



HOKKAIDO UNIVERSITY

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 [全文の要約]
Author(s)	松澤, 文彦
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2481 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13467号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74745
Type	doctoral thesis
File Information	Fumihiko_Matsuzawa_summary.pdf



学 位 論 文 (要約)

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)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

松澤 文彦

Fumihiko Matsuzawa

学 位 論 文 (要約)

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)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

松澤 文彦

Fumihiko Matsuzawa

【背景と目的】 膵癌は急速な増大や遠隔転移の可能性を高度に有する癌腫であり、最も致死的な悪性腫瘍の一種である。近年の研究で gemcitabine を他の薬剤と組み合わせることにより、標準的な gemcitabine 単独療法で得られた結果と比較して患者予後を改善できることが示されつつあるが、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、40 kDa のグリコシルホスファチジルイノシトール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。mesothelin は複数の癌細胞株で過剰発現が MAPK/ERK, PI3K/Akt, NF κ B 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。癌幹細胞性が腫瘍形成や転移、再発に関連していることが様々な癌腫で報告されている。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による腹膜播種モデルを作成することに成功し、そのモデルに対する 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、第一に 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)が生じることを見出した。第二に腹膜播種マウスモデルでの Amatuximab 投与群で出現した sherbet-like aggregates が gemcitabine 併用により消失することが分かった。この結果より、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)より供与していただいた。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。

1) 膵癌腹膜播種モデルマウスの作成及び検体採取: 5×10^6 cell 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 3 μ m 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。

2) in vitro 実験での Amatuximab の効果の検討: 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膵癌細胞集塊があり, 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】我々は本研究において, Amatuximab を投与された膵癌腹膜播種モデルマウスで出現した sherbet-like aggregates での CSC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.

近年の報告によると mesothelin は細胞接着, 細胞生存/増殖, 腫瘍進行および化学療法抵抗性において重要な役割を果たす可能性があると考えられている. 膵癌細胞株における mesothelin の過剰発現が Stat3 の活性化を誘導することや NFκB/Akt 依存性抗アポトーシス経路を誘導することで TNF-αにより誘導されるアポトーシスから膵癌細胞を保護することができ, これが炎症および炎症性メディエーターにさらされていてもなお膵癌細胞が生存しうる所以となっていることが示されている. また膵癌細胞での別のメカニズムとして, 薬物誘発アポトーシスから癌細胞を保護するための PI3K / Akt 経路が関連してい

る可能性や、mesothelin が ERK シグナル伝達経路を介して細胞傷害性薬物誘発アポトーシスに対する耐性に寄与していることが見出されている。今回の我々の結果は Amatumimab が細胞増殖を阻害しなかったが、これまで mesothelin との関連が指摘されている細胞生存や増殖に関連する分子を抑制し、浸潤能、遊走能および GEM 耐性の低下につながることを示した。

CSC は腫瘍の初期形成、維持および遠隔臓器への転移に関与する未分化な腫瘍細胞の集団であり、非対称的に分裂し、同一の娘細胞を生成すると同時にそれとは異なる腫瘍の大部分を占める分化した細胞を生成することができる。CSC は特徴として化学療法抵抗性、腫瘍形成性、幹細胞遺伝子発現及び ALDH 活性を有する。これまでに同定された膵臓 CSC マーカーは、CD133, CD24, CD44, EPCAM, ESA, c-MET, ALDH1 等がある。また、近年 mesothelin が EMT および癌幹細胞性を調節することが報告されている。本研究では、Amatumimab による治療で出現した sherbett-like aggregates では ALDH1, CD44, c-MET の発現低下及び CD133 の発現上昇がみられ、in vitro での Amatumimab 曝露により MSLN 高発現膵癌細胞株で CD44 および c-MET 発現が抑制された。また CSC に関して可塑性理論が提唱されている。古典的 CSC 理論では腫瘍の不均一性は腫瘍内に分化した状態の細胞群と CSC が共存することにより生じるとしている。古典的には CSC から分化した細胞への変化は単方向性であると考えられている。一方可塑性 CSC 理論では、細胞外マトリックスまたは血管などの環境因子、および遺伝的後天的変化などの内在因子によって CSC と分化した細胞の間に双方向変換が存在するとしている。可塑性 CSC 理論では、分化細胞群が腫瘍形成を通じて CSC を絶えず作り出すことができることを示唆している。言い換えれば、今回のように mesothelin 阻害等により腫瘍細胞の環境を調整することで CSC を分化した状態で維持することが可能になり得ることを示唆する。我々は今回 Amatumimab の直接作用だけでなく、MSLN 阻害による腫瘍細胞の環境変化が MSLN 高発現細胞株での癌幹細胞性を抑制し、GEM の感受性を改善したのではないかと考察した。

【結論】Amatumimab 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 高発現膵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。