

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07633

研究課題名(和文) RNF43によるWnt受容体ユビキチン化の分子メカニズムの解明と治療への応用

研究課題名(英文) Dissecting the molecular mechanism of Wnt receptor ubiquitination by RNF43.

研究代表者

築山 忠維 (Tsukiyama, Tadasuke)

北海道大学・医学研究院・助教

研究者番号：20399819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本課題においては、RNF43のリン酸化スイッチによるWntシグナル経路の調節機構の解明と、RNF43の遺伝子変異が発がんに関与する分子メカニズムの解明を中心とした研究を行った。その中で、RNF43のリン酸化スイッチによるWntシグナル経路の調節と発がんへの関与について論文としてNature Communications誌に報告した。またBioEssays誌から依頼を受け、Wnt受容体の調節機構と発がんについての総説を執筆した。さらにメディアでは複数のテレビニュースやがん治療特集番組において研究結果が紹介されたことから、本研究は国内外において一定の評価を得たと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸がんは死者数の上位3位以内を占め、また国民の約1割が生涯において大腸がんと診断されることから、日本の医療に大きなインパクトを与えている疾患といえる。また大腸がんは、左側に発生する比較的予後の良いタイプと、右側に発生する予後の悪いタイプに分けられる。本研究で焦点を当てたユビキチン化酵素RNF43の遺伝子変異は左側では殆ど見られないが、右側のがんではこの左側での遺伝子変異とは相互排他的に高頻度に観察される。しかし、その発がんにおける分子的詳細は明らかになっていなかった。本研究にて得られた結果は、予後の悪い右側大腸がんの発症機序を理解した上で、今後の治療方針を決定する上での大きな知見となった。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we focused on elucidating the regulatory mechanism of the Wnt receptor degradation via the functional switch of RNF43 by its phosphorylation, and the molecular mechanism by which RNF43 gene mutation is involved in carcinogenesis. On these projects, we have reported that the phospho-switch of RNF43 roles the direction of Wnt signaling to the activation or suppression, and that missense mutations in this switch abolish the function of RNF43 and invert it from a tumor suppressor to an oncogene. These results were published in Nature Communications. Also, we reported a review explaining the outline of Wnt receptor regulation and oncogenesis/onco-therapy in BioEssay. In addition, the results in our research were introduced in the media in several TV news programs and a special program for cancer research/treatment. Therefore, we think that our research was evaluated as well-contributed to the society domestically and internationally.

研究分野：Wnt signaling and oncogenesis

キーワード：RNF43 Wnt p53 tumorigenesis ubiquitin

## 1. 研究開始当初の背景

Wnt/ $\beta$ catenin シグナルの異常活性化と発がんの密接な関係は古くから知られている。そのなかで、Wnt シグナルの活性調節機構においてエフェクタータンパク質のユビキチン化依存的分解機構が重要な役割を果たすことも歴史的に示されてきた。特に家族性大腸がんにおいて  $\beta$ catenin の分解に重要な役割を果たしている APC 遺伝子の変異が同定されたことが、Wnt シグナルの調節機構と発がんメカニズムの解明に大きな役割を果たした。その後も  $\beta$ -catenin の分解にユビキチンリガーゼの SCF<sup>E3</sup>CP が関与するだけでなく、Dvl、Axin、APC、TCF/Lef といった Wnt シグナルのエフェクター分子の大半の分子も、それぞれが複数のユビキチンリガーゼによって分解されることが明らかにされてきた。最近、幹細胞特異的ユビキチンリガーゼである ring finger protein 43 (RNF43) が Wnt 受容体の Frizzled (Fzd) をユビキチン化する酵素であること、RNF43 が Fzd をユビキチン化依存的にリソソームで分解することが複数のグループから報告された。RNF43 を欠損したマウスは腸管幹細胞領域の異常拡大を示すことから、腸管恒常性維持に RNF43 が重要であることも報告されている。我々は、大腸がんを高発現している RNF43 ががん抑制遺伝子の p53 依存的な細胞死を抑制することを報告していた [Shinada, *BBRC*: 404: 143 (2011)]。しかし、RNF43 がどのような分子メカニズムで p53 の転写活性を調節しているかは、まだ明らかにされていない。がん患者では RNF43 遺伝子に変異が高頻度にみられることも報告されており、これらの変異と発がんの関連についての研究が現在も盛んに行われている。実際、我々は以前、RNF43 の一部の変異が細胞内局在異常を引き起こし Wnt 受容体の分解不全によるシグナル活性化が発がんの一員となっていることを示した [Tsukiyama *Molecular and Cellular Biology* 35:2007-2023. 2015]。また他のグループはまた別のタイプの変異により RNF43 が Wnt リガンドに依存せず直接 Wnt シグナル下流を活性化することも報告している。

このように、RNF43 による Wnt 受容体のユビキチン化と p53 経路の調節機構が成体の恒常性維持に果たす役割とその破綻による発がんは、世界的にも注目されていた。これらの背景に基づき、我々は本研究において RNF43 の遺伝子変異による発がん機構のさらなる解明と、その治療への応用を目指して研究を行った。

## 2. 研究の目的

大腸がんは死者数の上位 3 位以内を占め、また国民の約 1 割が生涯において大腸がんを診断されることから、日本の医療に大きなインパクトを与えている疾患といえる。我々は以前、大腸がんが発現の亢進している分子として知られているユビキチンリガーゼ RNF43 が p53 依存的な転写を抑制することで細胞死を抑制することを報告した。さらにその後の研究で RNF43 が Wnt 受容体複合体の分解に関与し、Wnt シグナルと腸管幹細胞の増殖の調節を行っていることが明らかとなってきた。またその遺伝子変異の発がんへの関与も活発に研究されている。大腸がんは、左側に発生する比較的予後の良いタイプと、右側に発生する予後の悪いタイプに分けられる。本研究で焦点を当てたユビキチン化酵素 RNF43 の遺伝子変異は左側では殆ど見られないが、右側のがんではこの左側での遺伝子変異とは相互排他的に高頻度に観察される【図 1】。しかし、RNF43 の遺伝子変異の発がんにおける分子的機序の詳細は明らかになっていなかった。そのような背景の中で、最近我々は RNF43 が Wnt 受容体の分解を行う際に必要とされる酵素活性が、細胞内ドメインのリン酸化によって調節されている可能性を見出していた。そこで本研究では、RNF43 のリン酸化による Wnt シグナルの調節機構が正常組織においてどのように腸管の恒常性維持に関与しているか、また発がんステップ全体の進行にこの RNF43 リン酸化制御の破綻がどのように関与しているかを分子レベルで解明することを目的とした。

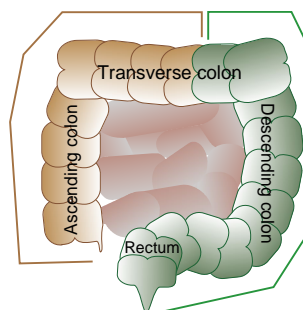
Right-sided CRC

MSI-Hi

Poor prognosis

RNF43-BRAF-TGF-INK4A

Gut from duodenum to right 2/3 of transverse colon originates from embryonic midgut



Left-sided CRC

MSS

Better prognosis

APC-KRAS-SMAD-TP53

Gut from left 1/3 of transverse colon to anal canal originates from embryonic hindgut

図 1；右側大腸がんにおける RNF43 の遺伝子変異

## 3. 研究の方法

1) RNF43 の活性制御に関与する部位の決定： RNF43 タンパク質の細胞内ドメインにおいて、どの領域がそのユビキチン化活性に関与しているかを大まかに検討するため、第一段階としてさまざまな領域を欠く欠失変異体を作製した。変異 RNF43 の Wnt シグナル活性に及ぼす影

響の測検討は、Wnt シグナルレポーターをゲノム上に組み込んだ STF293 細胞を用いたルシフェラーゼアッセイにより行った。欠失変異体によって絞り込んだ部位に存在したセリンに対して、リン酸化状態、もしくは非リン酸化状態を模倣するアミノ酸置換を行った変異体を作製した。これらの置換変異体も欠失変異体と同様にレポーターアッセイによる活性調節部位の確認を行った。さらに、Wnt 受容体の分解制御に与える影響については、Wnt 受容体 Fzd に対するフロースイトメトリー解析を行った。

(2) RNF43 の活性を制御するリン酸化メカニズムの解明： RNF43 の活性を制御する高度に保存されたセリンをリン酸化する酵素を、*in vitro* キナーゼアッセイにより探索した。細胞内で実際にリン酸化が起きているかについて、二次元電気泳動と正リン酸を用いた全細胞ラベルにより検討した。内因性の RNF43 が細胞内で実際にリン酸化を受けているかについては、リン酸化されるアミノ酸にゲノム編集で変異を導入した細胞を作製し、Wnt レポーターアッセイにより検討した。

(3) 正常個体の発生に RNF43 リン酸化による Canonical/noncanonical Wnt シグナル制御が与える影響の検討： RNF43 のリン酸化部位をアミノ酸置換した変異体を Wnt レポーターゼブラフィッシュに導入した。Wnt 標的遺伝子に対する *in situ* ハイブリダイゼーションとリアルタイム PCR を用いて canonical Wnt シグナルの活性変化の検討を、胚発生中の体軸形成における表現型の変化により non canonical Wnt シグナルへの影響を検討した。

(4) RNF43 リン酸化の腸管恒常性維持への貢献の検討： ウィルスベクターによりリン酸化部位をアミノ酸置換した変異体を腸管オルガノイドに導入した。オルガノイドの短期的な発達と長期にわたる腸管幹細胞の維持の両面について、さまざまな増殖因子の組み合わせで培養を行うことにより検討した。

(5) RNF43 リン酸化が発がんに及ぼす影響： 非がん細胞であるマウス NIH3T3 細胞に Ras のみ導入した Cle-H3 細胞を用いて RNF43 のリン酸化が発がんに与える影響を検討した。Cle-H3 細胞にリン酸化固定、非リン酸化固定の変異体を導入し、恒常的にこれらの RNF43 を発現するようになった細胞をヌードマウス皮下に移植した。移植後の細胞片の増殖を測定することで、RNF43 のリン酸化が発がんへの影響を検討した。

(6) RNF43 リン酸化が p53 の機能に及ぼす影響： 正常な p53 を持っている大腸がん細胞である HCT116 細胞に RNF43 のリン酸化変異体を導入し、恒常的に発現する細胞株を作製した。これらの細胞を用いて、定常状態と DNA ダメージを与えた状態で p53 の下流標的遺伝子の発現が影響を受けるかについて、mRNA の転写レベルとタンパク質の発現レベルの双方で確認した。

#### 4. 研究成果

RNF43 は複数のセリンがリン酸化されることにより多段階に活性が制御されていた。複数の RNF43 欠失変異体を用いた Wnt レポーターアッセイを行った結果、細胞内ドメインに存在する異種間、同種ホモログ間で高度に保存されている 4 つのセリン残基がリン酸化されてはじめて活性化することが判明した。また正リン酸ラベルにより、内在性の RNF43 においてこれらのセリンが実際に CK1 によってリン酸化されていることも証明した。さらに、細胞内局在を改変しがん遺伝子へと転換した RNF43 は、これらのリン酸化を失っていることを見出した。この結果を踏まえて現状ではリン酸化されていない発がん変異 RNF43 に擬似的にアミノ酸置換によるリン酸化状態を導入すると、Wnt シグナル抑制活性を回復した。つまり、細胞内局在異常自体が原因ではなく局在異常により正常なリン酸化制御を失うことが発がんの原因であったことが明らかになった。そこで我々は RNF43 のリン酸化の有無により Wnt シグナルの活性が正負両方向に可逆的に制御されるこの調節機構を“リン酸化スイッチ”と定義した。

RNF43 のリン酸化変異体をゼブラフィッシュ胚に発現させた結果、リン酸化スイッチは canonical と non-canonical 両方の Wnt シグナルを制御し、胚が正常な形態に発生するよう制御していることを明らかにした。

腸管オルガノイドモデルにより、リン酸化スイッチをオンに固定し常に活性化状態にある RNF43 では、短期的な腸管陰窩の発達に加えて長期的な幹細胞維持も阻害されることが明らかとなった。これらの結果より、RNF43 のリン酸化スイッチがオフになり不活性化されることによって維持される Wnt シグナルの活性が、腸管の恒常性維持に重要であることが明らかとなった。

一方で、RNF43 リン酸化スイッチがオフのまま維持されると発がんを誘導した。非がん細胞である NIH3T3 細胞に、RNF43 がリン酸化されず Wnt シグナルを異常活性化する変異体を単独で発現しただけでは、足場非依存的増殖やスフィア形成などは起こらず、ヌードマウス皮下に移植しても腫瘍の形成も起こらなかった。しかしこのリン酸化不全変異 RNF43 を導入した NIH3T3 細胞に更に活性型 Ras を導入すると、足場非依存的増殖やスフィア形成が可能となり皮下に腫瘍も形成された。これらの結果から、RNF43 のリン酸化による Wnt シグナルの活性抑制は、特に Ras 変異の存在下で発がん抑制に必須であることが示された。

これらの結果より、RNF43 のリン酸化スイッチが入らないとがんになり、入ったままでは組織の維持ができず恒常性が破綻することが明らかになり、Wnt シグナルの fine tuning におけるリン酸化スイッチの重要性が明らかになった。

しかし一方で、RNF43 はそのリン酸化スイッチの状態に関係なく p53 下流を抑制した。変異のない正常型だけでなく、Wnt 活性に影響を与える全ての RNF43 変異体も同様に p53 下流の p21 や Bax の発現を抑制したことから、RNF43 のリン酸化による活性調節は Wnt シグナルにおいてのみ有効で、p53 シグナルでは別の分子メカニズムによりその活性を制御していることが示唆された。

これらの結果はまず初めに Nature Communications 誌に発表された[\*Tsukiyama *Nature Communications* 11(1):4586, 2020]。この報告を受け、当該研究成果はテレビやインターネットニュースなど複数のメディアにおいて報道された。さらに BioEssays 誌より依頼を受け、Wnt 受容体の安定性を制御する分子機構を理解する上でこれまでに解明されてきたこと、まだ未解決のまま残されている謎について、総説にまとめ発表した[\*Tsukiyama, *BioEssays* 43(4) 2000297, 2021]。またその総説内では、現在有効な抗がん剤候補として臨床応用への注目が集まっている PORCN 阻害剤に対する反応性や感受性が RNF43 遺伝子変異の種類の違いにより大きく異なることを解説し、今後の治療応用の際に薬剤選択の指針の一つとなることが期待できる【図 2】。

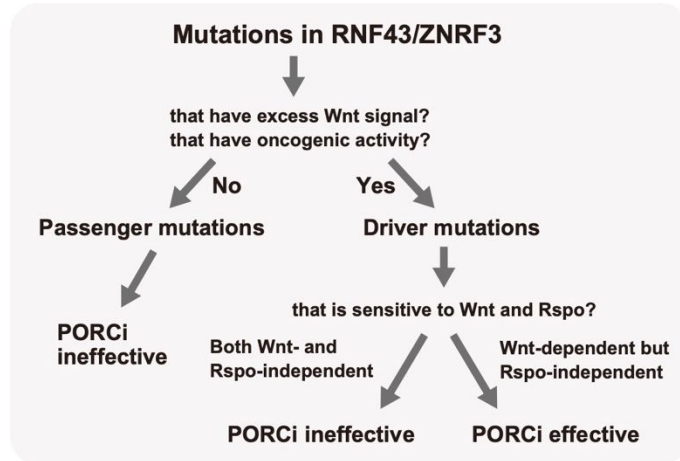


図 2 ; RNF43 遺伝子変異による PORCNi 感受性の違い

## 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 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Kosumi Hideyuki, Watanabe Mika, Shinkuma Satoru, Nohara Takuma, Fujimura Yu, Tsukiyama Tadasuke, Donati Giacomo, Iwata Hiroaki, Nakamura Hideki, Ujiie Hideyuki, Natsuga Ken	4. 巻 142-6
2. 論文標題 Wnt/ -Catenin Signaling Stabilizes Hemidesmosomes in Keratinocytes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Investigative Dermatology	6. 最初と最後の頁 1576-1586
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jid.2021.10.018	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 該当する
1. 著者名 Tsukiyama Tadasuke, Koo Bon Kyoung, Hatakeyama Shigetsugu	4. 巻 43
2. 論文標題 Post translational Wnt receptor regulation: Is the fog slowly clearing?	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 BioEssays	6. 最初と最後の頁 2000297 ~ 2000297
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/bies.202000297	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Tsukiyama Tadasuke, Zou Juqi, Kim Jihoon, Ogamino Shohei, Shino Yuki, Masuda Takamasa, Merenda Alessandra, Matsumoto Masaki, Fujioka Yoichiro, Hirose Tomonori, Terai Sayuri, Takahashi Hidehisa, Ishitani Tohru, Nakayama Keiichi I., Ohba Yusuke, Koo Bon-Kyoung, Hatakeyama Shigetsugu	4. 巻 11
2. 論文標題 A phospho-switch controls RNF43-mediated degradation of Wnt receptors to suppress tumorigenesis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1 ~ 16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-18257-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Takahashi H, Ranjan A, Chen S, Suzuki H, Shibata M, Hirose T, Hirose H, Sasaki K, Abe R, Chen K, He Y, Zhang Y, Takigawa I, Tsukiyama T, Watanabe M, Fujii S, Iida M, Yamamoto J, Yamaguchi Y, Suzuki Y, Matsumoto M, Nakayama KI, Washburn P, Saraf A, Florens L, Sato S, Tomomori-Sato C, Conaway RC, Conaway JW, Hatakeyama S	4. 巻 11
2. 論文標題 The role of Mediator and Little Elongation Complex in transcription termination	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-020-14849-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 築山忠維、石谷太、高橋秀尚、松本雅記、大場雄介、中山敬一、Koo Bonkyoung、畠山鎮次
2. 発表標題 Wnt受容体の発現調節異常と発がん機構の解明
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 築山忠維
2. 発表標題 Wnt receptor regulation
3. 学会等名 Wnt研究会2021
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 築山忠維・石谷太・畠山鎮次
2. 発表標題 単一遺伝子変異による多段階発がんの起動と完成
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 築山忠維・石谷太・畠山鎮次
2. 発表標題 幹細胞特異的ユビキチンリガーゼRNF43の遺伝子変異による多段階発がんステップの起動と完成
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 築山忠維・篠裕輝・寺井小百合・高橋秀尚・BK Koo・石谷太・畠山鎮次
2. 発表標題 RNF43の遺伝子変異は多段階発がんステップにおいてWntとp53経路の変異を代償する
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 築山忠維
2. 発表標題 Wnt受容体調節の破綻が多段階発がん過程で果たす複雑な役割
3. 学会等名 第59回日本生化学会北海道支部例会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 築山忠維, 畠山鎮次
2. 発表標題 Wnt 受容体調節の破綻が多段階発がん過程で果たす複雑な役割
3. 学会等名 第81回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tadasuke Tsukiyama
2. 発表標題 A role of RNF43 other than Wnt receptor regulation in oncogenesis (poster)
3. 学会等名 Wnt 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tadasuke Tsukiyama
2. 発表標題 A role of RNF43 other than Wnt receptor regulation in oncogenesis (oral)
3. 学会等名 Wnt 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 築山忠維
2. 発表標題 多段階発がんにおけるRNF43遺伝子変異の意義
3. 学会等名 北海道がん若手研究者交流会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tadasuke Tsukiyama
2. 発表標題 Wnt receptor regulation and maintaining homeostasis
3. 学会等名 CGE International Seminar Series (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>北海道大学大学院医学研究院医化学教室  <a href="https://hokudai-ikagaku.jp">https://hokudai-ikagaku.jp</a></p> <p>北海道大学プレスリリース</p> <p>1. 大腸がん発症のスイッチを発見～一度壊れた遺伝子にがん抑制効果を回復させる～  <a href="https://www.hokudai.ac.jp/news/2020/09/post-723.html">https://www.hokudai.ac.jp/news/2020/09/post-723.html</a></p> <p>2. Molecular basis underlying colorectal cancer ~  <a href="https://www.global.hokudai.ac.jp/blog/molecular-basis-underlying-colorectal-cancer-revealed/">https://www.global.hokudai.ac.jp/blog/molecular-basis-underlying-colorectal-cancer-revealed/</a></p> <p>メディア報道 (テレビ)</p> <p>1. 大腸がんタンパク質の働き解明 NHKニュース・おはよう北海道 2020年9月18日放送</p> <p>2. 大腸がん発症のスイッチを発見-北大 東京メトロポリタンテレビジョン MEDICAL NEWS LINE 2020年10月9日放送</p> <p>3. 大腸がんの進行抑制できるタンパク質の働きを初解明 北海道のがん研究最前線・ほっとニュース北海道 2020年10月13日放送</p>
--



## 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
研究協力者	クー ポギョン (Koo BonKyoung)		
研究協力者	石谷 太 (Ishitani Tohru)		
研究協力者	高橋 秀尚 (Takahashi Hidehisa)		
研究協力者	大場 雄介 (Ohba Yusuke)		
研究協力者	松本 雅記 (Matsumoto Masaki)		
研究協力者	中山 敬一 (Nakayama Kei-ichi)		
研究協力者	畠山 鎮次 (Hatakeyama Shigetsugu)		

## 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
オーストリア	オーストリア・バイオテクノロジー研究所			
イタリア	University of Turin			
英国	ケンブリッジ大学			
韓国	基礎科学研究院			
米国	ストワーズ研究所			