

論文審査の結果の要旨

博士の専攻分野の名称	博士 (医学)	氏名	網岡 愛
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1・2 項該当		
論文題目 Effect of Wnt5a on drug resistance in estrogen receptor-positive breast cancer (エストロゲン受容体陽性乳癌における、Wnt5a の薬剤耐性への影響)			
論文審査担当者			
主査	教授	有廣 光司	印
審査委員	教授	檜井 孝夫	
審査委員	准教授	岡本 渉	
〔論文審査の結果の要旨〕			
<p>Wnt5a は Wnt シグナル経路のうち β-カテニン非依存性経路の代表的なリガンドであり、細胞運動や接着、細胞極性などに関与している。Wnt5a は胃癌、肺癌、および前立腺癌では腫瘍増殖因子として、甲状腺癌および卵巣癌では腫瘍抑制因子として機能することが報告されている。乳癌においては、Wnt5a 陽性乳癌はエストロゲン受容体 (estrogen receptor : ER) 陽性乳癌に属し、悪性度が高く予後不良であることが先行研究で明らかとなっている。2011 年 1 月から 2014 年 2 月の間に広島大学病院で乳癌手術を受けた 151 人の ER 陽性乳癌患者の 8 年無再発生存率が調査され、Wnt5a 陽性では 91.9%、Wnt5a 陰性では 98.6%であり、Wnt5a 陽性乳癌の再発率は有意に高かった。</p> <p>この予後不良となるメカニズムについては、Wnt5a 発現そのものが悪性度を高め、activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) 発現の誘導により乳癌細胞の遊走能を亢進させるという先行研究の報告以外には、未だ十分に検討されていない。本研究では、ER 陽性 Wnt5a 陽性乳癌の予後不良のメカニズムを解明することが目的とされ、そのために Wnt5a 発現により変動する遺伝子の解析、並びに Wnt5a 発現と薬剤感受性に関する検証が行われた。</p> <p>初めに、Wnt5a を内因性に発現していない ER 陽性乳癌細胞株である MCF-7 に、Wnt5a を恒常的に発現させた細胞株 [MCF-7/Wnt5a(+)] に対し DNA マイクロアレイが行われた。コントロール細胞株である MCF-7/Wnt5a(-)と比較して MCF-7/Wnt5a(+)]において発現量が変動した 176 の遺伝子が抽出され、そのうち癌または薬物代謝との関連が報告されている 21 の遺伝子が同定された。21 遺伝子のうち、ER 陽性乳癌の悪性度と正の相関を示し、MCF-7/Wnt5a(-)よりも 2 倍以上発現亢進した遺伝子は、<i>UGT2B15</i>、<i>AKR1C3</i>、<i>ALCAM</i>、<i>PTPRN2</i>、逆に 1/2 以下に発現減弱した遺伝子は、<i>JAK2</i>、<i>STAT1</i>、<i>CCNA1</i> であった。DAVID を用いたパスウェイ解析では、薬剤代謝に関与するシトクロム P450 (CYP) 経路のみが MCF7/Wnt5a(+)で有意に亢進していた。一方、JAK-STAT シグナル伝達経路の発現は低下しており、この経路の発現低下は乳癌の進行と転移に寄与しているとの報告がある。Cytoscape を用いてネットワーク解析を行い 21 遺伝子の相互関係が解析され、<i>UGT2B15</i> と <i>AKR1C3</i> は CYP 経路に含まれ、<i>ALCAM</i> と <i>PTPRN2</i> は Wnt5a の発現と相関し、細胞の遊走を促進することが示された。さらに、<i>CCNA1</i> の発現低下は乳癌細胞の増殖を引き起こすという報告がある。</p> <p>次に、Wnt5a と薬剤感受性との相関について検討された。ER 陽性乳癌の術後治療で用いられる、タモキシフェン、パクリタキセル、エピルビシン、シクロfosファミド、および 5-フルオロウラシルへの薬剤感受性試験を行った。その結果、薬剤投与から 72 時間の時点で、タモキシフェン、パクリタキセル、シクロfosファミドに対する感受性が、MCF-7/Wnt5a(-)と比較して MCF-7/Wnt5a(+)で有意に低下した。非常に興味深いことに、それら 3 種の薬剤は全て CYP 経路の代謝基質である。逆に CYP 経路の代謝基質ではない</p>			

エピルピシン、5-フルオロウラシルに対しては、MCF-7/Wnt5a(+)で感受性の低下を示さなかった。さらに、内因性に Wnt5a 発現を認める ER 陽性 HER2 陰性乳癌細胞株の MDA-MB-175-VII に対しても薬剤感受性試験を行った。Wnt5a-siRNA 処理を行った Wnt5a ノックダウン細胞株と比較して、MDA-MB-175-VII はタモキシフェン、シクロホスファミドへの感受性が低下し、MCF-7/Wnt5a(+)と同様の傾向を示した。

これらの結果から、Wnt5a が CYP 経路を亢進させることでタモキシフェン、パクリタキセル、およびシクロホスファミドの代謝が促進され、それら薬剤の細胞内濃度の低下に繋がることを示唆される。そのため、Wnt5a が ER 陽性乳癌の薬剤耐性マーカーとして役立つ可能性がある。今後は *in vivo* での検証が必要である。

また、ER 陽性乳癌のホルモン療法耐性や予後不良に関与する最も頻度の高い遺伝子変異として *PIK3CA* 変異があり、その変異により PI3K-AKT-mTOR 経路は活性化する。それらと Wnt5a との相関が解析された。MCF-7/Wnt5a(+)と MCF-7/Wnt5a(-)を用いたタンパク定量実験では、PI3K の下流にあるリン酸化 AKT の発現量に、Wnt5a 発現による変化は認めなかった。次に 40 症例の乳癌病理検体を用いてサンガー法により *PIK3CA* 遺伝子変異が検索されたが、Wnt5a 発現との間には有意な相関は認められなかった。さらに *PIK3CA* 遺伝子変異の有無により Wnt5a の mRNA 発現量が変動するか解析されたが、その発現量に差は認めなかった。

本研究の結論として、Wnt5a は CYP 代謝経路を亢進させ、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を低下させた。それらは ER 陽性乳癌に対する主要な薬剤であり、かつ CYP の代謝基質でもある。Wnt5a は、PI3K-AKT-mTOR シグナル伝達経路とは別の機序で、ER 陽性乳癌の予後不良に関与している可能性がある。

本研究は、Wnt5a 陽性乳癌の予後不良のメカニズムを遺伝学的検索、培養細胞を用いた薬剤感受性試験を用いて明らかにしており臨床応用に向けての基礎研究として高く評価される。

よって審査委員会委員全員は、本論文が 網岡 愛 に博士（医学）の学位を授与するに十分な価値あるものと認めた。