

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26461947

研究課題名(和文)新規Wnt5a関連細胞接着因子ALCAMを標的とした新しい乳癌治療法の開発

研究課題名(英文)Development of a novel therapy targeting Wnt5a-related cell adhesion factor ALCAM

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) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：Wnt5a陽性乳癌は178例中69例(39%)であり、Wnt5a発現とER陽性とは強く相関し($P < 0.001$)、ER陰性乳癌にはWnt5aはほとんど発現していなかった。ER陽性乳癌153例におけるWnt5a発現は悪性度と相関しており、無再発生存期間はWnt5a陽性乳癌が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)はコントロール細胞と比較して有意に遊走能が亢進していたため、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。

研究成果の概要(英文)：Wnt5a was positively expressed in 69 cases (39%) among 178 cases of invasive breast cancer. Wnt5a expression was strongly correlated with being estrogen receptor (ER)-positive ($P < 0.001$), and Wnt5a was barely expressed in ER-negative breast cancers. 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 ($P < 0.001$), nuclear grade ($P = 0.004$), and lymphatic invasion ($P = 0.002$). 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. In order to clarify the mechanism, a DNA microarray analysis was carried out. Activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) was identified as an Wnt5a-dependent expression molecule.

研究分野：乳癌

キーワード：Wnt5a 乳癌 分子標的治療

1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナル経路は、β-カテニンを介し多くの遺伝子発現を制御する β-カテニン依存性経路と、PCP 経路、Wnt/Ca²⁺経路からなる β-カテニン非依存性経路の二つに分類される。β-カテニン依存性経路は、APC の変異により核内に β-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 β-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、肺癌や膵癌では 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。

2. 研究の目的

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。

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。

3. 研究の方法

- ① 乳癌病理検体において Wnt5a, ALCAM, ER, HER-2 などの免疫染色やリンパ節転移、再発データを蓄積し、Wnt5a 陽性乳癌の生物学的特徴や悪性度、予後との関係を明らかにする。
- ② 乳癌病理検体や培養細胞を用いて Wnt5a と ER, PI3K, β-カテニンなど既知の乳癌関連シグナル変化を測定するとともに、ALCAM を介した新しい Wnt5a シグナル伝達メカニズムを解析する。
- ③ 既知の乳癌内分泌療法、化学療法や、Wnt5a 抗体、RNAi などの Wnt5a 治療法に対する Wnt5a 発現乳癌培養細胞の治療効果を、コントロール細胞と比較して観察する。

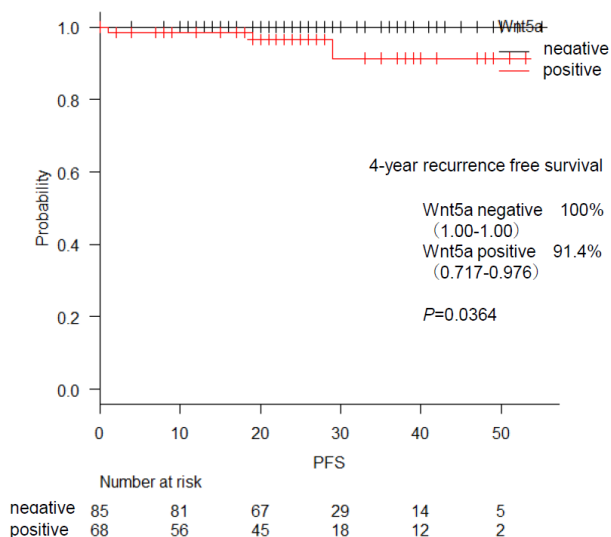
4. 研究成果

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。

	Total (n=178)	Wnt5a expression		P value
		Negative (n=109)	Positive (n=69)	
ER, n (%)				
Negative	25 (14)	24 (22)	1 (1)	<0.001
Positive	153 (86)	85 (78)	68 (99)	
PgR, n (%)				
Negative	38 (21)	34 (31)	4 (6)	<0.001
Positive	140 (79)	75 (69)	65 (94)	
HER2, n (%)				
Negative	159 (89)	96 (88)	63 (91)	0.496
Positive	19 (11)	13 (12)	6 (9)	

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、4 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。

DNA マイクロアレイによって新規 Wnt5a 関連細胞接着因子として同定された ALCAM を Wnt5a/MCF7 cell においてウエスタンブロットで調べたところ、ALCAM は著明に増加

していた。Wnt5a をノックダウンすると ALCAM の発現は減少した。

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 ($P<0.001$)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 2 件)

(1) Wnt5a 陽性乳癌の病理学的特徴と DNA μ アレイによる新規 Wnt5a 関連分子の同定
小林美恵、魚舎学行ら
第 23 回日本乳癌学会学術総会、2015 年 7 月 2 日～4 日、東京フォーラム

(2) Wnt5a expression is associated with high-grade malignancy in ER-positive breast cancer.

小林美恵、魚舎学行ら

San Antonio Breast Cancer Symposium、2015 年 12 月 8 日～12 日、サンアントニオ、米国

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

角舎学行 (KADOYA Takayuki)

広島大学・病院・講師

研究者番号：20609763

(2) 研究分担者

岡田守人 (OKADA Morihito)

広島大学・原爆放射線医科学研究所・教授

研究者番号：70446045