

## 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～

### ポイント

- ・発がんに関与する Wnt シグナルを制御しているリン酸化スイッチを新たに発見。
- ・リン酸化スイッチが壊れると、通常より少ない遺伝子変異で大腸がんを発症することを確認。
- ・リン酸化スイッチを強制的にオンにすると発がんを抑制できることから、がん治療への応用に期待。

### 概要

北海道大学大学院医学研究院の築山忠維助教らの国際共同研究グループは、大腸がんの発症メカニズムを解明し、その新たな治療法を提示しました。

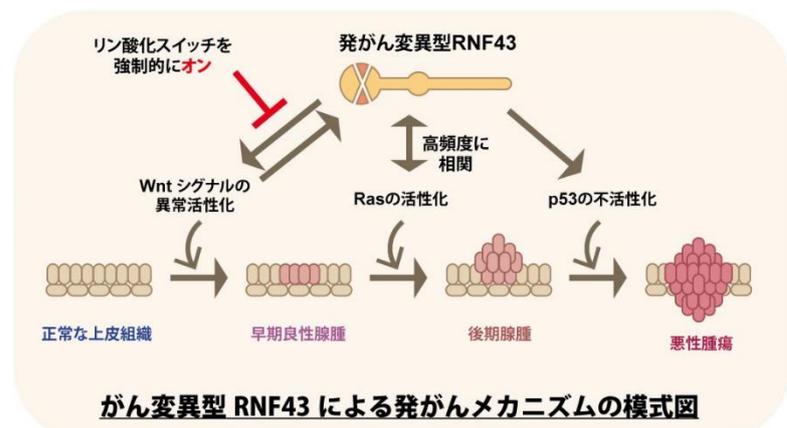
これまでに築山助教らの研究グループは、大腸がんで比較的多く見られる遺伝子変異に着目した研究を行ってきました。そして主に腸管の幹細胞\*1 で働く RNF43\*2 という遺伝子が、がん細胞の増殖と異常細胞の排除の両方を抑制していることを報告してきました。

今回の研究では、がん細胞の増殖を抑制するためには RNF43 タンパク質がリン酸化\*3 を受けて機能的なスイッチがオンになる必要があることを発見しました。一方で RNF43 は、がん細胞が細胞死によって排除される過程を、このリン酸化スイッチとは関係ない別のメカニズムで抑制していることも同時に発見しました。また大腸がんの患者さんでは RNF43 遺伝子の変異によってリン酸化スイッチが壊れているため、がん細胞の増殖を抑制することも増殖したがん細胞を排除することも出来なくなっていることを発見しました。一般的に発がんには最低でも 3 段階の遺伝子変異が必要と考えられていますが、RNF43 に変異を持つ場合はたった 2 つの遺伝子変異だけで大腸がんが発症することをマウスのモデル実験によって確認しました。

さらにマウスに移植したがんの中で RNF43 のリン酸化スイッチを人工的にオンにすると、遺伝子変異によって失われた RNF43 の機能が回復し、発がんも大きく抑制されました。これは RNF43 の遺伝子変異により大腸がんを発症した患者さんにおいて RNF43 のスイッチを外部から強制的に入れることが可能となれば、大腸がんの有効な治療法になり得ることを示しています。

本研究成果は、2020 年 9 月 15 日（火）公開の Nature Communications 誌にオンライン掲載されました。

本研究成果は、2020 年 9 月 15 日（火）公開の Nature Communications 誌にオンライン掲載されました。



## 【背景】

日本国内だけでなく世界的にも大腸がんは死因の上位を占めていることから、その発症メカニズムの解明や有効な治療法の開発は重要な科学的意義を持っていると考えられます。大腸がんをはじめとして、胃がんや膵臓がんなど消化器系のがんにおいて、RNF43 という遺伝子が高頻度に変異を起こすことが知られていました。この RNF43 は正常組織では主に幹細胞で働いている遺伝子であり、Wnt 受容体タンパク質の分解に関与することで Wnt シグナルの過剰な活性化を防いでいる遺伝子として注目されていました。研究グループは以前より、RNF43 に遺伝子変異が起こると RNF43 タンパク質の細胞内局在に異常が起こること、そしてがんの発症を促進する作用がある Wnt シグナルの過剰活性化が起こることを報告してきました。加えて RNF43 は重要ながん抑制遺伝子である p53 の機能を阻害する働きがあることも過去に報告してきました。

現在 RNF43 による Wnt シグナル抑制機構とその遺伝子変異による発がんメカニズムは非常に注目されている研究領域であり、複数のグループによって国際的にも研究されています。これまでに Wnt シグナルの負のフィードバック機構の一環として Wnt シグナルを抑制するために RNF43 の発現が誘導されることは報告されていました。しかし発現した RNF43 そのものの活性が変化することは、全く知られていませんでした。

## 【研究手法】

がん患者さんで見られる様々な RNF43 遺伝子変異のなかで実際にどの変異が Wnt シグナルの異常活性化を引き起こすのか、Wnt シグナルの活性を特異的に高感度で検出できるレポーター細胞を用いてスクリーニングしました。スクリーニングで同定された変異の場所がリン酸化を受けるアミノ酸（セリン）上であったため、該当するセリンに実際に変異を導入し、リン酸化スイッチが切れたままの状態の変異 RNF43 と、スイッチが入ったまま切れないう状態の変異 RNF43 を遺伝子組換えにより作製しました。これらの RNF43 変異体を使用して、培養細胞を用いたレポーターアッセイや定量的 PCR、正リン酸ラベルなどの生化学的手法により、Wnt シグナルの異常活性化や p53 シグナルへの影響を確認しました。

またゼブラフィッシュの発生・形態形成モデルとマウスの腸管オルガノイドモデルを用いて、RNF43 のリン酸化スイッチが実際に生物の中で重要な役割を担っているかを検討しました。さらにリン酸化スイッチとその変異が正常組織における Wnt シグナルの調節や発がん過程で重要な役割を果たしていることについて、足場非依存性増殖を用いた培養細胞レベルでの検討に加えて、ヌードマウスへの細胞移植実験により動物レベルでの確認も行いました。

## 【研究成果】

本研究は、これまでに研究グループらが報告してきた研究結果をさらに発展させて、RNF43 の機能が種を越えて高度に保存されているセリンのリン酸化によって調節されていることを明らかにしました。このリン酸化による RNF43 の機能調節をリン酸化スイッチと定義し、またそのセリンは RNF43 の細胞内局在に依存してカゼインキナーゼ 1 によってリン酸化されていることを明らかにしました（図 1）。リン酸化を受けるセリンを遺伝子組換えにより、脱リン酸化状態を模倣するアラニンと恒常的なリン酸化状態を模倣するアスパラギン酸にそれぞれ置換したところ、Wnt 受容体のユビキチン化依存的分解は RNF43 がリン酸化されて起こることが初めてわかりました。しかし生体内で RNF43 がリン酸化された状態で固定された場合は、過剰に Wnt シグナルが抑制され、ゼブラフィッシュの発生異常が起こること、また、マウスでは長期的な腸管幹細胞の維持が出来なくなることを明らかにし

ました。

一方で、全くリン酸化されない RNF43 は発生中の形態形成や成体での幹細胞維持には影響しませんでした。一方、発がんを大きく促進することがわかりました。つまり RNF43 のリン酸化スイッチがオンになったままでは Wnt シグナルの恒常的な抑制により成長生存に支障をきたし、またオフになったままでは Wnt シグナルの過剰な活性化と p53 の過剰な抑制が同時に起こり発がんをさらに強く促進するという事です。これらの結果は、RNF43 の活性がリン酸化によって状況に応じた厳密な調節を受けることにより生体の恒常性が維持されていることを示しています。

また、RNF43 のリン酸化スイッチが遺伝子変異で働かなくなった場合はそこに Ras 遺伝子の変異がもう 1 つ加わっただけで、つまりたった 2 つの遺伝子変異によってがんの発症に至る可能性を示しました。これは発がんには 3 段階以上の遺伝子変異が必要であると考えられてきたこれまでの通説を変えるものです。さらに、RNF43 の遺伝子変異によって発症したがん細胞の中でリン酸化スイッチを強制的にオンにすると、RNF43 変異体は正常ながん抑制機能を取り戻すこともわかりました(図 2)。

### 【今後への期待】

本研究では、RNF43 の遺伝子変異によるがん発症メカニズムの新しい側面が解明されました。さらに遺伝子変異によって一度がん遺伝子となってしまった RNF43 のリン酸化スイッチを強制的に入れることで、本来のがん抑制遺伝子としての機能を回復出来ることも示されました。今回の研究では RNF43 のリン酸化スイッチをオンにする実験的な手段として、遺伝子組換えによるアミノ酸置換(セリン→アスパラギン酸)を用いましたが、この手法をそのまま実際に患者さんの治療へ使用することは出来ません。またこのリン酸化スイッチをオンにする役割を担っている酵素がカゼインキナーゼ 1 であることも同定しましたが、単純にこの酵素を活性化するだけですぐがん治療が可能になる訳でもありません。しかし今後研究が進み RNF43 のリン酸化スイッチ本体を標的にしたリン酸化誘導法が開発されれば、それは非常に強力ながん治療のツールとなることが期待されます。

### 論文情報

論文名	A phospho-switch controls RNF43-mediated degradation of Wnt receptors to suppress tumorigenesis (RNF43 のリン酸化スイッチは Wnt 受容体の分解を調節して発がんを抑制する)
著者名	築山忠維 <sup>1</sup> , ゴウ・ジュキ <sup>2</sup> , ジフーン・キム <sup>3,4</sup> , 小神野翔平 <sup>5</sup> , 篠 裕輝 <sup>6</sup> , 増田隆昌 <sup>7</sup> , アレッサンドラ・メレンダ <sup>3</sup> , 松本雅記 <sup>7,8</sup> , 藤岡容一郎 <sup>1</sup> , 廣瀬智威 <sup>9</sup> , 寺井小百合 <sup>1</sup> , 高橋秀尚 <sup>1,9</sup> , 石谷 太 <sup>2,5,7</sup> , 中山敬一 <sup>7</sup> , 大場雄介 <sup>1</sup> , ポギョン・クー <sup>3,4</sup> , 畠山鎮次 <sup>1</sup> (1北海道大学大学院医学研究院, 2大阪大学微生物病研究所, 3ケンブリッジ大学幹細胞研究所, 4オーストリアバイオテクノロジー研究所, 5群馬大学生体調節研究所, 6北海道大学医学部, 7九州大学生体防御医学研究所, 8新潟大学大学院医学研究科, 9横浜市立大学大学院医学研究科)
雑誌名	Nature Communications (自然科学の総合誌)
DOI	10.1038/s41467-020-18257-3
公表日	2020年9月15日(火)(オンライン公開)

## お問い合わせ先

北海道大学大学院医学研究院 助教 築山忠維（つきやまただすけ）

T E L 011-706-5047 F A X 011-706-5169 メール tsukit@med.hokudai.ac.jp

U R L https://hokudai-ikagaku.jp

## 配信元

北海道大学総務企画部広報課（〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目）

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール kouhou@jimuhokudai.ac.jp

## 【参考図】

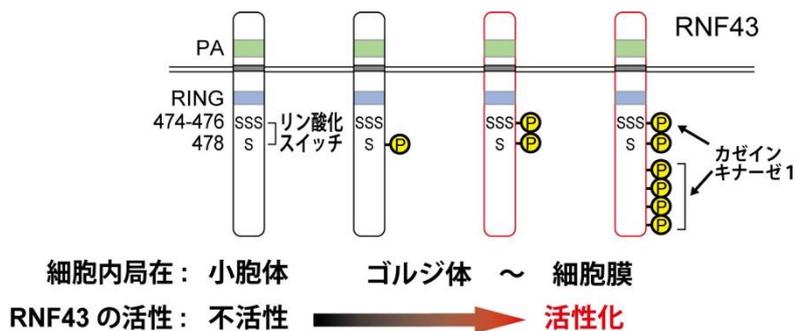


図1. 細胞内局在に依存した RNF43 のリン酸化と活性化

mRNA から翻訳されたばかりの未熟な RNF43 タンパク質は小胞体に局在している。その後小胞体からゴルジ体を経て細胞表面へと向かう膜輸送の過程で、RNF43 はプロセッシングや糖鎖付加、カゼインキナーゼによるリン酸化などの修飾を受けて成熟・活性化して、Wnt 受容体の分解を行う。

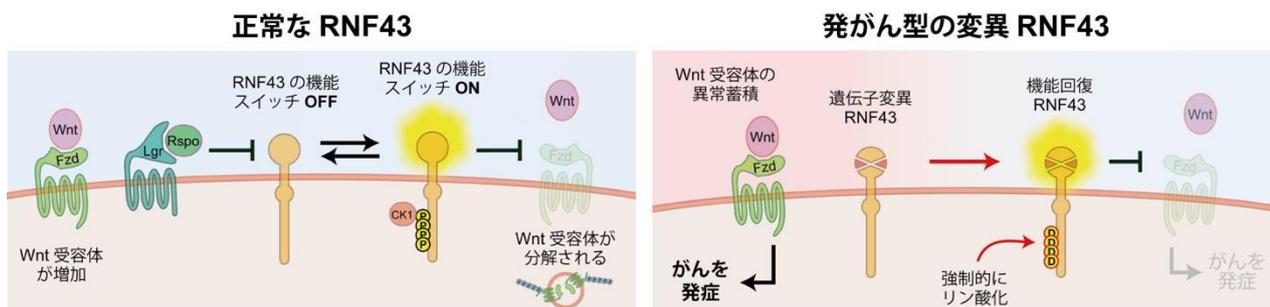


図2. RNF43 のリン酸化スイッチとがん抑制機能の調節

正常な RNF43 は細胞表面で Wnt 受容体の Fzd を分解することで、がんを抑制する方向に働いている（左図）。しかし、RNF43 の遺伝子変異により細胞局在が変化するとリン酸化を受けられないため活性化出来ず、その機能は本来のがん抑制遺伝子からがん遺伝子へと転換する。しかしリン酸化スイッチを強制的にオンにすると、がん遺伝子になった変異 RNF43 は再度がん抑制遺伝子としての機能を取り戻す（右図）。

## 【用語解説】

- \*1 幹細胞 … 様々な種類の細胞を生み出す元になる細胞のこと。
- \*2 RNF43 … Ring finger protein 43; タンパク質に分解やその他の機能変化の目印となるユビキチンという標識を付ける酵素のひとつ。
- \*3 リン酸化 … タンパク質の標識のひとつで、そのタンパク質の機能や性質を変える働きを持つ。