

令和 4 年 6 月 25 日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K10556

研究課題名(和文) Wnt/ β -cateninシグナルを標的としたトリプルネガティブ乳癌の化学予防

研究課題名(英文) Chemoprevention of triple negative breast cancer by targeting Wnt signaling.

研究代表者

大竹 徹 (Ohtake, Tohru)

福島県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：50363750

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)：本研究はトリプルネガティブ乳癌とWntシグナルの活性化の関連の解析を行うとともに、その関連分子の検討を行った。本研究により、トリプルネガティブ乳癌とWntシグナル活性化の関連が明らかとなった。さらに関連分子として、アネキシンA1、AP1が考えられたため、乳癌症例における免疫組織学的検討ならびに予後、臨床病理学的検討を行ったところ、アネキシンA1高発現トリプルネガティブ症例では発現のない症例に対して予後不良であった。また、AP1発現の発現様式の解析により、乳癌サブタイプとの有意な相関がみられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

トリプルネガティブ乳癌とWntシグナルとの関連ならびにアネキシンA1発現、AP1発現との関連と臨床学的意義を研究することは、発癌機序や予後因子との関連の解明に必須であるとともに、乳癌の化学予防や個別化医療に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to analyze the association between triple negative breast cancer and Wnt signaling. This study revealed an association between triple negative breast cancer and Wnt signaling. Annexin A1 and AP1 were considered as Wnt signaling related molecules. Immunohistological, prognostic, and clinicopathological analysis in breast cancer cases revealed that triple negative breast cancer cases with high expression of annexin A1 were poor prognosis than those without expression. Analysis of AP1 expression patterns showed a significant correlation with breast cancer subtypes.

研究分野：乳癌

キーワード：トリプルネガティブ乳癌 Wntシグナル

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

乳癌は女性での罹患数1位、死亡数5位であり、早期発見や治療と並んで、予防が極めて重要なテーマである。乳癌の予防には高リスク群の抽出と、化学予防や手術による介入が必要である。高リスク女性を対象にタモキシフェンとプラセボを比較した複数の試験によると、NSABP (National Surgical Adjuvant Breast & Bowel Project) においては浸潤性乳癌の発症率が約50%低下し、IBIS (The International Breast Cancer Intervention Study) では浸潤性乳癌の発症率が約30%低下した。しかし、タモキシフェンによるリスク低下はホルモン受容体陽性乳癌に限られ、ホルモン受容体陰性乳癌の発症率を低下させる新たな化学予防薬の開発が必要であると考えた。

Wnt/ β -catenin シグナル (以下 Wnt シグナル) は細胞の分化、形態形成を制御する。そのシグナルは受容体から細胞内の Dvl、GSK3、Axin へと伝達され、 β -catenin/転写因子 TCF との複合体の形成と、それに続く c-myc、c-jun、cyclin D1 などの標的遺伝子の発現を促進する。Wnt シグナルの活性化は様々な癌腫にみられるが、Wnt シグナルは正常乳腺上皮細胞株 (MCF10A) と比較し、異型乳管過形成細胞株 (MCF10AT) において活性化することが報告された (*Tumour Biol* 2012)。例えば大腸癌においても APC 変異に伴う Wnt シグナル活性化は多段階の腫瘍形成において最初のステップである。このことから我々は、Wnt シグナル活性化が乳腺の腫瘍形成初期段階において発癌のドライバーとして働くと考えた。

ホルモン受容体陰性、HER2 陰性であるトリプルネガティブ乳癌 (TNBC) は生物学的悪性度が高く、他のサブタイプに比べて予後不良である。TNBC と Wnt シグナルの関連を示す報告により、TNBC における β -catenin の高発現や Wnt シグナル活性化との関連が示唆された (PLoS One 2013, PLoS One 2015)。

非ステロイド性消炎鎮痛薬 (NSAIDs) が Wnt シグナルに影響をおよぼすことが明らかとなり (PNAS 2010, *Cancer Prev Res (Phila)* 2011)、 β -catenin と炎症との密接な関連性が示唆された。さらに複数の大規模な疫学調査により、NSAIDs の常用者において発癌が減少するという報告がみられた。NSAIDs は細胞内のシクロオキシゲナーゼ (COX) を抑制することによりアラキドン酸カスケードを止め、炎症性生理活性脂質の生成を阻害し、抗炎症作用を発揮するが、この阻害活性が Wnt シグナル経路を阻害することで、その下流のターゲット分子を抑制し、結果として発癌を抑制すると推測した。TNBC について極めて多くの基礎・臨床研究が行われる一方で、予防のための研究はほとんどなかったため、副作用が少なく予防投与が現実的と考えられる NSAIDs や特定の natural compound が Wnt シグナルを阻害することから、Wnt シグナルを標的とする化学予防の可能性を追求するという着想に至った。

2. 研究の目的

Wnt シグナルと炎症の分子機構の解明、つまり TNBC における β -catenin のターゲット分子の新規同定および機能解析が目的である。ここではバイオインフォマティクスによる in silico 解析と TNBC 培養細胞株を用いた in vitro 解析が中心となり、新規ターゲット候補の取得と、分子生物学的な検証、機能的解明を本研究の目的とした。

3. 研究の方法

本研究では以下のような方法を用いた。

- ・網羅的発現データを用いた Wnt シグナル活性化の検討、標的遺伝子の抽出
- ・乳癌手術検体を用いたアネキシン A1 発現の免疫組織学的検討と予後の解析
- ・乳癌手術検体を用いた AP1 発現の免疫組織学的検討と臨床病理学的因子との関連の解析

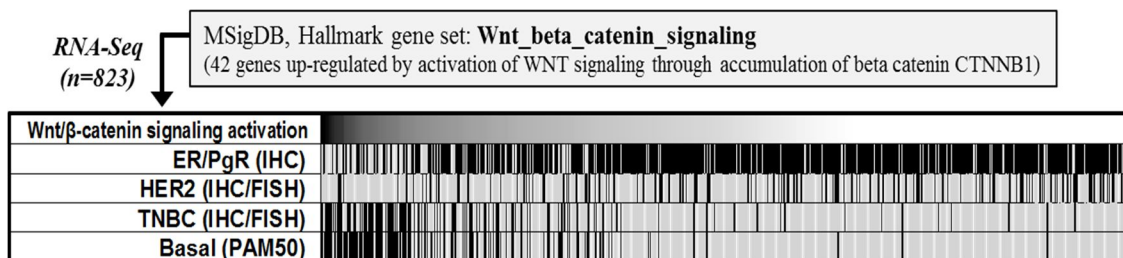
4. 研究成果

(1) 網羅的データ解析による Wnt シグナル活性化レベルの検討、Wnt シグナルが標的とする炎症関連遺伝子の抽出

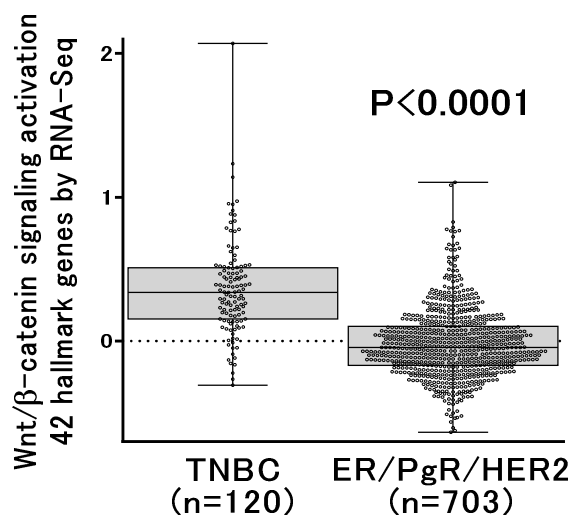
TCGA data portal、cBioPortal (MSKCC) および TCGA 論文 (Cell 2015) の supplementary data から、800 例以上の乳癌サンプルの各種データを取得し、解析を行った (図 1)。転写レベルでの Wnt シグナル活性化状態は、MSigDB (Broad Institute) の hallmark gene sets から、Wnt/ β -catenin シグナル活性化により発現上昇する 42 遺伝子を抽出し、TCGA の RNA シークエ

ンス (RNA-Seq) データを用いて算出した(図 2)。TNBC における Wnt シグナルの活性化は顕著であった。

(図 1)



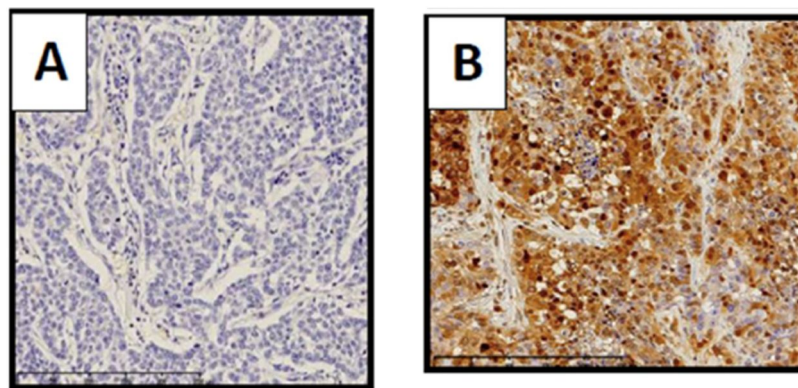
(図 2)



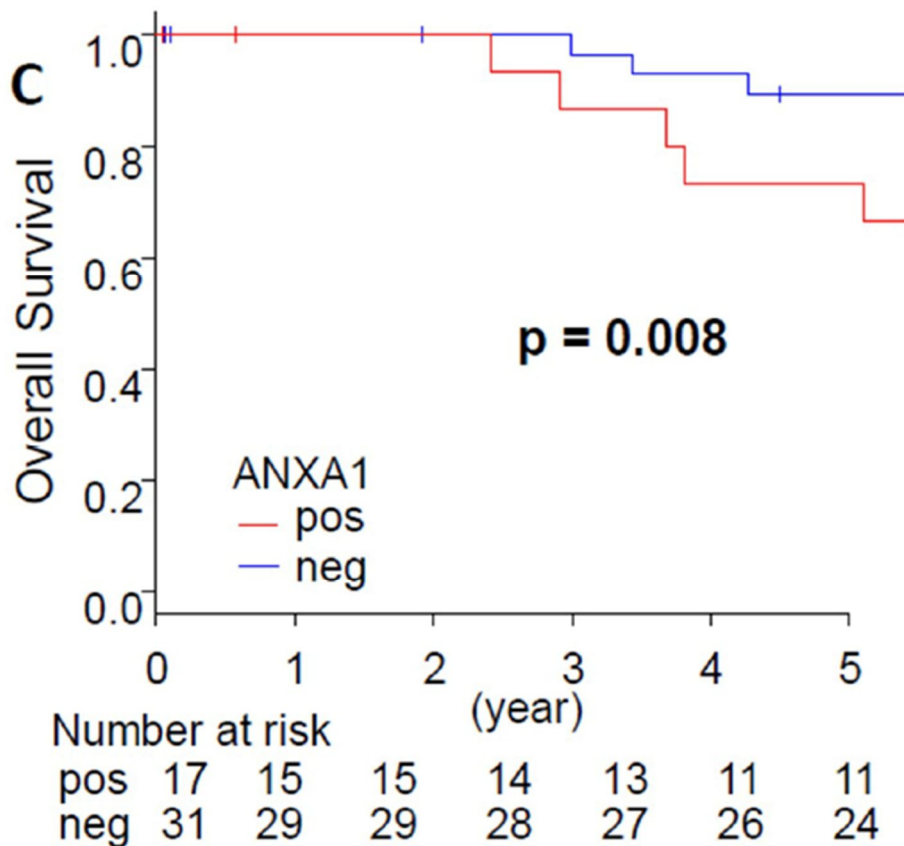
(2) 乳癌手術検体を用いたアネキシン A1 発現の免疫組織学的検討と予後の解析

上記の検討で、アネキシン A1 (ANXA1) が関連していることが考えられた。ANXA1 は炎症、免疫応答、肥満細胞の反応性に関与するリン脂質結合タンパク質であり、ANXA1 高発現と EMT 形質は TNBC において強く関連している。Wnt シグナルの関連分子と考えられた ANXA1 について、その発現と予後との関連についての検討を行った。ANXA1 発現に対して、2002 年 1 月から 2011 年 12 月までに本学附属病院で手術を行った TNBC 症例 48 例に対して免疫組織染色を行い、発現のない症例と発現のある症例での全生存率について解析した。解析の結果、ANXA1 染色陽性症例は ANXA1 染色陰性症例に比べ、有意に全生存率が低かった(図 3)。

(図 3)



A: 乳癌組織 Negative staining B: 乳癌組織 Positive staining

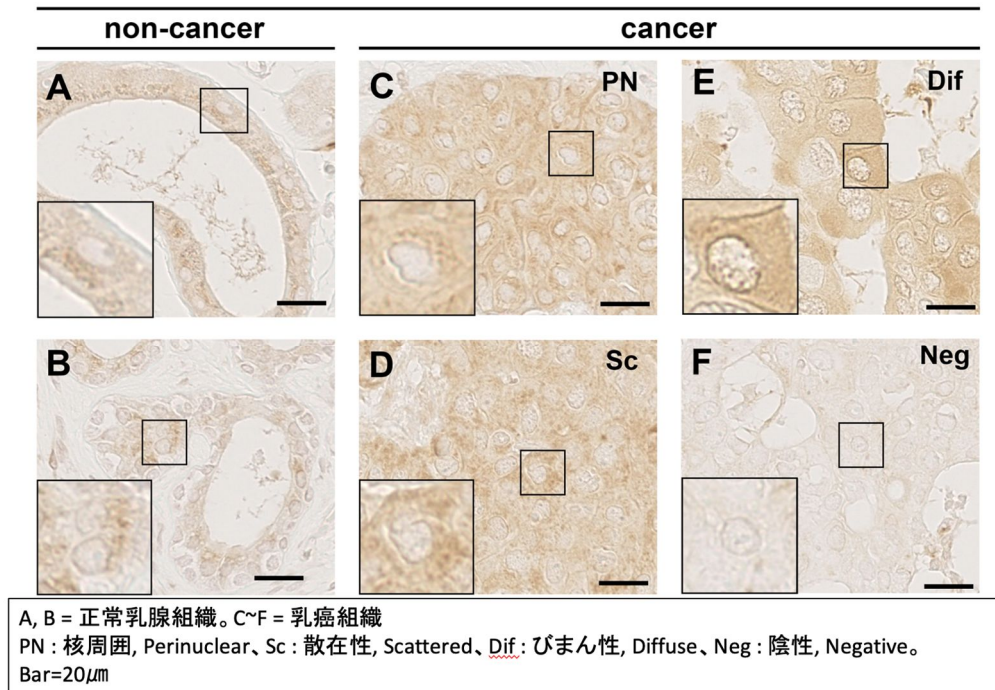


Int J Mol Sci. 2019

(3) 乳癌手術検体を用いた AP1 発現の免疫組織学的検討と臨床病理学的因子との関連の解析

(1) の検討において、Wnt シグナルと関連する分子として AP1 も考えられた。TGN/エンドソーム局在型クラスリンアダプター分子である AP-1 はヘテロ 4 量体でありヒンジ領域でクラスリンと結合し、 $\mu 1$ アダプチンを介して膜タンパク質などの積荷タンパク質と結合し、細胞内小胞輸送を仲介する役割を担っている。AP-1 は核周囲のトランスゴルジネットワークと細胞質に散在し、積荷タンパク質の輸送先を決定するエンドソームへの局在が知られている。代表的な積荷タンパク質としてマンノース 6 リン酸受容体(MPR)があり、リソソーム酵素の効率的な輸送に参与している。AP1 発現に対して、2011 年 1 月から 2012 年 12 月までに本学附属病院で手術を行った原発乳癌症例 150 症例で免疫組織染色を行い、臨床病理学的検討を行った。正常乳腺細胞においては、AP-1 の陽性反応が核上部に茶褐色の集合顆粒として認められ、乳癌細胞においては、核の周囲に陽性顆粒が認められる perinuclear パターン、細胞質に散在性に顆粒が認められる scattered パターン、細胞質が茶褐色にびまん性に染色される diffuse パターン、陽性反応が認められない negative パターンの 4 パターンに分けられた (図 4)。AP-1 の局在発現様式を Perinuclear と Negative、Scattered と Diffuse の 2 群に分け、臨床病理学的因子との相関を解析したところ、MIB-1 index、Subtype、Intensity で有意な相関が認められた (表 1)。

(図 4)



第 121 回日本外科学会定期学術集会 2021

(表 1)

Clinicopathological factors	AP-1 Staining pattern		p value	Clinicopathological factors	AP-1 Staining pattern		p value
	Perinuclear / Negative	Scattered / Diffuse			Perinuclear / Negative	Scattered / Diffuse	
All	73	134		Subtype			**** < 0.0001
Age at surgery (years)			0.5773	Luminal A	42	31	(excluding unknown)
< 35	1	3		Luminal B	24	56	
35-49	14	34		HER 2 ype	4	31	
50-59	24	34		TNBC	2	15	
60-69	15	38		Unknown	1	0	
70+	14	25		Postoperative recurrence (excluding StageIV)			0.5688
Tumor size (cm)			0.1472	Yes	4	10	
<= 2	51	81		No	69	122	
> 2, <= 5	22	48		Intensity			**** < 0.0001
> 5	0	5		high	22	107	
Axillary lymph nodes metastasis			0.9026	low	51	27	
positive	21	38		Death caused by primaey disease			0.4650
negative	51	96		Yes	1	4	(excluding deaths by other disease)
Stage			0.7115	No / Unknown	72	129	
Stage I	40	69	(excluding unknown)				**** : p < 0.0001 (Chi-square test)
Stage II	30	58					
Stage III	2	5					
Stage IV	0	2					
Unknown	1	0					
MIB-1 index			**** < 0.0001				(excluding unknown)
< 14%	42	33					
>= 14%	30	99					
Unknown	1	2					

第 121 回日本外科学会定期学術集会 2021

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tachibana K, Saito M, Imai JI, Ito E, Yanagisawa Y, Honma R, Saito K, Ando J, Momma T, Ohki S, Ohtake T, Watanabe S, Waguri S, Takenoshita S	4. 巻 6
2. 論文標題 Clinicopathological examination of dipeptidase 1 expression in colorectal cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomedical Reports	6. 最初と最後の頁 423 428
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3892/br.2017.870. Epub 2017 Mar 8	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 -

1. 著者名 Okano Maiko, Oshi Masanori, Butash Ali Linsk, Katsuta Eriko, Tachibana Kazunoshin, Saito Katsuharu, Okayama Hirokazu, Peng Xuan, Yan Li, Kono Koji, Ohtake Toru, Takabe Kazuaki	4. 巻 20
2. 論文標題 Triple-Negative Breast Cancer with High Levels of Annexin A1 Expression Is Associated with Mast Cell Infiltration, Inflammation, and Angiogenesis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 4197 ~ 4197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms20174197	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 立花和之進
2. 発表標題 トリプルネガティブ乳癌におけるAnnexin A1の発現と臨床病理学的因子との関連および予後の検討
3. 学会等名 第25回日本乳癌学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岡野舞子
2. 発表標題 Annexin A1 expression associate with EMT and poor prognosis in patients of triple negative breast cancer
3. 学会等名 Society of Surgical Oncology Annual Cancer Symposium（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 星 信大
2. 発表標題 乳癌におけるクラスリンアダプター分子AP-1の発現様式と臨床病理学的因子の関連性について
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部貞彦
2. 発表標題 乳癌におけるp62/SQSTM-1の発現様式と臨床病理学的因子の関連性について
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022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	岡山 洋和 (Okayama Hirokazu) (20583397)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	
研究分担者	立花 和之進 (Tachibana Kazunoshin) (50583598)	福島県立医科大学・医学部・学内講師 (21601)	
研究分担者	齋藤 元伸 (Saito Motonobu) (90611749)	福島県立医科大学・医学部・講師 (21601)	

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
---------	---------