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
Author(s)	松澤, 文彦
Description	配架番号：2481
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13467号
Issue Date	2019-03-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13467
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/77142
Type	doctoral thesis
File Information	Fumihiko_Matsuzawa.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文

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

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

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 5 頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7 頁

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 11 頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 17 頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 41 頁

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 46 頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 47 頁

利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 47 頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 48 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は現在 Molecular Cancer Therapeutics 誌に投稿中である.

本研究の一部は以下の学会で発表した.

1. 松澤文彦，蒲池浩文，水上達三，永生高広，畑中豊，古内恵司，神山俊哉，武冨紹信．抗メソテリン抗体(MORAb-009)によるヒト膵癌細胞株に対する抗腫瘍効果の検討．第 117 回日本外科学会定期学術集会．2017 年 4 月 29 日．横浜市.

要旨

【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，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．mesothelin を標的とした IgG1 キメラ抗体である Amatuximab は MORPHOTEK INC (Exton, PA, USA)より供与していただいた．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．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 (200 mg/kg) または control IgG (200 mg/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，腹膜播種巣および 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 μm 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エ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 で有意に発現細胞数比率の低下を認めた．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 の発現が有意に低下していた．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(以下 adhesive sherbet-like aggregates)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．mesothelin 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 mesothelin 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．mesothelin 高発現株である AsPC-1 と低発現株である 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．また 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, mesothelin 低発現である 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 を投与された膵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．

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
ALDH1	aldehyde dehydrogenase 1
AML	acute myeloid leukemia
ATCC	American Type Culture Collection
BSA	bovine serum albumin
CA125	carbohydrate antigen 125
CD133	cluster of differentiation 133
CD44	cluster of differentiation 44
CDK	cyclin-dependent kinase
CSC	cancer stem cell
CXCR4	CXC chemokine receptor 4
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition
EPCAM	epithelial cell adhesion molecule
ERK	extracellular signal-regulated Kinase
ESA	epithelial specific antigen
EZH2	enhancer of zeste homolog 2
FACS	fluorescence activated cell sorter
FBS	fetal bovine serum
5-FU	5-fluorouracil
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GEM	gemcitabine
GPI	glycosylphosphatidylinositol
HE	Hematoxylin-Eosin
HEPES	4-(2-HydroxyEthyl)-1-PiperazineEthaneSulfonic acid
HPF	high power field
HRP	horseradish peroxidase
IgG	Immunogloblin G
IL6	Interleukin 6
mAb	monoclonal antibody

MAPK	mitogen-activated Protein Kinase
MEK	MAPK/ERK kinase
mRNA	messenger ribonucleic acid
MSLN	mesothelin
MUC16	mucin 16
NFκB	nuclear factor-kappa B
PBS	phosphate buffered saline
PI3K	phosphoinositide 3-kinase
PVDF	polyvinylidene di fluoride
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
SDS PAGE	sodium dodecyl sulfate poly acrylamide gel electrophoresis
SP	side population
TNFα	Tumor Necrosis Factor α
ZO-1	zonula occludens-1

緒言

≪膵癌≫

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．現在膵癌は米国での癌関連死の第 4 の原因であり，2030 年には第 2 まで上昇すると予想されている．米国癌学会は，53070 人(男性 27670 人/女性 25400 人)が 2016 年に膵癌と診断され，41780 人(男性 21450 人/女性 20330 人)がこの疾患で死亡すると推定している．本邦でのがん統計でも 2017 年のがん患者死亡数では肺癌，大腸癌，胃癌に続き第 4 位となっており，男性 17401 人/女性 16823 人が膵癌により命を落としている(人口動態統計，厚生労働省大臣官房統計情報部編)．膵癌は病変が限局している状況ではほとんどの罹患者に自覚症状がなく、早期の段階での症状が乏しく発見が困難である．また本疾患の早期発見が可能な検査がなく，その結果として 50%以上の患者が遠隔転移を有する状態で診断を受け，全体の 5 年生存率はわずか 2%である(Siegel et al., 2015, 2016).

≪膵癌の治療≫

膵癌に対する唯一の治癒療法は外科的切除のみである(Vauthey and Dixon, 2009).しかし，診断時には 15-20%のみが切除可能な状態であり，それ以外の症例は外科治療の適応外となる.さらに手術を受けた患者の周術期死亡率は 4-18%であり，手術後の合併症のリスクが他の疾患に比較し非常に高い(Freelove and Walling, 2006; Hezel et al., 2006; Li et al., 2004)．患者の大部分は手術時に局所的な浸潤および微小転移を有することが多く,手術後の疾患の再発率は非常に高値にのぼる．Hattangadi らは腹膜播種(55%)および肝転移(53%)が再発の最も一般的な再発様式であると報告している(Hattangadi et al., 2009)．術後補助療法は，局所再発および遠隔転移の危険性を低下させると考えられている(Herman et al., 2008)．しかし 5-fluorouracil(5-FU)または gemcitabine(GEM)ベースの従来の補助化学療法では膵癌に対し期待されるような有効性が示されていない.現在利用可能な化学療法剤のうち，GEM は膵癌の最も一般的な薬剤である(Burris et al., 1997). 近年の研究では、GEM を他の薬剤と組み合わせることにより，標準的な GEM 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を示す結果が得られつつあるが(Ducreux et al., 2007)，それでも進行した膵癌患者に対する生命予後延長への寄与は限られている.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≫

mesothelin(MSLN)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，正常組織の中では腹膜を覆う中皮細胞に存在する(Chang and Pastan, 1996)．一方で MSLN は，中皮腫(Chang and Pastan, 1996)，卵巣癌(Chang and Pastan, 1996)および膵臓癌(Argani et al., 2001; Hassan et al., 2005)などの様々な種類の癌において高度に過剰発現している．最近の研究では，癌腫における細胞生存，遊走，浸潤および腫瘍進行に関連していることが示されている(Chang et al., 2012; Li et al., 2008a; Servais et al., 2012; Wang et al., 2012)．我々の教室では，消化器癌患者の予後に関する MSLN 発現の重要性を多数の論文で報告してきた(Einama et al., 2012; Einama et al., 2015; Einama et al., 2011; Einama et al., 2016; Kawamata et al., 2014; Kawamata et al., 2012)．MSLN は，2500～5000kDa(O'Brien et al., 2001)の範囲の分子量を有する高度にグリコシル化された膜結合タンパク質である CA125 / MUC16 に結合することができる(Gubbels et al., 2006; Kaneko et al., 2009; Rump et al., 2004)．MUC16 は卵巣癌(Rump et al., 2004) および膵癌(Streppel et al., 2012)の細胞表面上で過剰発現されるが, 正常な膵管には存在しない(Haridas et al., 2011; Streppel et al., 2012)．MUC16 の高発現は膵癌症例の生存率低下と強く関連している(Bast et al., 1998; Streppel et al., 2012)．最近の免疫組織学的研究により MUC16 と MSLN は患者の組織標本の膵癌細胞表面で同時発現し，これらの 2 つの分子の染色強度は腫瘍中心部より侵襲部先端の方が有意に高いことが示されている(Einama et al., 2011; Shimizu et al., 2012)．さらに MUC16 と MSLN との同時発現は強力な予後不良因子である(Einama et al., 2011; Shimizu et al., 2012)．MUC16 に結合する MSLN は腫瘍細胞同士の接着に影響を有するが(Gubbels et al., 2006; Kaneko et al., 2009; Rump et al., 2004)，MSLN-MUC16 相互作用が膵癌の浸潤および転移に寄与する分子機構はほとんど知られていない．また MSLN は複数の癌細胞株で過剰発現が 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(Tang et al., 2013)．

≪癌幹細胞≫

近年癌細胞のうち幹細胞様特性を有する特定の集団が腫瘍増殖の原因であり，他の癌細胞は腫瘍増殖に寄与しないという概念が提唱されている(Clarke et al., 2006)．これら癌幹細胞(CSC)は、以下に記載する 2 つの特徴を有する癌細胞として定義される． 第一に CSC 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． 第二にそれらはより分化した子孫を生じさせることができ，CSC 以外の細胞集団を補充することができる．CSC は、腫瘍細胞集団の維持を担っており，これらの細胞の根絶が治療上重要と考えられる．しかしこれら CSC は分化した癌細胞よりも化学療法および放射線療法に対して高度の耐性があると考えられている(Vaz et al., 2014).

≪分子標的薬≫

分子生物学の進歩により癌の特性が徐々に明らかになるにつれ,癌薬物療法における新しい抗悪性腫瘍薬の開発戦略が大きく変化してきた.B 細胞リンパ腫に対する Rituximab が認可されて以来，様々な分子標的薬が開発され現在では複数の癌腫で標準治療に位置づけられている.癌細胞と正常細胞との違い,すなわち癌細胞に生じた質的量的分子変化を選択的に攻撃するものが分子標的薬と呼ばれる.開発当初これらは正常細胞では存在しないもしくは働きが盛んではない分子に作用するため従来の抗腫瘍薬と比較して優れた癌選択性と安全性が期待された一方で,癌細胞の増殖を抑制するだけで腫瘍縮小効果は少ないと予想されていた.しかし実際にはいくつかの分子標的薬の腫瘍縮小効果は劇的であり,またその反面想定していなかった毒性も認められた(Knight et al., 2010).

≪Amatuximab≫

Amatuximab は MSLN 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 はメソテリン発現腫瘍細胞株に対する抗体依存性細胞傷害(ADCC)を誘発し, CA125 を介した異型細胞接着を阻害する． 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 MSLN を発現する腫瘍の増殖をより強く抑制し，Amatuximab を用いた悪性胸膜中皮腫患者の第 II 相臨床試験は良好な成績を得られている(Hassan et al., 2014). 一方膵癌治療では安全性と化学療法との相乗作用を示す第 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 stageIII 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．しかしこの試験では Amatuximab の化学療法への上乗せによる有用性を実証できなかった．この試験では対象が切除不能膵癌症例であったことから,我々はこの結果の解釈として，膵癌が切除不能なほどの腫瘍塊となった状況では膵癌細胞に Amatuximab が到達することができず，有効性が示されなかった可能性を考えた.

≪Amatuximab の膵癌腹膜播種モデルマウスでの治療効果≫

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た．そのモデルに対する Amatuximab の腹腔内注入による治療効果を検討した．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(図 1)．第二に Amatuximab と GEM の併用によりこれらの sherbet-like aggregates が消失することが分かった(Mizukami et al., 2018)．これらの現象は Amatuximab により膵癌細胞の腹膜への接着が阻害されることで起こったと予想されるが詳細は不明であった．

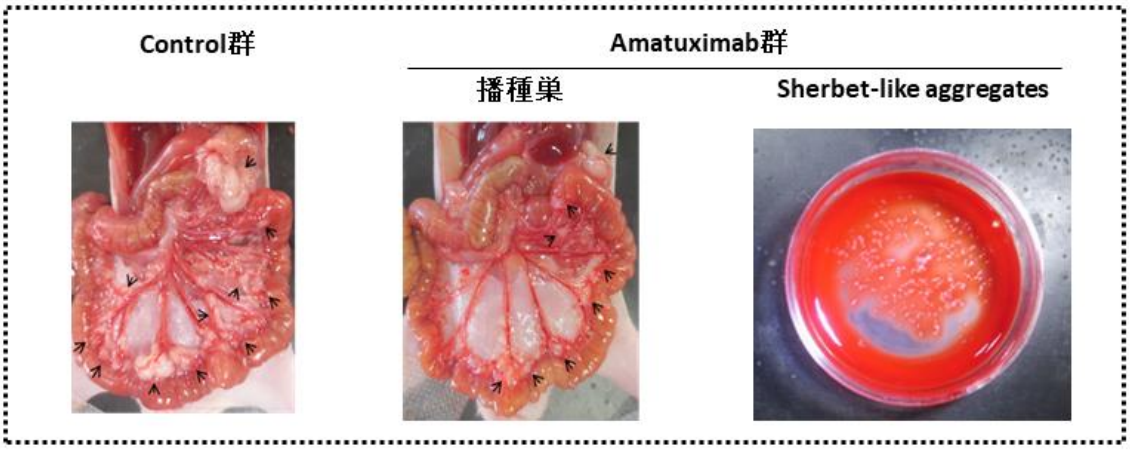


図 1　膵癌細胞株を用いたマウスモデルにおける Amatuximab の有効性の検討

Control 群では腹膜播種の形成が高度であるのに対し Amatuximab 投与群では腹膜播種巣の減少と sherbet-like aggregates の出現がみられた(Mizukami, 2018 より引用、一部改変)．図中の矢印は，生着した腹膜播種巣を示す．

≪本研究の目的≫

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 GEM 投与により消失したことから，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．これらの細胞集塊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．

実験方法

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) 動物

オスの BALB/cAJcl-*nu/ nu* マウスを第 5～6 週齢で三共ラボサービス株式会社（東京，日本)より購入し，北海道大学大学院医学研究科附属動物実験施設内で，病原体より隔離された状態で管理した.

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 は MORPHOTEK INC (Exton, PA, USA)より供与していただいた. 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) *In vitro* experiments

① 細胞培養

ヒト膵癌細胞株 AsPC-1 (ATCC,CRL-1682)，MIA Paca-2 (ATCC,CRL-1420), Panc-1 (ATCC,CRL-1469), BxPC-3 (ATCC,CRL-1687)は American Type Culture Collection (ATCC) から購入した．細胞は 37℃，CO2 5%下で 10％ Fetal bovine serum (FBS)，penicillin (100 Units/mL)、streptomycin (100 µg/mL) を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) 培地 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)(MIA Paca-2，Panc-1) または RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)(AsPC-1，BxPC-3)で培養し，サブコンフルエントのものを実験に供した.

② 膵癌細胞株の mesothelin 発現の検討

イ) FACS 分析

各細胞を採取，PBS で洗浄後氷冷 PBS1ml で懸濁し細胞数を 2×10^6 cell/ml の濃度になるよう調整した. 一次抗体として mesothelin（Immuno-Biological Laboratories，福岡，日本）を PBS で 1 : 100 に希釈し添加し氷上で 1 時間反応させた. 細胞を再度 PBS で洗浄し 1 µg/ ml に希釈した Alexa Fluor 488 ヤギ抗マウス二次抗体（Invitrogen、Carlsbad、CA、USA）と反応させ，BD FACS Canto TM II フローサイトメーターで分析した.

ロ) 免疫細胞染色

Nunc Lab-Tek Chamber Slide 8 well (シグマアルドリッチジャパン，東京，日本)で 1.5×10^4 cell ずつ細胞を播種し 24 時間培養を行った．PBS で洗浄後 95%，80%，70%で脱水後 5 分間ブロッキングを行った．一次抗体は mesothelin （Immuno-Biological Laboratories，福岡，日本）を PBS で 1 : 100 に希釈し室温で一時間反応させた．二次抗体として Labbelled polymer 原液と 30 分室温で反応させた．DAB を 1:50 に PBS で希釈し室温 10 分反応後アルコール脱水，キシレンで固定しマリノールで封入した．

② Amatuximab による細胞動態の変化

イ）増殖能への影響

膵癌細胞株を 1.5×10^5 cell ずつ 35 mm dish に播種した．成長培地に Amatuximab を 0, 0.01, 1, 100 μg/mL の各濃度で添加し，total 2 ml/dish とした．48 時間培養した後 0.05%の Trypsin/EDTA (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) 500 μL で細胞を回収した．50 μL の細胞回収液を同量の trypan blue(富士フィルム和光純薬株式会社，大阪，日本)と混合し丁寧に撹拌した. 撹拌した溶液を 20 μL ずつ hemocytometer(エルマ販売株式会社，東京，日本)に充填し，細胞数を計測した．

ロ）浸潤能への影響

in vitro の浸潤能実験は BD Bio-Coat Matrigel invasion assay system (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)を用いて実施した. まず細胞を 8.0μm の孔を有するポリカーボネート膜からなるマトリゲルプレコート transwell チャンバーに 2.5×10^5 cell ずつ播種した．24 ウェルプレートに 100 μg/mL の Amatuximab を添加した培地と control IgG(MORPHOTEK INC, Exton, PA, USA)を添加した培地を入れ，transwell チャンバーをセットした．細胞を 24 時間インキュベートした後、Transwell チャンバーの上面を綿棒で拭き取り, 侵入した細胞を Diff-Quick 細胞染色キット（Dade Behring、Inc.、Newark、DE、USA）を用いて固定し染色した．浸潤細胞の数は 5 つのランダムな顕微鏡視野（200×倍率）を実験者一人でブラインドで計測した．

ハ）遊走能への影響

in vitro の遊走能実験は，BD Bio-Coat migration assay system (BD Biosciences, San Jose, CA, USA)を用いて実施した．播種細胞数，実験手法は浸潤能と同様の方法で行った．

③ Amatuximab による蛋白発現の変化

イ）ウエスタンブロッティング法

10 cm 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 48 時間培養した．sodium fluoride (4 mM), sodium orthovanadate (4 mM) を含む氷冷 PBS(Wako #048-29805 を超純水で 10 倍に希釈して使用)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× protease inhibitor cocktail, pH 7.5) (Sigma-Aldrich) を 100 µL 添加しセルスクレーパーで回収し，氷上で 1 秒 × 10 回超音波破砕した．細胞液を遠心し，上清を whole cell lysate として採取した (4℃, 20,000×*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 (NP-40 Lysis Buffer，組成：Tris-HCl(pH7.5) 25mM，NaCl　150mM，デオキシコール酸 Na 0.5％，EDTA/2Na 1mM，NP40 0.5%(w/v)，フッ化 Na　5mM，オルトバナジン酸 Na 5mM，protease inhibitor cocktail 1/100 量)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 µg のタンパクを測定に供した．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 次抗体希釈液で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 抗体または HRP-conjugated anti-rabbit IgG 抗体，Cell Signaling Technology，Danvers，MA，USA) 希釈液で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），ALDH1（BD Biosciences，San Jose，CA，USA），CD44，p-MET，E-cadherin，N-cadherin，ZO-1，GAPDH，MEK1/2，ERK1/2，p-NFkB，NFkB，vimentin，p-Stat3，および Stat3（Cell Signaling Technology，Danvers，MA，USA）を含み，全ての一次抗体を 1：2000 の濃度で 5%BSA/TBS で希釈して使用した．2 次抗体は 1:5000 の濃度で 5%BSA/TBS で希釈して使用した．

④ Amatuximab による GEM への上乗せ効果

まず，播種細胞数，GEM 濃度及び培養時間の決定のため，予備実験を

実施した．GEM の濃度は過去の報告(Awasthi et al., 2018)を参考にした．方法詳細は結果の項で示す．

予備実験の結果より 1μM の GEM および 100 μg/ml の Amatuximab を含む 10％FBS を添加した培地に AsPC-1，MIA Paca-2 を各々 1.5×10^5 cell/35mm dish の濃度で播種した．48 時間のインキュベーション後に生存細胞数を計測した．

4) *In vivo* experiments

① モデルの作成，組織回収

播種細胞数，Amatuximab 及び control IgG の投与量は前任者の実験結果を参照し決定した(Mizukami et al., 2018)．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 (200 mg/kg，投与溶液量はマウス体重 1 g 当たり 0.04 ml) または control IgG (200 mg/kg，投与溶液量はマウス体重 1 g 当たり 0.04 ml) 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(図 2)．これらの切除標本は採取直後にホルマリンで 6 時間固定し、パラフィンに包埋した後 4 μm の厚さでスライスした．

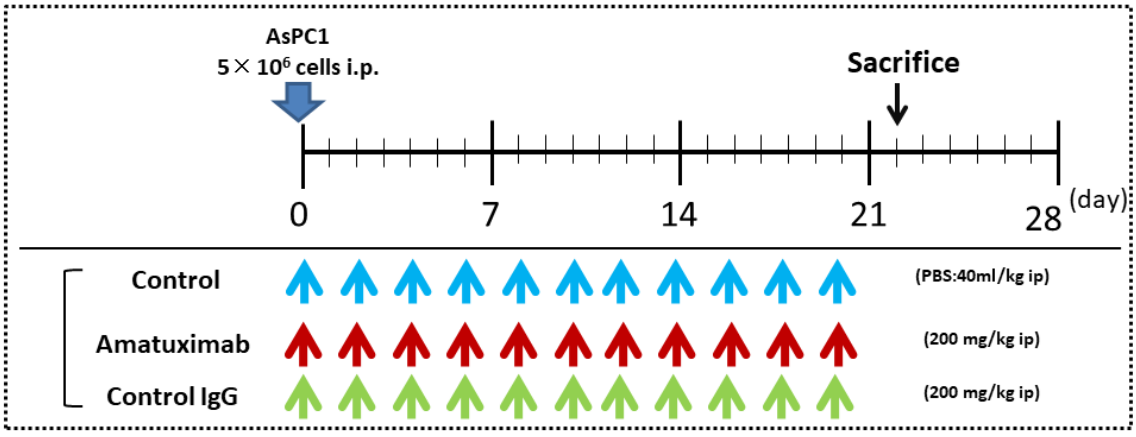


図 2　AsPC-1 を用いたマウス腹膜播種モデルに対する Amatuximab 投与のプロトコール

② 組織におけるタンパク発現の変化

各ブロックを 4 μm 切片に切断し，下記した一次抗体の免疫組織化学染色を EnVision＋System-HRP（Dako Japan、Tokyo）を用いて行った．切片をスライドグラス上に載せ，キシレンによる脱パラフィン後エタノール濃度を調整した溶液を通して再水和させた．抗原は Dako EnVision FLEX Target Retrieval Solution で Dako PT Link を用いて 97℃で 20 分間賦活

化した．0.03%過酸化水素で内在性ペルオキシダーゼ活性を失活させた後，切片を一次抗体と共に室温で 30 分間インキュベートし，次に EnVision HRP (ダコ・ジャパン株式会社，東京，日本)と室温で 30 分間反応させた．特異的抗原-抗体反応をジアミノベンジジン色素原を 10 分間適用して視覚化した．スライドを Hematoxylin で対比染色し脱水後封入した．一次抗体には，mesothelin (clone 5B2, Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK), Ki-67 (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), ALDH1 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), CD44, E-Cadherin, N-Cadherin, p-ERK 1/2, Vimentin (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA). c-MET (Novus Biologicals, Littleton, CO, USA), CXCR4 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA), CD133 (Miltenyi Biotec, Somerville, MA, USA)を使用した．各一次抗体は Dako Real Agent Dulient (ダコ・ジャパン株式会社，東京，日本)に下記の倍率で希釈した．

抗体	希釈倍率
mesothelin	1:50
Ki-67	1:200
ALDH1	1:100
CD44	1:400
E-cadherin	1:50
N-cadherin	1:50
p-ERK1/2	1:50
Vimentin	1:50
c-MET	1:50
CXCR4	1:100
CD133	1:50

③ 組織における RNA 発現の変化

mRNA 分析のため，TRIzol 試薬（Invitrogen）を用いて組織の全 RNA を単離抽出した．SYBR green リアルタイム定量的 RT-PCR（qRT-PCR）（LightCycler 480 Roche，Switzerland）を用いて ALDH1, c-MET, CD44, E-Cadherin の mRNA を測定し，GAPDH の mRNA の発現量に対して標準化した．試薬は Transcript First Strand cDNA Synthesis Kit を使用した．

各分子については以下のプライマーを使用した.

ALDH1 forward, 5'- AAATCCTCTGACCCCAGGAG -3';
ALDH1 reverse, 5'- GTTTGGCCCCTTCTTTCTTC -3';
c-MET forward, 5'- AGTGAAGTGGATGGCTTTGG -3';
c-MET reverse, 5'- ATAAGGTGGGGCTCCTCTTG -3';
CD44 forward, 5'- GAAAGGAGCAGCACTTCAGG -3';
CD44 reverse, 5'- GGGTGGAATGTGTCTTGGTC -3';
E-Cadherin forward, 5'- GACTCGTAACGACGTTGCAC -3';
E-Cadherin reverse, 5'- GGTCAGTATCAGCCGCTTTC -3';
GAPDH forward, 5'- ATCAAGTGGGGCGATGCTG -3';
GAPDH reverse, 5'- ACCCATGACGAACATGGGG -3'.

RNA 発現量については $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法を用いて計算した. すべての qRT-PCR 分析を三回独立で行いデータを平均±標準誤差として提示した.

5) 統計学的解析

数値は平均±標準偏差で示した．Student の t 検定もしくは片側 ANOVA で有意差を検定した．p 値は 0.05 未満を有意とした．統計解析には JMP Pro 14 for Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC) を使用した.

実験結果

1) 膵癌細胞株での MSLN 発現の比較

まず本実験開始に先立ち，AsPC-1、BxPC-3、PANC-1 および MIA Paca-2 の 4 種の膵癌細胞株における MSLN の発現を比較した．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高い MSLN 発現を示した(図 3A). FACS 分析では AsPC-1 での MSLN 発現が最も高く, MIA Paca-2 で最も低い発現を示した(図 3B)．また免疫細胞染色でも AsPC-1 での発現が最も高く，MIA Paca-2 で最も低い発現を示した(図 3C)．MIA Paca-2 の評価でウェスタンブロッティング法と他の方法で差異がみられたが，FACS で表面発現が他と比較し低いため，結果を総合的に評価し MSLN 高発現膵癌細胞株として AsPC-1 を，MSLN 低発現株として MIA Paca-2 を選択し，続く実験を行うこととした．

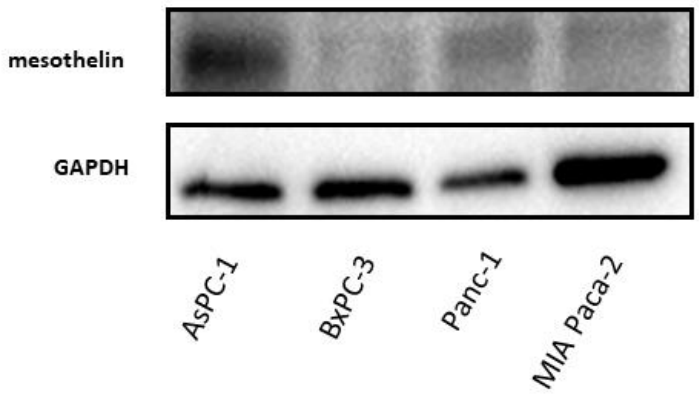


図 3A　膵癌細胞株に対するウェスタンブロッティング法での MSLN 発現の比較
AsPC-1 で最も高い発現を認めた．

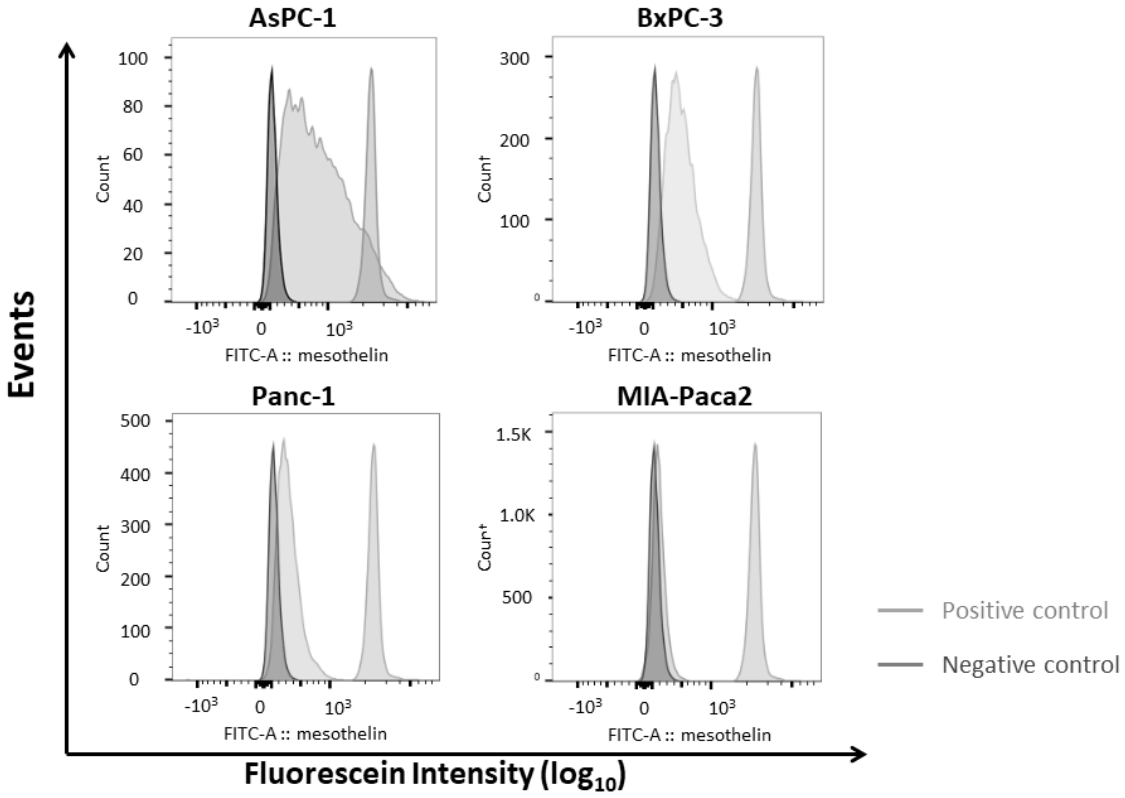


図 3B　膵癌細胞株に対する FACS 分析での MSLN 発現の比較

AsPC-1 で最も高い発現を示し、MIA Paca-2 で最も低い発現を示した. Onecomp eBeads (#01-1111, eBioscience)を positive control, FITC Mouse IgG1κ Isotype Control を negative control として使用した.

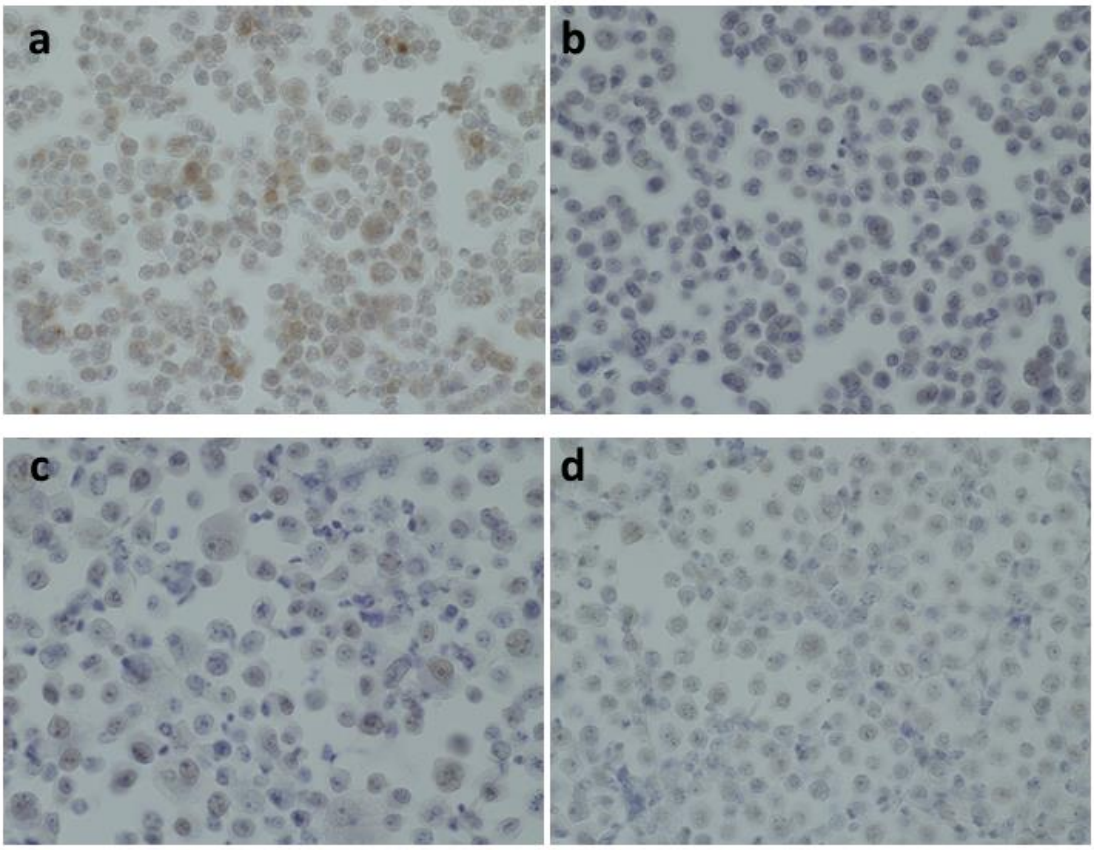


図 3C　免疫細胞染色での MSLN 発現の比較

a:AsPC-1、b:PANC-1、c:BxPC-3、d:MIA Paca-2. FACS 分析と同様に AsPC-1 で最も高い発現を示し、MIA Paca-2 で最も低い発現であった.

2) 腹膜播種マウスモデルより採取した腹膜播種巣及び sherbet-like aggregates での分子発現の変化の検討

①MSLN 及び EMT に関連する分子の検討

まず本実験の着想に至った'sherbet-like aggregates では一体何が起こっているのか'という疑問へのアプローチとして，腹膜播種モデルより採取した腹膜播種巣及び sherbet-like aggregates に対し各種抗体を使用し免疫組織学的染色により分子発現の変化を検討した. 前任者の実験結果で sherbet-like aggregates では MSLN の発現が増強しているのではという提言があり，まず MSLN について検討した．結果，control IgG 群での腹膜播種巣、Amatuximab 群での腹膜播種巣，sherbet-like aggregates のいずれにおいても MSLN の発現に明らかな差を認めなかった．次に接着や浸潤に関わる因子として，EMT に関連する分子について検討を行った．sherbet-like aggregates で E-cadherin が軽度抑制されていたが, 他の分子での明らかな差は認めなかった(図 4A).

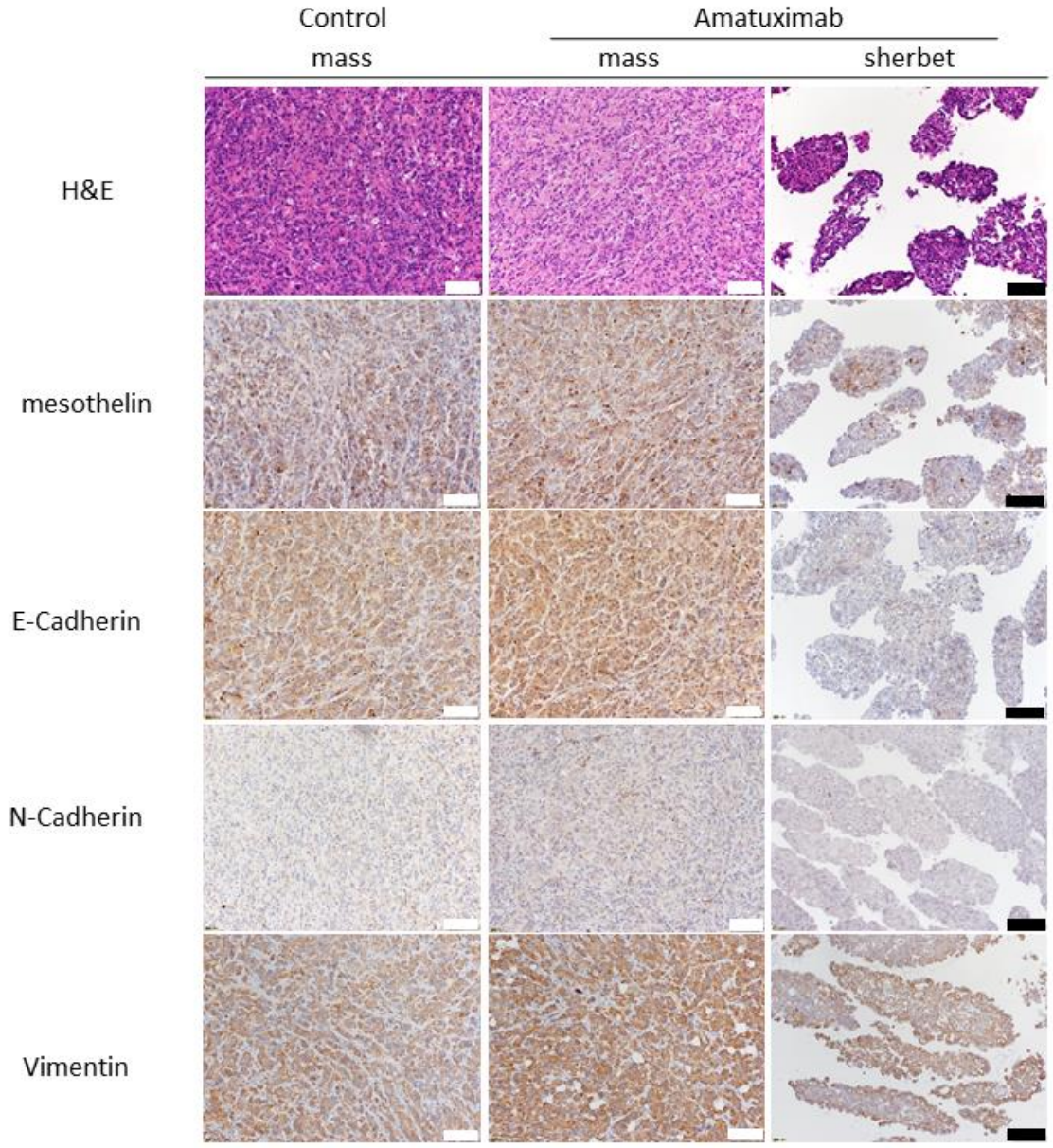


図 4A　腹膜播種モデルマウスより採取した組織の免疫組織学的染色による分子発現の検討

いずれの群においても MSLN 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．スケールバーは 100μm を示す．

②細胞増殖，生存に関連する分子の検討

続いて，既報で MSLN 発現に関連すると考えられている分子を含む細胞生存や増殖に関連する分子の検討を行った．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(図 4B)．いずれの分子でも陽性細胞数の比較で有意差をもって sherbet-like aggregates での低下が示された(図 4C)．

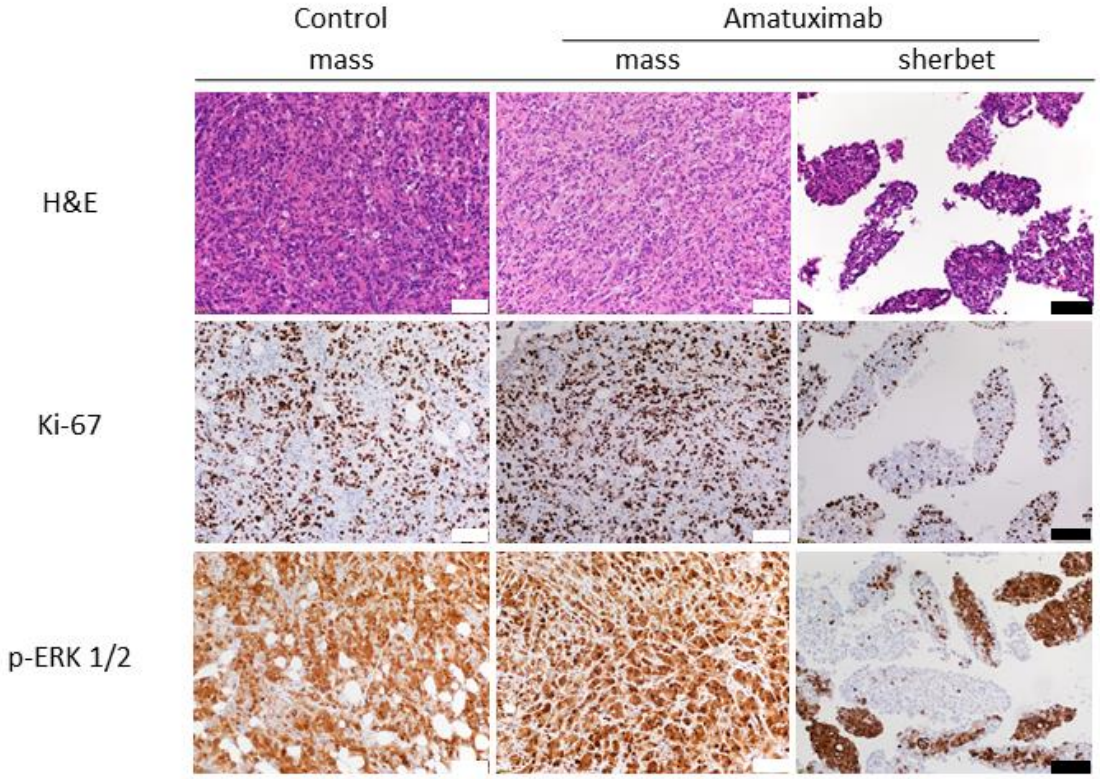


図 4B　細胞増殖及び生存に関連する分子発現の検討

各群の腹膜播種巣と比較して Amatuximab 群で出現した sherbet-like aggregates では明らかに発現が低下していた．スケールバーは 100μm を示す．

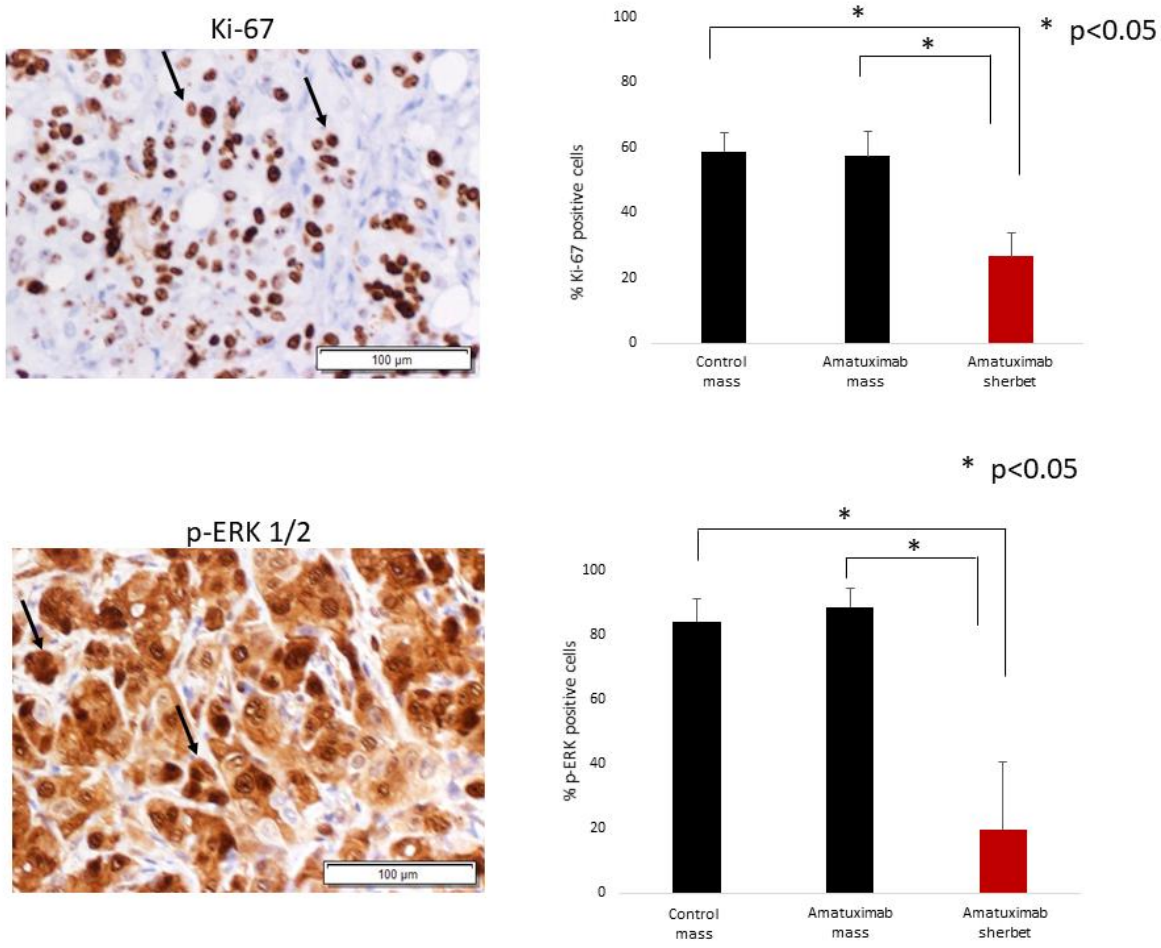


図 4C　細胞増殖及び生存に関連する分子発現の検討

各群でランダムに抽出した 6 視野における染色陽性細胞数の割合を計測し比較した. Ki-67、p-ERK1/2 のいずれにおいても有意差をもって sherbet-like aggregates で陽性細胞数の低下を示した．矢印は典型的な染色陽性細胞を示す．スケールバーは 100μm を示す.

③癌幹細胞性に関連する分子の検討

前実験において sherbet-like aggregates は GEM を追加することで消失することが明らかとなっており，これらの細胞集塊では抗癌剤耐性の低下に関連する分子変化があるのではないかという着想に至った．そこで我々は抗癌剤耐性に関連する分子群として癌幹細胞性マーカーの染色を行った．その結果，control 群及び Amatuximab 群の腹膜播種巣と比較し sherbet-like aggregates において ALDH1、CD44、c-MET で明らかに発現低下を認めることが分かった(図 4D)．これらの陽性細胞数の比率の比較において有意差が示された(図 4E)．

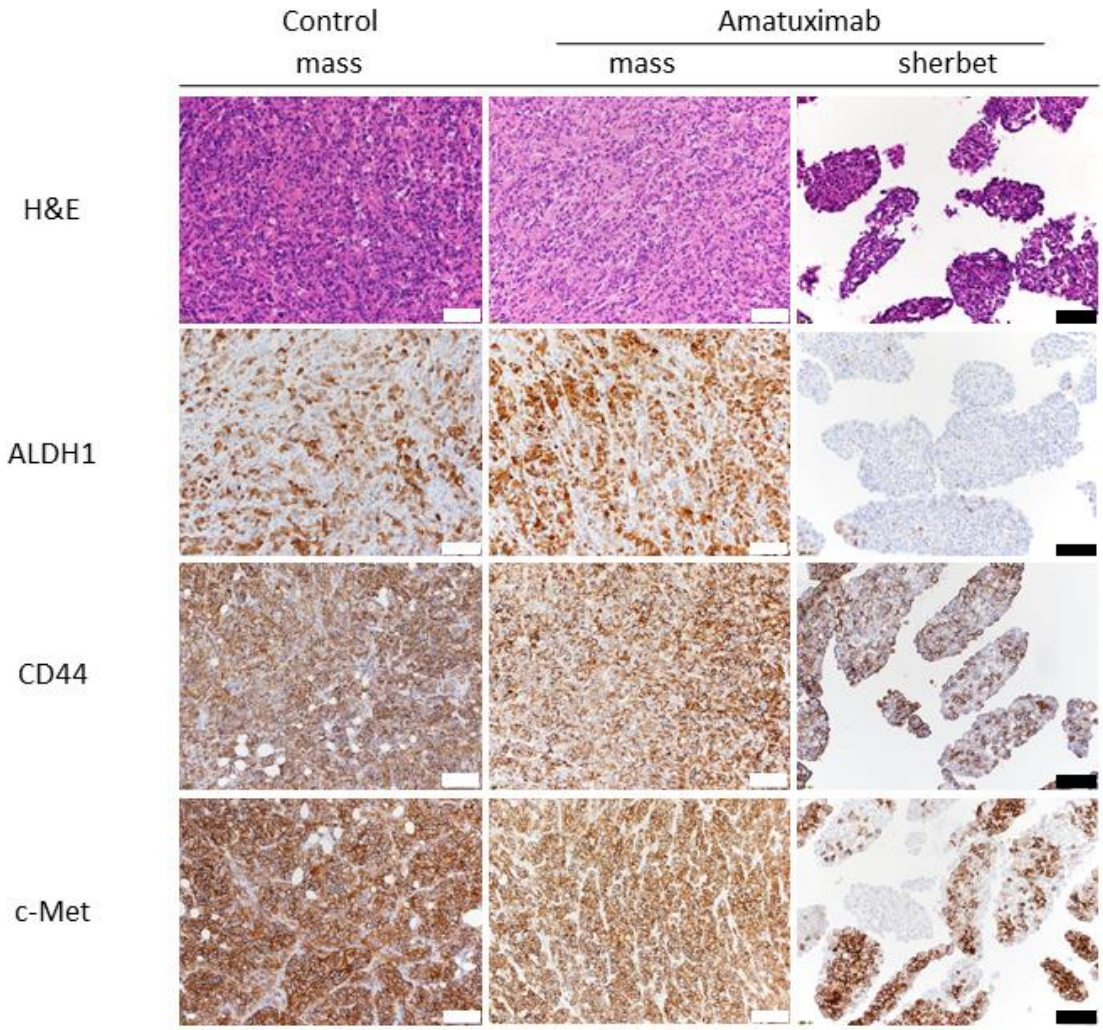


図 4D　癌幹細胞性に関連する分子発現の検討

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．スケールバーは 100μm を示す．

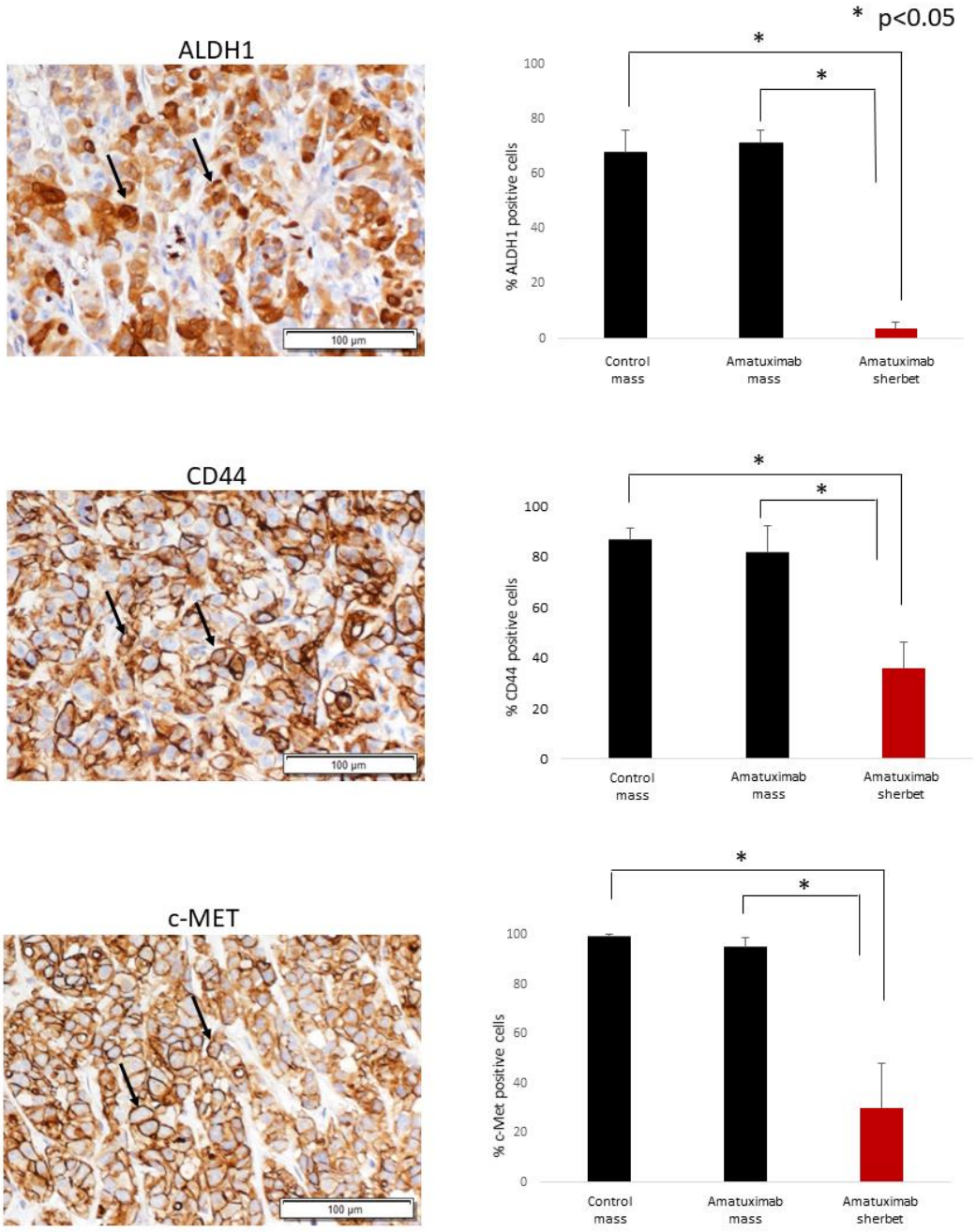


図 4E　癌幹細胞性に関連する分子発現の検討

各群でランダムに抽出した 6 視野における染色陽性細胞数の割合を計測し比較した．ALDH1，CD44，c-MET のいずれにおいても有意差をもって sherbet-like aggregates で陽性細胞数の低下を示した．矢印は典型的な染色陽性細胞を示す．スケールバーは 100μm を示す．

癌幹細胞性に関連する分子のうち，CD133 では他の分子と異なり sherbet-like aggregates で発現の増強がみられ，CXCR4 では腹膜播種巣と sherbet-like aggregates で明らかな差を認めなかった(図 4F).

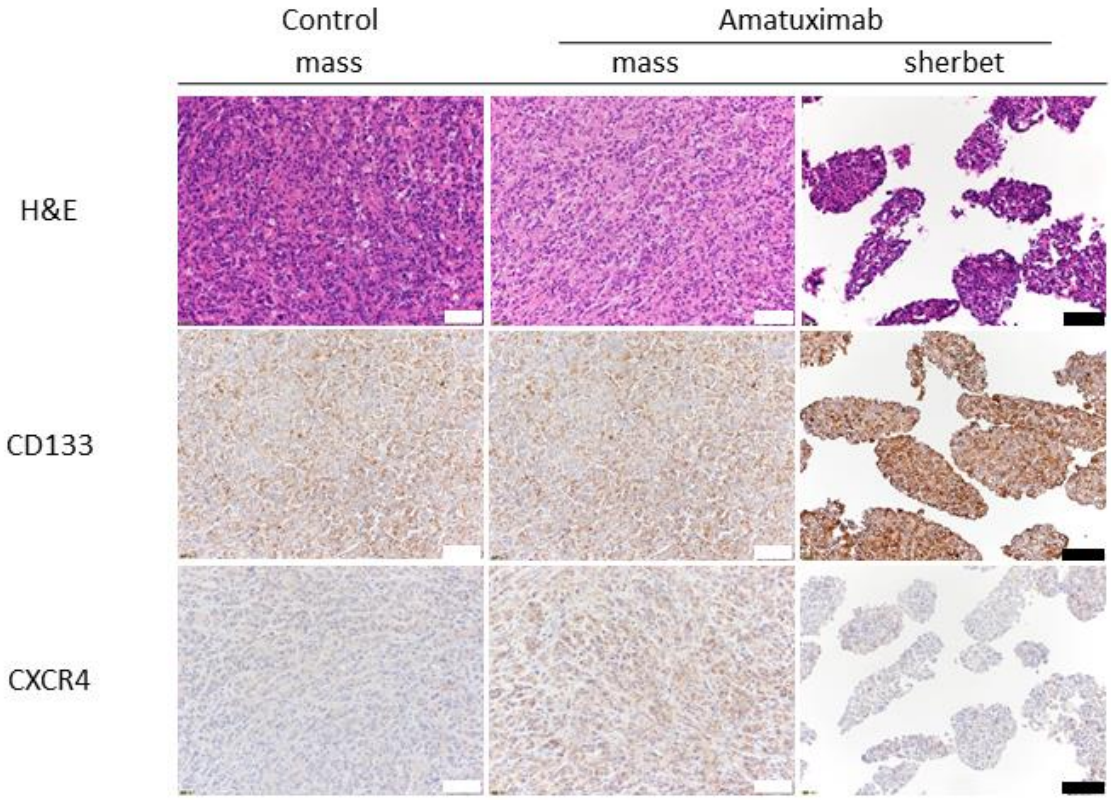


図 4F　癌幹細胞性に関連する分子発現の検討

CD133 は他の分子と異なり sherbet-like aggregates で発現増強が見られ，また CXCR4 はいずれの群においても明らかな差を認めなかった．スケールバーは 100μm を示す.

④mRNA レベルでの各種発現の検討

免疫染色で差を認めた ALDH1，CD44，c-MET，E-cadherin についてパラフィン包埋検体より total RNA を抽出し quantitaitve RT-PCR により各組織での mRNA 発現を比較検討した．いずれの分子においても免疫組織染色と同様の結果であった(図 4G).

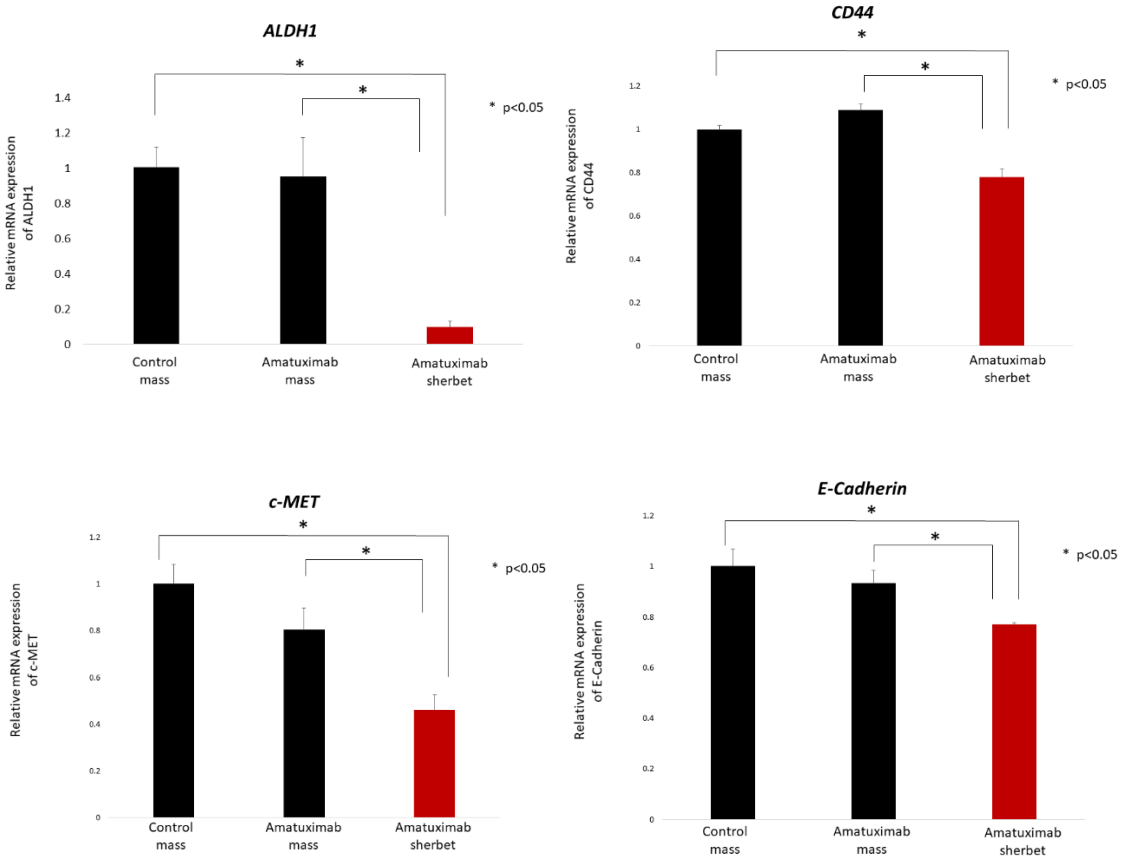


図 4G　腹膜播種巣及び sherbet-like aggregates での免疫組織染色で変化のあった分子の quantitative RT-PCR による検討

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.

3) 腹膜に接着する sherbet-like aggregates の分子発現の検討

さらに病理組織の観察を進めると,腹膜内に浸潤した播種巣を形成した組織の周囲に腹膜に付着するように接している膵癌細胞集塊(以下 adhesive sherbet-like aggregates)があることが分かり，これらは HE 染色上形態学的には腹水中に浮遊する sherbet-like aggregates に近似していた(図 5A). adhesive sherbet-like aggregates は Amatuximab 群，control 群のいずれにおいても確認され，また各群において頻度の差を認めなかった.

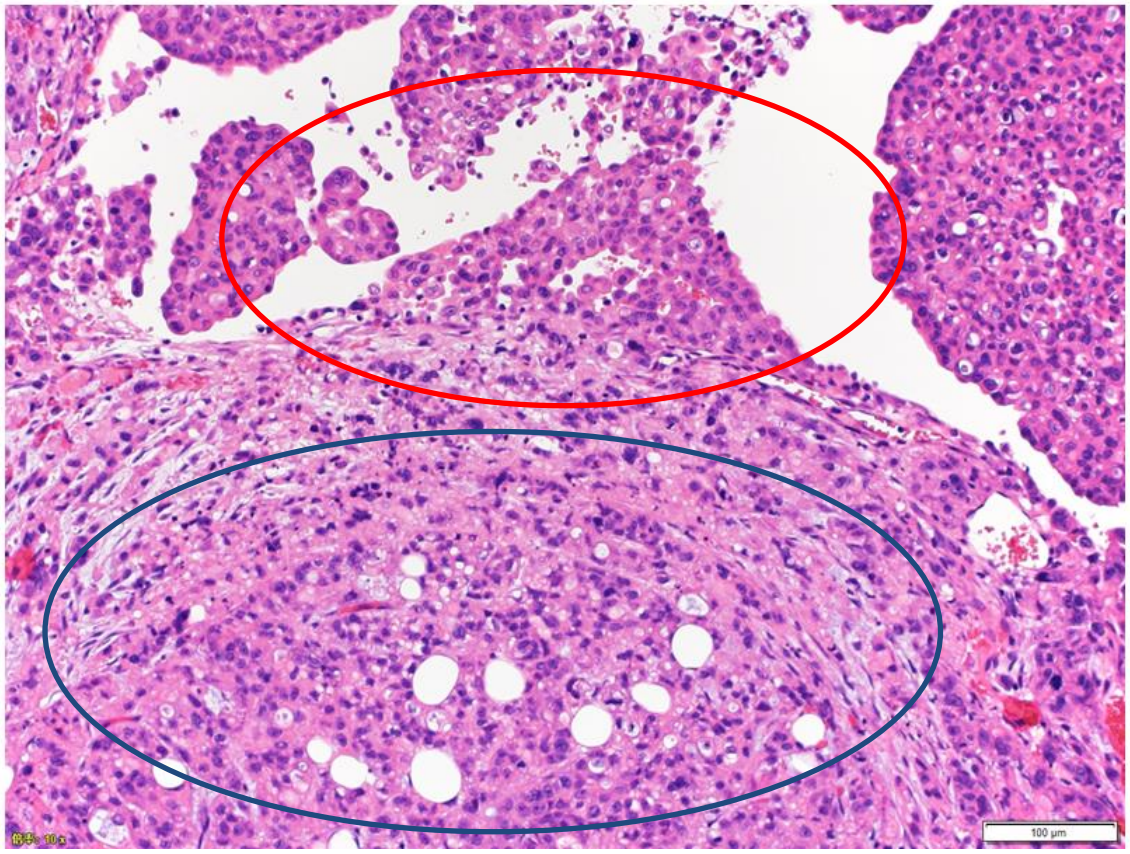


図 5A　腹膜に接着する sherbet-like aggregates

腹膜播種巣(青円)の辺縁の腹膜に接するように存在する膵癌細胞集塊(赤円)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.

これらの腹膜に接着する adhesive sherbet-like aggregates のタンパク発現を観察すると，sherbet-like aggregates よりもむしろ腹膜播種巣に近似していることが分かった(図 5B，図 5C).

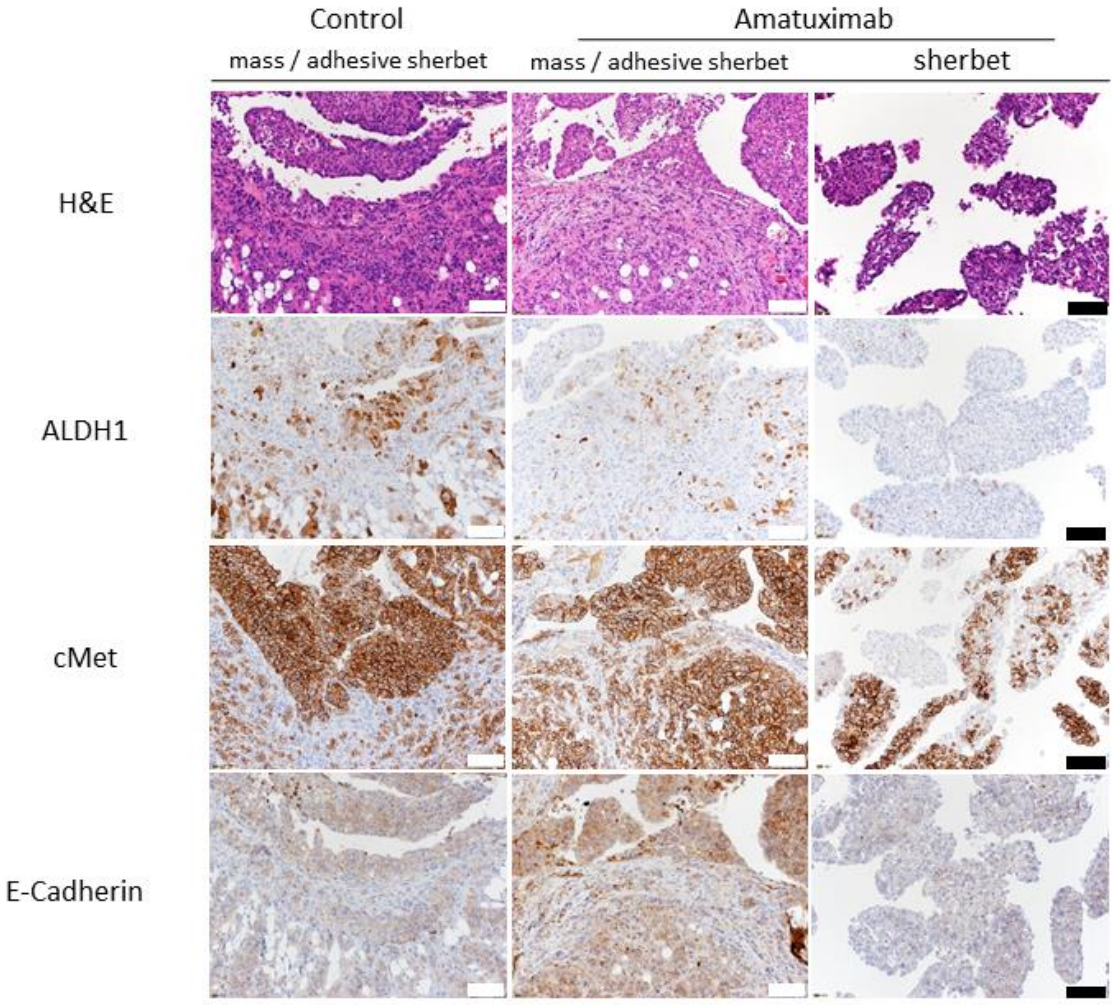


図 5B　adhesive sherbet-like aggregates の分子発現の検討

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．スケールバーは 100μm を示す.

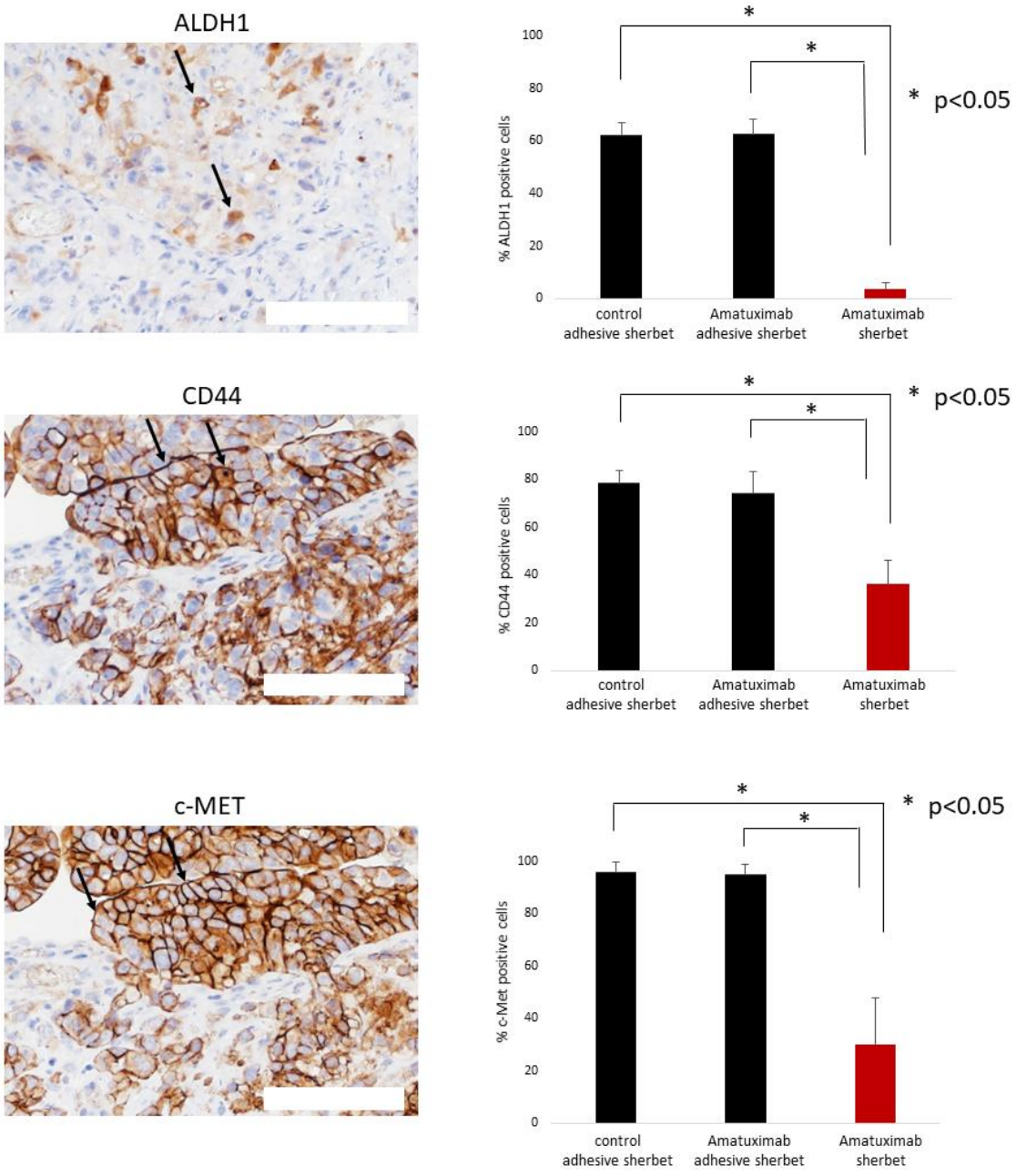


図 5C　adhesive sherbet-like aggregates の分子発現の検討

各群でランダムに抽出した 6 視野における染色陽性細胞数の割合を計測し比較した．adhesive sherbet-like aggregates に比較し腹水中に浮遊している sherbet-like aggregates は各分子の発現低下がみられ，adhesive sherbet-like aggregates の分子発現の比率は腹膜播種巣に近似していた．矢印は典型的な染色陽性細胞を示す．スケールバーは 100μm を示す．

4) *in vitro* での Amatuximab による膵癌細胞株への効果の検討

①Amatuximab による膵癌細胞株の増殖への影響

Amatuximab による MSLN 阻害が膵癌細胞株の増殖に及ぼす影響を検討した．Amatuximab を各種濃度(0,0.01,1 または 100 μg/ mL)で添加した培地で AsPC-1 および MIA Paca-2 を培養した．いずれの細胞株でも増殖に対する効果を有さないことが観察された(図 6A).

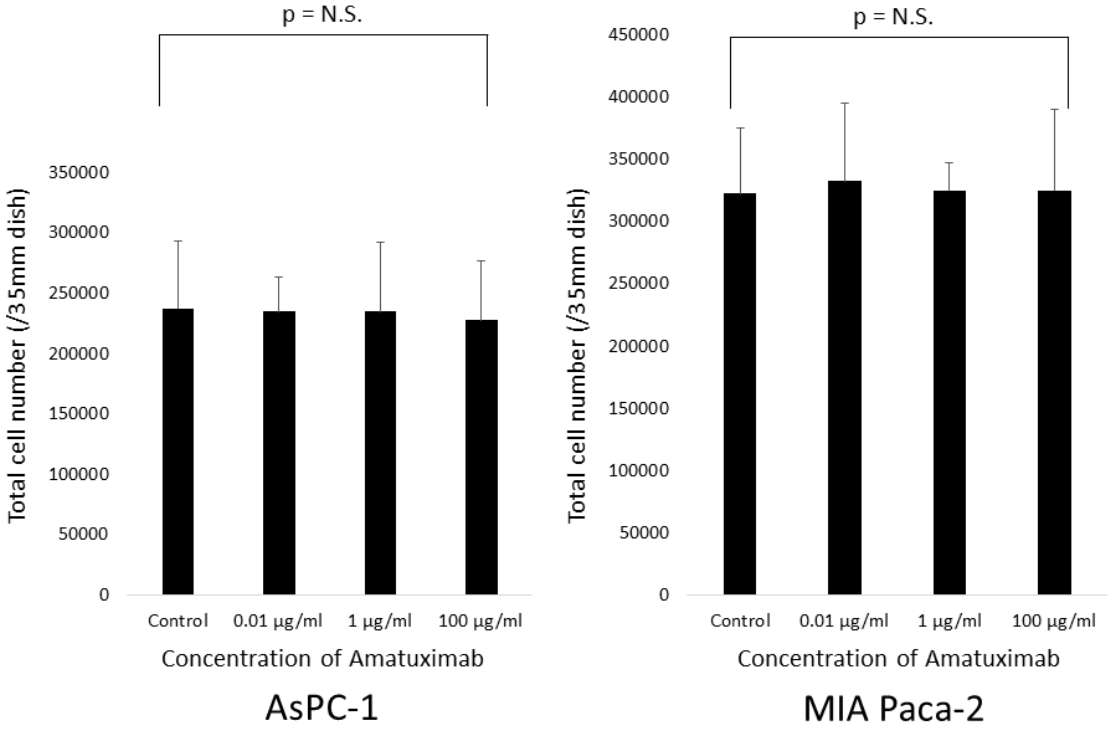


図 6A　35 mm dish に 1.5×10^5 cell/2mL で各種細胞を播種し，播種時より Amatuximab を添加した．48 時間培養後に trypan blue 染色を行い生存細胞数を計算した．MSLN の発現に関わらず AsPC-1，MIA Paca-2 のいずれにおいても Amatuximab の添加による増殖への影響は認めなかった．エラーバーは 4 回行った実験の標準誤差を示す.

②Amatuximab による膵癌細胞株の遊走能、浸潤能への影響

次に Amatuximab が AsPC-1 および MIA Paca-2 の浸潤能および遊走能に及ぼす影響を検討した. 対照群と比較して Amatuximab 群では MSLN 高発現株である AsPC-1 において浸潤能および遊走能の両方が抑制されることを示した．対照的に Amatuximab は MSLN 低発現株である MIA Paca-2 の浸潤能および遊走能のいずれにも影響を与えなかった（図 6B、図 6C）.

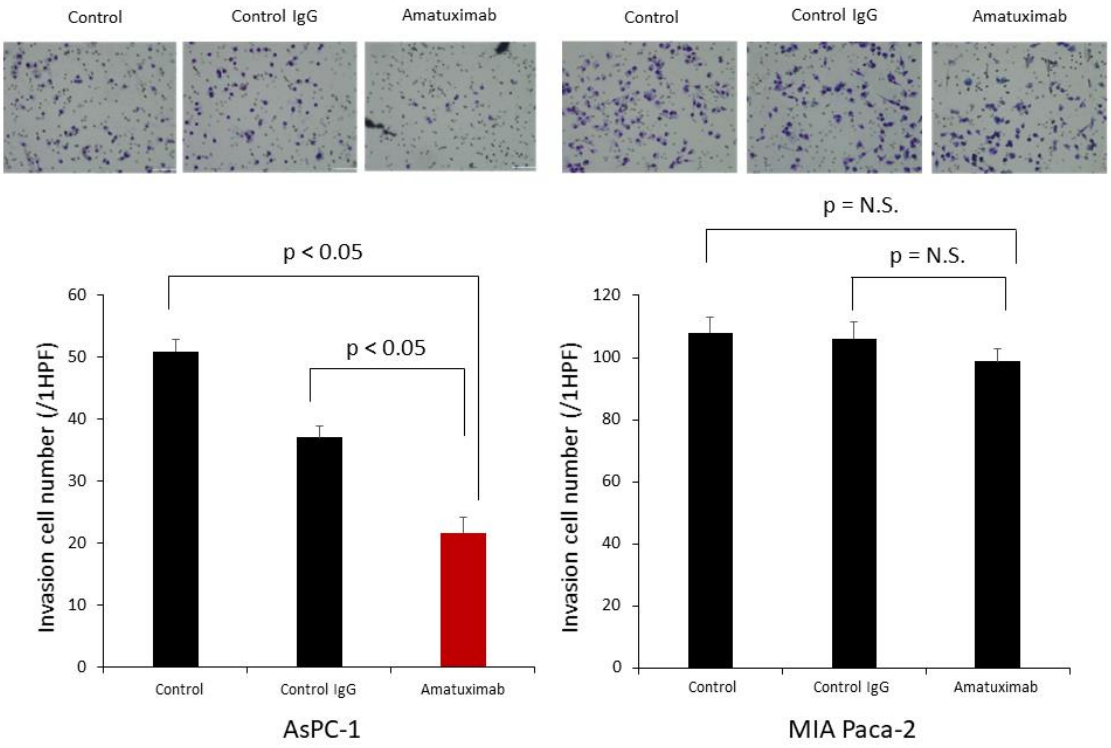


図 6B　Amatuximab の浸潤能への影響

マトリゲルチャンバーの上室に 2.5×10^5 cell/well の膵癌細胞株を FBS(-)培地で播種し，下室は FBS(+)，Amatuximab/control IgG 100 μg/ml 添加培地とした．24 時間後に浸潤した細胞数をディフクイックで染色し顕微鏡で計測した．Amatuximab の投与量，培養時間については前任者の検討結果を参照した．MSLN 高発現株である AsPC-1 では Amatuximab 群で浸潤能が抑制されたのに対し MSLN 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．control 群は薬物(Amatuximab、control IgG)非添加群とした．エラーバーは 10 回行った実験の標準誤差を示す.

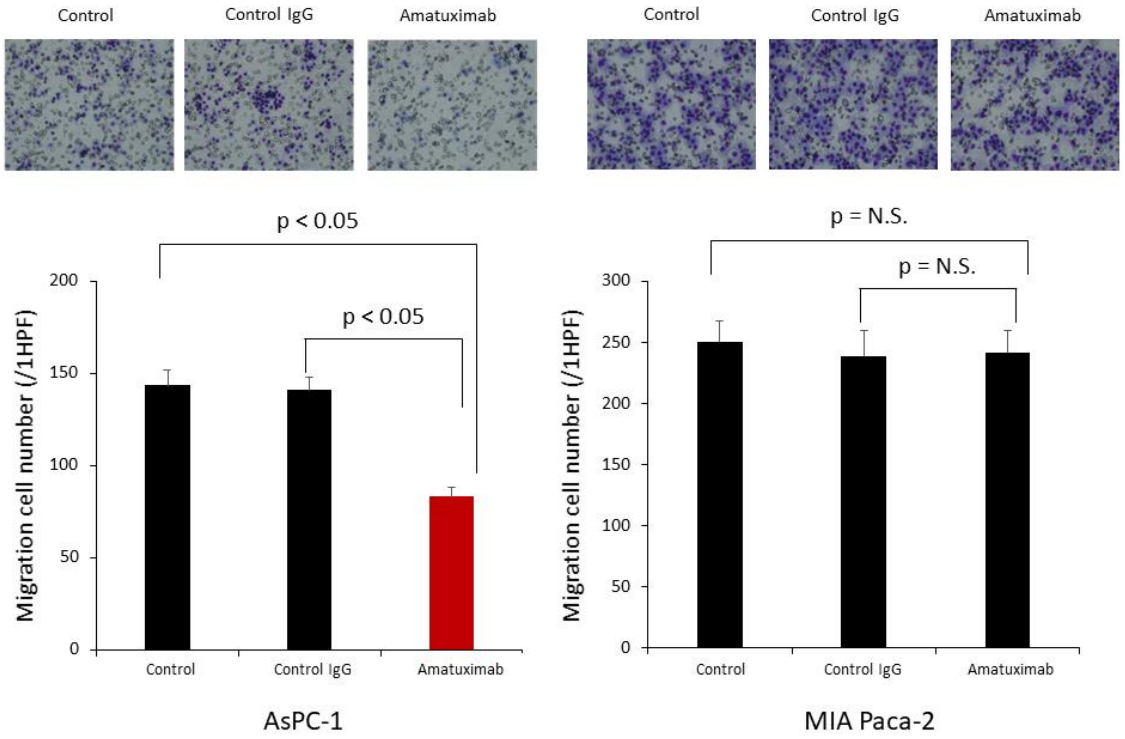


図 6C　Amatuximab の遊走能への影響

ポアサイズ 8 μm の上のインサートに 2.5×10^5 cell/well の膵癌細胞株を FBS(-)培地で播種し，下の well は FBS(+)，Amatuximab/control IgG 100 μg/ml 添加培地とした．24 時間後に浸潤した細胞数をディフクイックで染色し顕微鏡で計測した．Amatuximab の投与量，培養時間については前任者の検討結果を参照した. MSLN 高発現株である AsPC-1 では Amatuximab 群で遊走能が抑制されたのに対し MSLN 低発現株である MIA Paca-2 ではいずれの群でも遊走能に変化を認めなかった．control 群は薬物(Amatuximab、control IgG)非添加群とした．エラーバーは 15 回行った実験の標準誤差を示す.

③Amatuximab による各種分子発現への影響

イ) MSLN 及び EMT に関連する分子への影響

腹膜播種モデルマウスの組織で確認された sherbet-like aggregates での分子発現変化を参考にして *in vitro* での分子変化を検討した．まず MSLN 及び EMT に関連する分子の変化を検討した．AsPC-1 及び MIA Paca-2 を Amatuximab 存在下，非存在下で培養しこれらのタンパク発現を検討した．いずれの細胞株でも MSLN, EMT に関連する分子に発現の変化を認めなかった(図 7A).

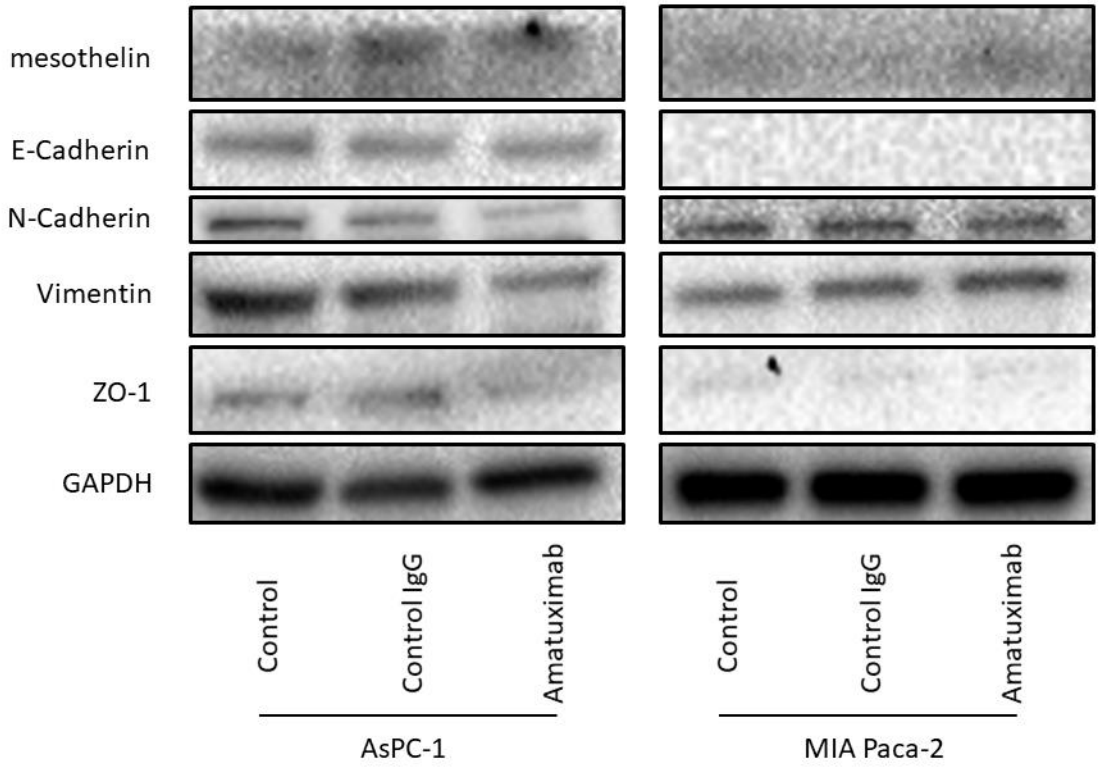


図 7A　Amatuximab による MSLN、EMT 関連の分子発現の検討

10 cm dish に AsPC-1 及び MIA Paca-2 を 1.5×10^6 cell/dish ずつ播種した．播種時より Amatuximab 及び control IgG を 100 μg/ml の濃度で添加した．24 時間後に細胞を回収しタンパクを抽出した．MSLN 高発現株である AsPC-1 と低発現株である MIA Paca-2 のいずれにおいても MSLN, EMT 関連分子の発現に差を認めなかった．

ロ）増殖及び生存に関連する分子への影響

続いて、増殖及び生存に関連する分子について同様の方法で抽出したタンパクを用いて検討した．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．この現象は MSLN 低発現株である MIA Paca-2 では見られなかった(図 7B).

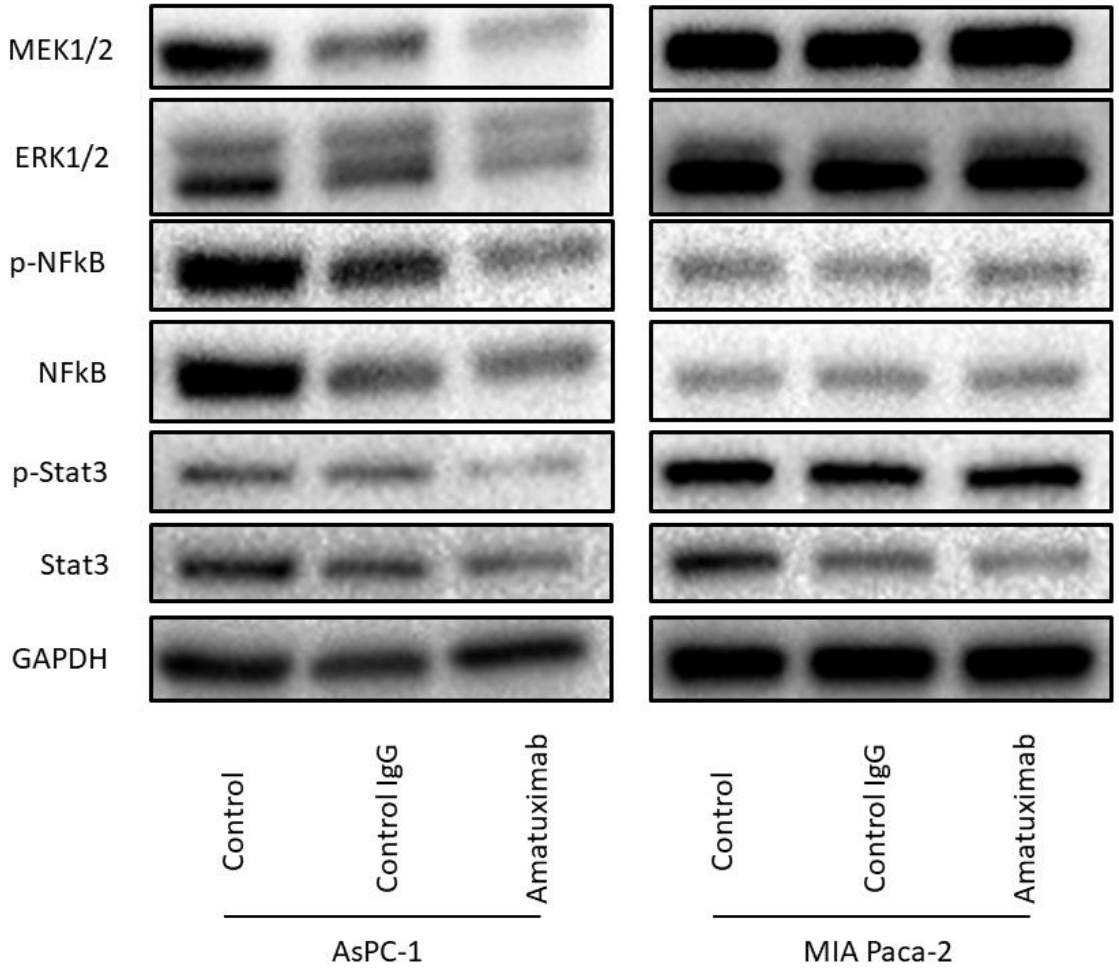


図 7B　Amatuximab による増殖及び生存に関連する分子発現の検討

10 cm dish に AsPC-1 及び MIA Paca-2 を 1.5×10^6 cell/dish ずつ播種した．播種時より Amatuximab 及び control IgG を 100 μg/ml の濃度で添加した．24 時間後に細胞を回収しタンパクを抽出した．MSLN 高発現株である 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. 対照的に低発現株である MIA Paca-2 では Amatuximab 添加による変化を認めなかった.

ハ) 癌幹細胞性に関連する分子への影響

最後に sherbet-like aggregates で著明な変化をきたした CSC に関連する分子の検討を行った．組織で最も変化の著明であった ALDH1 はこの実験系では Amatuximab 添加による明らかな変化を認めなかったが, 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．MSLN 低発現株の MIA Paca-2 ではこの変化を認めなかった(図 7C).

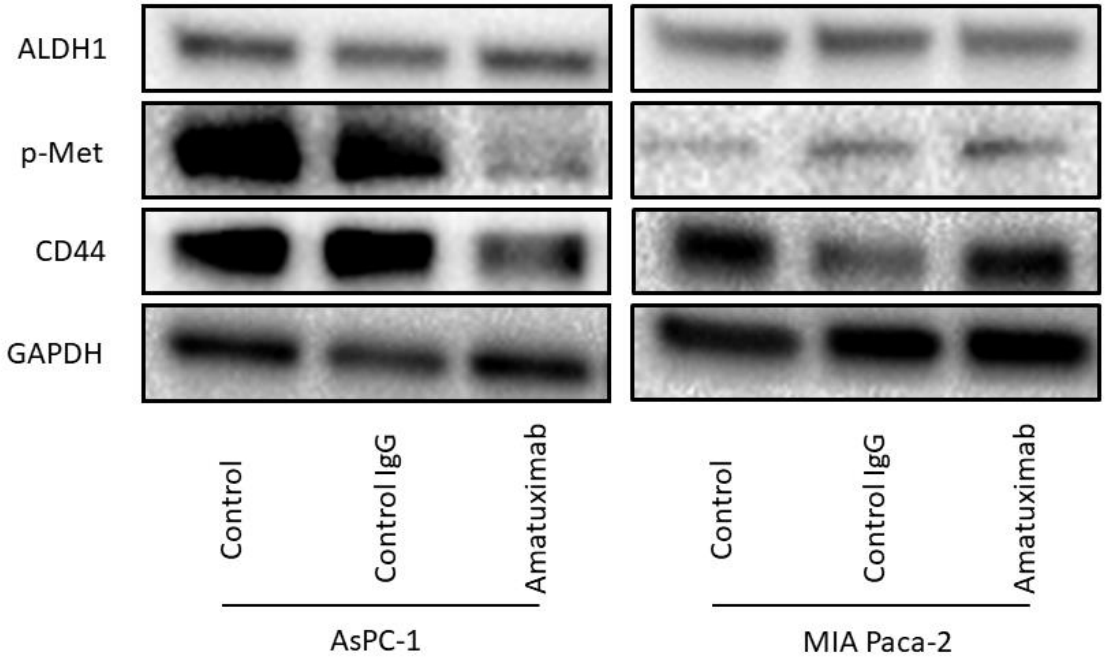


図 7C　Amatuximab による CSC 関連の分子発現の検討

10 cm dish に AsPC-1 及び MIA Paca-2 を 1.5×10^6 cell/dish ずつ播種した．播種時より Amatuximab 及び control IgG を 100 μg/ml の濃度で添加した．24 時間後に細胞を回収しタンパクを抽出した．MSLN 高発現株である AsPC-1 において Amatuximab 群で p-MET, CD44 の発現が低下していた．対照的に低発現株である MIA Paca-2 では Amatuximab 添加による変化を認めなかった．

④膵癌細胞株における Amatuximab および GEM 共添加の効果

最後に、膵癌細胞株における Amatuximab および GEM との共添加の効果を検討した.

本実験に先立ち，播種細胞数，GEM 濃度及び培養時間の検討を行った.

35mm dish に AsPC-1 を 4 群(3.0×10⁴ 個/dish, 6.0×10⁴ 個/dish, 15.0×10⁴ 個/dish，30.0×10⁴ 個/dish)に分けて播種し培養した. 培養開始 1 日後，4 日後，5 日後，8 日後に細胞を回収し生存細胞数を計測した. 播種細胞数が 15.0×10⁴ 個/dish，4 日目までが単純増加の傾向にあり，続く実験を播種細胞数 15.0×10⁴ 個/dish で行う方針とした(図 8A).

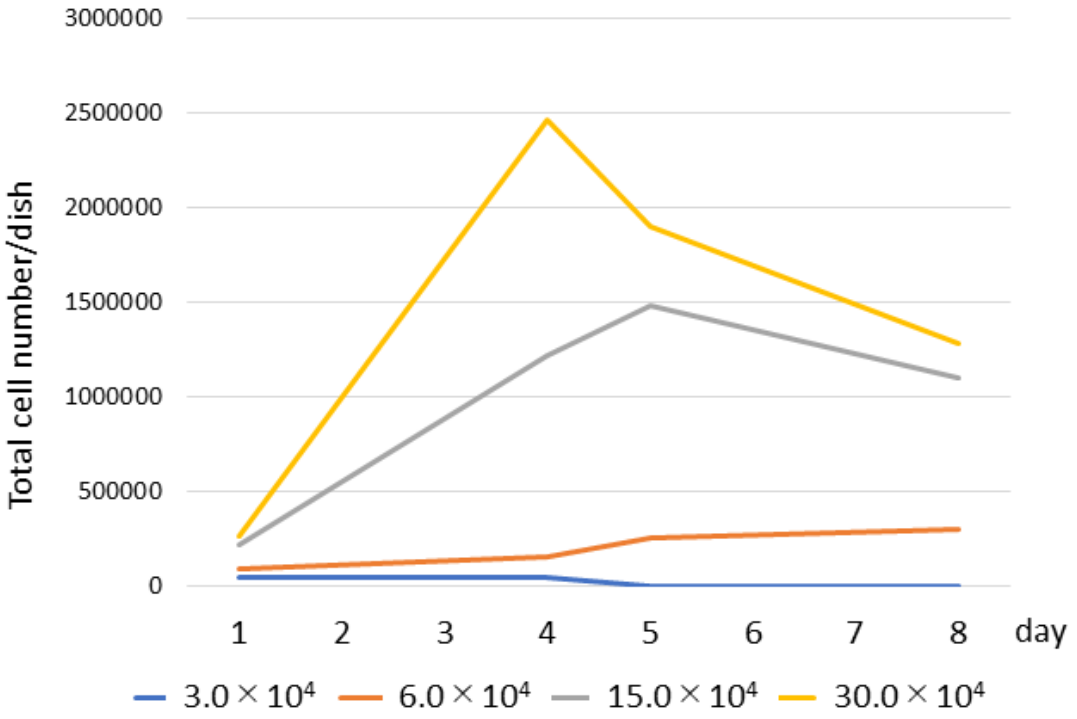


図 8A　播種細胞数の検討

35mm dish に AsPC-1 を 4 群(3.0×10⁴ 個/dish，6.0×10⁴ 個/dish，15.0×10⁴ 個/dish，30.0×10⁴ 個/dish)に分けて播種し培養した. 培養開始 1 日後, 4 日後, 5 日後, 8 日後に細胞を回収し生存細胞数を計測した. 15.0×10⁴ 個/dish 播種した 4 日目までの結果が単純増殖を示したため，続く実験を播種細胞数 15.0×10⁴ 個/dish とした.

薬剤不添加，control IgG 100 μg/ml ，Amatuzimab 100 μg/ml ,

Amatuzimab 100 μg/ml 及び GEM 1μM, Amatuzimab 100 μg/ml 及び GEM 10μM, Amatuzimab 100 μg/ml 及び GEM 100μM に分けて培養後 1 日目, 4 日目に生存細胞数を計測した(図 8B). GEM を 100μM 添加した群ではほとんどの細胞が生存しないことが分かったため, GEM 濃度は 1μM が適切と考えた.

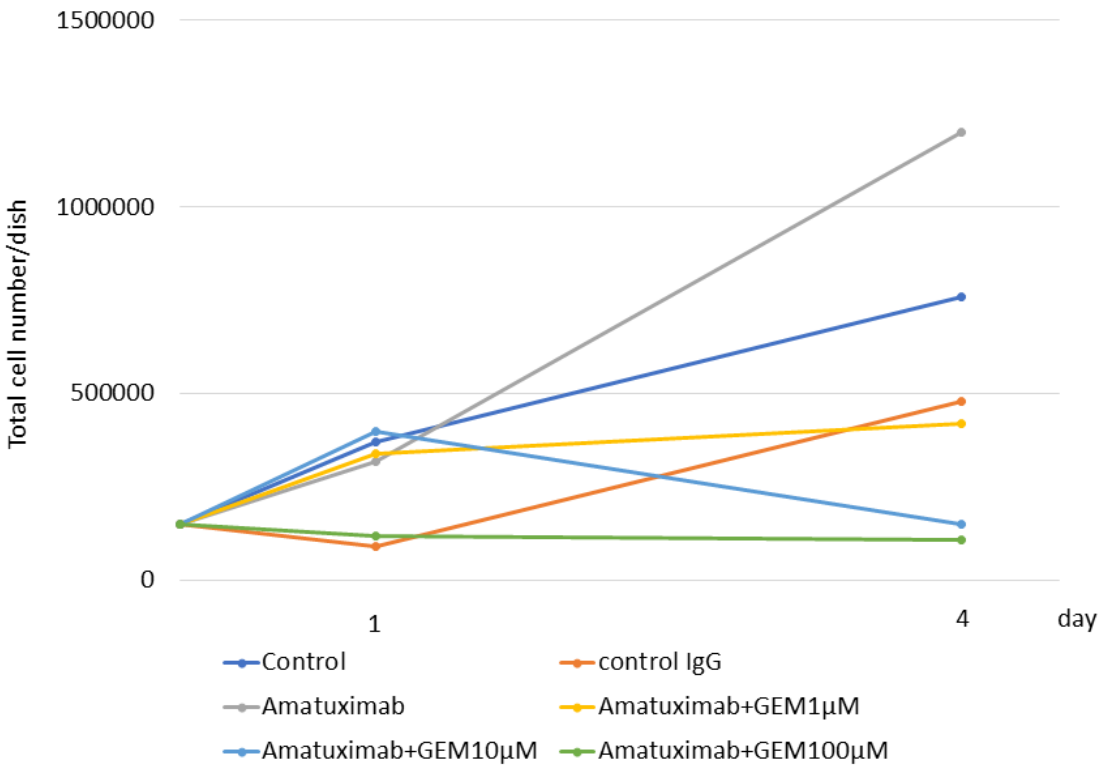
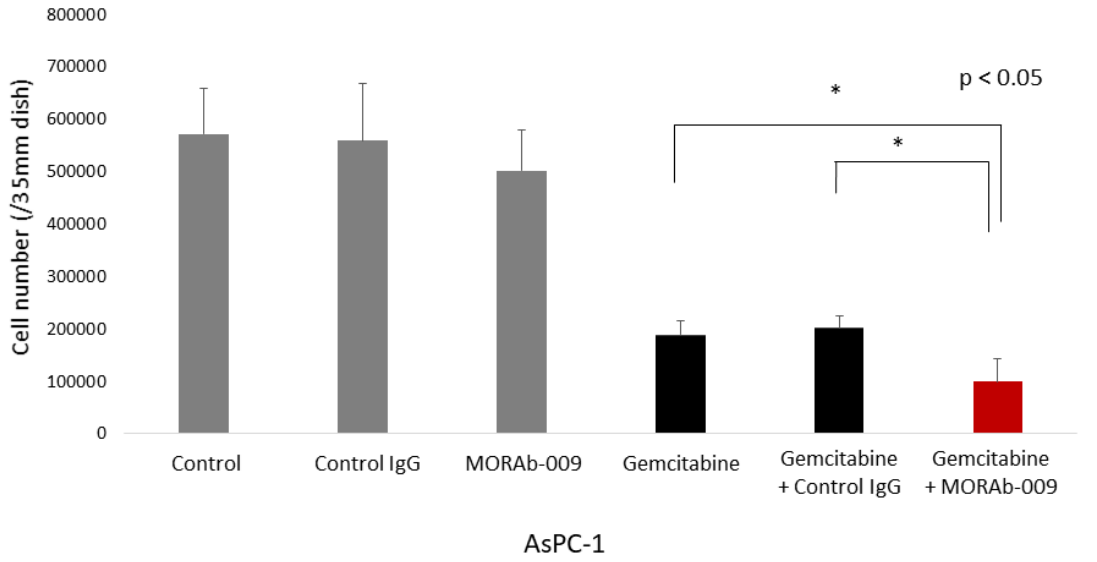


図 8B　GEM 濃度の検討

GEM を 10μM 以上添加した群ではほとんどの細胞が生存しないことが分かったため, GEM 濃度は 1μM が適切と考えた. 培養時間としては, 1 日目では差がつかない可能性を考えた. また前実験でタンパク発現の変化がみられた 48 時間の培養が, 本実験でも最も変化がとらえられる可能性があると考え 2 日目での検討を行う方針とした.

Amatuximab と GEM を共添加することでゲムシタビン単独群よりも 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, MSLN 低発現である MIA Paca-2 では観察されなかった(図 8C).



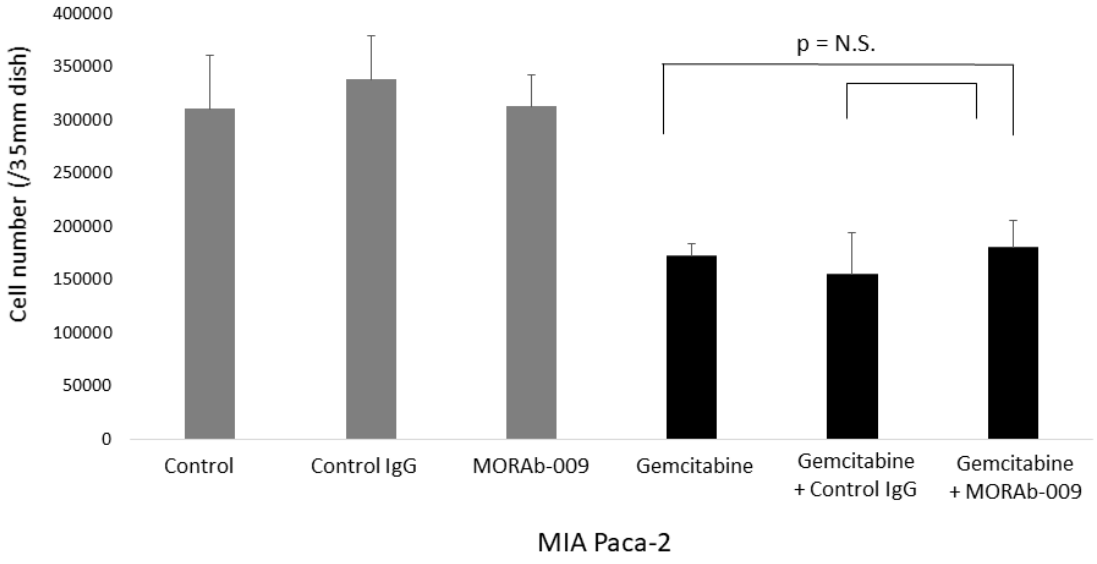


図 8C　Amatuximab と GEM の共添加による効果の検討

35 mm dish に AsPC-1 及び MIA Paca-2 を 1.5×10^5 cell/2mL 播種した．播種時より GEM 1μM，Amatuximab or control IgG 100 μg/mL を添加した．48 時間培養後に細胞を回収，生細胞数を計測した．MSLN 高発現株である AsPC-1 では GEM と Amatuximab の共添加により増殖が有意に抑制されたのに対し MSLN 低発現株である MIA Paca-2 ではいずれの群でも変化を認めなかった．エラーバーは 12 回行った実験の標準誤差を示す．

5) 本研究で得られた結果からの仮説

本研究より得られた結果からの腹膜播種モデルでの現象を説明する仮説をシェーマで示した(図 9). 腹腔内に注入された AsPC-1 は, Control 群では腹膜への付着及び浸潤, 増殖の課程を経て, 播種巣を形成する. 安定した播種巣では脱分化に関連する分子が発現し GEM への抵抗性が増強される. Amatuximab を投与された群では一部は Control 群と同様に播種巣を形成するが, 多くは Amatuximab の直接作用及び抗 MSLN 作用による腹膜付着阻害をきたし, sherbet-like aggregates として腹水中に浮遊する. Sherbet-like aggregates は腹膜付着との経時的な前後関係は不明だが, 脱分化に関連する分子を発現せず GEM への感受性を示し, GEM を併用した際に消失する.

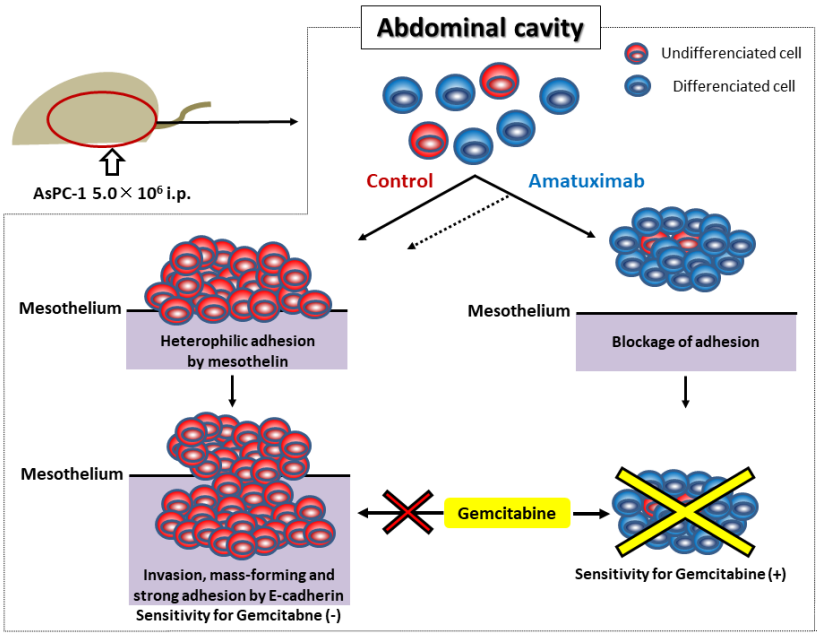


図 9　腹膜播種モデルでの現象のシェーマ

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，MSLN 高発現株特異的に浸潤能，遊走能や GEM 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 MSLN 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(Tang et al., 2013)．また Stat3 は，発癌に関わる形質転換(DeArmond et al., 2003; Scholz et al., 2003)，細胞生存および増殖(Scholz et al., 2003; Toyonaga et al., 2003)，およびアポトーシス抵抗性(Greten et al., 2002)において重要な役割を果たし，膵癌組織及び膵癌細胞株において異常に活性化されていることが明らかとなっている．Bharadwaj らは，膵癌細胞株における MSLN の過剰発現が Stat3 の活性化を誘導することを示した(Bharadwaj et al., 2008). Bharadwaj らはさらに、MSLN が NFκB/Akt 依存性抗アポトーシス経路を誘導しすることで 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を示している．膵癌細胞における MSLN の過剰発現は，NFκB を恒常的に活性化することでより高い IL-6 産生を維持する．逆に MSLN の発現を抑制することで IL-6 レベルは低下することが分かっている．MSLN 過剰発現を伴う膵癌細胞において IL-6 の高産生状態は，Stat3 を誘導し，結果として cyclin E/CDK2 複合体の発現を上昇させ G1- S 移行を加速する(Bharadwaj et al., 2008)．NFkB および Stat3 の活性化は Bcl-xl および Bcl-2 の発現を誘導し，アポトーシスシグナルの伝達を阻害する(Aggarwal, 2004; Aggarwal et al., 2006; Bharadwaj et al., 2011)．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がある(Bharadwaj et al., 2011; Chang et al., 2009)．MSLN は PI3K 活性下で Akt のリン酸化を速やかに刺激し，Bad および Bax などのアポトーシス促進因子の発現を阻害し，かつ Bcl-2 および Mcl などの抗アポトーシス遺伝子の発現を促進することで TNF-α 誘導性アポトーシスから癌細胞を保護する．MSLN を過剰発現させた MIA Paca-2 では TNF-α への曝露により Cyclin A の増加が報告されてい

る(Bharadwaj et al., 2011).

他の報告では MSLN が ERK シグナル伝達経路(Chang et al., 2009; Uehara et al., 2008)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．ヒト乳癌モデルでは MSLN が癌細胞の足場非依存性の増殖を誘導し，プロアポトーシスタンパクである Bim の発現を抑制し ERK シグナル伝達経路の刺激を介してアノイキス誘導性アポトーシスへの抵抗性を獲得する(Uehara et al., 2008)．白金とシクロホスファミドで治療した卵巣上皮癌患者のうち,化学療法抵抗性患者は化学療法への感受性を有する患者よりも有意に高い MSLN 発現を示した．さらに C57BL/6 マウスの腹膜細胞に MSLN を過剰発現させることで PI3K/Akt および MAPK/ERK 経路の両方を介して腹膜細胞をパクリタキセル誘発アポトーシスから保護することができた(Chang et al., 2009)．Amatuximab を含む MSLN mAb は MSLN の重要なシグナル伝達ドメインではなく N 末端領域 I を標的とするため，癌細胞増殖を阻害することができないことが報告されている．我々の結果は既報と同様に Amatuximab が細胞増殖を阻害しなかったが，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．

本研究では Amatuximab 投与により腹膜播種モデルで出現した sherbet-like aggregates で CSC に関連する分子の発現が低下した．また *in vitro* の系でも MSLN 高発現膵癌細胞株における Amatuximab への曝露による CSC 関連分子の発現抑制が認められた．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る(Reya et al., 2001)．これらの細胞は無制限の増殖能，自己複製能および腫瘍を構成するより分化した細胞を生成する能力を持つ(Szilvassy et al., 1990)．CSC は非対称的に分裂し，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(Clevers, 2005). 癌における CSC に関する最初の報告は 1994 年にヒト急性骨髄性白血病（AML）の研究によってもたらされた(Lapidot et al., 1994)．固形癌における CSC に関連した報告は 2003 年 Al-Hajj らより初めてなされた(Al-Hajj et al., 2003)．これまでに CSC は前立腺癌(Collins et al., 2005)，卵巣癌(Bapat et al., 2005)，肺癌(Eramo et al., 2008)，胃癌(Takaishi et al., 2009)，骨肉腫(Tirino et al., 2008)，軟骨肉腫(Tirino et al., 2011)，神経膠芽細胞腫(Singh et al., 2003)および黒色腫(Fang et al., 2005)を含む様々な固形腫瘍において同定されている．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．分化した腫瘍細胞とは対照的に

CSC の細胞周期は比較的静止しており，細胞のサイクル速度が遅い．これらの特徴により急速に分裂している細胞を標的とするのに有効な化学療法に対し CSC は抵抗性を示す(Graham et al., 2002)．実際に化学療法後に CSC の数が増加することが報告されている．実際に化学療法後に CSC の割合が増加することが多種の悪性腫瘍において確認されている．GEM の曝露を受けた膵癌細胞株では CD133 陽性 CSC の数の増加がみられる(Mueller et al., 2009)．結腸直腸癌ではシクロホスファミドおよびイリノテカンによる治療後，ALDH 酵素活性を有する CSC の増加が確認された(Dylla et al., 2008)．肺癌細胞株をドキソルビシン，シスプラチン，またはエトポシドで処理すると CSC が選択的に残存した(Levina et al., 2008)．乳癌のドキソルビシンおよびシクロホスファミド治療は，CD44+/CD24-細胞の割合が増加した(Li et al., 2008b)．異なる複数の方法により CSC を同定および単離することが可能である．具体的には，CSC 特異的細胞表面マーカー(Collins et al., 2005; Eramo et al., 2008; Takaishi et al., 2009; Tirino et al., 2008; Tirino et al., 2011)に基づくフローサイトメトリー，Hoechst 33342 排除によるサイドポピュレーション（SP）の検出(Moserle et al., 2008)および足場非依存性増殖を利用しての単離といった方法がある(Rybak et al., 2011)．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(Bao et al., 2013; Habib and Saif, 2013; Hermann et al., 2007; Kim et al., 2011; Li et al., 2007; Li et al., 2009; Takao et al., 2012)等がある．これらの CSC マーカーが共発現することで CSC が認識される，あるいは膵癌細胞が CSC の機能を有するに至ると考えられている(Lee et al., 2008; Mizukami et al., 2014; Xu, 2013)．CD133 陽性膵癌 CSC は，膵癌の浸潤の先進部で CXCR4 受容体を共発現する(Lee et al., 2008)．CD24/CD44/EPCAM および CD133 等多数の CSC マーカーが同時発現している場合、より化学療法および放射線療法に対して高度の耐性を有している可能性が高い．しかしながらこれらの異なる CSC マーカーの間に完全なオーバーラップが見出されないことが多い(Kure et al., 2012)．化学療法で用いられる薬剤の多くがこれらの膵癌 CSC を根絶することができず，それが腫瘍の再発および転移をもたらす最大の理由と考えられている．細胞表面マーカーである CD24，CD44 および ESA を発現する膵癌 CSC は，免疫不全マウスに対する異種移植で継代を繰り返した後に細胞表面マーカー表現型を維持することが観察された(Bao et al., 2013; Lee et al., 2008; Li et al., 2007)．c-MET 陽性細胞は *in vitro* での球体を容易に形成したが，c-MET 陰性細胞は形成することができなかった(Bao et al., 2013)． CD44 と c-MET

を共発現している細胞は，腫瘍形成能・再生能の増強を示した(Bao et al., 2012)．Kim ら複数の研究者より、CD133 の状態にかかわらず高い ALDH1 活性を有する膵癌細胞は，化学療法により誘発される細胞死に耐性であり，腫瘍形成性が高いことが報告されている(Bao et al., 2013; Kim et al., 2011)．

我々は以前 CD44 陽性細胞および ALDH1 陽性細胞が化学放射線耐性を示し，一方 CD133 陽性細胞では化学放射線感受性を示し得ると報告した(Mizukami et al., 2014)．本研究では，Amatuzimab による治療で出現した sherbet-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 Amatuximab 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．これらの結果はこれまでに我々が報告した結果と一部合致するものであった．He らは MSLN が EMT および癌幹細胞性を調節することを報告している(He et al., 2017). MSLN のノックダウンにより上皮性および接着に関連する分子の発現が上昇し, それに対し間葉系及び癌幹細胞性に関連する分子が抑制された. その結果, 癌細胞の自己複製能, 増殖能, 播種及び転移形成能が抑制された. 一方正常細胞における MSLN の過剰発現は，足場非依存性の増殖，遊走能および浸潤能を上昇させる．我々が知る限り，これは MSLN と CSC との間の関係を明示した最初の報告である．

今回我々は Amatuximab を投与された腹膜播種モデルマウスで出現した sherbet-like aggregates では増殖，幹細胞および化学療法抵抗性に関連する分子が抑制されることを示した．また腹膜に付着した adhesive sherbet-like aggregates では浮遊状態とは異なり，むしろ腹膜播種巣を形成した細胞群に近似した分子発現状況を示していた. 可塑性 CSC 理論が Marjanovic らにより提唱されている(Marjanovic et al., 2013)．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 MSLN 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． Stankevicius らはヒト結腸直腸癌細胞における癌幹細胞の足場を含む微環境の重要性を報告しており(Stankevicius et al., 2017)，2D 単層培養と比較して 3D 培養ではいくつか

の CSC マーカーの発現が増加した(Stankevicius et al., 2017)．我々は今回 Amatuximab 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．

総括及び結論

①本研究全体から得られた新知見

・膵癌腹膜播種モデルマウスに対する Amatuximab 投与により出現した Sherbet-like aggregates では，細胞の生存や増殖に関わる分子や CSC に関連する分子の発現が抑制された.

・腹膜に接着した adhesive sherbet-like aggregates では，形態学的には sherbet-like aggregates に似ているが分子発現の状況はむしろ腹膜播種巣に近似していた.

・in vitro の実験系において，Amatuximab の曝露により MSLN 高発現膵癌細胞株で選択的に浸潤能，遊走能の低下及び GEM への耐性の低下がみられた.

・in vitro の実験系において，Amatuximab の曝露により MSLN 高発現膵癌細胞株に選択的に細胞生存や増殖に関連する分子及び CSC に関連する分子の抑制が認められた.

②新知見の意義

・Amatuximab による MSLN 阻害が細胞生存や増殖に関連する因子及び CSC に影響を与えるという結果はこれまでにない知見である．MSLN 阻害による癌治療の可能性がより大きなものとなったといえる.

③今後の研究展開と課題

･MSLN 阻害がどのような経路を経て CSC 関連分子の発現を抑制しているのか.

・膵癌腹膜播種モデルでの現象を考えるにあたり，MSLN，CSC のみではなく接着や微小環境が抗癌剤耐性や細胞生存にどのように関わるのか.

上記を明らかにすることで Amatuximab による膵癌治療に新しい可能性が生まれると考える．また今回の検討では膵癌細胞株のみにとどまったが，今後膵癌以外の癌腫でも MSLN 発現を有するものであれば Amatuximab による治療が有効な可能性がある．また CSC や細胞生存といった癌の性質のより根源的な解明へつながる可能性があると思われる.

謝辞

本博士論文は，筆者が北海道大学大学院医学研究科消化器外科学分野 I 博士課程在学中において行った研究をまとめたものです．研究計画の立案から，基礎論文，博士論文作成の全ての過程に至るまで，終始厳しくも温かく御指導御鞭撻を賜りました北海道大学病院消化器外科 I 蒲池浩文先生へ心より感謝申し上げます．本研究を遂行し，基礎論文を作成するにあたり，多大なる御指導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分野 I 教授武冨紹信先生へ深く感謝申し上げます．また，研究遂行への御助言を賜りました北海道大学病院コンパニオン診断学研究部門畑中豊先生へ感謝申し上げます．Amatuximab 等の試薬を御提供下さった Morphotek inc. ImmunotherapyDevelopment Associate Director 古内恵司様へ感謝申し上げます．最後に，実験を共に手伝って下さり，論文作成にも多大なる御助言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分野 I 永生高広先生，川俣太先生，水上達三先生，堀米正敏様，小林希様，三好早香様，研究室の後輩の先生方に心より感謝申し上げます．

利益相反

本研究で使用した Amatuximab は Morphotek inc. より提供を受けたものである．その他開示すべき利益相反状態はない．

引用文献

Aggarwal, B.B. (2004). Nuclear factor-kappaB: the enemy within. Cancer Cell *6*, 203-208.

Aggarwal, B.B., Shishodia, S., Sandur, S.K., Pandey, M.K., and Sethi, G. (2006). Inflammation and cancer: how hot is the link? Biochem. Pharmacol. *72*, 1605-1621.

Al-Hajj, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A *100*, 3983-3988.

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.

Awasthi, N., Monahan, S., Stefaniak, A., Schwarz, M.A., and Schwarz, R.E. (2018). Inhibition of the MEK/ERK pathway augments nab-paclitaxel-based chemotherapy effects in preclinical models of pancreatic cancer. Oncotarget *9*, 5274-5286.

Bao, B., Ahmad, A., Azmi, A.S., Ali, S., and Sarkar, F.H. (2013). Overview of cancer stem cells (CSCs) and mechanisms of their regulation: implications for cancer therapy. Curr. Protoc. Pharmacol. *Chapter. 14*, Unit 14.25.

Bao, B., Ali, S., Banerjee, S., Wang, Z., Logna, F., Azmi, A.S., Kong, D., Ahmad, A., Li, Y., Padhye, S.*, et al.* (2012). Curcumin analogue CDF inhibits pancreatic tumor growth by switching on suppressor microRNAs and attenuating EZH2 expression. Cancer Res. *72*, 335-345.

Bapat, S.A., Mali, A.M., Koppikar, C.B., and Kurrey, N.K. (2005). Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. Cancer Res. *65*, 3025-3029.

Bast, R.C., Jr., Xu, F.J., Yu, Y.H., Barnhill, S., Zhang, Z., and Mills, G.B. (1998). CA 125: the past and the future. Int J Biol Markers *13*, 179-187.

Bharadwaj, U., Li, M., Chen, C., and Yao, Q. (2008). Mesothelin-induced pancreatic cancer cell proliferation involves alteration of cyclin E via

activation of signal transducer and activator of transcription protein 3. Mol. Cancer Res *6*, 1755-1765.
Bharadwaj, U., Marin-Muller, C., Li, M., Chen, C., and Yao, Q. (2011). Mesothelin confers pancreatic cancer cell resistance to TNF-alpha-induced apoptosis through Akt/PI3K/NF-kappaB activation and IL-6/Mcl-1 overexpression. Mol. Cancer *10*, 106.
Burris, H.A., 3rd, Moore, M.J., Andersen, J., Green, M.R., Rothenberg, M.L., Modiano, M.R., Cripps, M.C., Portenoy, R.K., Storniolo, A.M., Tarassoff, P.*, et al.* (1997). Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. J. Clin. Oncol. *15*, 2403-2413.
Chang, K., and Pastan, I. (1996). Molecular cloning of mesothelin, a differentiation antigen present on mesothelium, mesotheliomas, and ovarian cancers. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A *93*, 136-140.
Chang, M.C., Chen, C.A., Chen, P.J., Chiang, Y.C., Chen, Y.L., Mao, T.L., Lin, H.W., Lin Chiang, W.H., and Cheng, W.F. (2012). Mesothelin enhances invasion of ovarian cancer by inducing MMP-7 through MAPK/ERK and JNK pathways. Biochem. J. *442*, 293-302.
Chang, M.C., Chen, C.A., Hsieh, C.Y., Lee, C.N., Su, Y.N., Hu, Y.H., and Cheng, W.F. (2009). Mesothelin inhibits paclitaxel-induced apoptosis through the PI3K pathway. Biochem. J. *424*, 449-458.
Clarke, M.F., Dick, J.E., Dirks, P.B., Eaves, C.J., Jamieson, C.H., Jones, D.L., Visvader, J., Weissman, I.L., and Wahl, G.M. (2006). Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. Cancer Res. *66*, 9339-9344.
Clevers, H. (2005). Stem cells, asymmetric division and cancer. Nat. Genet. *37*, 1027-1028.
Collins, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. Cancer Res. *65*, 10946-10951.
DeArmond, D., Brattain, M.G., Jessup, J.M., Kreisberg, J., Malik, S., Zhao, S., and Freeman, J.W. (2003). Autocrine-mediated ErbB-2 kinase activation of STAT3 is required for growth factor independence of pancreatic cancer cell lines. Oncogene *22*, 7781-7795.
Ducreux, M., Boige, V., and Malka, D. (2007). Treatment of advanced

pancreatic cancer. Semin. Oncol. *34*, S25-30.
Dylla, S.J., Beviglia, L., Park, I.K., Chartier, C., Raval, J., Ngan, L., Pickell, K., Aguilar, J., Lazetic, S., Smith-Berdan, S.*, et al.* (2008). Colorectal cancer stem cells are enriched in xenogeneic tumors following chemotherapy. PLoS One *3*, e2428.
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.
Einama, T., Kamachi, H., Nishihara, H., Homma, S., Kanno, H., Ishikawa, M., Kawamata, F., Konishi, Y., Sato, M., Tahara, M.*, et al.* (2015). Importance of luminal membrane mesothelin expression in intraductal papillary mucinous neoplasms. Oncol. Lett. *9*, 1583-1589.
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., Kawamata, F., Kamachi, H., Nishihara, H., Homma, S., Matsuzawa, F., Mizukami, T., Konishi, Y., Tahara, M., Kamiyama, T.*, et al.* (2016). Clinical impacts of mesothelin expression in gastrointestinal carcinomas. World J. Gastrointest. Pathophysiol. *7*, 218-222.
Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., and De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. Cell Death Differ. *15*, 504-514.
Fang, D., Nguyen, T.K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A.N., Hotz, S., Van Belle, P.A., Xu, X., Elder, D.E., and Herlyn, M. (2005). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. Cancer Res. *65*, 9328-9337.
Freelove, R., and Walling, A.D. (2006). Pancreatic cancer: diagnosis and management. Am. Fam. Physician *73*, 485-492.
Graham, S.M., Jorgensen, H.G., Allan, E., Pearson, C., Alcorn, M.J., Richmond, L., and Holyoake, T.L. (2002). Primitive, quiescent,

Philadelphia-positive stem cells from patients with chronic myeloid leukemia are insensitive to STI571 in vitro. Blood *99*, 319-325.
Greten, F.R., Weber, C.K., Greten, T.F., Schneider, G., Wagner, M., Adler, G., and Schmid, R.M. (2002). Stat3 and NF-kappaB activation prevents apoptosis in pancreatic carcinogenesis. Gastroenterology *123*, 2052-2063.
Gubbels, J.A., Belisle, J., Onda, M., Rancourt, C., Migneault, M., Ho, M., Bera, T.K., Connor, J., Sathyanarayana, B.K., Lee, B.*, et al.* (2006). Mesothelin-MUC16 binding is a high affinity, N-glycan dependent interaction that facilitates peritoneal metastasis of ovarian tumors. Mol. Cancer *5*, 50.
Habib, M., and Saif, M.W. (2013). Pancreatic cancer stem cells: their role in pancreatic cancer patient outcomes and what is future? Jop *14*, 401-404.
Haridas, D., Chakraborty, S., Ponnusamy, M.P., Lakshmanan, I., Rachagani, S., Cruz, E., Kumar, S., Das, S., Lele, S.M., Anderson, J.M.*, et al.* (2011). Pathobiological implications of MUC16 expression in pancreatic cancer. PLoS One *6*, e26839.
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., 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.
Hassan, R., Laszik, Z.G., Lerner, M., Raffeld, M., Postier, R., and Brackett, D. (2005). Mesothelin is overexpressed in pancreaticobiliary adenocarcinomas but not in normal pancreas and chronic pancreatitis. Am. J. Clin. Pathol. *124*, 838-845.
Hattangadi, J.A., Hong, T.S., Yeap, B.Y., and Mamon, H.J. (2009). Results and patterns of failure in patients treated with adjuvant combined chemoradiation therapy for resected pancreatic adenocarcinoma. Cancer *115*, 3640-3650.

He, X., Wang, L., Riedel, H., Wang, K., Yang, Y., Dinu, C.Z., and Rojanasakul, Y. (2017). Mesothelin promotes epithelial-to-mesenchymal transition and tumorigenicity of human lung cancer and mesothelioma cells. Mol. Cancer *16*, 63.
Herman, J.M., Swartz, M.J., Hsu, C.C., Winter, J., Pawlik, T.M., Sugar, E., Robinson, R., Laheru, D.A., Jaffee, E., Hruban, R.H.*, et al.* (2008). Analysis of fluorouracil-based adjuvant chemotherapy and radiation after pancreaticoduodenectomy for ductal adenocarcinoma of the pancreas: results of a large, prospectively collected database at the Johns Hopkins Hospital. J. Clin. Oncol. *26*, 3503-3510.
Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J., and Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. Cell Stem Cell *1*, 313-323.
Hezel, A.F., Kimmelman, A.C., Stanger, B.Z., Bardeesy, N., and Depinho, R.A. (2006). Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. Genes. Dev. *20*, 1218-1249.
Kaneko, O., Gong, L., Zhang, J., Hansen, J.K., Hassan, R., Lee, B., and Ho, M. (2009). A binding domain on mesothelin for CA125/MUC16. J. Biol. Chem. *284*, 3739-3749.
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.
Kawamata, F., Kamachi, H., Einama, T., Homma, S., Tahara, M., Miyazaki, M., Tanaka, S., Kamiyama, T., Nishihara, H., Taketomi, A.*, et al.* (2012). Intracellular localization of mesothelin predicts patient prognosis of extrahepatic bile duct cancer. Int. J. Oncol. *41*, 2109-2118.
Kim, M.P., Fleming, J.B., Wang, H., Abbruzzese, J.L., Choi, W., Kopetz, S., McConkey, D.J., Evans, D.B., and Gallick, G.E. (2011). ALDH activity selectively defines an enhanced tumor-initiating cell population relative to CD133 expression in human pancreatic adenocarcinoma. PLoS One *6*, e20636.
Knight, Z.A., Lin, H., and Shokat, K.M. (2010). Targeting the cancer kinome through polypharmacology. Nat. Rev. Cancer *10*, 130-137.

Kure, S., Matsuda, Y., Hagio, M., Ueda, J., Naito, Z., and Ishiwata, T. (2012). Expression of cancer stem cell markers in pancreatic intraepithelial neoplasias and pancreatic ductal adenocarcinomas. Int. J. Oncol. *41*, 1314-1324.
Lapidot, T., Sirard, C., Vormoor, J., Murdoch, B., Hoang, T., Caceres-Cortes, J., Minden, M., Paterson, B., Caligiuri, M.A., and Dick, J.E. (1994). A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature *367*, 645-648.
Lee, C.J., Dosch, J., and Simeone, D.M. (2008). Pancreatic cancer stem cells. J. Clin. Oncol. *26*, 2806-2812.
Levina, V., Marrangoni, A.M., DeMarco, R., Gorelik, E., and Lokshin, A.E. (2008). Drug-selected human lung cancer stem cells: cytokine network, tumorigenic and metastatic properties. PLoS One *3*, e3077.
Li, C., Heidt, D.G., Dalerba, P., Burant, C.F., Zhang, L., Adsay, V., Wicha, M., Clarke, M.F., and Simeone, D.M. (2007). Identification of pancreatic cancer stem cells. Cancer Res. *67*, 1030-1037.
Li, D., Xie, K., Wolff, R., and Abbruzzese, J.L. (2004). Pancreatic cancer. Lancet *363*, 1049-1057.
Li, L., Borodyansky, L., and Yang, Y. (2009). Genomic instability en route to and from cancer stem cells. Cell Cycle *8*, 1000-1002.
Li, M., Bharadwaj, U., Zhang, R., Zhang, S., Mu, H., Fisher, W.E., Brunicardi, F.C., Chen, C., and Yao, Q. (2008a). Mesothelin is a malignant factor and therapeutic vaccine target for pancreatic cancer. Mol. Cancer Ther. *7*, 286-296.
Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C.*, et al.* (2008b). Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. J. Natl. Cancer Inst. *100*, 672-679.
Marjanovic, N.D., Weinberg, R.A., and Chaffer, C.L. (2013). Cell plasticity and heterogeneity in cancer. Clin Chem *59*, 168-179.
Mizukami, T., Kamachi, H., Fujii, Y., Matsuzawa, F., Einama, T., Kawamata, F., Kobayashi, N., Hatanaka, Y., and Taketomi, A. (2018). 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.
Mizukami, T., Kamachi, H., Mitsuhashi, T., Tsuruga, Y., Hatanaka, Y., Kamiyama, T., Matsuno, Y., and Taketomi, A. (2014). Immunohistochemical analysis of cancer stem cell markers in pancreatic adenocarcinoma patients after neoadjuvant chemoradiotherapy. BMC Cancer *14*, 687.
Moserle, L., Indraccolo, S., Ghisi, M., Frasson, C., Fortunato, E., Canevari, S., Miotti, S., Tosello, V., Zamarchi, R., Corradin, A.*, et al.* (2008). The side population of ovarian cancer cells is a primary target of IFN-alpha antitumor effects. Cancer Res. *68*, 5658-5668.
Mueller, M.T., Hermann, P.C., Witthauer, J., Rubio-Viqueira, B., Leicht, S.F., Huber, S., Ellwart, J.W., Mustafa, M., Bartenstein, P., D'Haese, J.G.*, et al.* (2009). Combined targeted treatment to eliminate tumorigenic cancer stem cells in human pancreatic cancer. Gastroenterology *137*, 1102-1113.
O'Brien, T.J., Beard, J.B., Underwood, L.J., Dennis, R.A., Santin, A.D., and York, L. (2001). The CA 125 gene: an extracellular superstructure dominated by repeat sequences. Tumour Biol. *22*, 348-366.
Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L. (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature *414*, 105-111.
Rump, A., Morikawa, Y., Tanaka, M., Minami, S., Umesaki, N., Takeuchi, M., and Miyajima, A. (2004). Binding of ovarian cancer antigen CA125/MUC16 to mesothelin mediates cell adhesion. J. Biol. Chem. *279*, 9190-9198.
Rybak, A.P., He, L., Kapoor, A., Cutz, J.C., and Tang, D. (2011). Characterization of sphere-propagating cells with stem-like properties from DU145 prostate cancer cells. Biochim. Biophys. Acta *1813*, 683-694.
Scholz, A., Heinze, S., Detjen, K.M., Peters, M., Welzel, M., Hauff, P., Schirner, M., Wiedenmann, B., and Rosewicz, S. (2003). Activated signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) supports the malignant phenotype of human pancreatic cancer. Gastroenterology *125*, 891-905.
Servais, E.L., Colovos, C., Rodriguez, L., Bograd, A.J., Nitadori, J., Sima, C., Rusch, V.W., Sadelain, M., and Adusumilli, P.S. (2012).

Mesothelin overexpression promotes mesothelioma cell invasion and MMP-9 secretion in an orthotopic mouse model and in epithelioid pleural mesothelioma patients. Clin. Cancer Res. *18*, 2478-2489.
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.
Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2015). Cancer statistics, 2015. CA Cancer J. Clin. *65*, 5-29.
Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2016). Cancer statistics, 2016. CA Cancer J. Clin. *66*, 7-30.
Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. Cancer Res. *63*, 5821-5828.
Stankevicius, V., Kunigenas, L., Stankunas, E., Kuodyte, K., Strainiene, E., Cicenas, J., Samalavicius, N.E., and Suziedelis, K. (2017). The expression of cancer stem cell markers in human colorectal carcinoma cells in a microenvironment dependent manner. Biochem. Biophys. Res. Commun. *484*, 726-733.
Streppel, M.M., Vincent, A., Mukherjee, R., Campbell, N.R., Chen, S.H., Konstantopoulos, K., Goggins, M.G., Van Seuningen, I., Maitra, A., and Montgomery, E.A. (2012). Mucin 16 (cancer antigen 125) expression in human tissues and cell lines and correlation with clinical outcome in adenocarcinomas of the pancreas, esophagus, stomach, and colon. Hum Pathol. *43*, 1755-1763.
Szilvassy, S.J., Humphries, R.K., Lansdorp, P.M., Eaves, A.C., and Eaves, C.J. (1990). Quantitative assay for totipotent reconstituting hematopoietic stem cells by a competitive repopulation strategy. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A *87*, 8736-8740.
Takaishi, S., Okumura, T., Tu, S., Wang, S.S., Shibata, W., Vigneshwaran, R., Gordon, S.A., Shimada, Y., and Wang, T.C. (2009). Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. Stem Cells *27*, 1006-1020.
Takao, S., Ding, Q., and Matsubara, S. (2012). Pancreatic cancer stem cells: regulatory networks in the tumor microenvironment and targeted

therapy. J Hepatobiliary Pancreat. Sci. *19*, 614-620.
Tang, Z., Qian, M., and Ho, M. (2013). The role of mesothelin in tumor progression and targeted therapy. Anticancer Agents Med. Chem. *13*, 276-280.
Tirino, V., Desiderio, V., d'Aquino, R., De Francesco, F., Pirozzi, G., Graziano, A., Galderisi, U., Cavaliere, C., De Rosa, A., Papaccio, G.*, et al.* (2008). Detection and characterization of CD133+ cancer stem cells in human solid tumours. PLoS One *3*, e3469.
Tirino, V., Desiderio, V., Paino, F., De Rosa, A., Papaccio, F., Fazioli, F., Pirozzi, G., and Papaccio, G. (2011). Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo. Faseb. j. *25*, 2022-2030.
Toyonaga, T., Nakano, K., Nagano, M., Zhao, G., Yamaguchi, K., Kuroki, S., Eguchi, T., Chijiiwa, K., Tsuneyoshi, M., and Tanaka, M. (2003). Blockade of constitutively activated Janus kinase/signal transducer and activator of transcription-3 pathway inhibits growth of human pancreatic cancer. Cancer Lett. *201*, 107-116.
Uehara, N., Matsuoka, Y., and Tsubura, A. (2008). Mesothelin promotes anchorage-independent growth and prevents anoikis via extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human breast cancer cells. Mol. Cancer Res. *6*, 186-193.
Vauthey, J.N., and Dixon, E. (2009). AHPBA/SSO/SSAT Consensus Conference on Resectable and Borderline Resectable Pancreatic Cancer: rationale and overview of the conference. Ann. Surg. Oncol. *16*, 1725-1726.
Vaz, A.P., Ponnusamy, M.P., Seshacharyulu, P., and Batra, S.K. (2014). A concise review on the current understanding of pancreatic cancer stem cells. J. Cancer Stem Cell Res. *2*.
Wang, K., Bodempudi, V., Liu, Z., Borrego-Diaz, E., Yamoutpoor, F., Meyer, A., Woo, R.A., Pan, W., Dudek, A.Z., Olyaee, M.S.*, et al.* (2012). Inhibition of mesothelin as a novel strategy for targeting cancer cells. PLoS One *7*, e33214.
Xu, L. (2013). Cancer stem cell in the progression and therapy of pancreatic cancer. Front Biosci (Landmark Ed) *18*, 795-802.