



Title	膵癌肝転移マウスモデルにおける抗メソテリン抗体Amatuximabを用いた新規抗腫瘍療法の開発〔論文内容及び審査の要旨〕
Author(s)	藤居, 勇貴
Description	配架番号 : 2637
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14620号
Issue Date	2021-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82958
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Fujii_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士（医 学） 氏 名 藤居 勇貴

学 位 論 文 題 名

膵癌肝転移マウスモデルにおける

抗メソテリン抗体 Amatuximab を用いた新規抗腫瘍療法の開発

(Basic study to develop an innovative anti-neoplastic therapy by using an anti-mesothelin antibody
amatuximab in a liver metastasis xenograft mouse model of pancreatic cancer)

【背景と目的】 膵癌は予後不良の癌であり、治癒切除後においてもその 5 年生存率は 20% 以下と極めて低い。肝転移が重要な予後規定因子として報告されている一方、ゲムシタビン（GEM）などの術後化学療法を施行してもその制御は困難であり、治療成績はまだ十分なものではない。

メソテリンは、細胞膜に存在する糖タンパク質の一種であり、ヒト中皮に広く分布する。悪性中皮腫、膵癌などの癌腫に高発現することが知られ、腫瘍増生、転移・進展、化学放射線抵抗性に関与していると考えられている。また、メソテリンのリガンドとして MUC16（CA125）が知られており、細胞接着に関与する。実際、複数の悪性腫瘍において、メソテリン高発現症例は予後不良であることが報告されている。

Amatuximab は、ヒトマウスのキメラ抗体であり、メソテリンの region I に結合することで、細胞接着作用阻害、および Antibody dependent cellular cytotoxicity（ADCC）活性を示すことが報告されている。しかし、非切除となった進行膵癌患者を対象にした Phase 2 試験では、Amatuximab の優位性を示せなかった。これは、腫瘍に十分抗体が到達できていない、デリバリーの問題があると考えられた。

当教室では上記問題点を踏まえ、術後補助療法としての Amatuximab 療法に注目した。膵癌腹膜播種モデルにおいて、メソテリン高発現株に対する早期 Amatuximab 療法は、癌細胞の腹膜への接着を阻害し、GEM との相乗的治療効果を示した。

本研究では、MUC16 を介した接着作用の関与が少なく、臨床的に重要な課題である膵癌肝転移マウスモデルを使用し、Amatuximab の治療効果を検討することを目的とした。

【材料と方法】 半脾臓注射法を用いて膵癌細胞株（AsPC-1、Capan-2、MIA PaCa-2、Panc-1）を播種し、肝転移マウスモデルを作成した。マウスは、8 週齢、雄の BALB/c nu/nu を用いた。観察期間は 6 週間とし、剖検時に肝転移重量を測定した。また、評価に適した細胞にはガウシアルシフェラーゼ（Gluc）を遺伝子導入し、血清 Gluc 活性値を測定することで、間接的に腫瘍量を測定できるようにした。

術後補助療法を想定し、上記モデルに Amatuximab、もしくはコントロール抗体を、癌細胞株播種日より投与開始した。観察期間中は、薬剤投与を 3 日おきに繰り返し、1 週ごとに尾静脈採血を行った。観察期間は 6 週間とし、42 日目に犠牲死させ、各治療群の肝転移重量および経時的な血清 Gluc 活性値を測定、比較した。また、同マウスモデルで治療期間を 3 週間とし、各群の全生存期間も評価した。

Amatuximab と GEM との併用療法も評価した。膵癌肝転移モデルにコントロール抗体、Amatuximab、コントロール抗体+GEM、もしくは Amatuximab+GEM を、癌細胞株播種 7 日目、10 日目、13 日目に投与した。観察期間中は 1 週ごとに採血を行い、20 日目に犠牲死させた。摘出した肝臓よりパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン&エオジン染色後、ImageJ ソフトウェアを用いて腫瘍面積と腫瘍個数を測定、比較した。また、経時的な血清 Gluc 活性値も測定、比較した。さらに、肝転移組織を一部切り取り、タンパク抽出液を作成後、膵癌幹細胞 (CSC) マーカー、上皮間葉転換 (EMT) 関連タンパク、および c-Met/Akt 経路のタンパク発現を評価した。

【結果】4 種類の膵癌細胞株のうち、AsPC-1 (メソテリン高発現株) でのみ評価に十分な量の肝転移形成を認めた。AsPC-1 に Gluc を導入し、肝転移マウスモデルにおいて、血清 Gluc 活性値を測定することで、間接的に腫瘍量を評価できるアッセイ系を確立した。

AsPC-1-Gluc を用いた肝転移マウスモデルにおいて、Amatuximab 群はコントロール抗体群と比べ、有意に少ない肝転移重量、および血清 Gluc 活性値 (播種後 21、35、42 日目) を示した。また、Amatuximab 群はコントロール抗体群と比べ、有意な全生存期間の延長を認めた。

Amatuximab と GEM の併用療法を評価した実験では、併用療法群はコントロール抗体群、Amatuximab 単剤療法群、GEM 単剤療法群と比べ、有意に少ない腫瘍面積を示した。また、併用群の腫瘍個数、血清 Gluc 活性値 (20 日目) はコントロール抗体群より有意に低く、併用療法による相乗的抗腫瘍効果を示した。

ウエスタンブロット法で各治療群の肝転移巣のタンパク発現量を評価すると、GEM 単剤療法群で高い p-c-Met、p-Akt の発現を認めたが、Amatuximab との併用療法群ではこれらタンパクの発現は低下していた。CSC マーカー、EMT 関連タンパクの発現は各群で有意差を認めなかった。

【考察】本研究において、Amatuximab の早期投与が、メソテリン高発現株の肝転移形成を抑制し、生存率改善に寄与する現象を認めた。また、Amatuximab と GEM の併用療法は、相乗的抗腫瘍効果を示した。さらに、Amatuximab が GEM の治療効果を増強するメカニズムとして、GEM 治療により賦活化された c-Met/PI3K/Akt 経路が、Amatuximab により再抑制された可能性が示唆された。

本研究では、既存研究と比べ、Amatuximab の単剤治療効果が顕著であった。これは、Amatuximab がサイズの小さい腫瘍に、また肝臓に多く集積する特性によるものであると考えられた。この事実は、Amatuximab が膵癌の微小肝転移抑制に有用であることを裏付けている。

Amatuximab が GEM の治療効果を増強するメカニズムは、これまでに解明されていなかった。in vitro の実験では、Amatuximab がリン酸化 c-Met の発現を低下させることが報告されており、本研究で得られた実験結果は、その現象が in vivo の実験でも生じることを示唆するものである。PI3K/Akt 経路は癌細胞の増殖、代謝、生存の制御に極めて重要な役割を果たしており、GEM への耐性形成にも寄与している。Amatuximab が c-Met/PI3K/Akt 経路のリン酸化抑制に関与していることは、Amatuximab と GEM の併用療法の有効性を支持する所見と考えられる。

【結論】Amatuximab の早期投与は、メソテリン高発現膵癌の肝転移を抑制し、GEM と併用することにより相乗的抗腫瘍効果を示した。術後補助療法としての Amatuximab の臨床応用が期待される。