

REVIEW ARTICLE

非小細胞肺癌における Wnt シグナルの過剰発現とその制御への試み

黄 政龍¹・劉 大革¹・門田球一¹・中野 淳¹・
石川真也¹・山本恭通¹・横見瀬裕保¹

Overexpression of the Wnt in Non-Small Cell Lung Cancer

Cheng-long Huang¹; Dage Liu¹; Kyuichi Kadota¹; Jun Nakano¹;
Shinya Ishikawa¹; Yasumichi Yamamoto¹; Hiroyasu Yokomise¹

¹Department of General Thoracic Surgery, Breast and Endocrinological Surgery, Faculty of Medicine, Kagawa University, Japan.

ABSTRACT — The Wnt signal pathway is involved in embryogenesis, differentiation, and tumorigenesis. We have found that Wnt overexpression frequently occurs to promote carcinogenesis in non-small cell lung cancer (NSCLC). First, we found that the transduction of MRP-1/CD9 gene into human cancer cells can induce the down-regulation of Wnt1, Wnt2b, Wnt5a, and several Wnt targets. Clinical studies found that 89% of NSCLCs had overexpressions of Wnt1, Wnt2 or Wnt5a. The Wnt1-positive carcinomas had positive intratumoral expressions of c-Myc, Cyclin D1, VEGF-A, and MMP-7, and the high tumor proliferation index. The Wnt2-positive carcinomas also had positive intratumoral expressions of VEGF-A and high tumor proliferation index. On the other hand, an overexpression of Wnt5a was associated with stromal VEGF-A expression through a tumor-stromal interaction, to increase the tumor proliferation rate. Furthermore, overexpressions of Wnt1 and Wnt5a were independent prognostic factors for NSCLC patients. From these results, these Wnt members can be candidates for molecular-target therapy for NSCLC. We are performing experimental studies on Wnt-inhibiting gene therapy using adenoviral vectors expressing shRNA.

(JJLC. 2009;49:422-426)

KEY WORDS — Wnt signal, Wnt1, Wnt2, Wnt5a, Gene therapy

Reprints: Cheng-long Huang, Department of General Thoracic Surgery, Breast and Endocrinological Surgery, Faculty of Medicine, Kagawa University, 1750-1 Ikenobe, Miki-cho, Kita-gun, Kagawa 761-0793, Japan (e-mail: chuang@kms.ac.jp).

要旨 — Wnt シグナルは発生や分化・癌化などに広く関わっている。その中で、Wnt の過剰発現が多く見られることが判明してきた。まず、ヒト癌細胞株に癌転移抑制遺伝子 MRP-1/CD9 を遺伝子導入すると、Wnt1 及び Wnt2b、Wnt5a、さらに Wnt 標的遺伝子の発現に抑制がみられ、Wnt シグナルの癌化への関与が示唆された。非小細胞肺癌における臨床的検討では、その 89% に Wnt1 または Wnt2b、Wnt5a の過剰発現がみられた。Wnt1 高発現腫瘍では、c-Myc や Cyclin D1、VEGF-A、MMP-7 などの Wnt 標的遺伝子の腫瘍内発現が高く、腫瘍増殖能も高かった。

Wnt2b 高発現腫瘍でも、VEGF-A の腫瘍内発現が高く、腫瘍増殖能が高かった。Wnt5a の腫瘍内発現は、tumor-stromal interaction で間質内 VEGF-A 発現を誘導し、腫瘍増殖能の亢進と関連していた。Wnt1 と Wnt5a の過剰発現は独立した予後不良因子であった。以上より、これらの Wnt を癌治療のターゲットと考え、Wnt 抑制遺伝子治療の開発を目指し、shRNA 発現アデノウイルスベクターを作製し基礎的研究を現在行っている。

索引用語 — Wnt シグナル, Wnt1, Wnt2, Wnt5a, 遺伝子治療

¹香川大学医学部呼吸器・乳腺内分泌外科。
別刷請求先：黄 政龍, 香川大学医学部呼吸器・乳腺内分泌外科, 〒761-0793 香川県木田郡三木町大字池戸 1750-1 (e-mail:

chuang@kms.ac.jp).
※第 48 回日本肺癌学会総会シンポジウム「ゲフィチニブ」.

1. はじめに

分子生物学的癌研究の進歩により、ヒト癌に関わる遺伝子や蛋白の異常が多く判明してきた。¹ 非小細胞肺癌においても、癌遺伝子や癌抑制遺伝子の異常によるイニシエーションから癌化が始まり、それからのプログレッションの過程を通じて、血管新生や薬剤耐性などの悪性腫瘍としての性格を獲得してくることが示されてきた。そして、このような研究を通じて、新たな癌治療のターゲットとなるバイオマーカーを発見することが期待される。その中で、これまでの我々の研究から Wnt ファミリーの過剰発現が多く非小細胞肺癌で見られ、肺癌のプログレッションに広く関わっていることが判明してきた。²⁻⁴

2. 癌転移抑制遺伝子 MRP-1/CD9 の遺伝子導入による Wnt シグナルの抑制

我々は癌転移の抑制を目指して、癌転移抑制遺伝子の機能をもつ MRP-1/CD9 (以下 CD9) の研究に取り組んできた。この CD9 は細胞膜糖蛋白で、インテグリンなどと機能的複合体を形成し、細胞運動能や分化などの様々な機能に関与することが示されている。癌のプログレッションの過程では、この CD9 の発現減弱がおり、高転移能癌細胞が形成されていることが判明してきた。実際、アデノウイルスベクターを用いて、CD9 発現減弱癌細胞株に CD9 遺伝子を導入すると、細胞運動能に抑制がみら

れた。⁵ そこで、この CD9 の多彩な生物学的機能に関わるシグナル系を我々は探索した。CD9 発現減弱肺癌細胞株 A549 に、アデノウイルスベクターを用いて CD9 遺伝子を導入し、その導入前後におけるシグナル系の変化を検討した。cDNA マイクロアレイを用いて遺伝子発現変化を網羅的に解析したところ、CD9 誘導により Wnt1 及び Wnt2b、Wnt5a の遺伝子発現の減弱がみられた。⁶ 同時に、Wnt シグナルの canonical 経路の標的遺伝子である c-Myc、MMP-26、WISP1 などの遺伝子発現にも減弱がみられた。そして、抗 MRP-1/CD9 中和抗体を投与すると、これらの発現減弱に抑制が認められた。以上のことから、CD9 による Wnt シグナル系の抑制が認められた。多くの癌におけるプログレッションで CD9 発現減弱がみられることから、Wnt シグナル系の過剰発現の可能性が示唆された。

3. Wnt シグナル

Wnt ファミリーは多機能な分泌型糖蛋白で、これらも発生や分化・癌化など様々な機能に関与することが指摘されている。⁷⁻⁹ Wnt シグナルには数種類の経路があり、大きく canonical (Wnt-ベータ-カテニン) 経路と non-canonical 経路とに分けられている (Figure 1)。¹⁰ この中で Wnt1 や Wnt2b は主に canonical 経路に関与している。この canonical 経路が活性化されると、細胞膜表面の Frizzled レセプターを介し、いろいろなコファクターとともに、ベータ-カテニンの分解を抑制し、その細胞内プー

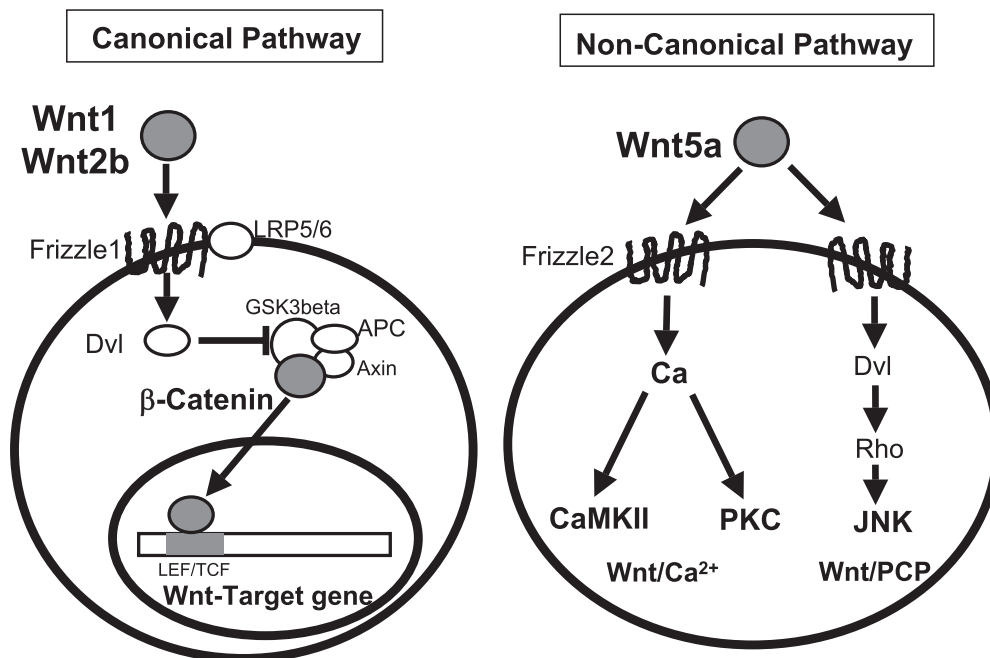


Figure 1. Wnt signal pathways.

ルを蓄積する。その結果、ベータ-カテニンの核内移行がみられる。そして、この核内ベータ-カテニンにより、多くの標的遺伝子の発現が誘導され、様々な生物学的機能を発揮する。この canonical 経路における標的遺伝子は LEF/TCF モチーフをプロモーター領域にもった構造をしている。この標的遺伝子には、c-Myc や Cyclin D1, vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) などの多くの癌関連バイオマーカーがある。実際、大腸癌ではベータ-カテニン遺伝子の活性化変異やコファクターである APC 遺伝子の不活化変異がみられ、canonical 経路の活性化が大腸癌の発癌に関与することが報告されている。¹¹ しかし、非小細胞肺癌ではこのような遺伝子変異はまれであるとされている。¹²

一方、non-canonical 経路にはカルシウム経路や PCP 経路などがあり、Wnt5a は主にこの non-canonical 経路に関与するとされている。

そこで、非小細胞肺癌における Wnt 発現とその生物学的意義について検討した。対象としては、先に示した CD9 誘導による研究成果から、Wnt ファミリーの中で Wnt1 と、Wnt2, Wnt5a について臨床的検討を行った。

4. 非小細胞肺癌における Wnt1 発現

非小細胞肺癌における腫瘍内 Wnt1 発現の臨床的意義を検討するために、切除非小細胞肺癌 151 例を対象にして、Wnt1 と canonical 経路における標的蛋白である c-Myc, Cyclin D1, VEGF-A, MMP-7 の腫瘍内発現をそれぞれ免疫組織化学的に評価した。²³ さらに Ki-67 増殖指数により腫瘍増殖能も評価した。

Wnt1 高発現腫瘍は 40.4% であった。組織型別で見ると、腺癌と扁平上皮癌で、Wnt1 発現に差はみられなかった。また、T 因子及び N 因子、分化度でも、Wnt1 発現に差はみられなかった。

Wnt1 の標的蛋白についてみると、細胞増殖能に関わる転写因子である c-Myc の腫瘍内発現が、Wnt1 高発現腫瘍では Wnt1 低発現腫瘍と比べて有意に高かった ($44.7\% \pm 26.3\%$ 対 $30.8\% \pm 26.7\%$; $P=0.0019$)。また、同じく細胞増殖能に関与する Cyclin D1 の腫瘍内発現も、Wnt1 高発現腫瘍で Wnt1 低発現腫瘍と比べて有意に高かった ($43.7\% \pm 22.7\%$ 対 $30.3\% \pm 21.3\%$; $P=0.0003$)。さらに、血管新生及び腫瘍増殖能に関わる VEGF-A の腫瘍内発現も、Wnt1 高発現腫瘍で Wnt1 低発現腫瘍と比べて有意に高かった ($43.5\% \pm 30.9\%$ 対 $32.5\% \pm 29.7\%$; $P=0.0293$)。また、同じく Wnt 標的蛋白の一つである MMP-7 の腫瘍内発現も、Wnt1 高発現腫瘍で Wnt1 低発現腫瘍と比べて有意に高かった ($56.4\% \pm 27.7\%$ 対 $34.9\% \pm 29.1\%$; $P<0.0001$)。この MMP-7 の生理学的機能は未だ十分に解明されてはいないが、他の MMP ファ

ミリーと同様に基質の分解により腫瘍転移を誘導することや、E-カドヘリンなどの分解に関わり、腫瘍の悪性形質の獲得に関与していることが示唆されている。

そして、Ki-67 増殖指数でみた腫瘍増殖能は、Wnt1 高発現腫瘍で Wnt1 低発現腫瘍と比べて有意に高かった ($52.4\% \pm 30.6\%$ 対 $38.8\% \pm 28.8\%$; $P=0.0062$)。予後についてみると、術後 5 年生存率は、Wnt1 高発現腫瘍で 39.9%、Wnt1 低発現腫瘍で 67.5% であった。Wnt1 高発現腫瘍は Wnt1 低発現腫瘍と比べて有意に予後不良であった ($P=0.0003$)。多変量解析でも腫瘍内 Wnt1 発現は独立した予後不良因子であった (危険率 1.983; $P=0.0061$)。

このように、腫瘍内 Wnt1 発現は、その標的蛋白である c-Myc や Cyclin D1, VEGF-A, MMP-7 などの腫瘍内発現に関与し、高い腫瘍増殖能を獲得し、悪性度の高い腫瘍の形成に関与していることが示された。

5. 非小細胞肺癌における Wnt2 発現

Wnt2 は、Wnt1 と同じく canonical 経路に関わるメンバーである。非小細胞肺癌における Wnt2 の腫瘍内発現についても、免疫組織化学的に検討した。その結果、40.9% (115 例中 47 例) が Wnt2 高発現腫瘍であった。組織型別、T 因子、N 因子、分化度では、腫瘍内 Wnt2 発現に差はみられなかった。

腫瘍内 Wnt2 発現の臨床的意義を検討すると、canonical 経路における標的蛋白である VEGF-A の腫瘍内発現が、Wnt2 高発現腫瘍で Wnt2 低発現腫瘍と比べて有意に高かった ($46.5\% \pm 30.2\%$ 対 $32.5\% \pm 33.6\%$; $P=0.0474$)。そして、Ki-67 増殖指数でみた腫瘍増殖能も、Wnt2 高発現腫瘍で Wnt2 低発現腫瘍と比べて有意に高かった ($51.5\% \pm 29.6\%$ 対 $33.1\% \pm 29.9\%$; $P=0.0024$)。このように、Wnt2 の腫瘍内発現も、Wnt1 の腫瘍内発現と同様に、canonical 経路の活性化を介して、悪性腫瘍の形成に関与していることが示された。

6. 非小細胞肺癌における Wnt5a 発現

我々は非小細胞肺癌における腫瘍内 Wnt5a 発現の臨床的意義についても検討した。⁴ 切除非小細胞肺癌 123 例を対象に、real-time RT-PCR で Wnt5a 遺伝子発現を、免疫組織化学法で Wnt5a 蛋白発現をそれぞれ評価した。Wnt5a 遺伝子発現と Wnt5a 蛋白発現は有意に相関しており ($r=0.729$, $P<0.0001$)、Wnt5a 高発現腫瘍は 57.7% であった。組織型で見ると、Wnt5a 高発現腫瘍は扁平上皮癌で 78.0%、腺癌で 41.8% であった。Wnt5a 高発現腫瘍は、扁平上皮癌で腺癌と比べて有意に高かった ($P<0.0001$)。しかし、T 因子、N 因子、分化度では、腫瘍内 Wnt5a 発現に差はみられなかった。

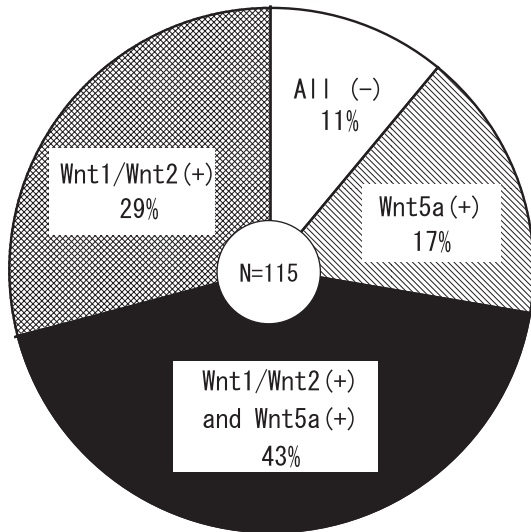


Figure 2. Distributions of Wnt family expressions in non-small cell lung cancer.

次に腫瘍内 Wnt5a 発現の機能について、Ki-67 指数で腫瘍増殖能を、抗 CD34 抗体による腫瘍内微小血管密度で腫瘍内血管新生を評価した。その結果、Ki-67 増殖指数は Wnt5a 高発現腫瘍で Wnt5a 低発現腫瘍と比べて有意に高かった ($55.1\% \pm 15.6\%$ 対 $37.1\% \pm 12.1\%$, $P < 0.0001$)。しかし、腫瘍内微小血管密度は Wnt5a 高発現腫瘍 (114.5 ± 28.8 個/ 0.785 mm^2) と Wnt5a 低発現腫瘍 (101.3 ± 31.2 個/ 0.785 mm^2) で差はみられなかった。

この機序を解明するために、これまでと同様に VEGF-A の発現について免疫組織化学的検討を行った。その結果、腫瘍内 VEGF-A 発現は、Wnt5a 高発現腫瘍と Wnt5a 低発現腫瘍で差はみられなかった ($35.1\% \pm 14.6\%$ 対 $34.1\% \pm 14.5\%$)。しかし一方で、腫瘍内結合組織における VEGF-A の発現 (間質内 VEGF-A 発現) は腫瘍内 Wnt5a 発現と有意に相関しており ($r = 0.661$; $P < 0.0001$)、Wnt5a 高発現腫瘍では Wnt5a 低発現腫瘍より間質内 VEGF-A 発現が有意に高かった ($37.6\% \pm 15.6\%$ 対 $22.7\% \pm 10.8\%$; $P = 0.0005$)。そして、この間質内 VEGF-A 発現は腫瘍増殖と有意に相関し ($r = 0.627$; $P < 0.0001$)、間質内 VEGF-A 高発現腫瘍では間質内 VEGF-A 低発現腫瘍より、Ki-67 増殖指数が有意に高かった ($62.6\% \pm 14.6\%$ 対 $33.3\% \pm 13.0\%$; $P < 0.0001$)。

そのため、この Wnt5a は先に述べた Wnt1 や Wnt2 とは異なった機序で肺癌に関わっていることが考えられた。そこで、canonical 経路活性化の指標となるベータ-カテニンの発現についても追加検討した。腫瘍内 Wnt5a 発現と腫瘍細胞におけるベータ-カテニン発現との間には関連がみられなかったが、腫瘍内 Wnt5a 発現は間質内ベータ-カテニン発現と有意に相関しており ($r = 0.729$, $P < 0.0001$)、Wnt5a 高発現腫瘍では Wnt5a 低発現腫瘍よ

り間質内ベータ-カテニン発現が有意に高かった ($36.0\% \pm 25.7\%$ 対 $10.8\% \pm 8.5\%$, $P < 0.0001$)。さらにこの間質内ベータ-カテニン発現は間質内 VEGF-A 発現と有意に相関していた ($r = 0.644$; $P < 0.0001$)。

以上の結果から、Wnt5a の腫瘍内発現は、tumor-stromal interaction を介し、間質内 VEGF-A 発現を誘導し、腫瘍増殖能の亢進に関与していることが示された。このように Wnt5a に関わるシグナルは、Wnt1 と Wnt2 とは異なった Frizzille レセプターを介して、特有な機序で肺癌のプログレッションに関与していると考えられた。

腫瘍内 Wnt5a 発現でみた予後からも、Wnt5a 高発現腫瘍が Wnt5a 低発現腫瘍と比べて有意に予後不良であった (術後 3 年生存率で、 58.1% 対 75.0% , $P = 0.0299$)。多変量解析でも腫瘍内 Wnt5a 発現は独立した予後不良因子であった (危険率 2.451; $P = 0.0193$)。

7. 非小細胞肺癌における Wnt 過剰発現の分布

非小細胞肺癌 115 例について、Wnt1, Wnt2, Wnt5a の腫瘍内発現について総合的に検討した (Figure 2)。その結果、Wnt1/Wnt2 と Wnt5a の両方で過剰発現がみられた腫瘍は 43%、Wnt1 または Wnt2 でのみ過剰発現がみられた腫瘍は 29%、Wnt5a のみ過剰発現がみられた腫瘍は 17% であった。非小細胞肺癌全体の 89% に、Wnt1 または Wnt2b, Wnt5a いずれかに過剰発現がみられた。このように、多くの非小細胞肺癌においてこれらの Wnt ファミリーの過剰発現がみられ、様々な癌関連バイオマーカーの発現誘導などを介して、悪性度の高い癌細胞が形成されていることが明らかとなった。現在のところ、非小細胞肺癌における Wnt ファミリーの遺伝子変異や遺伝子増幅の報告はほとんどない。そのため、このような Wnt ファミリーの腫瘍内過剰発現は、プログレッションの過程で他の癌関連バイオマーカー (protein kinase C など) の発現異常に伴っておこる二次的なものと考えられている。¹³

8. Wnt 発現抑制遺伝子治療の研究

以上の結果から、これらの Wnt ファミリーは非小細胞肺癌における分子標的治療や遺伝子治療などの新たな癌治療のターゲットになりうると思われる。そこで現在我々は Wnt 抑制遺伝子治療の開発を目指し基礎的研究を行っている。

特定の標的遺伝子の発現抑制を図る手段として、RNA 干渉 (RNA interference; RNAi) が注目されている。¹⁴ この RNAi は生物が広くもっている機能である。非翻訳型の double strand RNA (dsRNA) が、Dicer の働きにより 21~23 塩基の short interfering RNA (siRNA) を形成

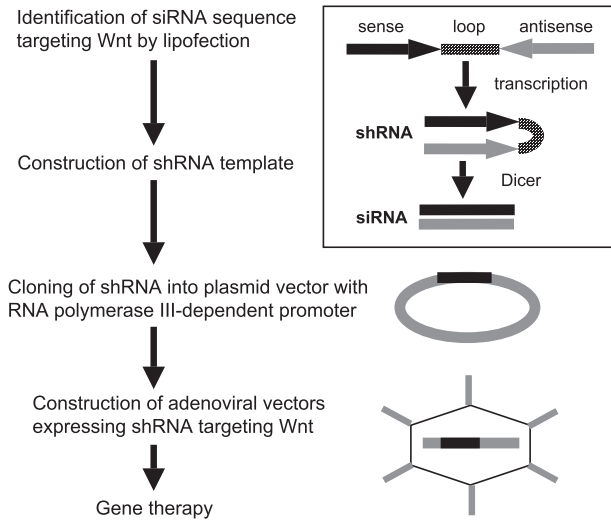


Figure 3. Construction of adenoviral vectors expressing short hairpin RNAs (shRNAs) targeting Wnts.

し、この siRNA が配列特異的に標的遺伝子の発現を抑制する機能である。現在、RNAi の機序について多くの研究が報告されているが、siRNA が発現抑制する機序としては、標的遺伝子の mRNA に結合し翻訳を抑制すること、結合した mRNA を分解することなどが指摘されている。

臨床応用を目指した遺伝子治療を開発するためには、遺伝子導入法の特異性、効率、持続性などが問題となる。適切な標的配列を設定することにより、siRNA の標的遺伝子に対する発現抑制の特異性は非常に高いものとなる。その中で、合成 siRNA は設計が簡便で入手しやすいが、その分解が早いため、抑制効果の持続が 3 日程度と短いのが欠点である。そのため、近年様々な short hairpin RNA (shRNA) 発現ベクターの開発と研究が報告されている。¹⁵ shRNA とは、標的配列に対するセンス鎖とアンチセンス鎖の間にループ構造を入れてつないだものである (Figure 3)。RNA ポリメラーゼ III 依存型プロモーターによる発現ベクターで、目的細胞内でこの shRNA を発現させると、細胞内における Dicer の働きにより siRNA が安定して形成され、標的遺伝子の発現抑制が持続的にみられることが報告されている。

shRNA 導入法については、ベクターの選択にも様々な方法がある。我々は臨床応用を目指した Wnt 抑制癌遺伝子治療の開発のために、アデノウイルスベクターを用いて、Wnt 抑制 shRNA 発現ベクターを作製し基礎的研究を現在行っている (Figure 3)。このアデノウイルスベクターは生体内への導入法として優れており、特に気道系への導入効率が良好であるため、今後の研究成果が期待されるものである。

REFERENCES

- Huang C, Liu D, Masuya D, Nakashima T, Kameyama K, Ishikawa S, et al. Clinical application of biological markers for treatments of resectable non-small-cell lung cancers. *Br J Cancer*. 2005;92:1231-1239.
- Nakashima T, Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Yokomise H, Ueno M, et al. Wnt1 overexpression associated with tumor proliferation and a poor prognosis in non-small cell lung cancer patients. *Oncol Rep*. 2008;19:203-209.
- Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Yokomise H, Ueno M, Kadota K, et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-7 (MMP-7) correlates with tumor proliferation, and a poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2007;58:384-391.
- Huang CL, Liu D, Nakano J, Ishikawa S, Kontani K, Yokomise H, et al. Wnt5a expression is associated with the tumor proliferation and the stromal vascular endothelial growth factor- α expression in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2005;23:8765-8773.
- Huang CL, Ueno M, Liu D, Masuya D, Nakano J, Yokomise H, et al. MRP-1/CD9 gene transduction regulates the actin cytoskeleton through the downregulation of WAVE2. *Oncogene*. 2006;25:6480-6488.
- Huang CL, Liu D, Masuya D, Kameyama K, Nakashima T, Yokomise H, et al. MRP-1/CD9 gene transduction downregulates Wnt signal pathways. *Oncogene*. 2004;23:7475-7483.
- Herzlinger D, Qiao J, Cohen D, Ramakrishna N, Brown AM. Induction of kidney epithelial morphogenesis by cells expressing Wnt-1. *Dev Biol*. 1994;166:815-818.
- Dale TC. Signal transduction by the Wnt family of ligands. *Biochem J*. 1998;329:209-223.
- Labbé E, Lock L, Letamendia A, Gorska AE, Gryfe R, Gallinger S, et al. Transcriptional cooperation between the transforming growth factor- β and Wnt pathways in mammary and intestinal tumorigenesis. *Cancer Res*. 2007;67:75-84.
- Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/ β -catenin and Wnt/ Ca^{2+} pathways. *Oncogene*. 1999;18:7860-7872.
- Bienz M, Clevers H. Linking colorectal cancer to Wnt signaling. *Cell*. 2000;103:311-320.
- Kotsinas A, Evangelou K, Zacharatos P, Kittas C, Gorgoulis VG. Proliferation, but not apoptosis, is associated with distinct β -catenin expression patterns in non-small-cell lung carcinomas: relationship with adenomatous polyposis coli and G(1)-to S-phase cell-cycle regulators. *Am J Pathol*. 2002;161:1619-1634.
- Jönsson M, Smith K, Harris AL. Regulation of Wnt5a expression in human mammary cells by protein kinase C activity and the cytoskeleton. *Br J Cancer*. 1998;78:430-438.
- Scherer L, Rossi JJ. RNAi applications in mammalian cells. *Biotechniques*. 2004;36:557-561.
- Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science*. 2002;296:550-553.