



Title	抗mesothelin抗体Amatuximabはmesothelin高発現膀胱癌細胞株によるマウス腹膜播種モデルにおいてgemcitabineの抗腫瘍効果を増強する
Author(s)	水上, 達三
Description	配架番号 : 2483
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13469号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13469
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74751
Type	doctoral thesis
File Information	Tatsuzo_Mizukami.pdf



学 位 論 文

抗 mesothelin 抗体 Amatuximab は mesothelin 高発現膵癌細胞株によるマウス
腹膜播種モデルにおいて gemcitabine の抗腫瘍効果を増強する

(The anti-mesothelin monoclonal antibody amatuximab enhances the
anti-tumor effect of gemcitabine against mesothelin-high expressing
pancreatic cancer cells in a peritoneal metastasis mouse model)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

水上 達三

Tatsuzo Mizukami

学 位 論 文

抗 mesothelin 抗体 Amatuximab は mesothelin 高発現膵癌細胞株によるマウス
腹膜播種モデルにおいて gemcitabine の抗腫瘍効果を増強する

(The anti-mesothelin monoclonal antibody amatuximab enhances the
anti-tumor effect of gemcitabine against mesothelin-high expressing
pancreatic cancer cells in a peritoneal metastasis mouse model)

2019 年 3 月

北 海 道 大 学

水上 達三

Tatsuzo Mizukami

目 次

発表論文目録および学会発表目録	1頁
要旨	2頁
略語表	4頁
緒言	5頁
方法	7頁
結果	14頁
考察	23頁
結論	25頁
謝辞	26頁
利益相反	27頁
引用文献	28頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究は以下の論文で発表した。

Tatsuzo Mizukami, Hirofumi Kamachi, Yuki Fujii, Fumihiko Matsuzawa, Takahiro Einama, Futoshi Kawamata, Nozomi Kobayashi, Yutaka Hatanaka, and Akinobu Taketomi. The anti-mesothelin monoclonal antibody amatuximab enhances the anti-tumor effect of gemcitabine against mesothelin-high expressing pancreatic cancer cells in a peritoneal metastasis mouse model. *Oncotarget*. 9, 33844–33852, (2018)

要旨

【背景と目的】

膵癌は予後不良の癌であり、治癒切除症例においてもその 5 年生存率は 20% 以下と極めて低く、肝転移・腹膜播種が重要な予後決定因子として報告されている。手術時には根治術であるかにも見えても、画像・肉眼所見で検出されない微小な病巣が既に体内に播種されていることが示唆され、手術予後の改善のためには、診断時に検出できない、あるいは術中・術後に残存する微小な癌細胞の制御が必須である。現在のところ治癒切除症例に対して、一般的に Gemcitabine（以下 GEM）あるいは S-1 を用いた術後補助化学療法が施行されているが、予後は 23～46 か月程度であり、より有効な補助療法の開発が強く望まれる。

Mesothelin は、ヒト胸膜、腹膜、心膜などの正常中皮細胞に発現する 40kDa の糖タンパク質である。悪性腫瘍においては悪性中皮腫、膵癌、卵巣癌などに高頻度に発現を認めており、そのリガンドである CA125（MUC-16）との共発現が悪性度の増大および予後不良に関与しているとの報告がある。各種消化器癌における Mesothelin 過剰発現が予後不良因子であるとの報告がなされ、また分子生物学的機構も徐々に解明されてきており、近年分子標的治療のターゲットとして注目されている。

Amatuximab はマウス抗体である可変部をヒト抗体の定常部に導入した抗 Mesothelin キメラ抗体で、その効用としては ADCC 活性および Mesothelin - CA125 結合阻害作用を持つとされているが、切除不能進行膵癌患者を対象とした臨床試験では第 II 相試験で打ち切りとなった。ただ、対象が切除不能進行膵癌患者であったため、乏血性腫瘍である膵癌での抗体の delivery の問題や binding site barrier という腫瘍表面に抗体がトラップされる現象などから、抗体が腫瘍に十分に到達されず、効果が発揮されなかったなどの懸念が残っている。

そこで、抗体が腫瘍に十分に到達されうる状況下として術後補助療法を想定し、Amatuximab の膵癌腹膜播種マウスモデルにおける有用性を検討することを目的とする。

【材料と方法】

ウェスタンブロッティング法、FACS 分析および免疫細胞染色を用いて AsPC-1、BxPC-3、Panc-1 および MIA Paca-2 の中から Mesothelin 高発現株として AsPC-1 を選定した。

In vivo での腫瘍細胞の増殖をモニターするためのモデル系として、Gaussia ルシフェラーゼ（Gluc）を分泌する膵癌細胞である AsPC-1-Gluc 細胞を作製し

た。尾静脈からの採血を行なうことで Gluc 活性を測定し、経過中の腹腔内の腫瘍細胞量をモニタリングした。

術後補助療法を想定した Amatuximab の腭癌腹膜播種マウスモデルにおける有用性の検討をするために、day 0 より AsPC-1 Gluc 細胞をヌードマウスの腹腔内に投与すると同時に、day 0 から 1 日おきに day 20 まで PBS、Amatuximab または Control IgG を腹腔内投与し、day 22 に犠牲死させて腹腔内を観察した。

また、Amatuximab および GEM の相乗効果の評価するために、day 0 より AsPC-1 Gluc 細胞をヌードマウスの腹腔内に投与すると同時に、day 0 から 1 日おきに day 20 まで PBS および Amatuximab を腹腔内投与した。また、day 10、17、24 に両群に GEM を腹腔内投与し、day 29 に犠牲死させて腹腔内を観察した。

【結果】

1) 腭癌腹膜播種マウスモデルにおける術後補助療法下での Amatuximab の有用性の検討：血漿 Gluc 活性に関してはいずれの群においても統計的に有意な差は見られなかったが、肉眼的所見に関しては Amatuximab 群においてのみ明らかな腹膜播種結節の減少とシャーベット状の癌細胞集塊(以下 sherbet-like aggregates)が認められた。

2) 腭癌腹膜播種マウスモデルにおける術後補助療法下での Amatuximab および GEM の相乗効果の検討：血漿 Gluc 活性に関して、GEM 単独群と比較し、GEM+Amatuximab 群では有意に低かった。また、肉眼的にも GEM+Amatuximab 群において明らかな腹膜播種結節の減少を認めた。

【考察】

本研究において、Amatuximab が、Mesothelin 高発現株である AsPC-1 Gluc 細胞を用いた腭癌腹膜播種マウスモデルにおける術後補助療法下で腹膜播種形成を抑制し、GEM の抗腫瘍効果を増強することが示された。

Amatuximab が腹膜播種形成の過程で、sherbet-like aggregates を形成し腫瘍体積を減少させることによって GEM の癌細胞へのアクセスを良好にすることで抗腫瘍効果が増強したことが示唆される。今後はこれらの薬剤間の相乗作用の正確なメカニズムを明らかにする必要があると思われる。

【結論】

Amatuximab を用いた術後補助療法は、Mesothelin 高発現の腭癌による腹膜播種を防止するための有用な戦略であり得ることが示唆された。

略語表

本文中及び図中で使用した略語は以下の通りである。

ADCC	antibody- dependent cellular cytotoxicity
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	bovine serum albumin
CA125	carbohydrate antigen 125
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FACS	fluorescence activated cell sorter
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GEM	gemcitabine
GPI	glycosylphosphatidylinositol
Gluc	Gaussia luciferase
HE	Hematoxylin-Eosin
HEPES	4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid
HRP	horseradish peroxidase
mRNA	messenger ribonucleic acid
MUC16	mucin 16
PBS	phosphate buffered salts
PVDF	polyvinylidene difluoride
RPMI	Roswell Park Memorial Institute media
RT-PCR	real time polymerase chain reaction
SDS PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

緒言

《膵癌》

膵癌は米国で 4 番目の主要ながん死亡原因であり、5 年生存率はわずか 6% である(Jemal et al. , 2010)。依然として外科的切除が、唯一の根治的治療法であるが、無症状で進行することが多く、診断時に外科的切除が可能となるのはわずか 10%~20% である(Geer et al. , 1993)。完全切除後でさえも、長期生存率は依然として非常に低く(Sohn et al. , 2000; Winter et al. , 2006)、肝転移および腹膜播種は、膵癌において重要な予後因子であることが報告されている(Matsuno et al. , 2004)。病理学的に根治切除が得られたとされる症例でも、画像所見や肉眼的には検出されない微小転移や播種を認めることが多く(Kayahara et al. , 1993)、術後に残存した悪性腫瘍の微小転移を制御することは、予後改善のために非常に重要である。

《膵癌の術後治療》

現在、Gemcitabine (以下 GEM) (Neoptolemos et al. , 2010) または S - 1 (Uesaka et al. , 2016) による術後補助化学療法が、外科的切除後の患者の予後を改善することが示唆されているが、予後は他の消化器癌と比較して依然として不良である。したがって、術後補助療法の開発が急務である。

《Mesothelin》

Mesothelin は 40kDa のグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) 結合タンパク質であり、正常なヒト組織における発現は、胸膜、心膜および腹膜を覆う中皮細胞に限定されている(Chang et al. , 1992; Chang et al. , 1996)。また、Mesothelin は悪性中皮腫(Ordenez , 2003)、卵巣癌(Hassan et al. , 2005a)、および膵癌(Argani et al. , 2001; Hassan et al. , 2005b; Einama et al. , 2011)を含む様々な種類の癌において過剰発現している。ヒト Mesothelin 遺伝子の全長は 71kDa 前駆体タンパク質をコードし、それらはフリン様プロテアーゼによって、膜結合したままの 40kDa の C 末端断片と、血中に分泌される 31kDa の N 末端断片に切断される。C 末端の膜結合型 40kDa 断片は Mesothelin と命名され、GPI アンカーを介して細胞膜に結合する(Chang et al. , 1996)。このような Mesothelin の発現パターンは、癌治療の魅力的なターゲットであり、実際に Mesothelin を標的とするいくつかの薬剤は臨床試験に用いられている(Hassan et al. , 2010; Le et al. , 2012; Hassan et al. , 2014)。

《Amatuximab》

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(Hassan et al. , 2007)。 Amatuximab は Mesothelin 発現腫瘍細胞に対して抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性を有するだけでなく、CA125 を介して異型細胞接着を阻害し、Mesothelin 発現腫瘍細胞を死滅させる。

悪性胸膜中皮腫患者における第 II 相臨床試験では、Amatuximab と化学療法との併用療法は、Amatuximab または化学療法単独よりも Mesothelin を発現する腫瘍の増殖をより強く抑制し、良好な成績を得られている(Hassan et al. , 2014)。膵癌においても安全性と化学療法との相乗効果を示す第 I 相試験に基づいて、第 II 相試験(NCT00570713)では未治療の切除不能 stage III または IV の膵癌患者に対し Amatuximab の GEM への上乗せ効果が検討されたが、Amatuximab の GEM 単独への上乗せによる有用性を実証できなかった。

また、放射性標識された Amatuximab を用いたヒトにおける腫瘍イメージング試験では、悪性中皮腫のような粘液産生が少なく、多血性の腫瘍とは対照的に、Amatuximab は乏血性腫瘍である膵腫瘍に浸透することができないことが示唆された(Lindenberg et al. , 2015)。

《本研究の目的》

以上より、巨大腫瘍あるいは転移を形成しているような切除不能膵癌では、抗体の delivery、Binding Site Barrier という腫瘍表面に抗体がトラップされる現象等、腫瘍に十分に抗体が到達できない状況が想定され、巨大腫瘍を形成していない微小転移の段階こそ、その有効性を発揮できると考えた。本研究では、膵癌腹膜播種マウスモデルを用いて術後補助療法としての Amatuximab 単独あるいは GEM との併用における有用性を検討した。

方法

本研究の実験計画書は、「北海道大学動物実験に関する規定」に則って承認され、同規定に従って施行された。

1) 細胞培養

ヒト膵癌細胞株 AsPC-1(ATCC、CRL-1682)、BxPC-3(ATCC、CRL-1687)、Panc-1(ATCC、CRL-1469)および MiaPaCa-2(ATCC、CRL-1420)は American Type Culture Collection (ATCC、Manassas、VA、USA) から購入した。

AsPC-1 は RPMI-1640 培地 (Sigma-Aldrich、Tokyo、Japan) で培養し、BxPC-3、Panc-1 および MiaPaCa-2 を Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地 (Sigma-Aldrich、Tokyo、Japan) で培養した。

各培養培地に 10%Fetal bovine serum (FBS)、penicillin (100Units / mL)、および streptomycin (100 μ g/mL)を添加した。

また、すべての細胞は 37℃の 5%CO₂を含む加湿インキュベーター内で培養し、サブコンフルエントのものを実験に使用した。

2) 試薬

細胞表面の Mesothelin を標的とした IgG1 キメラ抗体である Amatuximab および Contorl IgG は MORPHOTEK INC (Exton, PA, USA)より供与していた。ま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。

3) ウェスタンブロット分析および抗体

10cm dish に各細胞を 1.5×10^5 cell/dish の濃度で細胞を播種し、Amatuximab/Control IgG 含有、不含の成長培地で培養した。sodium fluoride (4 mM), sodium orthovanadate (4 mM) を含む氷冷 PBS で 2 度洗浄後、直ちに dish ごと -80℃で保存した。

保存した細胞は isolation buffer (0.25 M sucrose, 10 mM N-2-Hydroxyethyl piperazine-N-2-ethanesulfonic acid(HEPES)、100 $\times$ protease inhibitor cocktail, pH 7.5) (Sigma-Aldrich) を 100 μ L 添加しセルスクレーパーで回収し、氷上で 1 秒 $\times$ 10 回超音波破碎した。細胞液を遠心し、上清を whole cell lysate として採取した (4℃, 20,000 $\times$ g、25 分)。タンパク濃度は BCA protein Assay

Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。

タンパク抽出液に Sodium dodecyl sulfate (SDS) polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) sample buffer を添加し、95℃で 5 分煮沸した。Any-kD pre-cast gel (Bio-Rad、Hercules、CA) を用いて、各 well あたり 12 μ g のタンパクを測定に使用した。SDS-PAGE で展開し、Polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜へ転写した。3% Bovine serum albumin (BSA) (Sigma-Aldrich) でブロッキングし (室温、60 分)、1 次抗体希釈液にてインキュベートした (室温、60 分)。

洗浄後 2 次抗体 (horseradish peroxidase (HRP) -conjugated anti-rabbit IgG 抗体) 希釈液にてインキュベートした (室温、60 分)。化学発光検出試薬 West Dura (Thermo Fisher Scientific)、化学発光検知器 Chem Doc XRS® (Bio-Rad) を用いてバンドの濃度を測定した。タンパク量は GAPDH をコントロールとしてバンドの濃度を比較した。

一次抗体には、mesothelin (Immuno-Biological Laboratories、福岡、日本)、GAPDH (Cell Signaling Technology、Danvers、MA、USA) を含み、全ての一次抗体を 1 : 2000 に希釈した。2 次抗体は 1:5000 とした。

4) FACS 分析

培養細胞を洗浄し、氷冷 PBS に再懸濁した。一次抗体を 2 μ g/ml で加え、氷上で 1 時間インキュベートした。

次いで、細胞を PBS で洗浄し、1 μ g/ml に希釈した Alexa Fluor 488 ヤギ抗マウス二次抗体 (Invitrogen、Carlsbad、CA、USA) と共にインキュベートし、同様に洗浄し、BD FACS Canto TM II flow cytometer (BD Biosciences) を用いて分析した。

5) 免疫組織化学染色

EnVision + System-HRP (Dako Japan、Tokyo) を用いて免疫組織化学を行った。切片をスライドガラス上に載せ、キシレンにより脱パラフィンした後、エタノール濃度を段階的に調節した溶液に通して再水和させた。

抗原は Dako EnVision FLEX Target Retrieval Solution を用いて 97℃で 20 分間賦活化した。0.03%過酸化水素で内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした後、組織切片を 50 倍希釈のメソテリンに対するマウスモノクローナル抗体 (クローン 5B2、Novocastra、Newcastle Upon Tyne、UK) と共に室温で 30 分間インキュベートした。

次いで二次抗体およびペルオキシダーゼと組み合わせたデキストランポリマー試薬と室温で 30 分間させた。ジアミノベンジジン色素原を用いて 10 分間特異的抗原 - 抗体反応を行い視覚化した。

最後に、スライドをヘマトキシリンで対比染色し脱水後マウントした。

6) 動物

6 週齢のオス BALB/c nu/nu マウスを、CLEA Japan、Inc. (東京、日本) から購入した。マウスは、北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設内で、特異的な病原体のない条件下で管理され、実験前に 1~2 週間環境に適応させた。

7) AsPC-1-Gluc の確立と基質調製

In vivo での腫瘍体積および播種結節の定量的評価のために、Gaussia princeps から発現ベクターを単離し、遺伝子操作を行って AsPC-1 細胞にルシフェラーゼ分泌型 Gaussia ルシフェラーゼ (Gluc) を導入した。

CMV プロモーターを有する Gluc 遺伝子を発現するベクターと、SV40 プロモーター (New England BioLabs、Ipswich、MA、USA) を有するネオマイシン耐性遺伝子を制限酵素 SspI および PciI で線状化した。

AsPC-1 細胞に FuGENE HD トランスフェクション試薬 (Roche、Basel、Switzerland) を使用して、このベクターをトランスフェクションした。約 3 週間、400 μ g/ml の G418 (Sigma) で安定トランスフェクトされた細胞を選択してモノクローナル細胞株を作製した。

確立された細胞株 AsPC-1-Gluc を、10%FBS、100U/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン、および 100 μ g/ml G418 を補充した RPMI-1640 で培養した。

BioLux Gaussia ルシフェラーゼアッセイキット (New England BioLabs、Ipswich、MA、USA) の基質を、in vitro または ex vivo 実験に使用した。

8) AsPC-1-Gluc 細胞数と分泌型 Gluc 活性の相関関係

AsPC-1-Gluc 細胞を様々な細胞密度 (5 $\times$ 10⁴/well を最大として、32 倍まで順次倍希釈を行った) で 96 ウェルマイクロプレートに播種し、一晚培養した (n = 4)。続いて、20 μ l の上清を 50 μ l の反応緩衝液と混合し、化学発光を Varioskan フラッシュマイクロプレートリーダー (Thermo Fisher Scientific、Waltham、MA、USA) を用いて 2 秒間測定した。

9) 皮下移植マウスモデルの腫瘍体積とマウス血漿中の Gluc 活性との相関関係

サブコンフルエントな 5×10^6 個の AsPC-1-Gluc 培養細胞を収集し、PBS で洗浄し、 $50 \mu\text{l}$ の PBS と $50 \mu\text{l}$ の Matrigel (BD Biosciences、Bedford、MA、USA) の混合物に再懸濁し、ヌードマウスの右側腹部に皮下注射し、皮下異種食マウスモデルを作成した ($n = 5$)。少量の血液をヘパリン処理されたヘマトクリット毛細管を用いて 3 または 4 日ごとに尾静脈から収集し、12,000rpm で 5 分間遠心分離した。続いて、 $5 \mu\text{l}$ の血漿を $50 \mu\text{l}$ の反応緩衝液と混合し、化学発光を、Varioskan フラッシュマイクロプレートリーダーを用いて測定した (Gluc 血漿アッセイ)。

採血時に皮下腫瘍の大きさを測定し、以下の式を用いて腫瘍体積を計算した：腫瘍体積 = (腫瘍短径)² × (腫瘍長径) × 0.5。

10) 脾癌腹膜播種マウスモデルにおける術後補助療法下での Amatuximab の効果の評価

①前実験として Amatuximab 投与量の決定を以下のプロトコールにて行った。

0 日目にヌードマウスの腹腔内に 5×10^6 個の AsPC-1-Gluc 細胞を投与した。次いで PBS または各濃度の Amatuximab (50、100、200mg/kg) を 0 日目から 1 日おきに腹腔内投与した (各群 $n=2$ または 3)。

腫瘍体積の評価として 3 日、7 日、14 日、20 日および 28 日目に Gluc 血漿アッセイを行ない、29 日目にマウスを犠牲死させた。播種巣および sherbet-like aggregates を採取し、播種巣の腫瘍結節の全体積を上記のように測定した。

②Amatuximab 投与量の決定後、本実験を以下のプロトコールにて行った。

0 日目にヌードマウスの腹腔内に 5×10^6 個の AsPC-1-Gluc 細胞を投与した。次いで PBS、Amatuximab (200mg/kg) または Control IgG (200mg/kg) を、0 日目から 1 日おきに腹腔内投与した (PBS および Amatuximab 群は $n=6$ 、Control IgG 群は $n=7$)。

腫瘍体積の評価として 3 日、7 日、14 日および 21 日目に Gluc 血漿アッセイを行ない、22 日目にマウスを犠牲死させた (図 1)。播種巣および sherbet-like aggregates を採取し、播種巣の腫瘍結節の全体積を上記のように測定した。これら採取した標本を収穫直後にホルマリンで 6 時間固定し、パラフィンに包埋し、厚さ $3 \mu\text{m}$ で順次スライスし、H&E 染色または免疫組織化学に使用した。

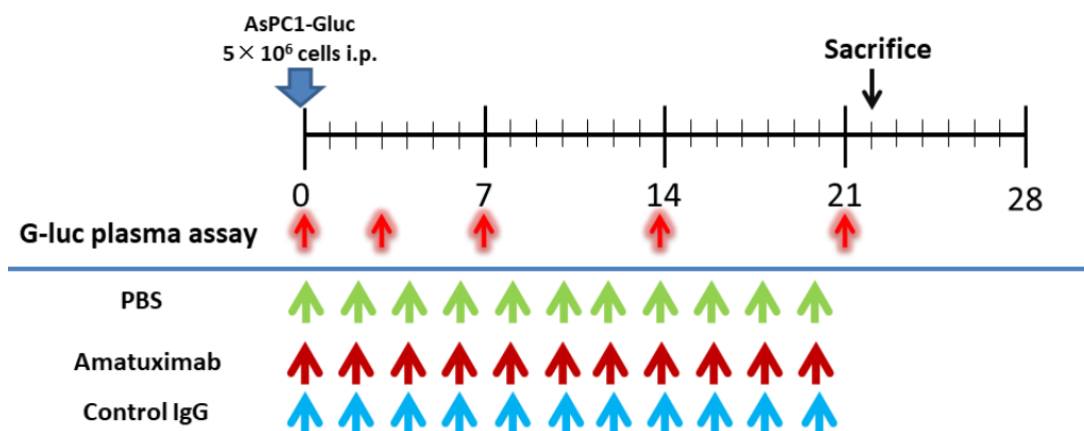


図1 AsPC-1-Gluc 細胞を用いたマウス腹膜播種モデルに対する Amatuximab 投与のプロトコール (本実験)

また、予備実験として Mesothelin 低発現の膵癌細胞株である MIA Paca-2 を用いた Amatuximab の効果の評価も行った。

0 日目にヌードマウスの腹腔内に 5×10^6 個の MIA Paca-2 細胞を投与した。次いで PBS および Amatuximab (200mg/kg) を、0 日目から 1 日おきに腹腔内投与した(n=3)。

22 日目にマウスを犠牲死させ、播種巣の腫瘍結節の全重量および体積を測定した。

11) 膵癌腹膜播種マウスモデルにおける術後補助療法下での Amatuximab および GEM の相乗効果の評価

①前実験として以下のプロトコールにて Amatuximab および GEM の相乗効果の評価した。

0 日目にヌードマウスの腹腔内に 5×10^6 個の AsPC-1-Gluc 細胞を投与した。次いで PBS および Amatuximab (200mg/kg) を 0 日目から 10 日目まで 1 日おきに腹腔内投与した(各群 n=6)。また、7、9、11 日目に両群に GEM (80mg/kg) を投与した。

腫瘍体積の評価として 3 日、7 日、14 日、21 日および 28 日目に血漿 Gluc アッセイを行ない、29 日目にマウスを犠牲死させた (図 2)。播種巣の腫瘍結節を採取し、全腫瘍体積および重量を測定した。

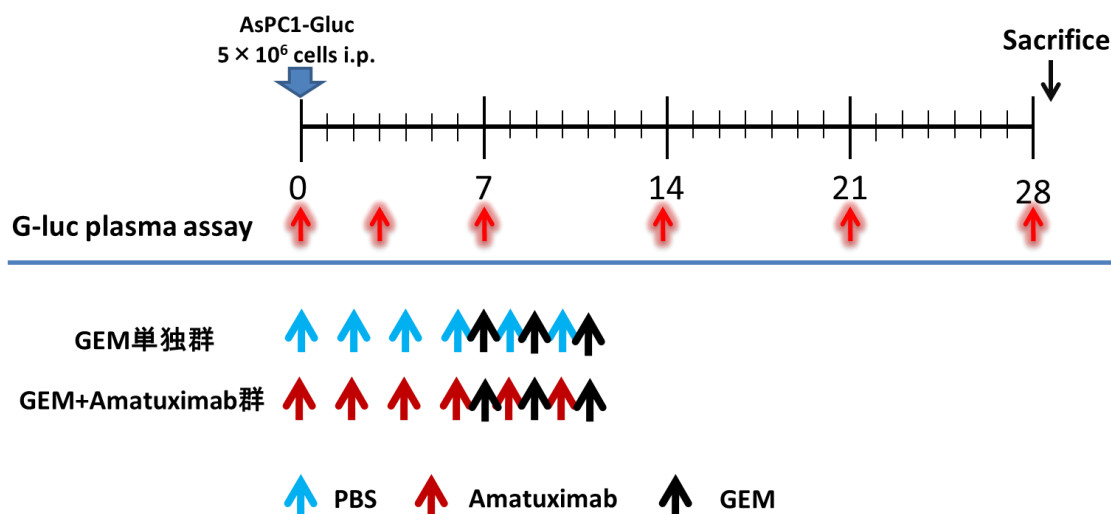


図 2 AsPC-1-Gluc 細胞を用いたマウス腹膜播種モデルに対する GEM 単独群および GEM+Amatuximab 群の投与のプロトコール (前実験)

②本実験として以下のプロトコールにて Amatuximab および GEM の相乗効果を評価した。

0 日目にヌードマウスの腹腔内に 5×10^6 個の AsPC-1-Gluc 細胞を投与した。次いで PBS および Amatuximab (200mg/kg) を 0 日目から 20 日目まで 1 日おきに腹腔内投与した(各群 n=6)。また、10、17、24 日目に両群に GEM (80mg/kg) を投与した。

腫瘍体積の評価として 3 日、7 日、14 日、21 日および 28 日目に血漿 Gluc アッセイを行ない、29 日目にマウスを犠牲死させた (図 3)。播種巣の腫瘍結節を採取し、全腫瘍体積および重量を測定した。

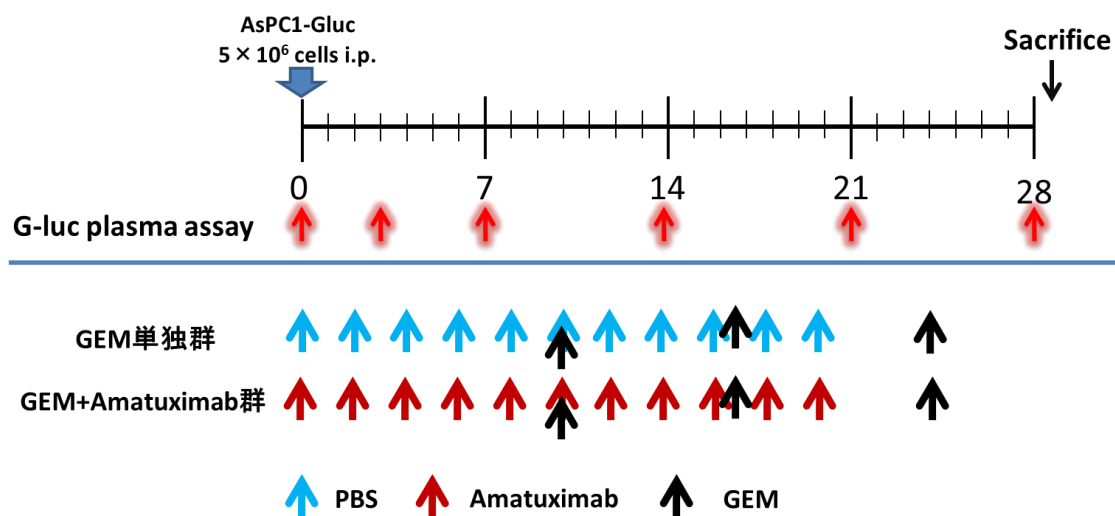


図 3 AsPC-1-Gluc 細胞を用いたマウス腹膜播種モデルに対する GEM 単独群および GEM+Amatuximab 群の投与のプロトコール (本実験)

12) 統計分析

数値は平均±標準偏差で示し、t 検定もしくは片側 ANOVA で有意差を検定した。p < 0.05 を有意とみなした。

統計解析には JMP Pro 13 for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC) を使用した。

結果

1) 膵癌細胞株における Mesothelin 発現の比較

AsPC-1、BxPC-3、Panc-1 および MIA Paca-2 の 4 種の膵癌細胞株を用いて、膵癌における Mesothelin 発現頻度を比較した。

ウェスタンブロッティング法では AsPC-1 が各種細胞株の中で最も強い Mesothelin 発現を示したが、BxPC-3 および MIA Paca-2 では Mesothelin の発現は弱かった (図 4A)。

FACS 分析では、AsPC-1 での Mesothelin 発現が最も強かったが、Panc-1 および MIA Paca-2 での Mesothelin 発現は弱かった (図 4B)。

また、免疫細胞染色では AsPC-1 の Mesothelin 染色強度が最も強く、Panc-1 および MIA Paca-2 での Mesothelin 染色強度は弱かった (図 4C)。

以上の結果から、Mesothelin 高発現膵癌細胞株として AsPC-1 を、低発現膵癌細胞株として MIA Paca-2 を使用することにした。

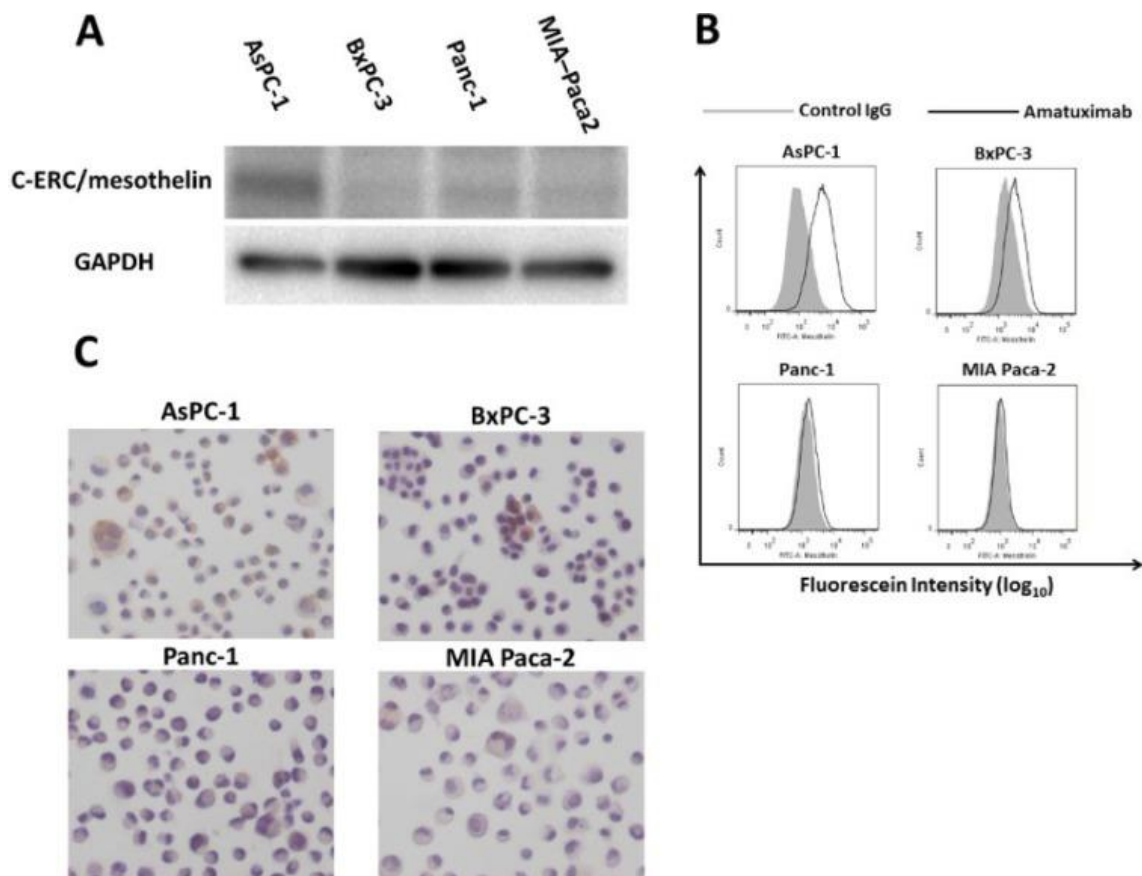


図 4 AsPC-1、BxPC-3、Panc-1 および MIA Paca-2 における Mesothelin 発現の比較 (A) ウェスタンブロッティング法 (B) FACS 分析 (C) 免疫細胞染色

2) Gluc 導入膵癌細胞株 (AsPC-1-Gluc) を用いた評価系の確立

In vivo での腫瘍細胞の増殖をモニターするためのモデル系として、ルシフェラーゼを分泌する膵癌細胞である AsPC-1-Gluc 細胞を作成し、細胞が分泌する Gluc の活性値が、腫瘍細胞数および体積と極めて強く相関することを示した。

図 5A に示すように、In vitro で分泌された Gluc 活性および細胞数は有意な相関関係を示した ($p < 0.05$ 、相関係数: $R=0.99$)。また、In vivo では、各マウスの皮下腫瘍体積は、血漿 Gluc 活性値と強く相関していた ($p < 0.05$ 、相関係数: $R=0.95$) (図 5B)。

以上の結果より AsPC-1-Gluc が In vivo で膵癌細胞の腫瘍体積を評価するための有用なアッセイ系であることが示された。

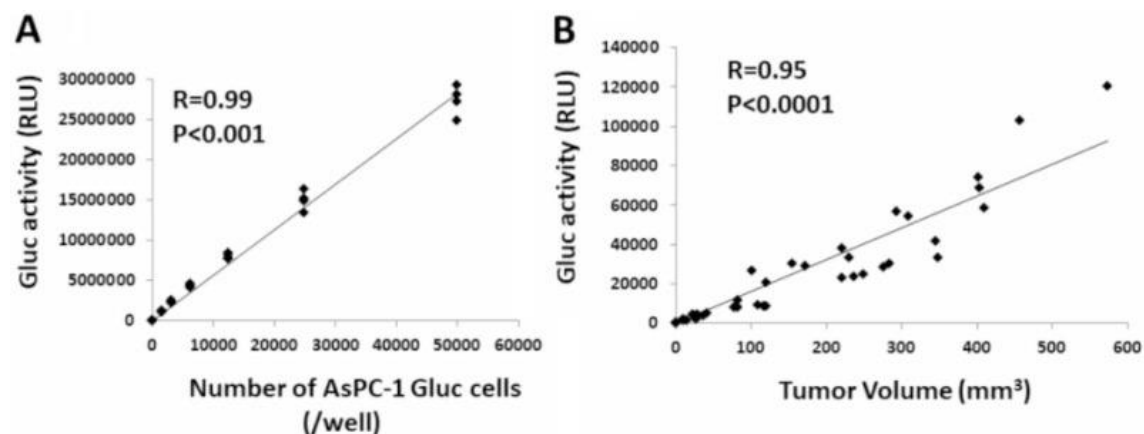


図 5

(A) In vitro における AsPC-1-Gluc 細胞数と分泌型 Gluc 活性の相関関係

(B) 皮下移植マウスモデルの腫瘍体積とマウス血漿中の Gluc 活性との相関関係

3) 膵癌腹膜播種マウスモデルにおける術後補助療法下での Amatuximab の腫瘍塊形成の抑制効果の検討

Amatuximab が Mesothelin 高発現の膵癌細胞株における腹膜播種形成にどのような影響を及ぼし得るかを評価するために、血漿 Gluc 活性と腫瘍細胞数との間に強い相関関係を示す上記の実験結果に基づいて、AsPC-1-Gluc 細胞を使用した。

①Amatuximab 投与量の決定

図 6A に示すように、血漿 Gluc 活性に関してはいずれの群においても統計的に有意な差は見られなかったが、腫瘍体積に関しては濃度依存性に減少する傾向にあった (図 6B)。また、いずれの群においても経時的な体重減少は認めなかった (図 6C)。

また、Amatuximab 200mg/kg 投与群のみで全例シャーベット状の癌細胞集塊 (以下 sherbet-like aggregates) を認めた。

以上より Amatuximab の投与量を 200mg/kg に決定した。

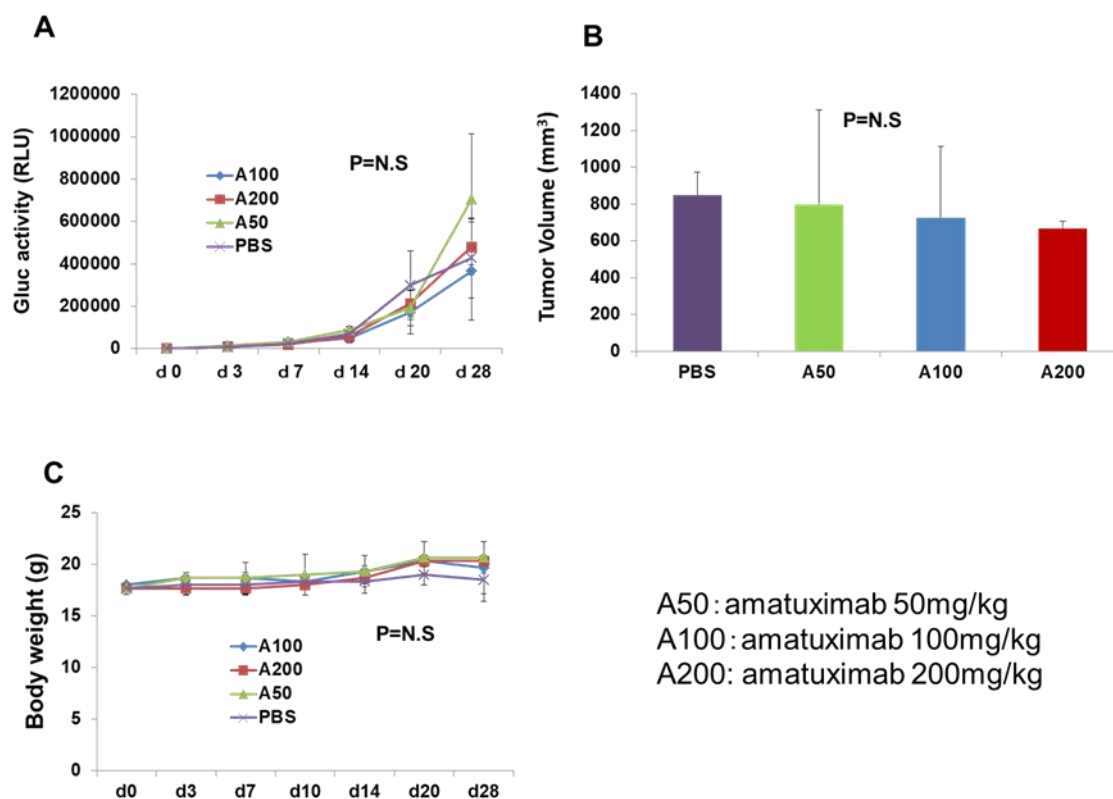


図 6 Amatuximab 投与量による各群における

(A) 血漿中の Gluc 活性の経時的変化 (B) 腫瘍体積 (C) 体重の経時的変化

② 本実験

図 7A に示すように、血漿 Gluc 活性に関してはいずれの群においても統計学的に有意な差は見られなかったが、肉眼的には Amatuximab 群において明らかに腫瘍塊の個数の減少を認めた (図 7B)。また、Amatuximab 群においてのみ、他の対照群には認めなかった sherbet-like aggregates が認められた (図 7C) (表 1)。

さらに、Amatuximab 群では、他の対照群と比較して腫瘍重量 ($p<0.01$) および腫瘍体積 ($p<0.01$) が有意に減少していた (図 7D、7E) が、Amatuximab 群も含めたすべての群において経時的な体重減少は認めなかった (図 7F)。

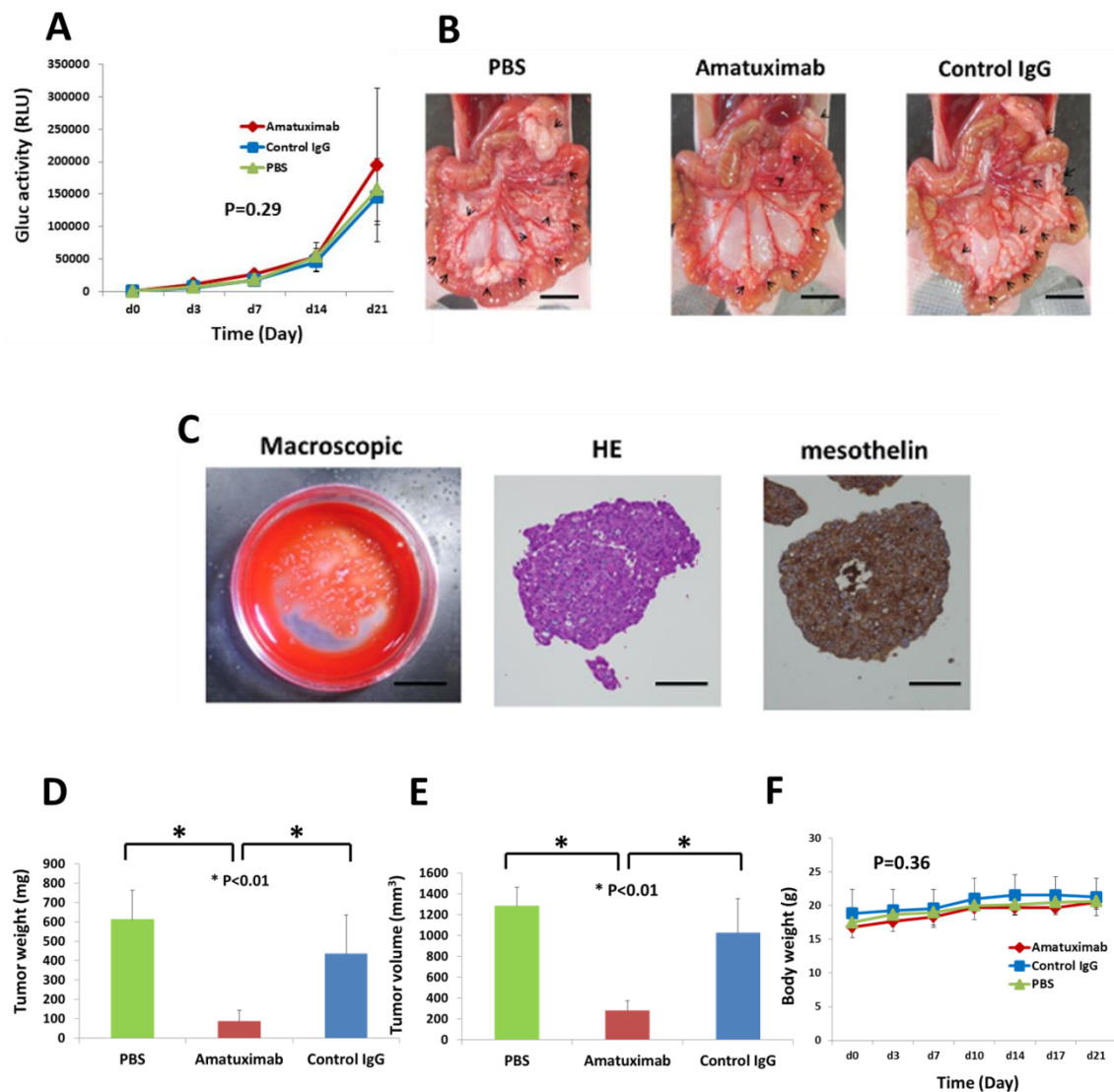


図7 Mesothelin 高発現株 AsPC-1-Gluc 細胞を用いたマウス腹膜播種モデルに対する Amatuximab の腫瘍塊形成抑制効果の検討

(A) マウス血漿中の Gluc 活性の経時的変化 (B) ノードマウスの腸間膜における AsPC-1 Gluc 腫瘍塊の肉眼的所見 (scale bar : 10mm)。 ➡は腫瘍塊を示す。

(C) sherbet-like aggregates. 左から順に肉眼的所見 (scale bar : 10mm)、HE 染色 (倍率 : 400 倍、scale bar : 50 μ m) および mesothelin 染色 (倍率 : 400 倍、scale bar : 50 μ m)。

各群における (D) 腫瘍重量、(E) 腫瘍体積 (F) 各群におけるマウスの体重の経時的変化。

表 1 AsPC-1-Gluc 細胞を用いたマウス腹膜播種モデルにおける Amatuximab 投与時の開腹所見

	Control (PBS)	Amatuximab (200 mg/kg)	Control IgG (200 mg/kg)
Ascites	1/6	3/6	1/7
Disseminated metastasis			
Mesenterium	6/6	6/6	7/7
Omentum	6/6	6/6	7/7
Peritoneum	6/6	6/6	7/7
Diaphragm	3/6	0/6	3/7
Liver	1/6	0/6	0/7
Pancreas	6/6	6/6	7/7
Kidney	6/6	6/6	7/7
Spleen	6/6	6/6	7/7
Lymph nodes metastasis	6/6	6/6	7/7
Sherbet - like aggregates	0/6	6/6	0/7

(分子 ; 0 : 所見なし, 1 : 所見あり、分母 ; 各群のマウス数 (匹))

また、予備実験として Mesothelin 低発現の膵癌細胞株である MIA Paca-2 を用いて、Amatuximab が腹膜播種形成に影響を及ぼし得るのかを検討した。

図 8A および B に示すように、両群間で腫瘍重量および体積に有意差を認めなかった。また、Amatuximab 群においても sherbet-like aggregates は認めなかった。

なお、両群間で経時的な体重減少は認めなかった (図 8C)。

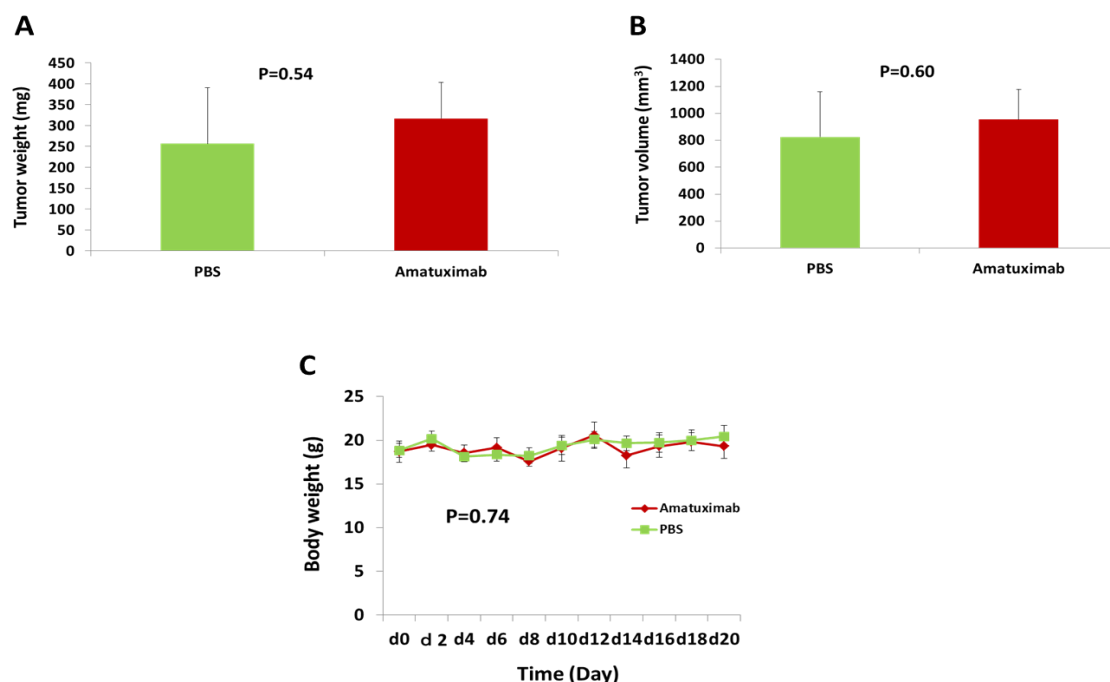


図 8 Mesothelin 低発現株 MIA-Paca 2 を用いたマウス腹膜播種モデルに対する Amatuximab の腫瘍塊形成抑制効果の検討

(A) 腫瘍重量、(B) 腫瘍体積 (C) 体重の経時的変化。

4) 膵癌腹膜播種マウスモデルにおける術後補助療法下での Amatuximab および GEM の相乗効果の検討

上記の実験結果より、Mesothelin 高発現の膵癌細胞株において、Amatuximab は腫瘍塊形成を抑制し sherbet-like aggregates を生成することが分かったが、腫瘍細胞数と相関関係のある血漿 Gluc 活性そのものには有意な影響を与えないことが分かった。そこで、膵癌の標準的治療薬である GEM を追加することで、膵癌腹膜播種マウスモデルに対する Amatuximab による抗腫瘍効果を増強させるかに関して検討を行った。

①前実験

図 9A に示されるように、28 日目に GEM 単独群と GEM+Amatuximab 群との間で血漿 Gluc 活性に統計学的に有意差を認めなかった。

さらに、両群間で腫瘍重量 (図 9B) および腫瘍体積 (図 9C) に有意差を認めなかった。また、両群間で経時的な体重減少は認めなかった (図 9D)。

これらの結果より、腫瘍の対数増殖期は 21-28 日に存在する可能性があり、GEM の抗腫瘍効果を発現する時期としては癌細胞の増殖期に投与することが必要と考え、本実験のプロトコルを立案した。

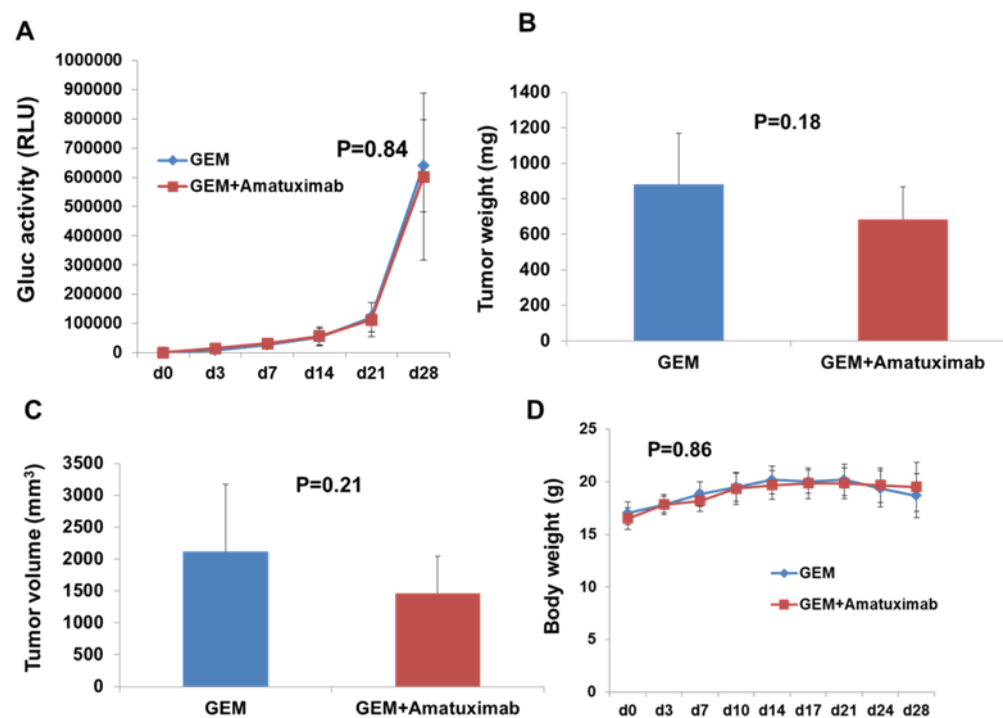


図9 GEM と Amatuximab の併用療法による AsPC-1-Gluc 腹膜播種マウスモデルにおける抗腫瘍効果の検討（前実験）

(A) 血漿中の Gluc 活性の経時的変化、(B) 腫瘍重量、(C) 腫瘍体積、(D) 体重の経時的変化。

②本実験

図 10A では、28 日目に GEM 単独群と GEM+Amatuximab 群との間で血漿 Gluc 活性に有意差を認めた。

肉眼的にも GEM+Amatuximab 群において明らかな腫瘍塊の個数の減少を認めた（図 10B）。

さらに、GEM+Amatuximab 群は、GEM 単独群と比較して腫瘍重量 ($p < 0.01$) および腫瘍体積 ($p < 0.01$) の有意な減少を示した（図 10C、10D）が、両群間で経時的な体重減少は認めなかった（図 10E）。

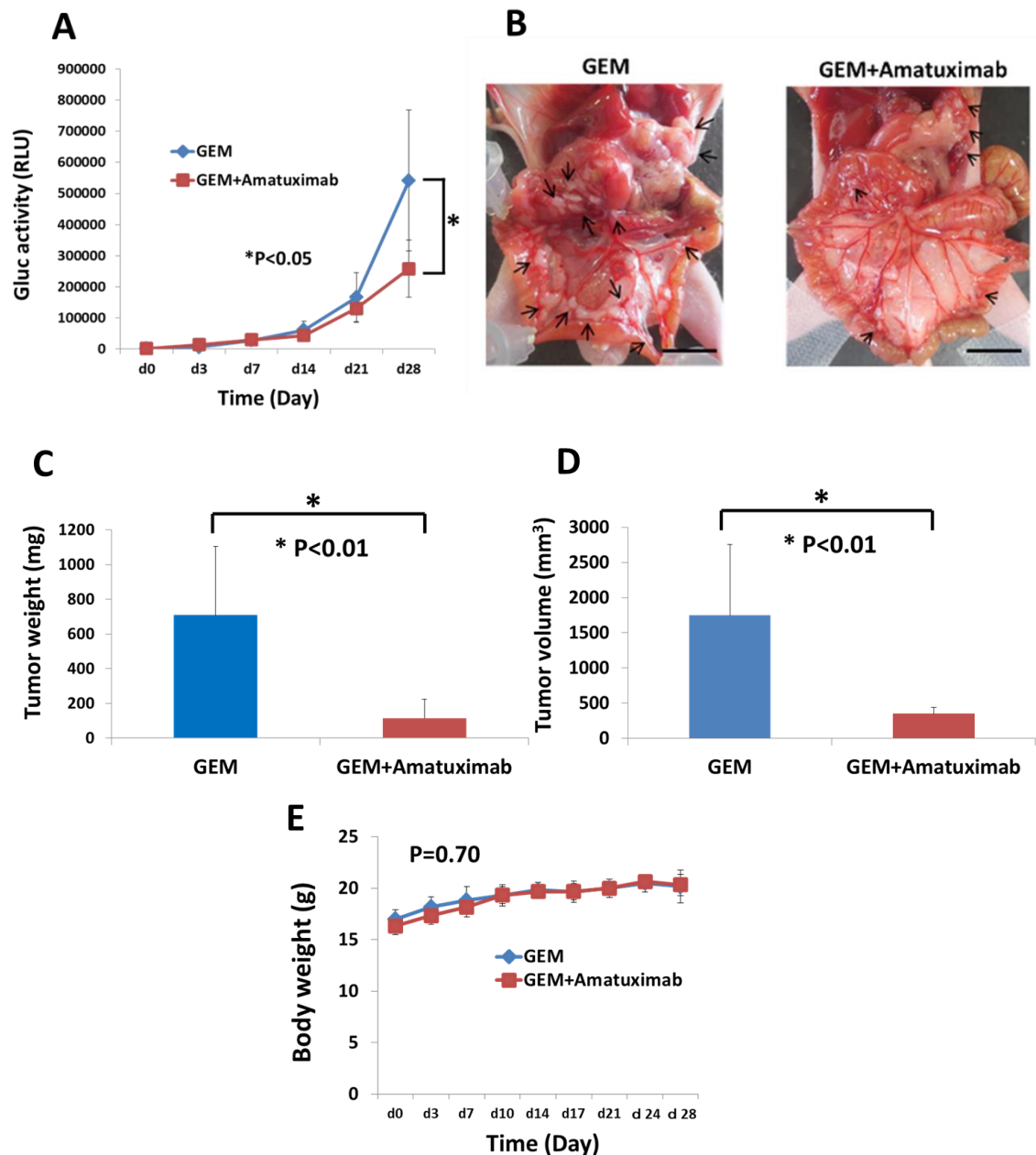


図 10 GEM と Amatuximab の併用療法による AsPC-1-Gluc 腹膜播種マウスモデルにおける抗腫瘍効果の検討（本実験）

(A) マウス血漿中の Gluc 活性の経時的変化

(B) ノードマウスの腸間膜における AsPC-1 Gluc 腫瘍塊の肉眼的所見（scale bar : 10mm）。 ➡は腫瘍塊を示す。

両群間における (C) 腫瘍重量、(D) 腫瘍体積、(E) 体重の経時的変化。

考察

本研究において、抗 Mesothelin 抗体である Amatuximab が、Mesothelin 高発現株である AsPC-1 Gluc 細胞を用いた、術後補助療法を想定した膵癌腹膜播種マウスモデルにおいて腹膜播種形成を抑制し、GEM の抗腫瘍効果を増強することを示した。

Amatuximab の投与により腫瘍塊形成が抑制されると同時に、生物学的に活性はあるものの、肉眼的には腫瘍を形成していない癌細胞である sherbet-like aggregates を認めた。この現象は Amatuximab の抗腫瘍効果の中でも、ADCC 活性を介した細胞傷害作用というよりは、むしろ CA125 を介した異型細胞接着の阻害による腫瘍細胞の形成阻害作用の方が優位となっているように思われた。実際に、Mesothelin を発現している患者に対する Amatuximab の効果を評価する第 I 相試験では、中皮腫および卵巣癌患者において、Amatuximab 投与により腫瘍細胞の胸膜内あるいは腹腔内の播種が抑制されると共に、血清 CA125 値が上昇することが報告されており (Hassan et al. , 2010)、これらの知見から Amatuximab による腫瘍塊抑制作用が、CA125 を介した腫瘍細胞接着の阻害が関与している可能性があることを示唆している。

また、膵癌においては、In vitro において Shimizu らが、抗 Mesothelin 抗体により CA125 と Mesothelin の結合を遮断することにより、膵癌細胞株の浸潤能と遊走能の両方を低下させることを報告している (Shimizu et al. , 2012) が、本研究は、Amatuximab の腫瘍塊形成抑制効果を In vivo で支持していると思われた。

また、本研究において、Amatuximab の抗腫瘍効果は膵癌の標準的治療薬として承認されている GEM と組み合わせることにより増強された。これは腹膜播種形成の過程で、Amatuximab が播種巣の腫瘍塊形成を抑制する際に、sherbet-like aggregates を形成し、腫瘍体積を減少させることによって GEM の癌細胞へのアクセスが良好となり、抗腫瘍効果が増強されたと考えられる。ただ、実臨床における未治療の切除不能 stage III または IV の膵癌患者に対する第 II 相試験 (NCT00570713) では、Amatuximab の GEM 単独への上乗せによる有用性を実証できなかった。このことは、巨大腫瘍あるいは転移を形成しているような切除不能膵癌では、腫瘍に十分に Amatuximab が到達できない状況が想定され、巨大腫瘍を形成していない微小転移の段階こそ、その有効性を発揮できると考えられた。

ただ、本研究ではこれらの薬剤間の相乗作用の正確なメカニズムを解明するための実験は行えていない。膵癌においては、In vitro において Shimizu らが、抗 Mesothelin 抗体により CA125 と Mesothelin の結合を遮断することにより

膵癌細胞株の浸潤能と遊走能の両方を低下させることを報告している(Shimizu et al. , 2012)が、本研究結果は、Amatuximab の CA125 と Mesothelin の結合阻害作用による抗腫瘍効果を In vivo で支持していると思われた。

また、当科で切除された検体で Mesothelin 発現を免疫組織学的に検討したところ、胃癌(Einama et al. , 2012)・大腸癌(Kawamata et al. , 2014)・肝外胆管癌(Kawamata et al. , 2012)といった高率に腹膜播種を起こしうる他の消化器癌においても、Mesothelin 過剰発現が予後不良因子であるとの報告がなされている。よって、今後は Amatuximab の対象を膵癌のみならず、Mesothelin が過剰発現している消化器癌にまで拡張し、標的を術後の腹膜播種や癌転移といった微小転移に絞ることにより、微小転移による腫瘍形成の制御と抗癌剤併用下で再発を抑制しうることを期待される。

結論

①本研究から得られた新知見

- ・ **Mesothelin** 高発現株である **AsPC-1 Gluc** 細胞を用いた、術後補助療法を想定した膵癌腹膜播種マウスモデルにおいて、抗 **Mesothelin** 抗体である **Amatuximab** を投与することにより **sherbet-like aggregates** が出現するとともに、腹膜播種形成が抑制された。
- ・ **GEM** と **Amatuximab** の併用療法は、同マウスモデルにおいて **GEM** の抗腫瘍効果を増強することが示された。

②新知見の意義

Amatuximab の標的を術後の腹膜播種といった微小転移に絞ることで、周術期の補助療法としての抗体療法の有効性に着目し、微小癌転移の腫瘍形成の制御と抗癌剤併用下での再発を抑制しうることが期待される。

③今後の研究の展開と課題

膵癌における予後決定因子のひとつとして腹膜播種の他に肝転移がある。膵癌切除臨床検体での免疫組織学的染色法を用いた解析により **Mesothelin** と **CA125** との共発現が術後肝転移と有意に相関することも報告されている。そこで、膵癌肝転移モデルを用いて **Amatuximab** の肝転移抑制効果についての検討を行う。

また、本研究では **Amatuximab** の投与により、**sherbet-like aggregates** の出現や腹膜播種形成が抑制されるなどの現象を発見するのみにとどまった。今後は、それらの分子生物学的メカニズムを解明することにより、**Mesothelin** を標的とした新規分子標的治療薬の開発、またそれらの臨床応用により、**Mesothelin** を発現する悪性腫瘍に罹患する患者の予後の改善につながっていくものと思われる。

謝辞

博士学位論文を終えるに当たり、本研究の機会を与えて下さいますと共に、終始御指導御鞭撻を賜りました北海道大学大学院医学研究科消化器外科学教室 I 武富紹信教授ならびに蒲池浩文講師に深謝いたします。また、御助言を賜りました北海道大学病院ゲノムコンパニオン診断学研究部門畑中豊先生ならびに **Amatuximab** 等の試薬を御提供下さった **Morphotek inc. Immunotherapy Development Associate Director** 古内恵司様へ感謝申し上げます。併せて、本研究の遂行にあたり様々な助言と励ましを頂きました北海道大学大学院医学研究科消化器外科学教室 I の皆様に心よりお礼を申し上げます。

利益相反

この研究で使用した、Amatuximab および Contorl IgG は MORPHOTEK INC (Exton, PA, USA) より供与していただいたものである。

引用文献

Argani P. , Iacobuzio-Donahue C. , Ryu B. , Rosty C. , Goggins M. , Wilentz R. E. , Murugesan S.R. , Leach S.D. , Jaffee E., Yeo C.J. et al. (2001). Mesothelin is overexpressed in the vast majority of ductal adenocarcinomas of the pancreas: identification of a new pancreatic cancer marker by serial analysis of gene expression (SAGE). Clin. Cancer. Res. 7, 3862–3868.

Chang, K., Pastan, I., Willingham M.C. (1992). Isolation and characterization of a monoclonal antibody, K1, reactive with ovarian cancers and normal mesothelium. Int. J. Cancer. 50, 373–381.

Chang, K., Pastan, I.(1996). Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93, 136–140.

Einama, T., Kamachi, H., Nishihara, H., Homma, S., Kanno, H., Takahashi, K., Sasaki, A., Tahara, M., Okada, K., Muraoka, S. et al. (2011) Co-expression of mesothelin and CA125 correlates with unfavorable patient outcome in pancreatic ductal adenocarcinoma. Pancreas. 40, 1276–1282.

Einama, T, Homma, S., Kamachi, H., Kawamata, F., Takahashi, K., Takahashi, N., Taniguchi, M., Kamiyama, T., Furukawa, H., Matsuno, Y. et al. (2012). Luminal membrane expression of mesothelin is a prominent poor prognostic factor for gastric cancer. Br. J. Cancer. 107, 137-142.

Hassan, R., Kreitman, R.J., Pastan, I., Willingham, M.C. (2005a). Localization of mesothelin in epithelial ovarian cancer. Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol. 13, 243–247.

Hassan, R., Laszik, Z.G., Lerner, M., Raffeld, M., Postier, R., Brackett, D. (2005b). Mesothelin is overexpressed in pancreaticobiliary adenocarcinomas but not in normal pancreas and chronic pancreatitis. *Am. J. Clin. Pathol.* 124, 838–845.

Hassan, R., Ebel, W., Routhier, E.L., Patel, R., Kline, J.B., Zhang, J., Chao, Q., Jacob, S., Turchin, H., Gibbs, L. et al. (2007). Preclinical evaluation of MORAb-009, a chimeric antibody targeting tumor-associated mesothelin. *Cancer. Immun.* 7, 20.

Hassan, R., Schweizer, C., Lu, K.F., Schuler, B., Remaley, A.T., Weil, S.C., Pastan, I. (2010). Inhibition of mesothelin-CA-125 interaction in patients with mesothelioma by the anti-mesothelin monoclonal antibody MORAb-009: Implications for cancer therapy. *Lung Cancer.* 68, 455–459.

Hassan, R., Kindler, H.L., Jahan, T., Bazhenova, L., Reck, M., Thomas, A., Pastan, I., Parno, J., O'Shannessy, D.J., Fatato, P. et al. (2014). Phase II clinical trial of amatuximab, a chimeric antimesothelin antibody with pemetrexed and cisplatin in advanced unresectable pleural mesothelioma. *Clin. Cancer. Res.* 20, 5927–5936.

Jemal, A., Siegel, R., Xu, J., Ward, E. (2010). Cancer statistics, 2010. *CA. Cancer. J. Clin.* 60, 277–300.

Kawamata, F., Kamachi, H., Einama, T., Homma, S., Tahara, M., Miyazaki, M., Tanaka, S., Kamiyama, T., Nishihara, H. et al. (2012). Intracellular localization of mesothelin predicts patient prognosis of extrahepatic bile duct cancer. *Int. J. Oncol.* 41, 2109–2118

Kawamata, F., Homma, S., Kamachi, H., Einama, T., Kato, Y., Tsuda, M., Tanaka, S., Maeda, M., Kajino, K., Hino, O. et al. (2014). C-ERC/mesothelin provokes lymphatic invasion of colorectal adenocarcinoma. *J. Gastroenterol.* 49, 81–92

Kayahara, M., Nagakawa, T., Ueno, K., Ohta, T., Takeda, T., Miyazaki, I. (1993). An evaluation of radical resection for pancreatic cancer based on the mode of recurrence as determined by autopsy and diagnostic imaging. *Cancer.* 72, 2118–2123.

Le, D.T., Brockstedt, D.G., Nir-Paz, R., Hampl, J., Mathur, S., Nemunaitis, J., Stermann, D.H., Hassan, R., Lutz, E., Moyer, B. et al. (2012) A live-attenuated *Listeria* vaccine (ANZ-100) and a live-attenuated *Listeria* vaccine expressing mesothelin (CRS-207) for advanced cancers: phase I studies of safety and immune induction. *Clin. Cancer. Res.* 18, 858–868.

Lindenberg, L., Thomas, A., Adler, S., Mena, E., Kurdziel, K., Maltzman, J., Wallin, B., Hoffman, K., Pastan, I., Paik, C.H. et al. (2015). Safety and biodistribution of ¹¹¹In-amatuximab in patients with mesothelin expressing cancers using single photon emission computed tomography-computed tomography (SPECT-CT) imaging. *Oncotarget.* 6, 4496–4504.

Matsuno, S., Egawa, S., Fukuyama, S., Motoi, F., Sunamura, M., Isaji, S., Imaizumi, T., Okada, S., Kato, H., Suda, K. et al. (2004). Pancreatic Cancer Registry in Japan: 20 years of experience. *Pancreas.* 28, 219–230.

Neoptolemos, J.P., Stocken, D.D., Bassi, C., Ghaneh, P., Cunningham, D., Goldstein, D., Padbury, R., Moore, M.J., Gallinger, S., Mariette, C. et al. (2010). Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial. *JAMA.* 304, 1073–1081.

Ordonez, N.G. (2003). Value of mesothelin immunostaining in the diagnosis of mesothelioma. *Mod. Pathol.* 16, 192–197.

Shimizu, A., Hirono, S., Tani, M., Kawai, M., Okada, K., Miyazawa, M., Kitahata, Y., Nakamura, Y., Noda, T., Yokoyama, S., et al. (2012). Coexpression of MUC16 and mesothelin is related to the invasion process in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer. Sci.* 103, 739–746.

Sohn, T.A., Yeo, C.J., Cameron, J.L., Koniaris, L., Kaushal, S., Abrams, R.A., Sauter, P.K., Coleman, J., Hruban, R.H., Lillemoe, K.D. (2000) Resected adenocarcinoma of the pancreas-616 patients: results, outcomes, and prognostic indicators. *J. Gastrointest. Surg.* 4, 567–579.

Uesaka, K., Boku, N., Fukutomi, A., Okamura, Y., Konishi, M., Matsumoto, I., Kaneoka, Y., Shimizu, Y., Nakamori, S., Sakamoto, H. et al. (2016). Adjuvant chemotherapy of S-1 versus gemcitabine for resected pancreatic cancer: a phase 3, open-label, randomised, non-inferiority trial (JASPAC 01) *Lancet.* 388, 248–257.

Winter, J.M., Cameron, J.L., Campbell, K.A., Arnold, M.A., Chang, D.C., Coleman, J., Hodgin, M.B., Sauter, P.K., Hruban, R.H., Riall, T.S. et al. (2006). 1423 pancreaticoduodenectomies for pancreatic cancer: A single-institution experience. *J. Gastrointest. Surg.* 10, 1199–1210.