

No.	23-2048	
Project Title	発がん過程におけるRNF43をハブとしたWntシグナルとp53経路のクロストーク機構の解明	
Principal Investigator	Tadasuke Tsukiyama (Hokkaido University・Assistant professor)	
Project Member(s)	IMSUT Host Researcher	Yoichi Furukawa (The Institute OF Medical Science, The University Of Tokyo・Professor)
	Project Member (s)	野口 卓郎 (北海道大学医学研究院・腫瘍内科学教室・助教)

東京大学医科学研究所国際共同利用・共同研究拠点事業
共同研究報告書（年次終了・研究完了）【国内】

共同研究報告（研究完了）

幹細胞特異的に発現する膜型ユビキチンリガーゼである RNF43 は Wnt 受容体の Frizzled (Fzd) をユビキチン化し、プロテアソームではなくリソソーム依存的に分解することで Wnt シグナルを抑制する。また東大医科学研究所古川教授らのこれまでの研究により RNF43 自身は Wnt/ β -catenin 経路の標的遺伝子の一つであることが同定され、RNF43 が Wnt シグナルの負のフィードバック回路を担う重要な分子であることが明らかになっている。横行結腸後半から下行結腸、直腸にかけて発症する比較的予後の良い MSS 型の大腸がんでは APC に多くの変異が見られる一方で、上行結腸から横行結腸前半に発生する予後の悪い MSI 型の大腸がんでは RNF43 に変異が見られる。これら MSI のがんで同定された RNF43 変異により Fzd の分解が出来なくなる。その結果細胞表面に Fzd の異常蓄積が引き起こされ Wnt リガンドに対して超過敏状態になることで Wnt/ β -catenin 経路の異常活性化が起こる。一度活性化した Wnt シグナルは前述の通り変異 RNF43 の発現を誘導して更なる Wnt シグナル活性化が起こる。すると野生型が本来形成する負のフィードバックは変異により正のフィードバックへと逆転する。ここでもう一つ重要であるのは、RNF43 による Wnt シグナル抑制が報告される以前から、我々は RNF43 が p53 の下流を抑制することを見出していたことである。大腸がん（特に MSS 型）の多段階発がんモデルにおいて発がん過程は APC→KRAS→TP53 変異に沿って進行すると考えられてきた。しかし我々は MSI 型の発がん過程では RNF43 と KRAS の 2 つの遺伝子変異だけで発がんに十分であることを実験的に示した。このモデルにおいては RNF43 変異により Wnt シグナルの異常活性化が起こると正のフィードバックが進行するにつれて過剰発現した変異型 RNF43 により p53 経路の抑制が引き起こされるため、MSI における RNF43 の変異は MSS における APC と TP53 の変異を同時に代償しているという仮説を提唱してきた (Tsukiyama, IVAN 2024)。

この仮説を証明するためには過剰発現した RNF43 から p53 抑制機能を喪失させることが重要であると考え、RNF43 上の p53 結合部位を同定した。p53 結合領域を欠く RNF43 (Δ p53BS) は Wnt シグナルを調節する機能に全く問題なく正常であったが、p53 を抑制する機能を完全に欠いていた。これは RNF43 の併せ持つ 2 つの独立した Wnt シグナルと p53 を調節する機能を切り離して個別に検討することを可能とする非常に重要な知見となった。この結果を踏まえて本共同研究により次世代シーケンサー (NGS) を用いた RNA-seq により網羅的な発現解析を行った。その結果、Wnt シグナルの抑制に関しては野生型と Δ p53BS の RNF43 間に差は認められなかった。しかし p53 標的遺伝子群に関しては野生型の持つ抑制効果が Δ p53BS においては完全にキャンセルされていたことから、RNF43 による Wnt シグナルと p53 の調節は完全に独立した別機能であり、この 2 つは切り離しが可能であることを厳密に確認できた。そこで発がんや老化において RNF43 の p53 抑制機能が担う生物学的意義を検討した。その結果、RNF43 から p53 結合部位を除去すると発がんを有意に抑制した。これは細胞の腫瘍化に RNF43 による p53 抑制が促進的に機能していることを意味する。また細胞老化においては野生型 RNF43 が老化を抑制したのに対し、RNF43 Δ p53BS ではその効果が失われていた。これらの結果により RNF43 の持つ p53 抑制機能の重要性が世界で初めて浮き彫りに出来たと言える。

また RNA-seq の過程で、RNF43 は全ての p53 標的遺伝子を均等に抑制するのではなく RNF43 により抑制されるものと殆ど影響を受けないものがあった。当初この現象に RNF43 結合タンパク質として同定した PRMT5/Mep50 が関与すると予想したが、詳細な検討の結果関与しないことを確認した。そこでこの差が各プロモーターへの p53 結合パターンの変化により生み出されるのか、それとも結合量は変わらずプロモーター上での転写活性化能が変化しているのかを確認するため、2026 年度も採択して頂いた共同研究により現在 ChIP-seq を行っている最中である。