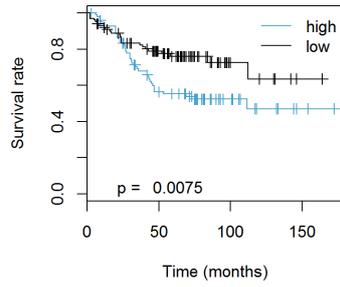
NCOA3_(209060_x_at)

NCOA3_(209060_x_at)



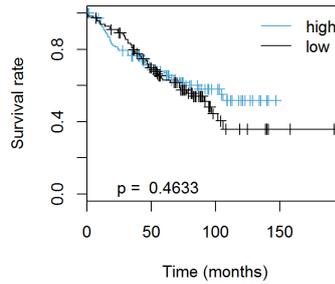
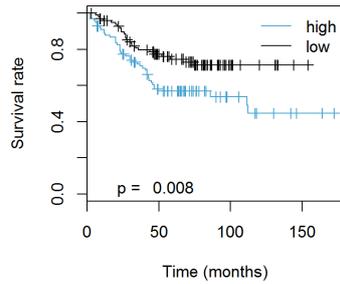
PHKA2_(209439_s_at)

PHKA2_(209439_s_at)



ADH1B_(209613_s_at)

ADH1B_(209613_s_at)



HOXA1_(214639_s_at)

HOXA1_(214639_s_at)

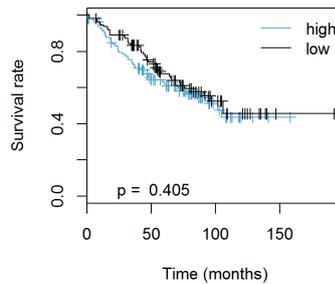
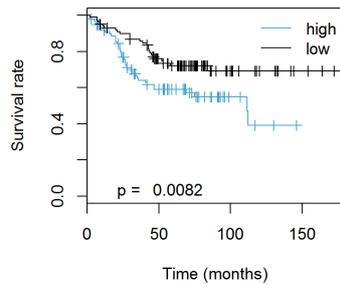


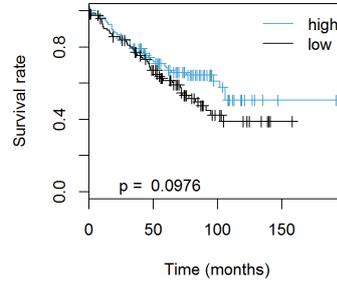
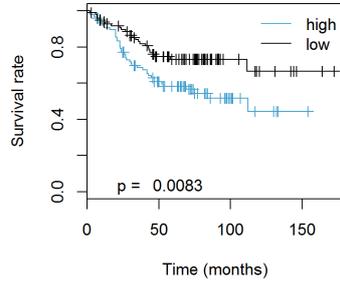
図 3-5 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≤ 0.57) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

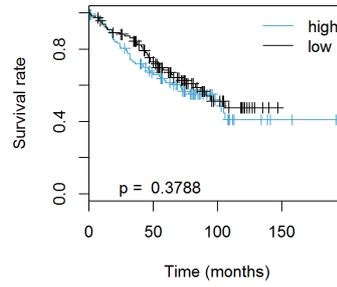
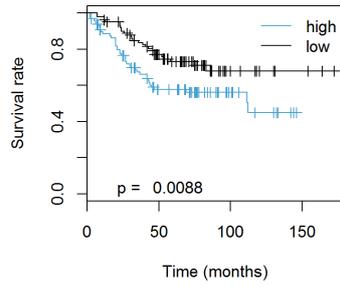
CD1E_(208592_s_at)

CD1E_(208592_s_at)



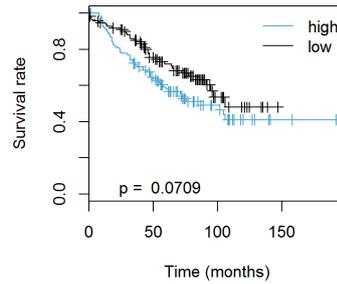
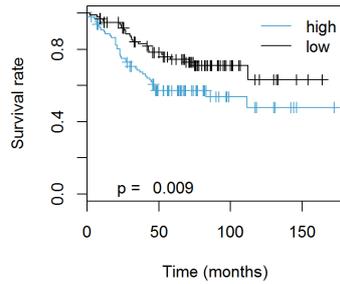
SIPA1_(204164_at)

SIPA1_(204164_at)



SELPLG_(209879_at)

SELPLG_(209879_at)



NDST2_(203916_at)

NDST2_(203916_at)

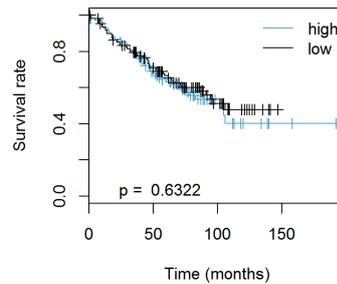
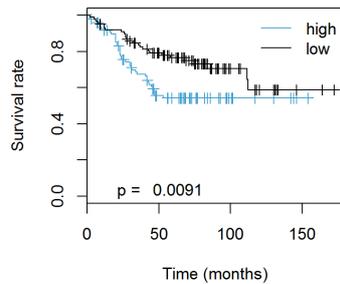


図 3-5 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≤ 0.57) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

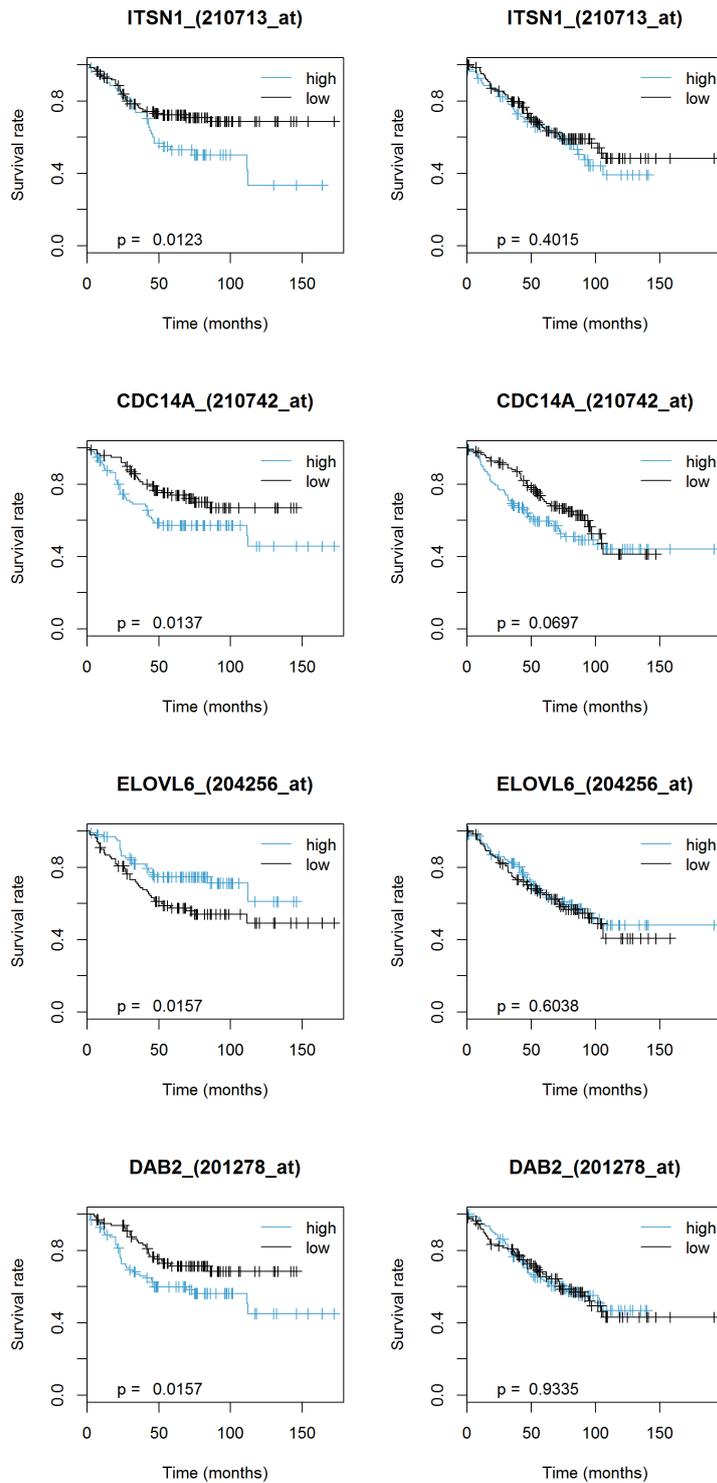


図 3-5 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≤ 0.57) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

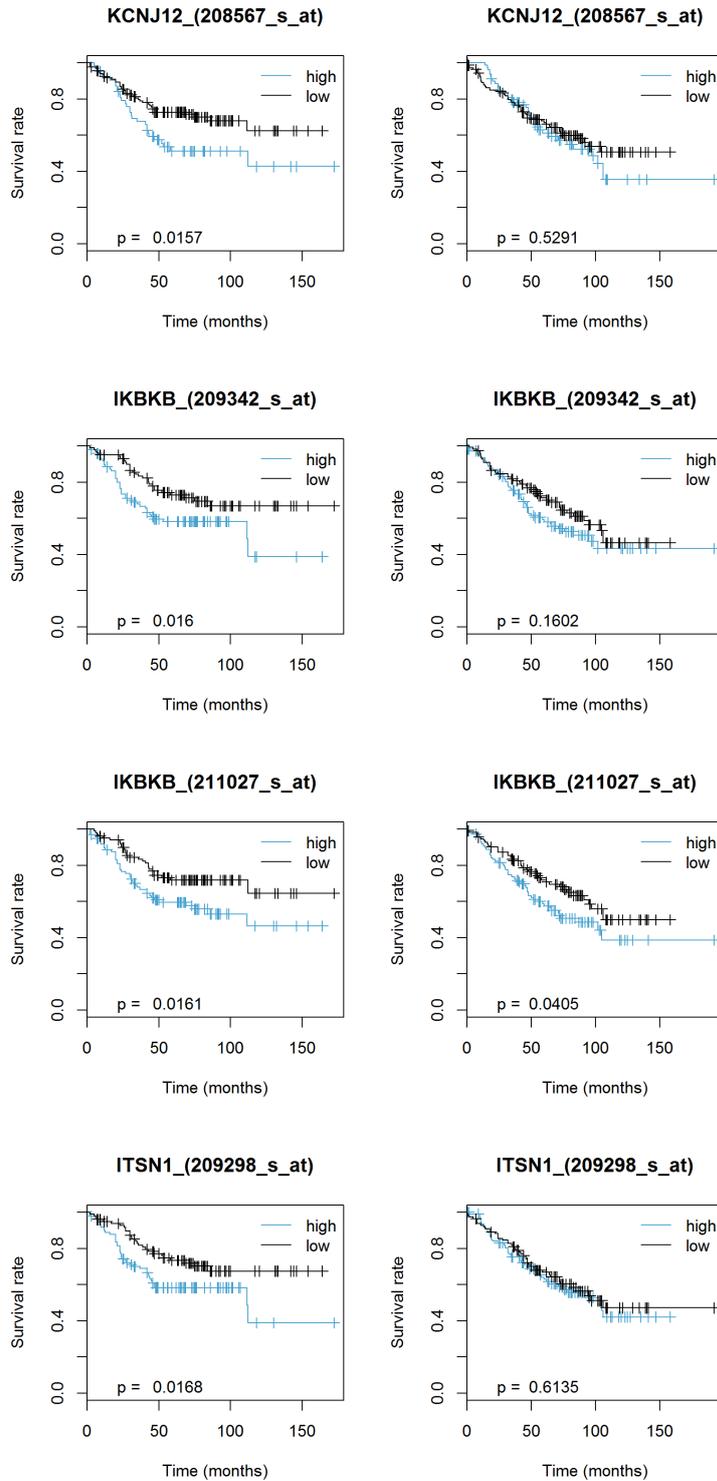


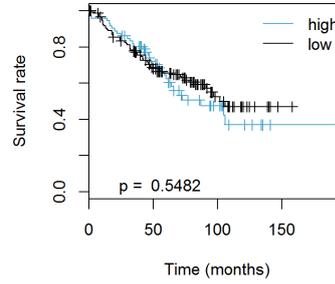
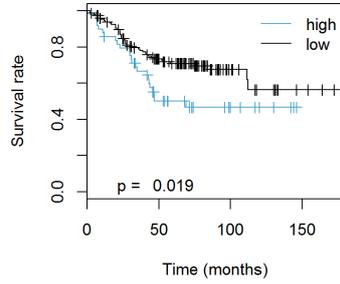
図 3-5 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≤ 0.57) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

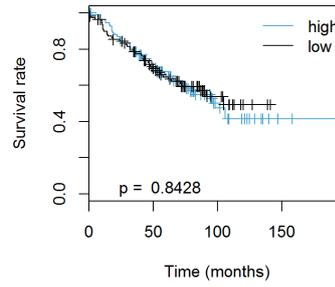
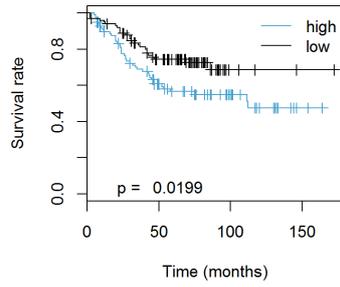
ADRA1A_(211491_at)

ADRA1A_(211491_at)



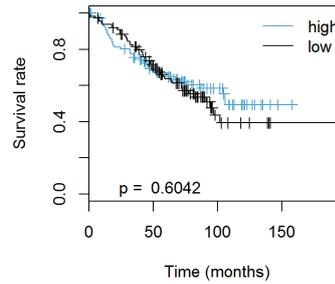
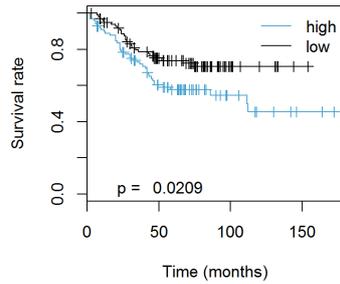
FOLR1_(204437_s_at)

FOLR1_(204437_s_at)



ADH1B_(209612_s_at)

ADH1B_(209612_s_at)



ITPR1_(240052_at)

ITPR1_(240052_at)

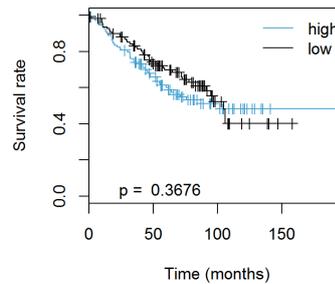
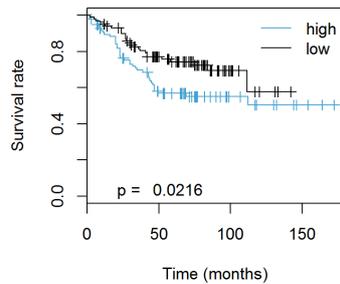


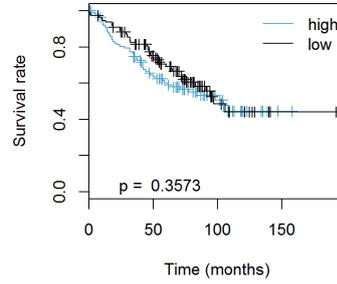
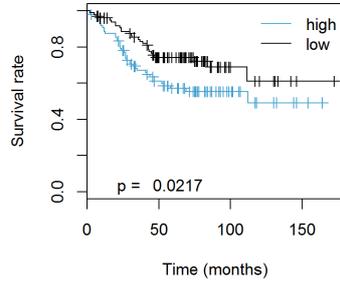
図 3-5 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≤ 0.57) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

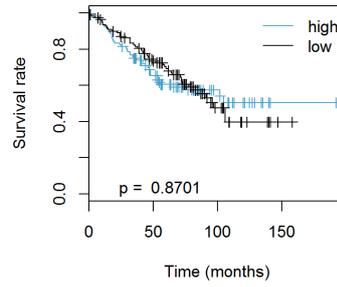
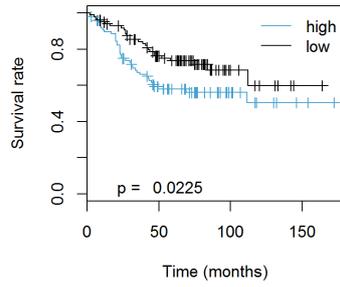
CLDN23_(228706_s_at)

CLDN23_(228706_s_at)



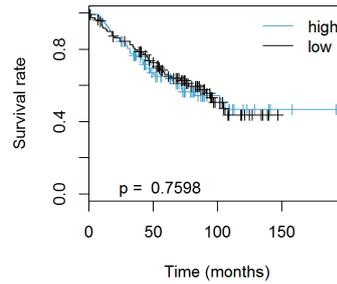
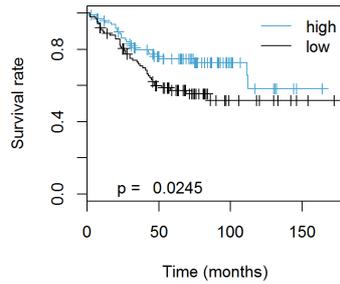
ATXN1_(1559249_at)

ATXN1_(1559249_at)



CSNK1E_(226858_at)

CSNK1E_(226858_at)



ITPR1_(211323_s_at)

ITPR1_(211323_s_at)

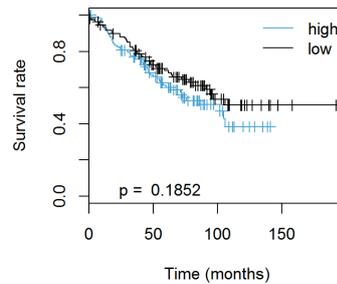
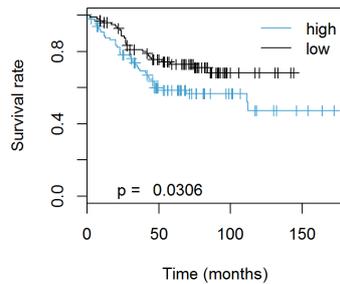


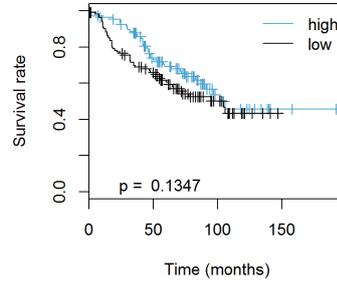
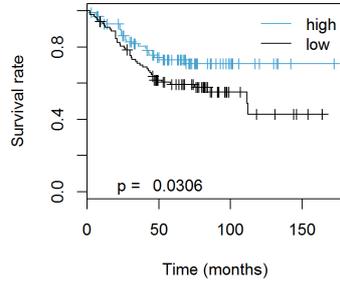
図 3-5 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≤ 0.57) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

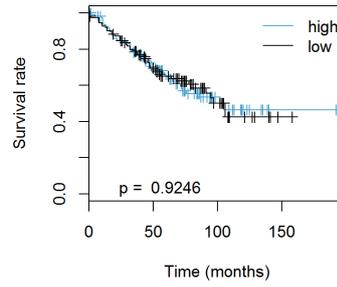
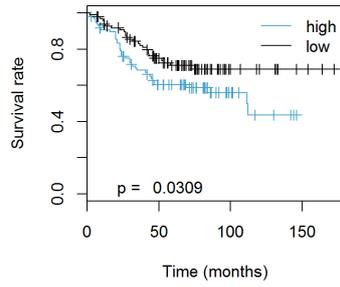
ALDH7A1_(208950_s_at)

ALDH7A1_(208950_s_at)



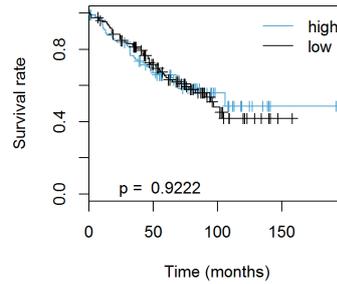
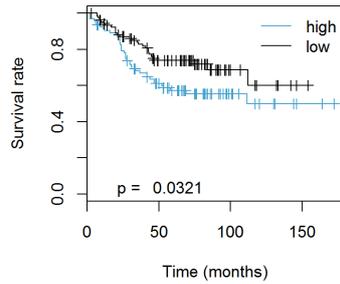
LITAF_(200704_at)

LITAF_(200704_at)



GIPR_(208105_at)

GIPR_(208105_at)



ADRA1A_(211489_at)

ADRA1A_(211489_at)

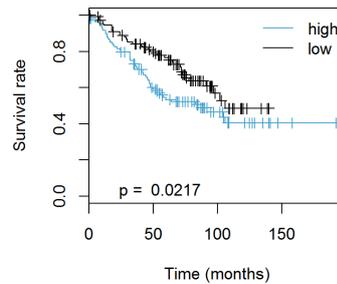
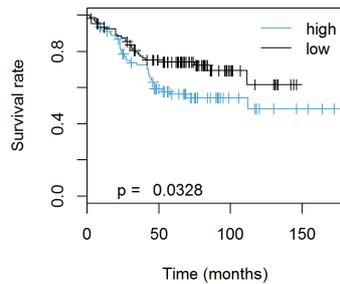


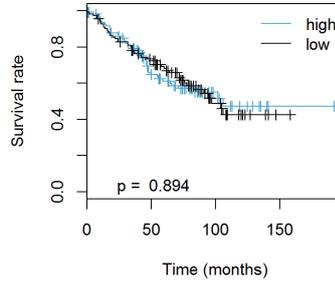
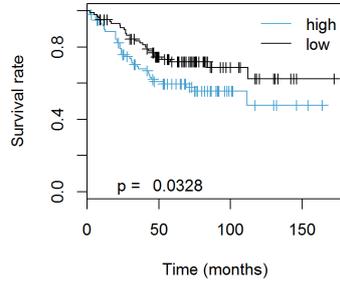
図 3-5 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≤ 0.57) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

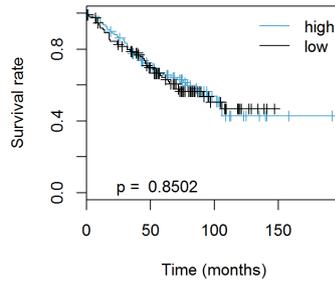
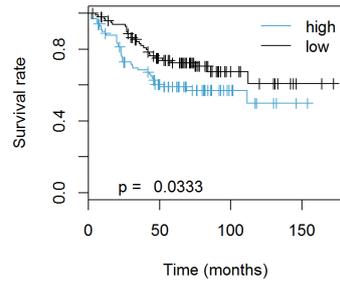
NCOA3_(209062_x_at)

NCOA3_(209062_x_at)



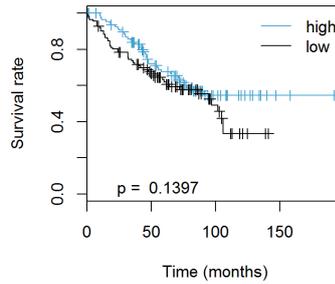
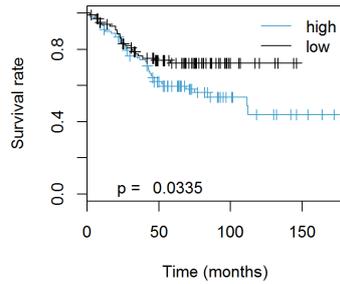
PI4KA_(207081_s_at)

PI4KA_(207081_s_at)



IL12A_(207160_at)

IL12A_(207160_at)



SOCS1_(210000_s_at)

SOCS1_(210000_s_at)

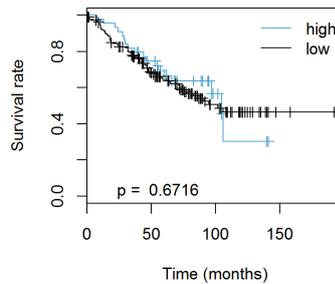
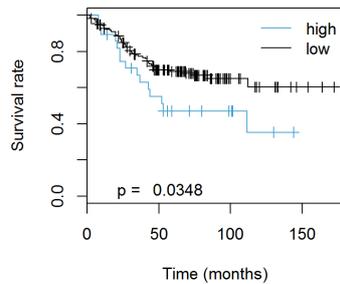


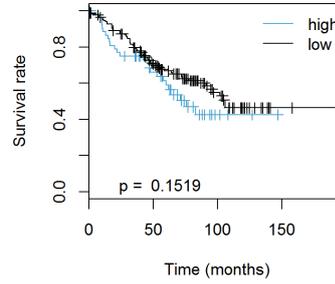
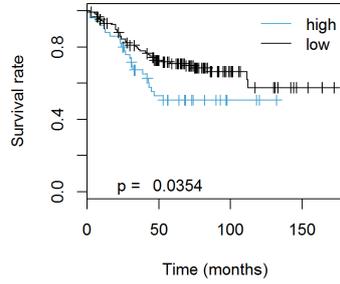
図 3-5 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≤ 0.57) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

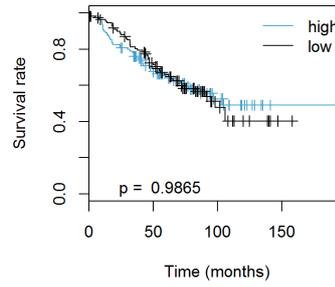
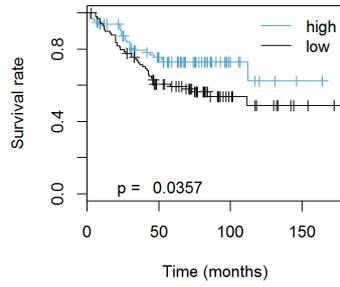
MAPK10_(237413_at)

MAPK10_(237413_at)



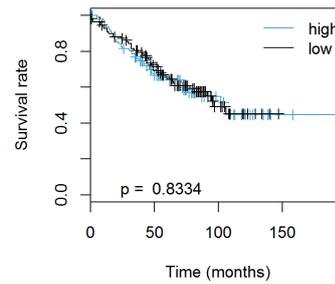
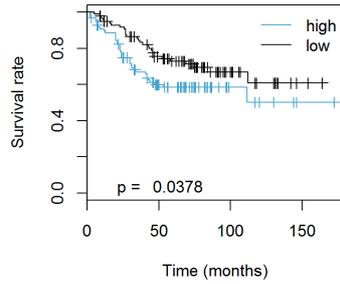
TCEA3_(226388_at)

TCEA3_(226388_at)



INPP5K_(202781_s_at)

INPP5K_(202781_s_at)



MCM3_(201555_at)

MCM3_(201555_at)

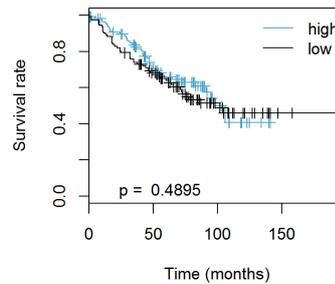
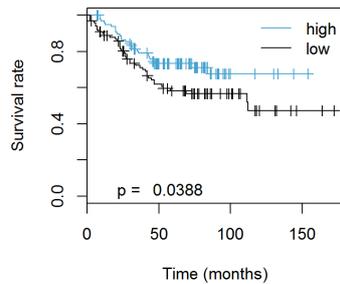


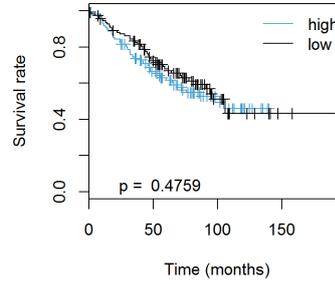
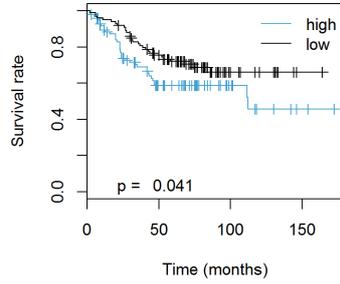
図 3-5 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≤ 0.57) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

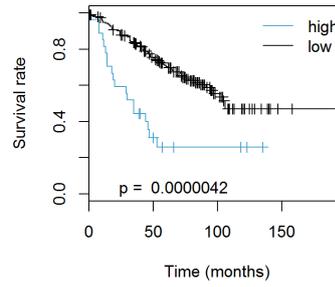
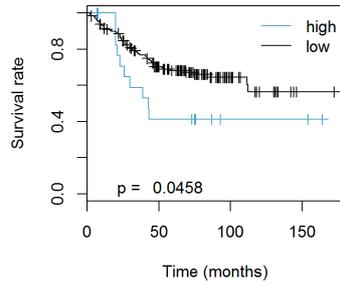
ATXN1_(203232_s_at)

ATXN1_(203232_s_at)



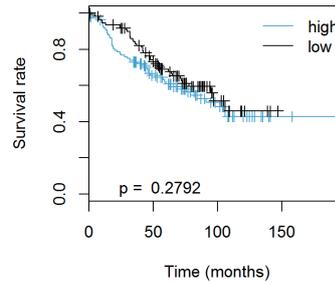
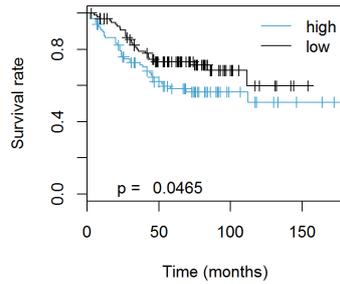
MSTN_(207145_at)

MSTN_(207145_at)



CDC14A_(205288_at)

CDC14A_(205288_at)



ITSN1_(35776_at)

ITSN1_(35776_at)

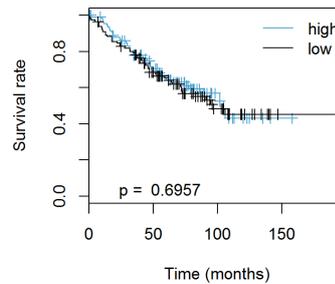
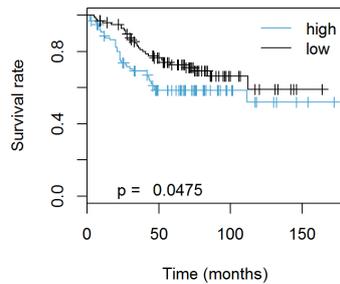


図 3-5 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≤ 0.57) (続き)

TP53 野生型

TP53 変異型

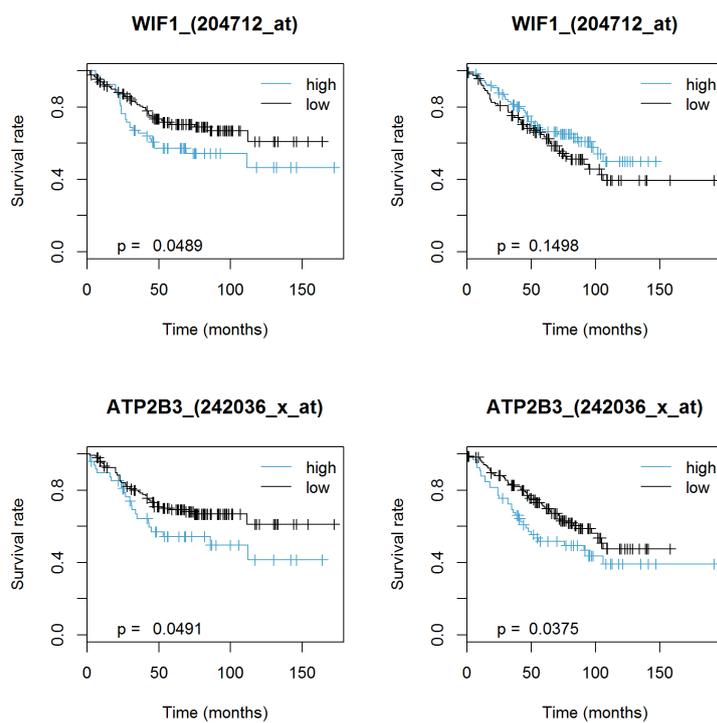


図 3-5 大腸がん検体の生存曲線 (FC ≤ 0.57) (続き)

表 3-3 p53 野生型および変異型患者の生存予後の相関と傾向の一覧

Fold Change ≥ 1.75			
WT p < 0.05 Mut p < 0.05	WT p < 0.05 Mut p ≥ 0.05 生存曲線の傾向不一致		WT p < 0.05 Mut p ≥ 0.05 生存曲線の傾向一致
	SIN3B	DCT	C3AR1
RUVBL2	AMOTL1	CASP4	EPHB3
EPAS1	MAP2K5	KCNJ3	TP53
PAFAH1B1	CPSF1	API5	ARF6
CFH	LRRK1	AKAP1	API5
	CEBPD	KRT7	CDC37
	PLIN1	CYP2R1	CCNB1
	PIWIL2	TCERG1	
	CBL	EIF3A	
	STMN2	CHRNA1	
	NEK1	AQP1	
	PIGT	PI4KA	
	EPAS1	ALB	
	EIF2AK2	SP1	
	RBL2	SPRY4	
	LIG4	TRAFD1	
	NFATC3		

Fold Change ≤ 0.57			
WT p < 0.05 Mut p < 0.05	WT p < 0.05 Mut p ≥ 0.05 生存曲線の傾向不一致	WT p < 0.05 Mut p ≥ 0.05 生存曲線の傾向一致	
RFC5	ASAH1	WNT9B	ITSN1
MTHFS	CHRNA5	MAPK10	CDC14A
DMD	MCM5	MAP2K5	KCNJ12
MCM5	COQ2	FCER1A	IKBKB
IKBKB	ELOVL6	ANKHD1	ADRA1A
ADRA1A	AFMID	LRRK1	FOLR1
MSTN	CSNK1E	EZH1	ITPR1
ATP2B3	ALDH7A1	DAB2	CLDN23
	TCEA3	RFC5	ATXN1
	MCM3	NCOA3	LITAF
		PHKA2	GIPR
		ADH1B	PI4KA
		HOXA1	IL12A
		CD1E	SOCS1
		SIPA1	INPP5K
		SELPLG	WIF1
		NDST2	

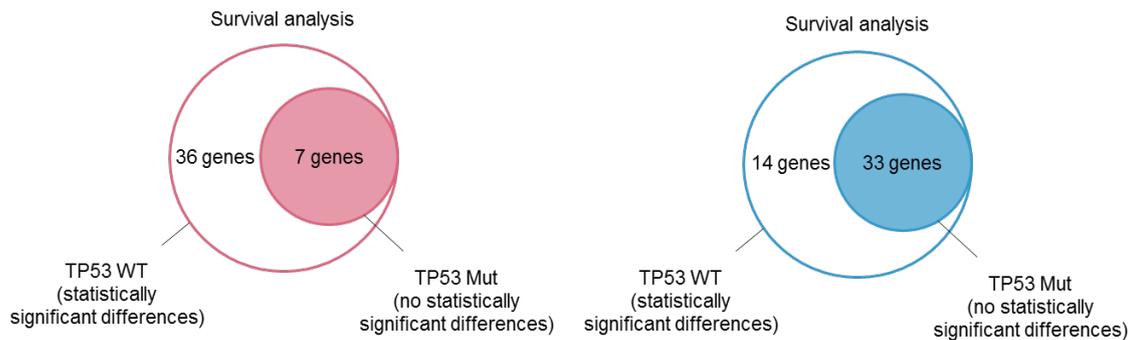


図 3-6 TP53 変異依存的に大腸がん患者の生存性へ影響する遺伝子数

ActD 感受性遺伝子（赤）および ActD 耐性遺伝子（青）において、TP53 野生型患者の生存性に有意に影響するが、TP53 変異型患者の生存性では影響が見られず、かつ生存曲線の傾向が想定と一致した遺伝子を示す。

3-3-4. ActD 感受性とがん患者の生存予後に寄与する遺伝子群の機能解析

選択された 40 遺伝子の機能を調べると、選択された遺伝子は細胞の生存性、細胞周期チェックポイント、薬剤耐性などの機能を有することがわかった（図 3-7）。これらの機能は p53 が制御するものと一致しており、スクリーニングと生存時間解析を組み合わせた解析によって選択された遺伝子が p53 経路に関連することが示唆された。

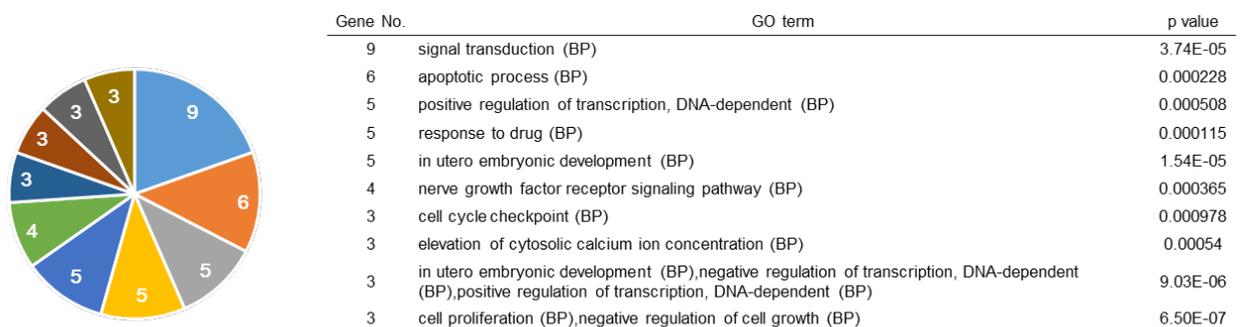


図 3-7 shRNA ライブラリースクリーニングとデータベース解析による p53 経路関連遺伝子候補の機能解析結果

p53 経路の制御遺伝子として選択された 40 遺伝子の機能解析結果 ($p \leq 0.00097773$)。Gene No.はその GO term を持つ遺伝子数、GO term はその遺伝子の Biological Process。

3-4. 小括

第2章で、shRNA ライブラリーを用いて、ActD に対する感受性を変化させる 322 遺伝子をスクリーニングした。ActD は p53 を作動させる薬剤であることから、ActD 感受性を変化させる遺伝子は p53 経路に関連していることが考えられた。しかし、これらの遺伝子群には疑陽性遺伝子が含まれていることが想定され、それらを除く必要があった。そこで、データベース解析を行い、スクリーニングで選択された 322 遺伝子に対して、p53 が正常に機能しているがん患者でのみ予後生存に影響する遺伝子を選択することで、疑陽性遺伝子の排除を行った。約 39,000 遺伝子について、TP53 野生型大腸がん患者の生存時間解析を行った。その結果、5,974 遺伝子について TP53 野生型大腸がん患者の生存性に有意に影響した。これらの遺伝子とスクリーニングされた 322 遺伝子の中で、生存傾向が一致する遺伝子を選択すると、FC 値が 1.75 以上となるものは 43 遺伝子、0.57 以下となるものは 47 遺伝子であった。これらの遺伝子について、TP53 変異型大腸がん患者では生存予後に影響しない遺伝子を同様に解析したところ、FC 値が 1.75 以上となるものは 7 遺伝子、0.57 以下となるものは 33 遺伝子であり、これらの遺伝子は p53 との関連が推定された。選択された 40 遺伝子の機能を調べると、細胞の生存性、細胞周期チェックポイント、薬剤耐性などに関連することがわかった。これらは p53 の正常な機能に一致しており、p53 と関連した遺伝子が選択されていることが示唆された。

第4章 結語

今回、shRNA ライブラリースクリーニングとヒト腫瘍患者の発現データベース解析を組み合わせることで、p53 機能依存的に大腸がん患者の生存予後に影響する 40 遺伝子を同定することができた。選択された遺伝子群の機能を解析すると、アポトーシス経路や薬剤への応答、細胞周期のチェックポイント、細胞増殖等の、p53 経路との関連が考えられる機能を有することが示された。同定された 40 遺伝子の中には、CCNB1¹⁾、ANKHD1²⁾、NCOA3³⁾、SIPA1⁴⁾、IKBKB⁵⁾、LITAF⁶⁾等の既知の p53 経路において働く遺伝子が含まれていた。この結果から、*in vitro* な shRNA ライブラリースクリーニングと *in silico* な生存予後解析を組み合わせた本手法は、p53 経路で機能する遺伝子の有効な選択法であることが示唆された。

p53 経路に関連するがん患者の生存因子を探索するにあたって、大腸がん患者の遺伝子発現による生存期間の相関を調べることが有効であると考えた。p53 変異型大腸がん患者は p53 野生型大腸がん患者よりも生存期間が短く、正常な p53 機能が大腸がん患者の生存予後に影響することがわかっている^{43,44)}。また、p53 経路制御遺伝子 *PICT1* のように、p53 野生型大腸がん患者ではその発現量が有意な予後相関を示すが、p53 変異型大腸がん患者では予後相関を示さなくなる遺伝子が知られている²⁸⁾ことから、大腸がん患者における p53 変異依存的な生存期間の解析が、p53 経路を介した生存因子の探索法として有効な手段と考えられた。そこで本研究では、大腸がん患者の生存期間と遺伝子発現の相関が p53 変異の有無による影響を受けるか検討した。shRNA ライブラリースクリーニングで選択された遺伝子の中で、ActD 感受性遺伝子群のうち 7 遺伝子が高発現の p53 野生型大腸がん患者は予後良好であり、ActD 耐性遺伝子群のうち 33 遺伝子が高発現の p53 野生型大腸がん患者は予後不良であり、いずれの遺伝子も p53 変異型の場合は予後生存に影響が見られなかった。同定された *NCOA3*^{7,8)}、*HOXA1*⁹⁾、*FOLR1*¹⁰⁾、*SOCSI1*¹¹⁾、*PI4KA*¹²⁾が含まれているが、これらの遺伝子はいずれも同様の発現傾向を示すがん患者の生存予後に相関することが報告されていた。以上のことから、本手法はがん患者の生存予後を規定する遺伝子を同定する方法としても有用であると考えられた。

特筆すべきは、本スクリーニング法によって、p53 経路への機能制御とがん患者の生存予後の両方へ関与する *NCOA3* が同定されたことである。*NCOA3* は、*TRAF4* の転写を促進し、p53 の脱ユビキチン化酵素である HAUSP を阻害することで、p53 の不安定化を引き起こして、p53 シグナルを負に制御する³⁾。*NCOA3* の発現とがん患者の生存予後との関連については、*NCOA3* の発現量が高い乳がん患者は、発現の低い乳がん患者に比べて予後不良となることが挙げられる^{7,8)}。本研究による *in silico* の大腸がん患者発現データベースの解析では、*NCOA3* は *TP53* 変異依存的に大腸がん患者の生存予後と有意な相関を示した。興味深いのは、*NCOA3* に対応する 2 種類のマイクロアレイプローブで同様の傾向が示されたことであり、このことから *NCOA3* は p53 経路を介した生存予後因子であることが強く示唆された。

今回我々が新たに構築した解析システムによって、p53 経路を介して生存予後に関連する候補遺伝子を、多数の候補遺伝子群から簡便に特定することが可能であることが示された。これまでに個別の *in vitro*⁴⁵⁾ や *in vivo*⁴⁶⁾ な解析によって、p53 経路の遺伝子が多数発見されてきた。これまでの細胞やモデル生物の表現型の変化を調べる解析法では、対象となる遺伝子ごとに検討する必要があった。そのため、遺伝子改変動物の作製や、解析システムの構築には多くのコストや時間が必要であった。また、ヒトの腫瘍患者の膨大な遺伝子発現情報から、p53 経路で機能する予後決定因子を特定する場合にも、同様の個別の機能解析が必要であり、コストや時間の問題から、簡便に施行することが困難であった。その他にも、大規模なライブラリーの機能スクリーニングや発現解析では、擬陽的な遺伝子も選択されることが重大な問題であった。今回、shRNA ライブラリースクリーニングに合わせて *in silico* の腫瘍患者の発現データベース解析を行うことで、個別検討を行わずに疑陽的な遺伝子を除き、簡便で、精度よく標的遺伝子を探索することが可能となった。さらに、本手法は異なるがん種や p53 以外の遺伝子への応用できると考えられる。例えば、shRNA ライブラリースクリーニングと乳がんの *HER2* 遺伝子増幅の有無の腫瘍患者の生存時間解析を組み合わせることで、乳がんでの新たな生存予後に関連する新規遺伝子を探索することが可能であるだろう。以上のように、本手法はさまざまながん遺伝子やがん抑制遺伝子経路を介して生存予後に関連する新規遺伝子の探索にも活用できる。

今回同定された遺伝子の多くは、これまで p53 機能制御や予後生存への関与が報告がされていない。今後、これらの遺伝子が p53 経路への制御や腫瘍を抑制する機能を解明することで、新規の p53 経路で作用する生存予後因子が明らかになれば、新たな癌治療標的分子を同定できる可能性がある。

今回、*in vitro* の大規模な shRNA ライブラリースクリーニングと *in silico* のヒト腫瘍患者の遺伝発現データベース解析を組み合わせた新たな遺伝子探索法を確立し、一度に数千の遺伝子に対して p53 経路に関連したがん患者の生存因子を同定することが可能になった。この手法で同定された遺伝子は腫瘍患者の生存性に影響することから、抗がん剤の新規ターゲットとなることも期待される。

參考論文

1. Fang, Y., Yu, H., Liang, X., Xu, J., and Cai, X. (2014) Chk1-induced CCNB1 overexpression promotes cell proliferation and tumor growth in human colorectal cancer. *Cancer biology & therapy* **15**, 1268-1279
2. Dhyani, A., Duarte, A. S. S., MacHado-Neto, J. A., Favaro, P., Ortega, M. M., and Olalla Saad, S. T. (2012) ANKHD1 regulates cell cycle progression and proliferation in multiple myeloma cells. *FEBS Letters* **586**, 4311-4318
3. Yi, P., Xia, W., Wu, R. C., Lonard, D. M., Hung, M. C., and O'Malley, B. W. (2013) SRC-3 coactivator regulates cell resistance to cytotoxic stress via TRAF4-mediated p53 destabilization. *Genes and Development* **27**, 274-287
4. Tanaka, H., Tamura, A., Sekai, M., Hamazaki, Y., and Minato, N. (2011) Increased c-Myc activity and DNA damage in hematopoietic progenitors precede myeloproliferative disease in Spa-1-deficiency. *Cancer Science* **102**, 784-791
5. Yang, P. M., Huang, W. C., Lin, Y. C., Huang, W. Y., Wu, H. A., Chen, W. L., Chang, Y. F., Chou, C. W., Tzeng, C. C., Chen, Y. L., *et al.* (2010) Loss of IKK β activity increases p53 stability and p21 expression leading to cell cycle arrest and apoptosis. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **14**, 687-698
6. Mestre-escorihuela, C., Rubio-moscardo, F., Richter, J. A., Siebert, R., Climent, J., Fresquet, V., Beltran, E., Agirre, X., Marugan, I., Marín, M., *et al.* (2012) Homozygous deletions localize novel tumor suppressor genes in B-cell lymphomas. *Blood* **109**, 271-280
7. Zhao, C., Yasui, K., Lee, C. J., Kurioka, H., Hosokawa, Y., Oka, T., and Inazawa, J. (2003) Elevated expression levels of *NCOA3*, *TOP1*, and *TFAP2C* in breast tumors as predictors of poor prognosis. *Cancer* **98**, 18-23
8. Burandt, E., Jens, G., Holst, F., Jänicke, F., Müller, V., Quaas, A., Choschzick, M., Wilczak, W., Terracciano, L., Simon, R., *et al.* (2013) Prognostic relevance of AIB1 (NCoA3) amplification and overexpression in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment* **137**, 745-753
9. Bitu, C. C., Destro, M. F. d. S. S., Carrera, M., da Silva, S. D., Graner, E., Kowalski, L. P., Soares, F. A., and Coletta, R. D. (2012) HOXA1 is overexpressed in oral squamous cell carcinomas and its expression is correlated with poor prognosis. *BMC Cancer* **12**, 146-146
10. Notaro, S., Reimer, D., Fiegl, H., Schmid, G., Wiedemair, A., Rössler, J., Marth, C., and Zeimet, A. G. (2016) Evaluation of folate receptor 1 (*FOLR1*) mRNA expression, its specific promoter methylation and global DNA hypomethylation in type I and type

- II ovarian cancers. *BMC Cancer* **16**, 589-589
11. Hou, H. A., Lu, J. W., Lin, T. Y., Tsai, C. H., Chou, W. C., Lin, C. C., Kuo, Y. Y., Liu, C. Y., Tseng, M. H., Chiang, Y. C., *et al.* (2017) Clinico-biological significance of suppressor of cytokine signaling 1 expression in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J* **7**, e588
 12. Ilboudo, A., Nault, J.-C., Dubois-Pot-Schneider, H., Corlu, A., Zucman-Rossi, J., Samson, M., and Le Seyec, J. (2014) Overexpression of phosphatidylinositol 4-kinase type III α is associated with undifferentiated status and poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. *BMC cancer* **14**, 7-7
 13. Toshiyuki, M., and Reed, J. C. (1995) Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* **80**, 293-299
 14. Nakano, K., Vousden, K. H., Ashcroft, M., Taya, Y., Vousden, K. H., Ashkenazi, A., Dixit, V. M., Bates, S., Vousden, K. H., Bennett, M., *et al.* (2001) PUMA, a novel proapoptotic gene, is induced by p53. *Molecular Cell* **7**, 683-694
 15. Bouvard, V., Zaitchouk, T., Vacher, M., Duthu, A., Canivet, M., Choisy-Rossi, C., Nieruchalski, M., and May, E. (2000) Tissue and cell-specific expression of the p53-target genes: bax, fas, mdm2 and waf1/p21, before and following ionising irradiation in mice. *Oncogene* **19**, 649-660
 16. Hermeking, H., Lengauer, C., Polyak, K., He, T.-C., Zhang, L., Thiagalingam, S., Kinzler, K. W., and Vogelstein, B. (1997) *14-3-3 σ* is a p53-regulated inhibitor of G2/M progression. *Molecular Cell* **1**, 3-11
 17. Kastan, M. B., Zhan, Q., El-Deiry, W. S., Carrier, F., Jacks, T., Walsh, W. V., Plunkett, B. S., Vogelstein, B., and Fornace, A. J. (1992) A mammalian cell cycle checkpoint pathway utilizing p53 and GADD45 is defective in ataxia-telangiectasia. *Cell* **71**, 587-597
 18. Smith, M. L., Chen, I. T., Zhan, Q., Bae, I., Chen, C.-Y., Gilmer, T. M., Kastan, M. B., O'Connor, P. M., and Jr, A. J. F. (1994) Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science* **266**, 1376-1380
 19. Kastan, M. B., Onyekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Craig, R. W. (1991) Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Research* **5**, 6304-6311
 20. Perry, R. P., and Kelley, D. E. (1970) Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: Characteristic dose-response of different RNA species. *Journal of Cellular Physiology* **76**, 127-139
 21. Perry, R. P., and Kelley, D. E. (1968) Persistent synthesis of 5S RNA when production of 28S and 18S ribosomal RNA is inhibited by low doses of actinomycin D. *Journal of*

- Cellular Physiology* **72**, 235-245
22. Bos, J. L. (1989) *ras* Oncogenes in Human Cancer : A Review. *Cancer Research*, 4682-4689
 23. Lee, C.-H., Inoki, K., Karbowniczek, M., Petroulakis, E., Sonenberg, N., Henske, E. P., and Guan, K.-L. (2007) Constitutive mTOR activation in TSC mutants sensitizes cells to energy starvation and genomic damage via p53. *The EMBO journal* **26**, 4812-4823
 24. Kruse, J. P., and Gu, W. (2009) Modes of p53 Regulation. *Cell* **137**, 609-622
 25. Zhang, Y., Xiong, Y., and Yarbrough, W. G. (1998) ARF promotes MDM2 degradation and stabilizes p53: *ARF-INK4a* locus deletion impairs both the Rb and p53 tumor suppression pathways. *Cell* **92**, 725-734
 26. Pomerantz, J., Schreiber-Agus, N., Liégeois, N. J., Silverman, A., Alland, L., Chin, L., Potes, J., Chen, K., Orlow, I., Lee, H. W., *et al.* (1998) The *Ink4a* tumor suppressor gene product, p19^{Arf}, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* **92**, 713-723
 27. Golomb, L., Volarevic, S., and Oren, M. (2014) p53 and ribosome biogenesis stress: The essentials. *FEBS Letters* **588**, 2571-2579
 28. Sasaki, M., Kawahara, K., Nishio, M., Mimori, K., Kogo, R., Hamada, K., Itoh, B., Wang, J., Komatsu, Y., Yang, Y. R., *et al.* (2011) Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11. *Nature Medicine* **17**, 944-951
 29. Uchi, R., Kogo, R., Kawahara, K., Sudo, T., Yokobori, T., Eguchi, H., Sugimachi, K., Maehama, T., Mori, M., Suzuki, A., *et al.* (2013) PICT1 regulates TP53 via RPL11 and is involved in gastric cancer progression. *British Journal of Cancer* **109**, 2199-2206
 30. Okamura, K., Takayama, K., Kawahara, K., Harada, T., Nishio, M., Otsubo, K., Ijichi, K., Kohno, M., Iwama, E., Fujii, A., *et al.* (2014) PICT1 expression is a poor prognostic factor in non-small cell lung cancer. *Oncoscience* **1**, 375-382
 31. Suzuki, A., Kogo, R., Kawahara, K., Sasaki, M., Nishio, M., Maehama, T., Sasaki, T., Mimori, K., and Mori, M. (2012) A new PICTure of nucleolar stress. *Cancer Science* **103**, 632-637
 32. Vousden, K. H., and Lu, X. (2002) Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Reviews Cancer* **2**, 594-604
 33. Young, K. H., Leroy, K., Møller, M. B., Colleoni, G. W. B., Sánchez-Beato, M., Kerbauy, F. R., Haioun, C., Eickhoff, J. C., Young, A. H., Gaulard, P., *et al.* (2008) Structural profiles of *TP53* gene mutations predict clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma: an international collaborative study. *Blood* **112**, 3088–3098

34. O'Shea, D., O'Riain, C., Taylor, C., Waters, R., Carlotti, E., Macdougall, F., Gribben, J., Rosenwald, A., Ott, G., Rimsza, L. M., *et al.* (2008) The presence of *TP53* mutation at diagnosis of follicular lymphoma identifies a high-risk group of patients with shortened time to disease progression and poorer overall survival. *Blood* **112**, 3126-3129
35. Network, T. C. G. A., Cancer, T., Atlas, G., Muzny, D. M., Bainbridge, M. N., Chang, K., Dinh, H. H., Drummond, J. a., Fowler, G., Kovar, C. L., *et al.* (2012) Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* **487**, 61-70
36. The Cancer Genome Atlas, N., Muzny, D. M., Bainbridge, M. N., Chang, K., Dinh, H. H., Drummond, J. a., Fowler, G., Kovar, C. L., Lewis, L. R., Morgan, M. B., *et al.* (2012) Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature* **487**, 330-337
37. Bolstad, B. M., Irizarry, R. A., Astrand, M., and Speed, T. P. (2003) A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics* **19**, 185-193
38. Nolan-Stevaux, O., Tedesco, D., Ragan, S., Makhanov, M., Chenchik, A., Ruefli-Brasse, A., Quon, K., and Kassner, P. D. (2013) Measurement of Cancer Cell Growth Heterogeneity through Lentiviral Barcoding Identifies Clonal Dominance as a Characteristic of In Vivo Tumor Engraftment. *PLoS ONE* **8**, e67316
39. Takeda, H., Wei, Z., Koso, H., Rust, A. G., Yew, C. C. K., Mann, M. B., Ward, J. M., Adams, D. J., Copeland, N. G., and Jenkins, N. a. (2015) Transposon mutagenesis identifies genes and evolutionary forces driving gastrointestinal tract tumor progression. *Nature Genetics* **47**, 142-150
40. Moncunill, V., Gonzalez, S., Bea, S., Andrieux, L. O., Salaverria, I., Royo, C., Martinez, L., Puiggros, M., Segura-Wang, M., Stutz, A. M., *et al.* (2014) Comprehensive characterization of complex structural variations in cancer by directly comparing genome sequence reads. *Nature Biotechnology* **32**, 1106-1112
41. Kirzin, S., Marisa, L., Guimbaud, R., De Reynies, A., Legrain, M., Laurent-Puig, P., Cordelier, P., Pradère, B., Bonnet, D., Meggetto, F., *et al.* (2014) Sporadic Early-Onset Colorectal Cancer Is a Specific Sub-Type of Cancer: A Morphological, Molecular and Genetics Study. *PLoS ONE* **9**, e103159
42. Marisa, L., de Reyniès, A., Duval, A., Selves, J., Gaub, M. P., Vescovo, L., Etienne-Grimaldi, M. C., Schiappa, R., Guenot, D., Ayadi, M., *et al.* (2013) Gene Expression Classification of Colon Cancer into Molecular Subtypes: Characterization, Validation, and Prognostic Value. *PLoS Medicine* **10**, e1001453
43. Hamelin, R., Laurent-Puig, P., Olschwang, S., Jego, N., Asselain, B., Remvikos, Y.,

- Girodet, J., Salmon, R. J., and Thomas, G. (1994) Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* **106**, 42-48
44. Tortola, B. S., Marcuello, E., Gonza, I., Arribas, R., Aiza, G., Sancho, F. J., Peinado, M. A., and Capella, G. (2017) p53 and K-ras Gene Mutations Correlate With Tumor Aggressiveness But Are Not of Routine Prognostic Value in Colorectal Cancer. **17**, 1375-1381
45. Freeman, D. J., Li, A. G., Wei, G., Li, H. H., Kertesz, N., Lesche, R., Whale, A. D., Martinez-Diaz, H., Rozengurt, N., Cardiff, R. D., *et al.* (2003) PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell* **3**, 117-130
46. Deng, C., Zhang, P., Harper, J. W., Elledge, S. J., and Leder, P. (1995) Mice lacking p21CIP1/WAF1 undergo normal development, but are defective in G1 checkpoint control. *Cell* **82**, 675-684

謝辞

本論文の執筆にあたり，多大なご支援と熱心なご指導を賜りました，指導教員である鹿児島大学大学院理工学研究科准教授・有馬一成先生に深謝申し上げます。学部4年生から有馬研究室でお世話になり，至らない私に諦めずにご指導くださいました。直接のご指導以外にも，バイオインフォマティクス解析の技術取得などの筋道をつけてくださいました。先生のご尽力のおかげで，たくさんの経験や知識を得，人間的にも成長することができました。

ご多忙の中，快く副査を引き受けてくださり，熱心にご指導賜りました，鹿児島大学大学院理工学研究科教授・伊東祐二先生，ならびに同研究科教授・内海俊樹先生，同研究科准教授・濱田季之先生に心より感謝申し上げます。また，共同研究において実験試料の提供および実験操作や解析を熱心にご指導賜りました，鹿児島大学大学院医歯学総合研究科教授・古川龍彦先生，ならびに同研究科講師・河原康一先生に深く感謝申し上げます。先生方が私の適正を考え辛抱強くご指導くださり，突拍子のない私のアイデアにも真剣に耳を傾けてくださいましたのおかげで，本研究を遂行することができました。さらに，共同研究において，バイオインフォマティクス解析の直接のご指導を賜りました九州工業大学大学院情報工学研究院教授・倉田博之先生に心より感謝申し上げます。

そして，長い研究室での生活を共にした先輩方，同期，後輩，同僚の皆様のおかげで，楽しい時を過ごし，辛く苦しい時期も乗り越えることができました。心より感謝申し上げます。

最後に，博士課程にまで進学する機会を与えてくださり，ご心配，ご迷惑をかけてばかりの私を，辛抱強く見守り，多大な支援を続けてくださいました両親・家族に深く感謝申し上げます。

皆様のご指導，ご協力なくして，今の私はおりません。

重ね重ね厚く謝意を表し，謝辞と致します。

平成30年9月

上條 陽平