

論文内容要旨

Wnt5a-induced cell migration is associated with
the aggressiveness of estrogen receptor-positive
breast cancer

(Wnt5a が誘導する細胞遊走はエストロゲン
レセプター陽性乳癌の悪性度と関連する。)

Oncotarget, 2018, in press.

主指導教員：岡田 守人教授

(原爆放射線医科学研究所 腫瘍外科)

副指導教員：吉栖 正生教授

(医歯薬保健学研究科 心臓血管生理医学)

副指導教員：角舎 学行講師

(原爆放射線医科学研究所 腫瘍外科)

小林 美恵

(医歯薬学総合研究科 創生医科学専攻)

初めに、Wnt シグナル経路は主にβ-カテニン依存性経路とβ-カテニン非依存性経路の 2 種類に大きく分類され、β-カテニン依存性経路は大腸癌などとの関連が既に報告されている。もう一つの経路であるβ-カテニン非依存性経路は PCP 経路、Ca²⁺経路の少なくとも 2 種類の経路が存在し、細胞骨格や細胞運動、遺伝子発現を調節する。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、その発現は悪性メラノーマ、胃癌、前立腺癌、肺癌、膀胱癌の悪性度や進行度に有意に関与している。一方、大腸癌、甲状腺癌、肝癌、悪性リンパ腫において Wnt5a は腫瘍抑制因子として働くとされ、臓器によって Wnt5a 発現の効果が異なる。乳癌における Wnt5a の発現についてはリンパ節転移や核グレードなどの病理学的因子との関連は明らかでない。一般的に乳癌はエストロゲン受容体 (estrogen receptor : ER) 、 human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) の発現の有無で 4 つのサブタイプに分類される。ER 陽性、ER 陰性乳癌は異なった組織 (上皮細胞、基底細胞) から発生するとされ、生物学的に異なる。我々の研究目的は乳癌における Wnt5a の意義を調べることであり、そのためには Wnt5a 発現がどのサブタイプの乳癌に多いのかをまず調べることが必要であると考えた。我々は最初に、2011 年 1 月～2014 年 2 月の間に広島大学病院において切除された原発性浸潤性乳癌における Wnt5a 発現と臨床病理学的因子との関係を免疫組織化学的に評価した。Wnt5a 発現は浸潤性乳癌 178 例のうち 69 例 (39%) に有意に発現し、ER 発現と強い関連を認めた。ER 陽性乳癌における Wnt5a 発現はリンパ節転移、核グレード、リンパ管侵襲と有意な関連がみられた。Wnt5a 陽性と Wnt5a 陰性乳癌における 5 年無再発生存率の比較ではそれぞれ 81.1%と 100%であり、Wnt5a 陽性乳癌は有意に再発率が高かった。興味深いことに再発例すべてに骨転移を認め、乳癌における Wnt5a は骨転移の重要な役割を果たしている可能性が示唆された。次に我々は Wnt5a による乳癌の悪性化メカニズムについて乳癌培養細胞を用いて研究した。Wnt5a を発現していない ER 陽性乳癌細胞株である MCF-7 にプラスミドを導入してトランスフェクションを行い、Wnt5a を恒常的に発現させた細胞 (MCF-7/Wnt5a cells) を樹立した。MCF-7/Wnt5a 細胞と MCF-7 細胞間には増殖能の差はなかった。Wnt5a は細胞遊走と関係していることが報告されていることから、Wnt5a 陽性乳癌細胞の遊走能を細胞遊走アッセイにて評価した。さらに siRNA を用いて、Wnt5a のノックダウンを行い (MCF-7/Wnt5a + Wnt5a-siRNA 細胞)、12 時間後の遊走能を評価した。MCF-7/Wnt5a 細胞は MCF-7 細胞と比較して有意に遊走しており、MCF-7/Wnt5a + Wnt5a-siRNA 細胞は遊走能を亢進した MCF-7/Wnt5a 細胞と比べて有意に遊走能が低下した。次に Wnt5a の発現が誘導する遊走能の亢進メカニズムについて調べるために MCF-7/Wnt5a 細胞とコントロールの MCF-7 細胞間の遺伝子変化について DNA マイクロアレイを用いて分析し、Wnt5a が誘導する遺伝子として activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) を同定した。我々は免疫組織化学的に乳癌組織における Wnt5a と ALCAM の発現を評価し、ALCAM は Wnt5a 陽性乳癌では 69%、Wnt5a 陰性乳癌では 27%に発現を認め、Wnt5a と ALCAM の発現には有意な相関がみられた。ウェスタンブロットによる分析でも MCF-7/Wnt5a 細胞において強い ALCAM の発現を確認した。ER 陽性乳癌細胞株での Wnt5a が誘導する遊走能亢進に関して ALCAM が介するメカニズムを研究するため、内在性に Wnt5a と ALCAM を発現してい

る ER 陽性乳癌細胞株を複数調べた。それらの細胞のうち、MDA-MB-175-VII 細胞において内在性に Wnt5a と ALCAM の強い発現がみられることを発見し、以後の機能解析の実験にこの細胞を用いることとした。MDA-MB-175-VII 細胞に対して Wnt5a をノックダウンすると、ウェスタンブロットで ALCAM の減少を認めた。さらに MDA-MB-175-VII 細胞の 12 時間後の遊走能を評価した。コントロール細胞として Wnt5a を発現しておらず、ALCAM を発現している MDA-MB-361 細胞を用いた。Wnt5a のノックダウンにより、遊走能は MDA-MB-175-VII 細胞では減少し、MDA-MB-361 細胞では変化しなかった。最後に、ALCAM の抑制が Wnt5a のノックダウンと同じように遊走能を低下させるかどうか検討するための細胞遊走アッセイを行った。すると、ALCAM のノックダウンにより MDA-MB-175-VII 細胞の 12 時間後の遊走能は有意に低下し、これらの結果から ER 陽性乳癌における細胞遊走は Wnt5a-ALCAM シグナル経路を介して調整されていることが推測された。また、*PIK3CA* 変異を伴った ER 陽性乳癌では Wnt5a 発現上昇を認めることが報告されているが、*PIK3CA* 変異は約 30% の ER 陽性乳癌においてみられ、治療抵抗性の原因となるとされている。これらの報告から Wnt5a は ER 陽性乳癌の悪性度や再発と関係しているのではないかと我々は推測する。しかし、ER 陽性乳癌における *PIK3CA* の変異により PI3K/AKT/mTOR シグナル経路が活性化されることで Wnt5a が発現するかはまだ明らかにされていない。この問題は今後の研究が必要である。我々の今回の研究の結論として、Wnt5a の発現は ER 陽性乳癌において高い悪性度と予後不良と関与しており、ALCAM を誘導し乳癌細胞の遊走能を亢進させ、乳癌の悪性度を高めると考える。Wnt5a は ER 陽性乳癌において悪性度の予測因子、治療ターゲット、そして予後因子として有用である可能性がある。