

令和 2 年 9 月 11 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10639

研究課題名(和文)大腸癌におけるRNF43遺伝子による腫瘍増殖メカニズムの解明

研究課題名(英文)To identify the molecular mechanism underlying colorectal cancer progression via RNF43

研究代表者

杉原 栄孝 (Hdetaka, Sugihara)

熊本大学・病院・非常勤診療医師

研究者番号：10608863

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：大腸がん切除検体、大腸がん細胞株、RNF43 knockout マウスを用いて消化管上皮および大腸腫瘍進展における RNF43発現意義を明らかにした。RNF43 mutationのある大腸癌患者はRFSが有意に短く、RNF43 mutationがあると細胞増殖が亢進し、腫瘍の発育進展にかかわることがわかった。RNF43 knockout mouseを用いた実験ではRNF43単独の機能喪失でも腫瘍の増大に関わっていた。これらの結果はRNF43 mutationによるWntシグナルの活性化は大腸癌患者において腫瘍を増大させ、再発させやすくすることを裏付けるものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではRNF43 knockout マウスを用いて消化管上皮および大腸腫瘍進展における RNF43発現意義を明らかにしてきた。

大腸 癌においてAPCや β -cateninのmutationを介した増殖・進展機構に関する報告は数多く認めるが、RNF43のmutationや発現低下が腫瘍増大・進展に与える影響について明らかにすることは学術的意義の大きいところといえる。

研究成果の概要(英文)：We identified the clinical significance of RNF43 mutations in a large Japanese cohort and the role of RNF43 at various stages of colorectal cancer development and progression. Patients with colorectal cancer harbouring mutated RNF43 experienced a higher recurrence rate than those harbouring non-mutated RNF43. We generated Rnf43 knockout mice. An azoxymethane/dextran sodium sulphate mouse model demonstrated that tumours were markedly larger in Rnf43 knockout mice than in wild-type mice. These findings provide evidence that Wnt signalling activation by RNF43 mutations during the tumorigenic stage enhances tumour growth and promotes a high recurrence rate in colorectal cancer patients.

研究分野：消化器外科学

キーワード：大腸癌 Wntシグナル RNF43

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナルは様々な癌腫において活性化している事が知られており、標的遺伝子発現の増幅、細胞増殖、細胞運動などを調節している。特に、大腸がんにおいては家族性大腸腺腫症 (familial adenomatous polyposis coli, FAP) の原因遺伝子である APC や β -catenin の遺伝子異常により -カテニン経路の活性化が発がんの初期に起こり、発がんに関与することが明らかになっている。これらのがん細胞の共通の表現型は -カテニンの細胞質や核への異常蓄積であり、cyclin D1 や c-Myc などのがん関連遺伝子の過剰発現を介して異常な細胞増殖を誘導すると考えられる。

一方、RNF43 は Wnt シグナルを抑制する癌抑制遺伝子であり、RNF43 は近年大腸癌をはじめとした様々な癌腫で mutation や発現低下が報告されている。大腸癌において APC や β -catenin の mutation を介した増殖・進展機構に関する報告は数多く認められるが、RNF43 の mutation や発現低下が腫瘍増大・進展に与える影響は明らかになっていなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は標的遺伝子発現の増幅や細胞増殖、細胞、細胞運動などを調節し、様々な癌腫において活性化している Wnt シグナルを抑制する癌抑制遺伝子である RNF43 の mutation や発現低下が消化管上皮および大腸腫瘍進展における及ぼす影響を明らかにする事であった。

3. 研究の方法

- i) 大腸癌臨床検体を用いて、免疫染色にて Dvl の蓄積を評価し予後との関係を検討する。
- ii) RNF43 発現が腫瘍増殖に関わるかどうか検証すべく、RNF43 野生株・変異株の大腸癌細胞株にて RNF43 siRNA による腫瘍増殖能を比較する。
- iii) AOM-DSS 大腸癌モデルを用いて RNF43 WT/knockout マウスを作成し大腸癌を誘導する。それぞれのマウスにおいて腸管を切除し crypt を採取し、Wnt シグナル活性化が与える影響についてオルガノイド形成能を評価する。また腫瘍の形成および大きさについて評価するとともに Wnt シグナルの活性化について機能解析し in vivo に評価する。
- iv) RNF43 遺伝子の下流シグナルの遺伝子発現変化および Wnt シグナルをターゲットとした薬剤投与による腫瘍増殖抑制効果などを評価する。

4. 研究成果

- i) RNF43 mutation は右結腸に多く、BRAF mutation と密接に関与しており、RFS が有意に短いことが明らかになった。
- ii) RNF43 mutation があると細胞増殖が亢進し、RNF43 WT の発現量は腫瘍の発育進展にかかわることを明らかにした。
- iii) 大腸癌において APC や β -catenin の mutation を介した増殖・進展機構に関する報告は数多く認められるが、RNF43 knockout mouse を用いた実験では RNF43 単独の機能喪失でも腫瘍の増大に関わることが明らかとなった。またマウス腸管から organoid を作成し、RNF43 が organoid 形成に及ぼす影響についても比較検討を行い同様の結果を得た。
- iv) Real-time qPCR を用いた Wnt 下流遺伝子の mRNA 発現解析では、RNF43 mutation および RNF43 knockout mouse に発生した大腸腫瘍では、ほぼすべての RNF43 下流遺伝子の mRNA 発

現が亢進していた。さらに、Dvl 阻害剤は RNF43 発現低下によって亢進した大腸癌細胞の増殖を効率良く阻害することが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Eto T, Miyake K, Noshō K, Ohmuraya M, Imamura Y, Arima K, Kanno S, Fu L, Kiyozumi Y, Izumi D, Sugihara H, Hiyoshi Y, Miyamoto Y, Sawayama H, Iwatsuki M, Baba Y, Yoshida N, Furukawa T, Araki K, Baba H, Ishimoto T	4. 巻 245
2. 論文標題 Impact of loss-of-function mutations at the RNF43 locus on colorectal cancer development and progression	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Journal of Pathology	6. 最初と最後の頁 445 ~ 455
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.5098	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ishimoto T, Miyake K, Nandi T, Yashiro M, Onishi N, Huang KK, Joyce LN, Kalpana R, Tay ST, Suzuki Y, Cho BC, Kuroda D, Arima K, Izumi D, Iwatsuki M, Baba Y, Oki E, Watanabe M, Saya H, Hirakawa K, Baba H, Tan P	4. 巻 153(1)
2. 論文標題 Activation of Transforming Growth Factor Beta 1 Signaling in Gastric Cancer-associated Fibroblasts Increases Their Motility, via Expression of RhoBoid 5 Homolog 2, and Ability to Induce Invasiveness of Gastric Cancer Cells.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Gastroenterology	6. 最初と最後の頁 191-204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1053/j.gastro.2017.03.046.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imai K, Castro Benitez C, Allard MA, Vibert E, Sa Cunha A, Cherqui D, Castaing D, Bismuth H, Baba H, Adam R	4. 巻 115(4)
2. 論文標題 Potential of a cure in patients with colorectal liver metastases and concomitant extrahepatic disease.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Surg Oncol.	6. 最初と最後の頁 488-496
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jso.24539.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Imai K, Allard MA, Castro Benitez C, Vibert E, Sa Cunha A, Cherqui D, Castaing D, Baba H, Adam R.	4. 巻 104(5)
2. 論文標題 Long-term outcomes of radiofrequency ablation combined with hepatectomy compared with hepatectomy alone for colorectal liver metastases.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Br J Surg.	6. 最初と最後の頁 570-579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/bjs.10447.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Ishimoto T, Eto T, Miyake K, Fu L, Uchihara T, Arima K, Yasuda T, Itoyama R, Yoshida N, Baba H
2. 発表標題 Impact of loss-of-function mutations at the RNF43 locus on colorectal cancer progression
3. 学会等名 SGICC 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Eto T, Ishimoto T, Oda E, Kuroda D, Arima K, Ohuchi M, Nakamura K, Sawayama H, Kinoshita K, Iwatsuki M, Baba Y, Sakamoto Y, Yoshida N, Baba H.
2. 発表標題 Functional role of Ring Finger Protein 43 in intestinal stem cells during colorectal tumorigenesis
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2017 (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 江藤二男、石本崇胤、内原智之、織田絵里、問端輔、八木泰佑、黒田大介、有馬浩大、大内繭子、中村健一、澤山浩、木下浩一、岩槻政晃、馬場祥史、坂本快郎、吉田直矢、馬場秀夫
2. 発表標題 大腸癌進展における Ring Finger Protein 43 (RNF43) の機能解析
3. 学会等名 第117 回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 江藤二男、石本崇胤、内原智幸、八木泰佑、黒田大介、澤山浩、日吉幸晴、岩槻政晃、馬場祥史、宮本 裕士、吉田 直矢、馬場 秀夫
2. 発表標題 大腸癌におけるRing Finger Protein 43 発現と腫瘍発育進展の検討
3. 学会等名 第 28 回消化器癌発生学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石本 崇胤 (Ishimoto Takatsugu) (00594889)	熊本大学・病院・特任准教授 (17401)	
研究分担者	今井 克憲 (Katsunori Imai) (60555746)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・助教 (17401)	
研究分担者	今村 裕 (yu Imamura) (70583045)	公益財団法人がん研究会・有明病院 消化器外科・医長 (72602)	