

令和 2 年 4 月 21 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10549

研究課題名(和文) Wnt5aシグナル伝達経路を標的としたER陽性乳癌に対する新規治療法の開発

研究課題名(英文) Wnt5a signaling is associated with aggressiveness of ER-positive breast cancer by stimulating cell migration

研究代表者

角舎 学行 (Kadoya, Takayuki)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・講師

研究者番号：20609763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ER陽性乳癌153例におけるWnt5a発現と悪性度の関係を解析したところ、リンパ節転移、核グレード、リンパ管侵襲との間に有意な相関を認めた。無再発生存期間を比較すると、Wnt5a陽性乳癌はWnt5a陰性乳癌よりも短かった( $P=0.036$ )。Wnt5aを恒常的に発現させたMCF7細胞(Wnt5a発現乳癌細胞)を作製し細胞遊走能を比較したところ、コントロール細胞と比較して有意に遊走能が亢進し、Wnt5aをノックダウンすると遊走能は低下した。そのメカニズムを明らかにするためDNAマイクロアレイを行い、Wnt5aによって発現が誘導される分子としてALCAMを同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌組織を用いた検討では、ER陽性乳癌においてWnt5aとALCAMの発現は強く相関しており、Wnt5a/ALCAM陽性乳癌はER陽性乳癌のなかで一つのグループを形成していることが考えられた。Wnt5aはER陽性乳癌における悪性化を誘導する因子であり、そのメカニズムとしてJNKを介してALCAMの発現が誘導されることが示唆された。今後は、ER陽性乳癌における悪性度、治療効果・予後予測としての因子への活用や、抗Wnt5a抗体やALCAM, Wnt5aを標的としたRNAiなど、新たな分子標的治療のターゲットとしてのさらなる検討が期待される。

研究成果の概要(英文)：Relationships were examined between Wnt5a expression and clinicopathologic factors in 178 consecutive cases of invasive breast cancer resected in our department between January 2011 and February 2014. Wnt5a was positively expressed in 69 cases among 178 cases of invasive breast cancer. Wnt5a expression was strongly correlated with being estrogen receptor (ER)-positive. Analysis of the relationship between Wnt5a expression and malignancy in exclusively 153 cases of ER-positive breast cancer led to detection of significant correlations with lymph node metastasis, nuclear grade, and lymphatic invasion. Relapse-free survival was shorter in cases of Wnt5a-positive breast cancer compared to Wnt5a-negative breast cancer cases ( $P = 0.024$ ). MCF7 cells forced to constitutively express Wnt5a showed significantly enhanced migratory capacity as compared to control cells, whereas knockdown of Wnt5a reduced the capacity. ALCAM was identified as an Wnt5a-dependent expression molecule.

研究分野：乳癌

キーワード：Wnt5a 乳癌 ALCAM JNK

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナル経路は、 $\beta$ -カテニンを介し多くの遺伝子発現を制御する  $\beta$ -カテニン依存性経路と、PCP 経路、Wnt/ $Ca^{2+}$ 経路からなる  $\beta$ -カテニン非依存性経路の二つに分類される。 $\beta$ -カテニン依存性経路は、APC の変異により核内に  $\beta$ -カテニンが蓄積し大腸癌が発癌する家族性大腸腺腫症がよく知られている。一方、Wnt5a は  $\beta$ -カテニン非依存性経路の代表的なリガンドであり、下流のシグナルである JNK のリン酸化を介して細胞運動や細胞極性などに関与することが報告されている。悪性黒色腫、胃癌、前立腺癌、肺癌や膀胱癌では Wnt5a の発現と悪性度、進行度は有意に相関している一方で、大腸癌や甲状腺癌、肝癌、悪性リンパ腫では逆に Wnt5a の発現と悪性度、予後は負の相関を示すことが報告されているなど、臓器によって Wnt5a 発現の意義は異なっている。

乳癌における Wnt5a 発現の意義については、乳癌病理検体において ER 陽性と正の相関があるとする報告や 43 例の ER 陽性腫瘍における検討で PIK3CA 変異と Wnt5a の発現が関連していたという報告がある一方、94 例の乳癌病理検体の染色では、Wnt5a と ER の発現に有意な相関は認めなかったという報告もあるが今のところ一定の見解は得られていない。また、Wnt5a の悪性化メカニズムについては、Wnt5a 陽性胃癌において FAK、Rac の活性化により細胞運動が亢進し悪性化が誘導されることが報告されている。しかし、乳癌における Wnt5a による悪性化のメカニズムについては報告がない。

## 2. 研究の目的

我々はこの研究で、乳癌病理検体を用いて Wnt5a 免疫組織染色を行い Wnt5a 陽性乳癌の臨床病理学的特徴を明らかにし、乳癌における Wnt5a 発現の意義について検討した。さらに、培養細胞を用いた生物学的解析により Wnt5a 発現による乳癌悪性化のメカニズムを明らかにする。

## 3. 研究の方法

我々はこの研究で、乳癌病理検体を用いて Wnt5a 免疫組織染色を行い Wnt5a 陽性乳癌の臨床病理学的特徴を明らかにし、乳癌における Wnt5a 発現の意義について検討した。さらに、培養細胞を用いた生物学的解析により Wnt5a 発現による乳癌悪性化のメカニズムを明らかにした。

## 4. 研究成果

Wnt5a は正常乳管上皮細胞では弱く発現していたが、間質細胞には発現していなかった。乳癌細胞内における局在では、Wnt5a は細胞質に発現しており、核内には認めなかった。浸潤性乳癌 178 例のうち、69 例 (39%) が Wnt5a 陽性、109 例 (61%) は Wnt5a 陰性であった。ER、PgR 陽性と Wnt5a 発現との間には非常に強い相関を認めたが、HER2 陽性と Wnt5a 発現の間には相関がなかった。ER 陰性乳癌にはほとんど Wnt5a は発現しておらず、Wnt5a 陽性乳癌をサブタイプで分類すると、Table 1B に示すように luminal タイプもしくは luminal-HER2 タイプに属していた。

Wnt5a はほぼ ER 陽性乳癌のみに発現していたため、ER 陽性乳癌に絞って病理学的因子、予後の解析を行った。ER 陽性 153 例において Wnt5a 発現と病理学的因子との関連を解析した結果、Wnt5a 陽性乳癌では、リンパ節転移陽性 ( $P=0.002$ )、核グレード 3 ( $P=0.004$ )、リンパ管侵襲陽性 ( $P=0.002$ ) が有意に多いという結果だった。その他に、Wnt5a と脈管侵襲陽性 ( $P=0.050$ )、腫瘍径 ( $P=0.069$ )、Ki-67 陽性 ( $P=0.058$ ) との間には有意な相関は見られなかったものの、一定の傾向があった。無再発生存率を比較すると、5 年生存率では Wnt5a 陽性乳癌で 91.4%、Wnt5a 陰性乳癌で 100% であり、log-rank test を用いた統計学的分析では有意差があった ( $P=0.039$ )。

Wnt5a の発現は細胞の遊走能を亢進に関係しているため、cell migration assay を行い Wnt5a 陽性乳癌細胞の遊走能を解析した。Wnt5a が発現していない ER 陽性乳癌細胞株である MCF7 に

Wnt5a を恒常的に発現させた細胞 (Wnt5a/MCF7 cell) を作製し、コントロール細胞と比較した。その結果、6 時間後、12 時間後において Wnt5a/MCF7 cell の遊走能は有意に亢進し、Wnt5a をノックダウンすると細胞遊走能は再び減少した。Wnt5a 発現により細胞の遊走能が亢進するメカニズムについて解析するため、Wnt5a/MCF7 cell およびコントロール細胞を用いて DNA マイクロアレイを行い、Wnt5a により発現が増加、もしくは減少する分子の 1 つとして ALCAM を同定した。ALCAM は免疫グロブリンスーパーファミリーのメンバーで細胞膜に局在しており、アポトーシス、血管新生、遊走、浸潤に関与することが示されている。ウエスタンブロットによる蛋白定量においても、培養細胞を用いて確認すると、Wnt5a/MCF7 cell において ALCAM は著明に増加していた。Wnt5a は JNK を介して細胞運動をコントロールしているため、Wnt5a の発現により JNK のリン酸化が変化するか調べた。その結果、Wnt5a を発現させると JNK のリン酸化および ALCAM は増加したが、Wnt5a をノックダウンするとこれらの発現は減少した。ER, HER2, リン酸化 AKT など他の乳癌関連シグナル伝達経路および  $\beta$ -カテニンには変化がなかった。

乳癌病理検体での Wnt5a と ALCAM の発現を免疫染色で確認した。ALCAM の発現をスコア法で定量化し、乳癌病理検体の連続切片で Wnt5a および ALCAM の発現を解析した。その結果、ER 陽性乳癌 153 例において Wnt5a 陽性乳癌の 69% に ALCAM が発現していたが、Wnt5a 陰性乳癌では 25% しか発現しておらず、Wnt5a と ALCAM の発現には有意な相関があった ( $P < 0.001$ )。

我々の結論としては、Wnt5a は ER 陽性乳癌における悪性化を誘導する因子であり、そのメカニズムとして JNK を介して ALCAM の発現が誘導されることが示唆された。今後は、ER 陽性乳癌における悪性度、治療効果・予後予測としての因子への活用や、分子標的治療のターゲットとしてのさらなる検討が期待される。

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 Yoshie Kobayashi*, Takayuki Kadoya, Ai Amioka, Hideaki Hanaki, Shinsuke Sasada, Norio Masumoto, Hideki Yamamoto, Koji Arihiro, Akira Kikuchi and Morihito Okada	4. 巻 9(30)
2. 論文標題 Wnt5a-induced cell migration is associated with the aggressiveness of estrogen receptor-positive breast cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget,	6. 最初と最後の頁 20979-20992
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.18632/oncotarget.24761	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 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takayuki Kadoya
2. 発表標題 Usefulness of Dedicated breast PET in the breast cancer treatment
3. 学会等名 13th Asia Oceania Congress of Nuclear Medicine and Biology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 角舎学行
2. 発表標題 エストロゲンレセプター陽性乳癌の発癌過程におけるWnt5a発現の意義
3. 学会等名 第27回日本乳癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshie Kobayashi
2. 発表標題 Effect of Wnt5a on aggressiveness of estrogen receptor-positive breast cancer and cancer cell migration through ALCAM pathway
3. 学会等名 AACR Annual Meeting 2018 in Chicago, Illinois（国際学会）
4. 発表年 2018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
--	---------------------------	-----------------------	----