



Title	ヒト膵癌細胞株に対する抗mesothelin抗体(Amatuximab)の治療効果に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	松澤, 文彦
Citation	北海道大学. 博士(医学) 甲第13467号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/74744
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Note	配架番号 : 2481
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	Fumihiko_Matsuzawa_abstract.pdf (論文内容の要旨)



[Instructions for use](#)

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医学） 氏名 松澤文彦

学位論文題名

ヒト膵癌細胞株に対する抗 mesothelin 抗体(Amatuximab)の治療効果に関する研究
(Study on efficacy of Amatuximab for human pancreatic cancer cell lines)

【背景と目的】膵癌は最も致死的な悪性腫瘍の一種である。近年の研究で gemcitabine との併用療法の報告があるが満足な結果は得られておらず、進行膵癌患者の治療成績を改善するために新規の治療戦略の開発が急務である。mesothelin は、40kDa の GPI 結合タンパク質で様々な種類の癌において高度に過剰発現している。MSLN の過剰発現が MAPK/ERK, PI3K/Akt, NFκB といった経路を介して細胞生存や細胞増殖に寄与するとの報告があるが詳細は依然明らかになっていない。癌幹細胞は自己複製能を有しており、細胞分裂中に幹細胞特性を維持することができることとより分化した子孫を生じさせることができ、癌幹細胞以外の細胞集団を補充することができることを特徴とする。Amatuximab は、mesothelin を標的とする高親和性キメラモノクローナル IgG1 / k 抗体である。我々は免疫不全マウスを用いて膵癌細胞株の腹膜播種モデルを作成することに成功し、Amatuximab の腹腔内注入による治療効果の検討を報告した。結果として、Amatuximab を投与された腹膜播種マウスにおいて腹膜播種の減少と腹水中に浮遊するシャーベット状の癌細胞集塊(以下 sherbet-like aggregates)が生じること、それら sherbet-like aggregates が GEM 投与により消失することを明らかにした。これらの細胞集塊では腫瘍増殖や抗癌剤耐性に関連する分子の発現に変化があるのではないかという着想に至った。sherbet-like aggregates と腹膜播種巣での分子発現の変化を検討すること、またヒト膵癌細胞株を用いた Amatuximab の *in vitro* での効果を検討し、Amatuximab の抗腫瘍効果の分子機構を明らかにすることを目的とする。

【材料と方法】動物実験は「北海道大学動物実験に関する規定」に従い、当該実験倫理委員会の承認のもと実施した。Amatuximab は MORPHOTEK INC (Exton, PA, USA) より提供していただいた。ゲムシタビン塩酸塩である Gemzar は Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA) より購入した。5×10⁶cell の AsPC-1 細胞を 7 週齢のヌードマウスの腹腔に注射した。Amatuximab (200mg / kg) または control IgG (200mg / kg) を day 0 より 2 日毎に腹腔内注射により投与した。22 日目にマウスを屠殺し、播種巣および sherbet-like aggregates を採取した。ホルマリン固定、パラフィンに包埋した後 3μm の厚さでスライスした。免疫組織学的染色及び RT-PCR により播種巣及び sherbet-like aggregates での EMT, 癌幹細胞, 細胞生存や増殖に関連する分子の発現を比較検討した。*in vitro* 実験では mesothelin 高発現膵癌細胞株(AsPC-1)、mesothelin 低発現膵癌細胞株(MIA Paca-2)を用い、Amatuximab

が増殖能、浸潤能、遊走能に与える影響を検討した。Amatuximab 存在下での癌幹細胞、細胞生存や増殖に関連する分子の発現変化をウェスタンブロッティング法により検討した。最後に Amatuzimab 存在下での gemcitabine に対する耐性を検討した。

【結果】1) 腹膜播種モデルの組織における分子発現状況：いずれの群においても mesothelin 発現に差を認めなかった。EMT に関連した分子についても sherbet-like aggregates で E-cadherin に軽度の発現低下があるものの他 N-cadherin, Vimentin に明らかな差を認めなかった。Ki-67 及び p-ERK1/2 において control 群及び Amatuximab 群の腹膜播種巣と比較して sherbet-like aggregates で明らかに発現細胞数の低下を認めた。また各群の腹膜播種巣と比較して Amatuximab 群で出現した sherbet-like aggregates では ALDH1, CD44, c-MET の発現が明らかに低下していた。control 群, Amatuximab 群の腹膜播種巣及び sherbet-like aggregates の免疫染色で差を認めた分子は RT-PCR でも同様に sherbet-like aggregates で低下していることが分かった。腹膜播種巣の辺縁の腹膜に接するように存在する腺癌細胞集塊があり、これらは control 群, Amatuximab 群のいずれでも認め、また各群における頻度に差を認めなかった。いずれの群においても adhesive sherbet-like aggregates は腹水中に浮遊している sherbet-like aggregates よりも腹膜播種巣を形成している細胞群に近似した分子発現を示していた。2) in vitro での Amatuximab の有効性の検討：mesothelin の発現に関わらず AsPC-1, MIA Paca-2 のいずれにおいても Amatuximab の添加による増殖への影響は認めなかった。MSLN 高発現株である AsPC-1 では Amatuximab 群で浸潤能、遊走能が抑制されたのに対し低発現株である MIA Paca-2 ではいずれの群でも浸潤能に変化を認めなかった。AsPC-1 と MIA Paca-2 のいずれにおいても mesothelin、EMT 関連分子の発現に差を認めなかった。Amatuximab を添加し培養した AsPC-1 では MEK1/2, ERK1/2, p-NFκB, NFκB, p-Stat3, Stat3 の発現が control 群と比較し低下していた。AsPC-1 において Amatuximab 群で MEK1/2, ERK1/2, p-NFκB, NFκB, p-Stat3, Stat3 が低下していた。p-MET, CD44 が AsPC-1 の Amatuximab 群で control 群に比較し低下していることが分かった。Amatuximab と gemcitabine を共添加することで gemcitabine 単独群よりも AsPC-1 細胞の増殖をより強く抑制した。これらの結果は AsPC-1 細胞でのみ観察され、MIA Paca-2 では観察されなかった。

【考察】今回我々は本研究において、Amatuximab を投与された腺癌腹膜播種モデルマウスで出現した sherbet-like aggregates での癌幹細胞に関連する分子や増殖や生存に関連する分子の発現が変化していることを示した。一方 in vitro の実験系においても Amatuximab に曝露することで、mesothelin 高発現株特異的に浸潤能、遊走能や gemcitabine 耐性の変化が認められ、sherbet-like aggregates と一部近似した分子発現の変化を確認できた。本検討結果より、Amatuximab の直接作用だけでなく、mesothelin 阻害による腫瘍細胞の環境変化が mesothelin 高発現細胞株での癌幹細胞性を抑制し、gemcitabine の感受性を改善したのではないかと考察した。

【結論】Amatuximab による mesothelin 阻害が細胞生存や増殖に関連する因子及び癌幹細胞に影響を与えることにより mesothelin 高発現腺癌細胞株に対し抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなった。