

令和 5 年 5 月 5 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17583

研究課題名(和文) Wnt5a陽性乳癌の薬剤耐性メカニズム解明による新規抗Wnt5a抗体療法の開発

研究課題名(英文) Development of novel anti-Wnt5a antibody therapy by elucidating drug resistance mechanism of Wnt5a positive breast cancer

研究代表者

網岡 愛 (Amioka, Ai)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・専門研究員

研究者番号：90727207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt5a陽性乳癌は、エストロゲン受容体陽性乳癌に分類され、その予後はWnt5a陰性よりも不良である。Wnt5aを恒常的に発現するMCF-7細胞[MCF-7/Wnt5a(+)]の遺伝子発現解析では、チトクロームP450(CYP)経路のみがMCF-7/Wnt5a(+)で発現亢進していた。更に、MCF-7/Wnt5a(+)は、CYP代謝基質であるタモキシフェン、パクリタキセル、シクロホスファミドに対する感受性の低下を示したことから、Wnt5aはCYP代謝経路を亢進させ、上記3剤への感受性を低下させることで、Wnt5a陽性乳癌の予後不良に関与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで我々は、Wnt5a陽性乳癌はER陽性乳癌に属し、Wnt5a陰性に比べて予後が悪いことを明らかとした。本研究ではWnt5a発現が乳癌治療薬に対する薬剤感受性に影響を与えるという仮説を検証したことに意義がある。結果、Wnt5a発現によりCYP代謝の発現が亢進し、その代謝基質のパクリタキセル・タモキシフェンへの薬剤感受性が、Wnt5a発現に伴い低下したことを突き止めた。Wnt5a発現は、それ自体への抗体治療が有用である可能性だけでなく、ER陽性乳癌に対する薬剤耐性のマーカーになる可能性がある。その薬剤耐性解除をターゲットとした新規薬剤開発の可能性も期待される。

研究成果の概要(英文)：Previously, we reported that Wnt5a-positive breast cancer can be classified as estrogen receptor (ER)-positive breast cancer; its prognosis is worse than that of Wnt5a-negative breast cancer. DNA microarray data suggest that only the cytochrome P450 (CYP) pathway was significantly upregulated in MCF-7/Wnt5a(+) cells. Additionally, MCF-7/Wnt5a(+) cells displayed reduced sensitivity to the metabolic substrates of CYP, tamoxifen, paclitaxel, and cyclophosphamide. In ER-positive breast cancer, Wnt5a upregulates the CYP metabolic pathway and decrease the sensitivity to tamoxifen, paclitaxel, and cyclophosphamide, all of the three, standard treatment methods for ER-positive breast cancer.

研究分野：乳腺外科

キーワード：Wnt5a ホルモン陽性乳癌 CYP 薬剤感受性 タモキシフェン パクリタキセル パスウェイ解析 代謝基質

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) Wnt5a は、Wnt シグナル伝達経路の一つである -カテニン非依存性経路の代表的なリガンドであり、胃癌、前立腺癌、肺癌などで予後、悪性度に関連していることが報告されている。我々は、病理検体を用いた免疫組織化学染色において Wnt5a 陽性乳癌は悪性度が高く、予後が悪いことを明らかにしている。

(2) 乳癌細胞株を用いた DNA マイクロアレイにより新規 Wnt5a 関連因子として ALCAM を同定した。Wnt5a 陽性乳癌では約 70%の症例に ALCAM が共発現しており、本研究では最終的に Wnt5a/ALCAM 陽性乳癌に対する複合抗体療法を中心とした新規治療の開発を目的としている。

(3) Wnt5a の属する ER 陽性乳癌の悪性度に関連するシグナルとして、PI3K-AKT-mTOR シグナルが最も頻度が高く、Wnt5a との関連を示唆している報告もある。

2. 研究の目的

ER 陽性乳癌において、Wnt5a による予後不良のメカニズムを明らかとすることを目的とした。

3. 研究の方法

ER 陽性乳癌において Wnt5a 発現と予後との関連を、追跡期間を延長して検証した。

Wnt5a 陽性乳癌の再発メカニズムに関連しているシグナルを見つけるため、Wnt5a 強制発現細胞株を樹立し、マイクロアレイ のパスウェイ解析を行った。Wnt5a 陽性細胞株と陰性株との比較で、ER 陽性乳癌の標準治療薬であるタモキシフェン、パクリタキセル、シクロホスファミド、エピルピシン、5-フルオロウラシルに対し薬剤感受性試験を行った。Wnt5a のタンパク発現量・mRNA 発現量と PI3K-AKT-mTOR 経路の関連を検索した。

4. 研究成果

(1) ER 陽性乳癌において Wnt5a 発現と予後との関連を調べたが、Wnt5a 陽性乳癌の予後は有意に悪かった[再発率 Wnt5a 陰性:98.6% (0.960-1.000)、Wnt5a 陽性 91.9% (0.851-0.987)、 $P=0.047$]。再発した 6 症例の受けた薬物治療としては、5 例中 3 例に化学療法が、5 例にホルモン療法が行われており、再発症例はすべて治療抵抗性であった。

(2) Wnt5a 陽性乳癌の予後不良のメカニズムを明らかにするため、ER 陽性乳癌細胞株である MCF7 に、Wnt5a を強制発現させた Wnt5a 強制発現細胞株 [MCF-7/Wnt5a (+)] を樹立し、DNA マイクロアレイ、パスウェイ解析を行った。結果、MCF7/Wnt5a(+)細胞株において、薬剤代謝に関与するシトクロム P450(CYP)経路のみが有意に亢進することを突き止めた。(図2)

(3) Wnt5a 発現により CYP 経路のみが有意に亢進していたことから、CYP 経路で代謝される薬剤とそれ以外の薬剤とで、Wnt5a 陽性乳癌への薬剤感受性に違いがあるという仮説を立て、薬剤感受性試験を行った。ER 陽性乳癌の代表的な

図1. ER陽性乳癌におけるWnt5a発現と予後

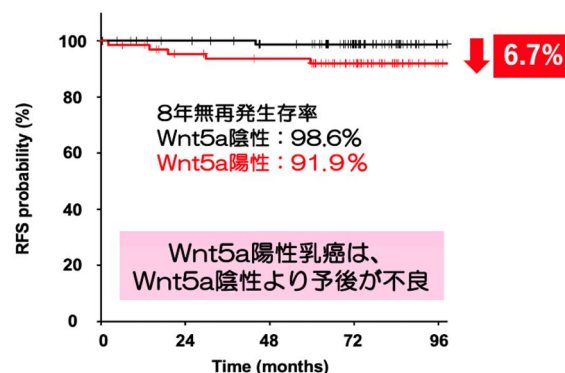


図2. Wnt5a発現に伴い亢進したパスウェイ

KEGG PATHWAY	Number of genes	%	P-value
Cytochrome P450	3	4.2	0.044
Chemical carcinogenesis	3	4.2	0.059

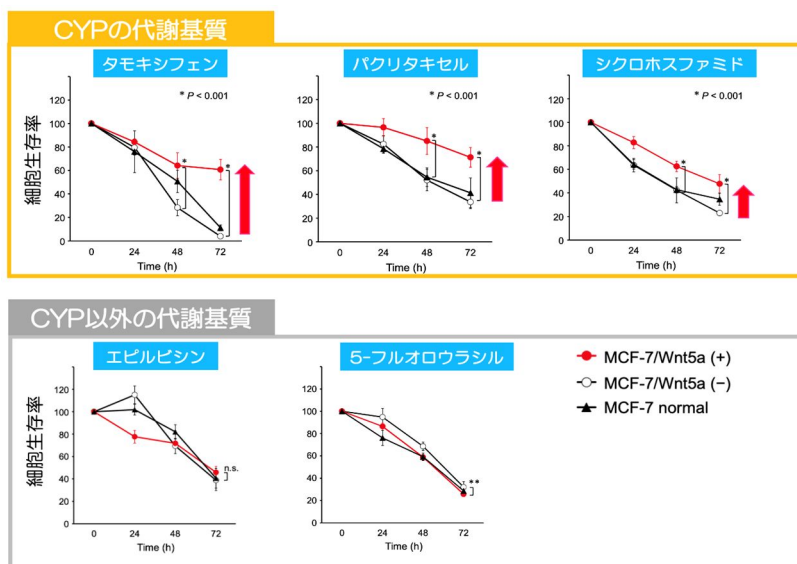
MCF7/Wnt5a(+)細胞株において、薬剤代謝に関与するCYP経路のみが有意に亢進

治療薬である、ER 拮抗薬のタモキシフェン、殺細胞性抗癌剤のパクリタキセル、シクロホスファミド、エピルピシン、5-フルオロウラシルを使用した。結果、タモキシフェン、パクリタキセル、シクロホスファミドに対し、MCF-7/Wnt5a(+)株で薬剤感受性が低下し、それら3剤は全て CYP 経路の代謝基質であった(図3)。一方、CYP 経路の代謝基質ではないエピルピシン、5-FU では感受性に差は認めなかった。Wnt5a は CYP 亢進を介して CYP 代謝基質の分解を促進させ、細胞内薬剤濃度を低下させる可能性が示唆された。

(4) Wnt5a 陽性乳癌が属する ER 陽性乳癌の、予後不良に關与する最も頻度の高いシグナル経路は、PI3K シグナルである。さらに、Wnt5a 強制発現細胞株で減弱したパスウェイの中に、Jak- STAT- signaling pathway が含まれていたことから、Wnt5a 発現と Jack の下流でもある PIK3-AKT-mTOR シグナルとの間に何らかの關連があるという仮説を検証した。Western Blot を Wnt5a 陽性細胞株と陰性細胞株に対して行い、Wnt5a の発現によりリン酸化 Akt のタンパク発現量が変化するかを確認したが、その量に変化は見られなかった。

PI3K シグナルの活性化の原因遺伝子である PIK3CA と Wnt5a 発現の關連について検討したが、PIK3CA 変異の有無と Wnt5a タンパク発現量・mRNA 量との間に有意な關連は認めなかった。

図3. Wnt5a発現による、各治療薬の細胞生存率



MCF7/Wnt5a(+)細胞株に対し、タモキシフェン、パクリタキセル、シクロホスファミドに対する薬剤感受性が低下した

それらの薬剤は全てCYP経路の代謝基質である

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Amioka Ai, Kadoya Takayuki, Sueoka Satoshi, Kobayashi Yoshie, Sasada Shinsuke, Emi Akiko, Masumoto Norio, Ito Masaoki, Nakayama Koh, Okada Morihito	4. 巻 28
2. 論文標題 Effect of Wnt5a on drug resistance in estrogen receptor-positive breast cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Breast Cancer	6. 最初と最後の頁 1062 ~ 1071
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12282-021-01241-0	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 網岡愛、角舎学行、末岡智志、小林美恵、笹田伸介、恵美純子、舩本法生、伊藤正興、岡田守人
2. 発表標題 Effect of Wnt5a on drug resistance in estrogen receptor-positive breast cancer
3. 学会等名 第29回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ai Amioka, Takayuki Kadoya, Satoshi Sueoka, Yoshie Kobayashi, Shinsuke Sasada, Akiko Emi, Norio Masumoto, Masaoki Ito and Morihito Okada.
2. 発表標題 Effect of Wnt5a on drug resistance in estrogen receptor-positive breast cancer
3. 学会等名 San Antonio Breast Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 網岡愛、角舎学行、仁科麻衣、木村優里、板垣友子、笹田伸介、恵美純子、舩本法生、岡田守人
2. 発表標題 ER陽性乳癌における薬剤感受性へのWnt5aの影響
3. 学会等名 第28回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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