

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 17 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861049

研究課題名(和文) Wnt5a陽性乳癌の薬剤耐性獲得機構の解明と制癌療法への応用

研究課題名(英文) Elucidation of drug resistance of Wnt5a positive breast cancer and its application to anticancer therapy

研究代表者

梶谷 桂子(滑川桂子)(Keiko, Kajitani (Namerikawa))

広島大学・病院(医)・医科診療医

研究者番号：30700041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、浸潤生乳管癌178例に対して免疫組織化学的染色によってWnt5aの発現とER、HER2などの臨床病理学的因子との関連性を検討した。その結果(1)全178例中、Wnt5a陽性乳癌は69例(39%)であり、Wnt5a発現とERは有意に相関していた。(2)ER陽性乳癌153例におけるWnt5a発現の意義を検討したところ、リンパ節転移、核グレード、リンパ管侵襲、脈管侵襲との間に有意な相関を認めた。(3)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。以上より、Wnt5aはERの発現と相関が強く、ER陽性乳癌においては予後予測因子になることが明らかになった。

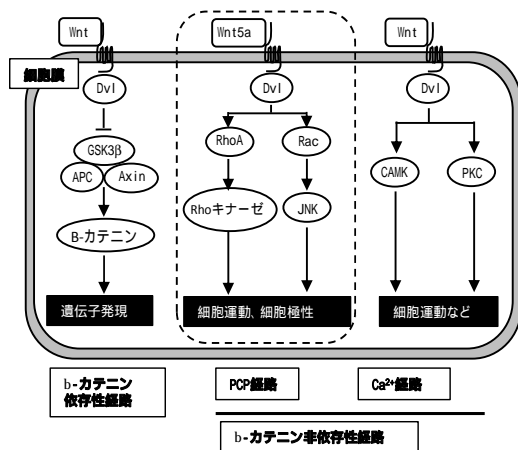
研究成果の概要(英文)：Relationships were examined between Wnt5a expression and clinicopathologic factors in 178 consecutive cases of invasive breast cancer.(1)Wnt5a was positively expressed in 69 cases (39%) among 178 cases of invasive breast cancer. Wnt5a expression was strongly correlated with being estrogen receptor (ER)-positive.(2)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. (3)Relapse-free survival was shorter in cases of Wnt5a-positive breast cancer compared to Wnt5a-negative breast cancer cases. Base on our data, Wnt5a expression can be a prognostic factor in ER-positive breast cancer.

研究分野：乳癌

キーワード：Wnt5a 分子標的治療

## 1. 研究開始当初の背景

Wnt シグナル経路には、 $\beta$ -カテニンを介して遺伝子発現を制御する  $\beta$ -カテニン依存性経路と、PCP(planar cell polarity)経路、Ca<sup>2+</sup>経路からなる  $\beta$ -カテニン非依存性経路とが存在する(図1)。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、JNK や Rho キナーゼを介して細胞運動や接着、細胞極性などに関与している (Kurayoshi 2006, Yamamoto 2009)。これまでに、Wnt5a は胃癌、悪性黒色腫、悪性リンパ腫の悪性度に関与していることが報告されていたが、乳癌における Wnt5a 発現の意義については明らかでなかった (Bittner 2000, Hanaki 2012)。そこで、我々は病理学的、生化学的手法を用いて Wnt5a と乳癌悪性度との関係を解析した。



(図1 Wnt シグナル伝達経路)

## 2. 研究の目的

現在、乳癌治療の中心は分子標的治療になりつつある。HER2 陽性乳癌におけるトラスツズマブに始まる複数の抗 HER2 治療薬や、VEGF 抗体であるベバシズマブ、mTOR 阻害剤であるアフィニトールなど、様々な分子標的治療薬が臨床で使われ成果を挙げている。最近、トラスツズマ

ブ+ラパチニブやトラスツズマブ+ペルツズマブや、肺癌領域でもエルロチニブ+ベバシズマブのように複数の分子標的治療を同時に行う dual blockade 療法が検討、開発されつつある。

Wnt5a 陽性癌においては、菊池らが Wnt5a を発現させた胃癌細胞株を作製し in vitro における癌細胞の遊走、浸潤能低下を確認するとともに、マウス肝転移モデルを作製し抗 Wnt5a 抗体を用いて肝転移に対する抑制効果を報告した (Hanaki 2012)。一方、乳癌においては乳癌病理検体の免疫染色により、乳癌全体の約 35% に Wnt5a が過剰発現していることを確認しているが、Wnt5a の発現が乳癌の予後や治療感受性、抵抗性獲得に与える意義については明らかになっていない。本研究では、Wnt5a 陽性乳癌細胞株を用いて、ホルモン治療、化学療法、分子標的治療、抗 Wnt5a 治療などの感受性、治療抵抗性を明らかにし、臨床治療に応用することを目的としている。

## 3. 研究の方法

(1) Wnt5a 免疫染色の病理検体データを蓄積し、Wnt5a の発現と既知の予後因子(エストロゲンレセプター = ER、HER2、リンパ節転移など) サブタイプとの関連を解析する。

(2) Wnt5a 発現乳癌細胞株を用い、既知の乳癌関連シグナル伝達経路の活性化や ALCAM を介した Wnt5a による乳癌悪性化のメカニズムを解析する。

(3) Wnt5a 発現乳癌細胞株を用い Wnt5a 陽性乳癌に最も効果的な薬剤濃度、薬剤の組み合わせ、および治療期間を決定する

## 4. 研究成果

2007年1月~2012年12月の期間に当科

で切除した浸潤性乳癌症例に対して抗 Wnt5a 抗体による免疫組織化学的染色を行い、Wnt5a 発現と臨床病理学的因子との関連性を検討した。その結果、浸潤癌 178 例中、Wnt5a 陽性乳癌は 69 例(39%)であった。Wnt5a 発現と ER 発現は強い相関を認めた。

そこで ER 陽性乳癌 153 例における Wnt5a 発現の意義を検討したところ、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。このことから、Wnt5a の発現は ER 陽性乳癌の悪性度に関与していることが明らかになった。

	n (%)			p-value
	Wnt5a 陽性 n=85	Wnt5a 陰性 n=96	total n=181	
腫瘍径				
T1	48 (56%)	67 (70%)	115(64%)	
T2/T3	37 (44%)	29 (30%)	66(36%)	0.0241
リンパ節転移				
+	54 (64%)	23 (24%)	77(43%)	
-	31(36%)	73 (76%)	104(57%)	<0.0001
核異型度				
1+2	35 (41%)	60 (62%)	95(52%)	
3	50 (59%)	36 (38%)	86(48%)	0.0016
Ki-67 (%)				
0~20	14 (16%)	65 (68%)	79(44%)	
21~100	71 (84%)	31 (32%)	102(56%)	<0.0001
脈管侵襲				
+	9 (11%)	7(7%)	16(9%)	
-	76 (89%)	89 (93%)	165(91%)	0.1392
リンパ管侵襲				
+	44 (52%)	27 (28%)	71(39%)	
-	41 (48%)	69 (72%)	110(61%)	0.0004

そのメカニズムを明らかにするため、ER 陽性乳癌細胞株 MCF7 に Wnt5a を恒常的に発現させた培養細胞を作製し、DNA マイクロアレイを行い Wnt5a の発現により誘導される分子を検索した。その結果、Wnt5a 細胞株において発現が上昇している分子を複数認めた。

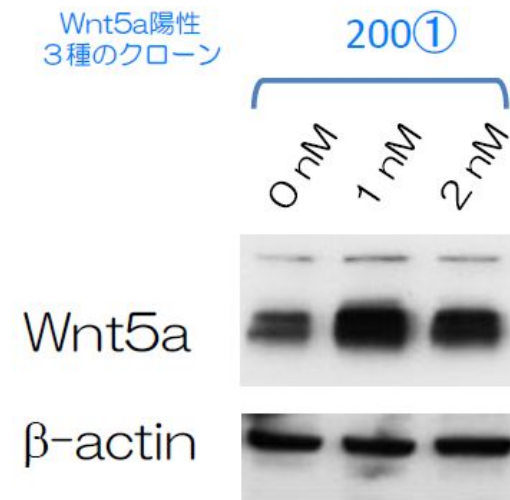
その一つである activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM)は、これまでに乳癌の悪性度、予後に関与する分子として報告されている。実際に乳癌病理検体において Wnt5a と ALCAM の発現を免疫染色によって調べてみると、二つの分子の発現が相関していることが明らかになった。

n (%)

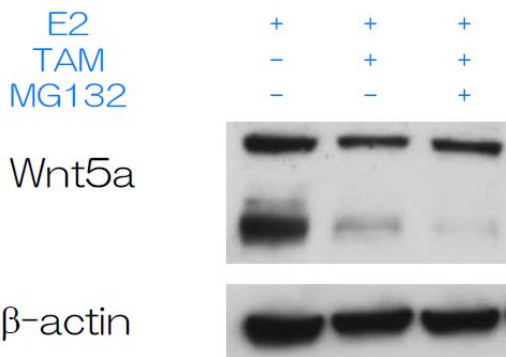
	ALCAM 陰性 (n=85)	ALCAM 陽性 (n=68)
Wnt5a 陰性 (n=85)	64 (75)	21 (25)
Wnt5a 陽性 (n=68)	21 (31)	47 (69)

我々の結果から、培養細胞および乳癌病理検体において Wnt5a と ALCAM の発現が関連していることを確認した。

これまでの我々の結果から、Wnt5a は ALCAM の発現を誘導することにより悪性化に働いていることが示唆された。次に我々が考えたのは、Wnt5a 陽性乳癌がほぼ ER 陽性乳癌のみであることから、Wnt5a の発現がエストロゲンシグナル(エストロゲンもしくは ER)により制御されているのではと考えている。前述の ER 陽性乳癌細胞株 MCF7 に対し、エストロゲン刺激による ER 機能の促進、および抗エストロゲン剤であるタモキシフェンにより ER の阻害により Wnt5a の発現が変化するか検討した。その結果、Wnt5a の発現は、エストロゲン刺激により増加することがわかった(下図)。



さらに、エストロゲン刺激により増加した Wnt5a はタモキシフェン投与により再び減少することも明らかになった。



このことは、Wnt5の発現がエストロゲンシグナルにより制御されていることを示しており、ER陽性乳癌においてWnt5a発現が悪性度に関与していることと併せて考えると、Wnt5aはER陽性乳癌における予後予測因子となると同時に、分子標的治療のターゲットとなる可能性もある。

今後は、さらに解析を進めWnt5a陽性乳癌におけるホルモン治療、およびホルモン治療耐性のメカニズムについて解析していきたい。

#### 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 3件)

(1) 乳癌におけるWntシグナル経路の意義：Wnt5a陽性乳癌の予後解析と新規バイオマーカーとしての可能性

小林美恵、梶谷桂子ら

第24回日本乳癌学会学術総会、2016年6月16日、東京ビッグサイト

(2) Wnt5a陽性乳癌の病理学的特徴とDNA $\mu$ アレイによる新規Wnt5a関連分子の同定

小林美恵、梶谷桂子ら

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

(3) Wnt5a expression is associated

with high-grade malignancy in ER-positive breast cancer.

小林美恵、梶谷桂子ら

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

梶谷 桂子 (KAJITANI Keiko)

広島大学・病院・医科診療医

研究者番号：30700041