



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14620
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82959
Type	doctoral thesis
File Information	Yuki_Fujii.pdf



学 位 論 文

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)

2021 年 6 月

北海道大学

藤居 勇貴

Yuki Fujii

学 位 論 文

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)

2021 年 6 月

北海道大学

藤居 勇貴

Yuki Fujii

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	6 頁
方法	9 頁
結果	17 頁
考察	27 頁
結論	30 頁
謝辞	31 頁
利益相反	32 頁
引用文献	33 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に発表した。

1. Yuki Fujii, Hirofumi Kamachi, Fumihiko Matsuzawa, Tatsuzo Mizukami, Nozomi Kobayashi, Moto Fukai, Akinobu Taketomi. Early administration of amatuximab suppresses liver metastasis of mesothelin-expressing pancreatic cancer cells and enhances gemcitabine sensitivity in a xenograft mouse model. Carcinogenesis (submitted).

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 藤居勇貴、蒲池浩文、深井原、折茂達也、坂本譲、旭火華、長津明久、島田慎吾、神山俊哉、武富紹信
抗メソテリン抗体 amatuximab による膵癌肝転移形成阻害効果の検討
第 120 回日本外科学会定期学術集会、2020 年 8 月 13-15 日、横浜
2. 藤居勇貴、蒲池浩文、深井原、折茂達也、坂本譲、旭火華、長津明久、島田慎吾、神山俊哉、武富紹信
Early administration of anti-mesothelin antibody inhibits liver metastasis of pancreatic cancer in xenograft mouse model
第 79 回日本癌学会学術集会、2020 年 10 月 1-3 日、広島

要 旨

【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、ヒトー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、ドラッグ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を開始した。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、10、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し、比較した。また、経時的な血清 Gluc 活性値も測定し、比較した。さらに、肝転移組織を一部採取し、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、肝転移重量、および血清 Gluc 活性値（播種後 21、35、42 日目）は有意に低値であった。また、Amatuximab 群はコントロール抗体群と比べ、全生存期間を有意に延長した。

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、腫瘍面積は有意に低値であった。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組織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 を腫瘍サイズが小さい時期に投与することで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、メソテリン高発現膀胱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。

略 語 表

本文中および図表に記載した略語は以下の通りである。

ADCC	antibody-dependent cellular cytotoxicity
ALDH1	Aldehyde dehydrogenase 1
ATCC	American Type Culture Collection
CA125	carbohydrate antigen 125
CD44	cluster of differentiation 44
CSC	cancer stem cell
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMT	epithelial-mesenchymal transition
FACS	fluorescence activated cell sorting
FBS	fetal bovine serum
FFPE	formalin-fixed paraffin embedded
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GEM	gemcitabine
Gluc	Gaussia luciferase
H&E	hematoxylin and eosin
MSLN	mesothelin
MUC16	mucin 16
NP40	nonidet P40
OS	overall survival
PBS	phosphate buffered saline
PD	polymerase chain reaction
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma
PVDF	polyvinylidene difluoride
RLU	relative light unit
RPMI	Roswell Park Memorial Institute media
SE	standard error
SDS PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis

緒 言

膵癌は本邦において7番目に罹患率が高く、4番目のがん死亡原因である (National Cancer Center Japan, 2019)。全世界的には7番目の (Bray et al., 2018)、米国においても4番目の主要ながん死亡原因であり (Siegel, Miller and Jemal, 2019)、年々罹患率が上昇していることから、膵癌診療の重要性は増してきている。膵癌の治療には、依然手術療法が重要な位置を占めるが、治癒切除後であっても5年生存率が約20%と予後不良である (Ferrone et al., 2008; Ferrone et al., 2012; He et al., 2014; Katz et al., 2009)。ゲムシタビン (GEM)、フルオロウラシルベースの術後化学療法の発達により、膵癌の治療成績は向上したが、その成績はまだ十分なものではない (Labori et al., 2016; Oettle et al., 2013; Parikh et al., 2016; Ueno et al., 2009; Uesaka et al., 2016)。一方で、膵癌の再発様式を調査した研究によると、肝転移が最も早く出現し、かつ予後に大きな影響を与えることが報告された (Groot et al., 2019; Groot et al., 2018; Hattangadi et al., 2009)。これらの事実より、膵癌の治癒切除後に肝転移を抑制する治療の開発が、さらなる予後改善のために必要であることが示唆される。

メソテリン (mesothelin: MSLN) は、細胞膜に存在する、40 kDa 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、ヒト中皮 (胸膜、腹膜、心膜) に広く分布する (Chang and Pastan, 1996; Hassan et al., 2016; Tang et al., 2013)。悪性中皮腫 (Chang and Pastan, 1996)、膵癌 (Einama et al., 2011; Hassan et al., 2005)、肝外胆管癌 (Kawamata et al., 2012)、卵巣癌 (Chang and Pastan, 1996; Yen et al., 2006)、肺癌 (NSCLC) (Ho et al., 2007) などの癌腫に高発現することが知られ、特に膵癌では全例に高発現するとの報告がある。これら癌腫において、メソテリンは腫瘍増生、転移・進展、化学放射線抵抗性、アポトーシスの抑制に関与していると考えられている。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 (細胞間および細胞-漿膜間) に関与するとされる (Gubbels et al., 2006; Rump et al., 2004)。また、Cyclin-E/CDK2、NFκB, MAPK, PI3K など、複数の細胞内伝達経路を活性化させ、癌細胞のアポトーシス抑制作用、細胞増殖作用を発揮すると考えられている (Bharadwaj et al., 2008; Chang et al., 2009; Cheng et al., 2007; He et al., 2017; Li et al., 2008; Tang et al., 2013; Uehara et al., 2008)。実際、複数の悪性腫瘍において、メソテリンの高発現は予後不良と関連していることが報告されている (Cheng et al., 2009; Einama et al., 2012; Einama et al., 2015; Einama et al., 2011; Kawamata et al., 2014; Kawamata et al., 2012; Suzuki et al., 2020)。

メソテリンに作用する治療抗体として、Amatuximab (MORAb-009) が注目されている。Amatuximab は、Heavy chain がヒト、Light chain がマウスに由来する高親和性キメラモノクローナル IgG1/k 抗体であり、メソテリンの region I に結合することで、細胞接着を阻害する (Hassan et al., 2007)。また、Antibody dependent cellular cytotoxicity

(ADCC) 活性を示し、細胞障害性を発揮することが知られている (Feng et al., 2009; Hassan et al., 2007)。既存研究では、メソテリン高発現細胞株を用いた皮下腫瘍モデルマウスにおいて、抗癌剤との相乗的腫瘍増殖抑制効果を示した (Hassan et al., 2007)。しかし、非切除となった進行膵癌患者 155 人を対象にした Phase 2 試験では、Amatuximab と GEM の併用療法はプラセボ群と比べ全生存率 (overall survival; OS)・無増悪生存率ともに有意差なく、併用療法の優位性を示せなかった (NCT00570713)。これは、腫瘍に十分抗体が到達できていない、すなわちドラッグデリバリーの問題があると考えられた。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、サイズの大きい腫瘍ほど Amatuximab の uptake が小さくなることが示されており、粗大な膵癌にはモノクローナル抗体が不均一に分布することも示唆されている (Fujimori et al., 1990; Lee et al., 2015; Lindenberg et al., 2015; Shin et al., 2011; Uzunparmak and Sahin, 2019)。メソテリンが、足場非依存性の細胞増殖を促し、Anoikis を抑制することを考慮すると (Uehara et al., 2008)、腫瘍塊を形成する前に治療を開始する方が望ましいと考えられる。

申請者の所属する北海道大学消化器外科学教室 I では、膵癌における抗メソテリン療法に注目し、臨床検体や細胞株、マウスを用いた実験を行ってきた。上記の問題点より、腫瘍塊形成以前に Amatuximab を投与すれば十分な抗腫瘍効果を示せると考え、術後補助療法としての Amatuximab 療法に注目した。また、Amatuximab の作用機序として、MUC16 をリガンドとした接着阻害作用、ADCC 活性作用だけでなく、膵癌の癌幹細胞特性をコントロールし、分化方向に誘導することでも抗腫瘍効果を発揮すると考えた。*In vitro* の実験では、メソテリン高発現細胞株 (AsPC-1) を Amatuximab に暴露させると、膵癌幹細胞 (CSC) マーカー (CD44、MET) の発現が抑制されることが示された (Matsuzawa et al., 2021)。また、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 Amatuximab 単独治療により、腹膜への接着を阻害された Sherbet 状細胞集塊の出現を認めた (Mizukami et al., 2018)。この Sherbet 状細胞集塊でも同様に CSC マーカー (CD44、MET、ALDH1) の発現が抑制されており、GEM を併用することで有意にその増殖が抑制されることが示された。これら実験結果より、Amatuximab は十分に腫瘍細胞に到達できる条件下では、メソテリン高発現膵癌株の CSC 特性の発現 (脱分化) を抑制し、抗癌剤と相乗的治療効果を示すと考えられた。

私は上記現象をより明らかにするため、膵癌肝転移モデルで Amatuximab の影響を検討することとした。肝転移モデルを選択した理由は、MUC16 を介した接着作用の関与が少なく、また臨床上肝転移の抑制は重要な課題であるためである。膵癌肝転移モデルにおいて、メソテリン高発現株は Amatuximab 投与により肝転移量減少を認め、GEM との相乗的治療効果を認めると予想された。また、Amatuximab 影響下では、肝転移巣の CSC マーカーの発現強度低下を認めると考えられた。これらが証明されるこ

とにより、術後補助療法としての Amatuximab と GEM 併用療法の臨床応用が期待されることとなる。

方 法

細胞培養

ヒト膀胱癌細胞株である AsPC-1、Capan-2、MIA PaCa-2 および Panc-1 は American Type Culture Collection (ATCC) より購入した。AsPC-1 は Roswell Park Memorial Institute media (RPMI) -1640 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) で、Capan-2 は McCoy's 5A (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) で、MIA PaCa-2 と Panc-1 は Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM ; Sigma-Aldrich) で培養し、各培地には 10% 非働化ウシ胎児血清 (FBS: fetal bovine serum ; Sigma Chemical Co, MO, USA)、100 U/mL ペニシリン、および 100 μ g/mL ストレプトマイシンを混注した。すべての細胞株は CO₂ インキュベーターにて 37 °C、5% CO₂ 下で培養した。

試薬

Amatuximab は MORPHOTEK Inc. (Exton, PA, USA) より供与していただいた。コントロールヒト全 IgG 抗体、ゲムシタビン塩酸塩はそれぞれ Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) と Eli Lilly (Indianapolis, IN, USA) より購入した。

ウェスタンブロット法および一次抗体

10-cm dish に各細胞を 1.5×10^6 個/dish の濃度で細胞を播種し、48-72 時間培養後、phosphate buffered saline (PBS) で十分に洗浄して -80 °C のディープフリーザーで凍結させた。凍結させた細胞より、NP-40 Lysis Buffer (Tris-HCl (pH 7.5) 25 mM、NaCl 150 mM、デオキシコール酸 Na 0.5%、EDTA/2Na 1 mM、NP40 0.5% (w/v)、フッ化 Na 5 mM、オルトバナジン酸 Na 5 mM、protease inhibitor cocktail (Sigma-Aldrich) 1/100 量) を用いて細胞質タンパク質・膜タンパク質・水溶性核タンパク質および細胞骨格タンパク質を抽出した。また、動物組織の場合は、5 mm 角のサンプルをホモゲナイザーで破碎し、同様に NP-40 Lysis Buffer を用いてタンパク質を抽出した。タンパク抽出液に 4 $\times$ Laemmli Sample Buffer solution (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA) を添加し、95 °C で 5 分煮沸した。

Any kD™ Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gel (Bio-Rad) に polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) を行った。各 well あたり 12 μ g のタンパクを測定に用いた。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)、表 1 に示す各一次抗体希釈液でインキュベートした (室温、60 分)。洗浄後、二次抗体 (horseradish peroxidase (HRP) -conjugated anti-rabbit IgG 抗体または HRP-conjugated anti-mouse IgG 抗

体 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)) の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 ChemiDoc XRS® (Bio-Rad) を用いてバンドの濃度を測定した。タンパク量は β -actin、もしくは glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をコントロールとしてバンドの濃度を比較した。

表 1: Primary antibodies used for western blotting analysis

Antibody name	Product code and manufacturer	Antibody dilution
Mesothelin rabbit polyclonal	#TA308767, ORIGENE	1:1000
MUC16/CA125 rabbit polyclonal	#20077-1-AP, Proteintech	1:2000
β -Actin rabbit polyclonal	#4967, Cell Signaling Technology	1:2000
Phospho-Met (Tyr1234/1235) rabbit monoclonal	#3077, D26, Cell signaling Technology	1:2000
Met mouse monoclonal	#3127, 25H2, Cell Signaling Technology	1:1000
Phospho-Akt (Ser473) rabbit monoclonal	#4060, D9E, Cell Signaling Technology	1:2000
Akt rabbit polyclonal	#9272, Cell Signaling Technology	1:1000
ALDH1 mouse polyclonal	#611195, BD Biosciences	1:2000
CD44 mouse monoclonal	#3570, Cell Signaling Technology	1:2000
CXCR4 mouse monoclonal	#35-8800, Thermo Fisher Scientific	1:500
E-cadherin rabbit monoclonal	ab1416, Abcam	1:2000
N-cadherin rabbit polyclonal	ab18203, Abcam	1:2000
Vimentin rabbit monoclonal	#5741, Cell Signaling Technology	1:2000
Slug rabbit monoclonal	#9585, Cell Signaling Technology	1:1000
GAPDH rabbit monoclonal	#5174, D16H11, Cell Signaling Technology	1:2000

MUC16, mucin 16; CA125, carbohydrate antigen 125; ALDH1, Aldehyde dehydrogenase 1; CD44, cluster of differentiation 44; CXCR4, C-X-C chemokine receptor type 4; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

Fluorescence activated cell sorting (FACS) 分析

培養細胞を洗浄し、氷冷 PBS に再懸濁した。一次抗体 (Amatuximab) を 2 μ g/mL で加え、氷上で 30 分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 Fluorescein (FITC) 488 ヤギ抗ヒト二次抗体 (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) と共にインキュベートした。その後、同様に洗浄し、BD FACS Canto TM II flow cytometer (BD Biosciences) を用いて分析した。

免疫染色

薄切した組織切片は、二つのキシレン槽にそれぞれ 5 分間順に浸して脱パラフィン

し、100%エタノール、100%エタノール、95%エタノールの順にそれぞれ3分間ずつ通し、最後に80%エタノール中でゆすぎ、再水和化したのちに水洗した。その後、pH 9.0の溶液中で賦活化装置（PT Link ; Dako Japan、東京）を用い加熱による抗原賦活化処理を行った（装置設定、約70分間）。続いて、5分間 Dako peroxidase blocking solution（Dako Japan）に浸水し、内因性ペルオキシダーゼ反応をブロックした。組織切片を500倍希釈した抗メソテリン抗体（#TA308767 ; OriGene Technologies, Rockville, MD, USA）に30分室温で反応させ、ポリマー法（EnVision™ FLEX/HRP secondary antibody-coated polymer peroxidase complexes（#SM802、DAKO））で可視化した。免疫組織化学染色後の切片はヘマトキシリンで対比染色し、エタノールで脱水した後、キシレンで洗浄した。

動物

7週齢のオス BALB/c nu/nu マウスを日本エスエルシー（静岡、日本）から購入した。マウスは北海道大学医歯学総合研究棟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。すべての実験は「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、および「国立大学法人北海道大学動物実験に関する規程」に基づき行われた。

膵癌肝転移マウスモデルの作成

膵癌肝転移マウスモデルの作成は半脾臓注射法により行った。イソフルラン 3%で全身麻酔の導入を行い、手術中は1.75~2%で麻酔を維持した。右側臥位とし、脾臓に沿って皮膚切開を入れ、開腹した（図 1A）。脾臓を体外に露出させ、無血野の脾門部にクリッピングを行い（図 1B）、脾臓を半分に分割した（図 1C）。頭側の脾臓は腹腔内に還納し、腹側の脾臓被膜下に 1×10^6 個の膵癌細胞を注入した（図 1D）。膵癌細胞が十分に肝臓に到達するように2分間待ち、クリッピング及び結紮で流入血管を処理した後に尾側の脾臓は摘出した（図 1E）。生理食塩水 20mL で腹腔内を洗浄し、筋膜と皮膚を4-0 ナイロン糸で縫合閉鎖した。各膵癌細胞株の肝転移形成能を比較し、十分に肝転移が観察された細胞株に関しては、観察期間を4週間と6週間で比較した（n = 5）。

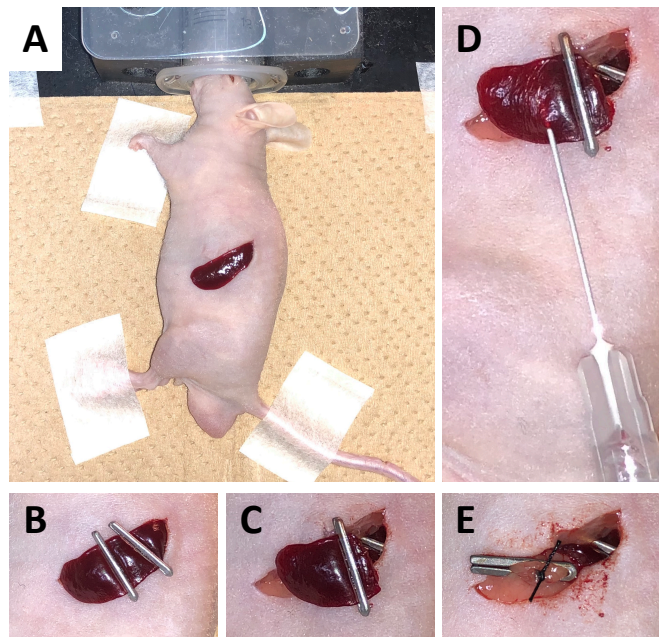


図1 半脾臓注射による肝転移マウスモデルの作成。(A) ノードマウスに全身麻酔を導入し、右側臥位とした。(B) 脾臓中央にクリップを2つかけた。(C) 脾臓を半分に分割し、頭側の脾臓は腹腔内に還納した。(D) 尾側の脾臓に膵癌細胞を注入した。(E) クリップと結紮で流入血管を処理し、尾側の脾臓は摘出した。

AsPC-1-Gluc の確立と基質調製

In vivo の実験で腫瘍量をより定量的に評価するために、分泌型ルシフェラーゼであるガウシアルシフェラーゼ (Gluc) を膵癌細胞株に遺伝子導入した。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 で線状化したものを使用した。膵癌細胞株に FuGENE HD トランスフェクション試薬 (Roche, Basel, Switzerland) を使用し、このベクターを遺伝子導入した。セレクションを 400 µg/mL の G418 (Sigma-Aldrich) で行い、約 3 週間後にコロニーを分離することで安定発現株の選定を行った。確立された Gluc 発現膵癌細胞株は、野生型の AsPC-1 と同様に培養・維持した。また、すべての遺伝子導入細胞を用いた実験は、「北海道大学遺伝子組換え実験等安全管理規定」に基づいて行われた。

In vivo、*in vitro* で採取したサンプル中の Gluc 活性は、BioLux Gaussia Luciferase Assay Kit (New England BioLabs)、もしくは Pierce™ Gaussia Luciferase Glow Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用い、Varioskan® Flash (Thermo Fisher Scientific) で発光度を測定した。測定はアッセイキットのプロトコール通りに行ったが、サンプルと試薬の反応時間は 1 分間とした。また、採血時に溶血が生じたサンプルは、結果に誤差が生じるため解析に用いなかった。

AsPC-1-Gluc 細胞数および肝転移重量と分泌型 Gluc 活性の相関関係

作成した AsPC-1-Gluc 細胞株を用い、細胞数と培養上清中の Gluc 活性値の相関を調べた。AsPC-1-Gluc 細胞を様々な細胞密度 (5×10^3 個/well、 1×10^4 個/well、 2×10^4 個/well、 3×10^4 個/well、 4×10^4 個/well、 5×10^4 個/well) で 96 ウェルマイクロプレートに播種し、一晩培養した ($n=4$)。その後、10 μ L の上清を 50 μ L のアッセイキット試薬と混合し、化学発光を測定した。

また *in vitro* の実験においても、膵癌肝転移重量とマウス血清中の Gluc 活性値の相関を調べた。マウスの尾静脈よりヘマトクリット毛細管を用いて採血を行い、1,000 G、5 分間で遠心分離を行い、血清と血餅を分離した。上記と同様の手法でマウス血清の Gluc 活性値を測定し、剖検時の肝転移重量との比較を行った。

膵癌肝転移マウスモデルに対する Amatuximab の効果の評価、および投与間隔の検討 (予備実験)

AsPC-1-Gluc を用いた膵癌肝転移マウスモデルに、Amatuximab の投与実験を行った。細胞株播種当日より、Amatuximab 60 mg/kg を 3 日おき (q 3 群)、もしくは 5 日おき (q 5 群) に静脈内投与し、コントロール抗体投与群 (60 mg/kg、5 日おき) と比較した ($n=4$)。Amatuximab の投与量は、先行研究を参考に決定した。観察期間は 6 週間とし、1 週ごとに採血を行い、血清 Gluc 活性値を測定した。42 日目に犠牲死させ、肝転移重量の測定、および他部位転移の有無を検索し、各群の肝転移重量および経時的な血清 Gluc 活性値を比較した (図 2)。

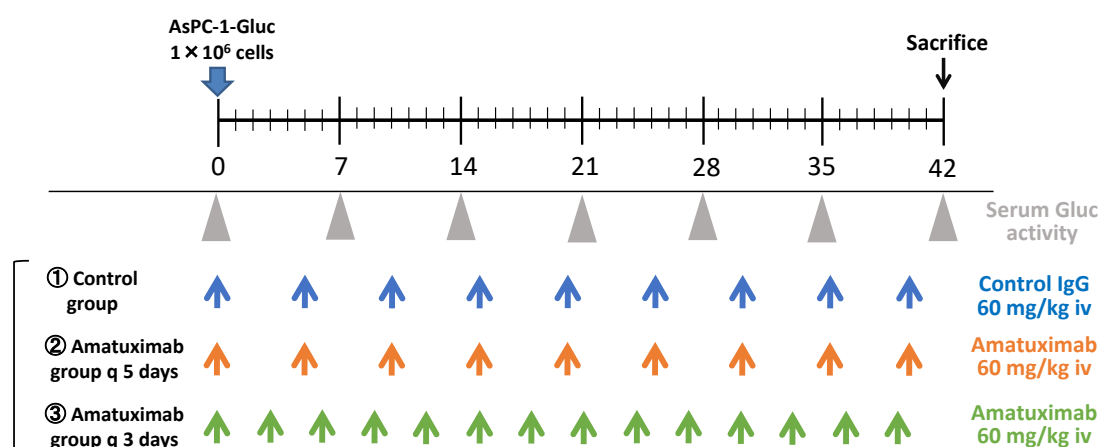


図 2 AsPC-1-Gluc 細胞を用いた肝転移マウスモデルに対する Amatuximab 投与のプロトコール (予備実験)

膵癌肝転移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 (本

実験)

Amatuximab の投与量、投与間隔を決定し、本実験を以下のプロトコールで行った。AsPC-1-Gluc 播種当日より、コントロール抗体、もしくは Amatuximab 60 mg/kg を 3 日おきに静脈内投与した (n=8)。観察期間は 6 週間とし、1 週ごとに体重測定と採血を行い、血清 Gluc 活性値を測定した。42 日目に犠牲死させ、肝転移重量の測定、および他部位転移の有無を検索し、各群の肝転移重量および経時的な血清 Gluc 活性値を比較した (図 3)。

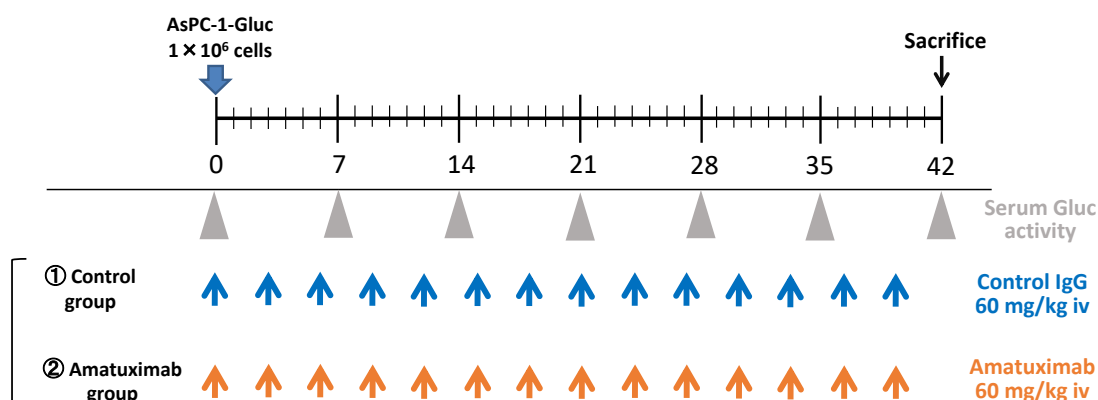


図 3 AsPC-1-Gluc 細胞を用いた肝転移マウスモデルに対する Amatuximab 投与のプロトコール (本実験)

膵癌肝転移マウスモデルにおける Amatuximab 治療による生存期間の評価

AsPC-1-Gluc を用いた膵癌肝転移マウスモデルに一定期間 Amatuximab を投与し、生存に与える影響を評価した。細胞株播種当日よりコントロール抗体、もしくは Amatuximab 60 mg/kg を 3 日ごとに投与した。各薬剤の投与期間は 3 週間とし、多量の血性腹水、もしくは重度の悪液質 (20%以上の体重減少) を認めた場合、犠牲死させた。

膵癌肝転移マウスモデルにおける Amatuximab と GEM の併用療法の評価 (予備実験)

AsPC-1-Gluc を用いた膵癌肝転移マウスモデルを用い、Amatuximab とゲムシタビンの併用療法の治療効果を評価した。AsPC-1-Gluc 播種当日よりコントロール抗体もしくは Amatuximab 60 mg/kg を 3 日おきに静脈内投与した。Amatuximab+GEM 併用療法群では 3 日おきの Amatuximab 投与に加え、6 日おきに GEM 80 mg/kg 腹腔内投与を行った。観察期間は 6 週間とし、1 週ごとに体重測定と採血を行い、血清 Gluc 活性値を測定した。42 日目に犠牲死させ、肝転移重量の測定、および他部位転移の有無を検索し、各群の肝転移重量および経時的な血清 Gluc 活性値を比較した (各群 n = 7) (図 4)。

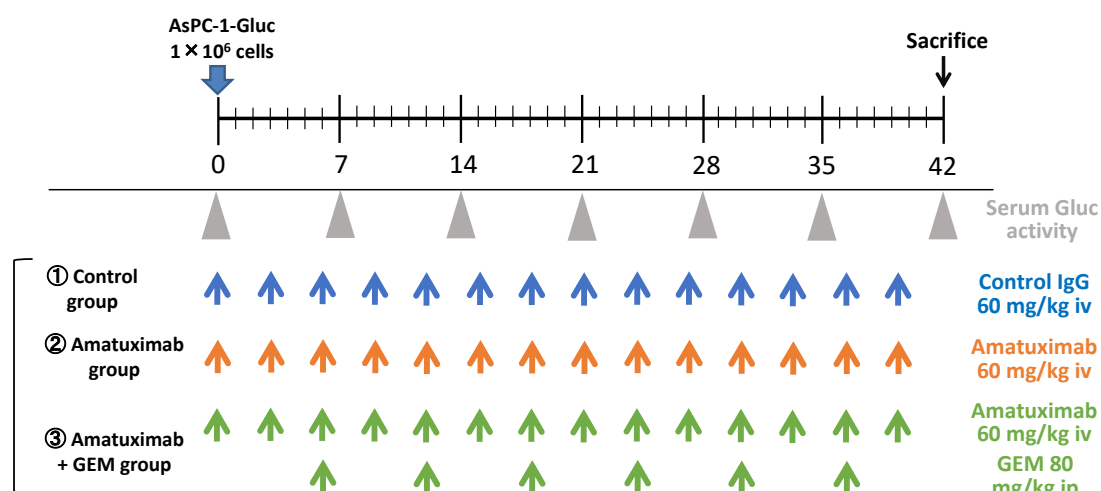


図4 AsPC-1-Gluc 細胞を用いた肝転移マウスモデルに対する Amatuximab、GEM 投与のプロトコール（予備実験）

膵癌肝転移マウスモデルにおける Amatuximab と GEM の併用療法の評価（本実験）

予備実験のプロトコールでは Amatuximab 単独療法による抗腫瘍効果が強く、GEM との併用療法の評価が困難であった。そのため、Amatuximab の治療効果を弱めるようにプロトコールを修正し、本実験を行った。AsPC-1-Gluc 播種 7 日目よりコントロール抗体、もしくは Amatuximab 60 mg/kg を 3 日おきに 3 回静脈注射を行った。この時期より抗体の投与を開始した理由は、癌細胞播種による肝炎が治まる時期であり、かつ術後補助療法としても適切な時期と考えたためである。また、それぞれの治療群に GEM 80 mg/kg を 3 日おきに 3 回腹腔内投与をする併用療法群を作成した。観察期間は 20 日間とし、1 週ごとに体重測定、採血を行い、血清 Gluc 活性値を測定した。20 日目に犠牲死させ、肝臓の摘出、および他部位転移の有無を検索した（図 5）。摘出した肝臓は、10% ホルマリン液に 1 日間漬け、パラフィン包埋した。腫瘍が最も含まれる断面で 4 μm の切片を作成し、ヘマトキシリン&エオジン（H&E 染色）を行った。全肝臓で腫瘍が多く含まれる 5 領域を抽出し、ImageJ ソフトウェアを用いて腫瘍面積と腫瘍個数を計算した。各群の平均腫瘍面積、腫瘍個数、および経時的な血清 Gluc 活性値を比較した（n=6）。また、肝転移組織を一部採取し、-80 °C で凍結保存した。

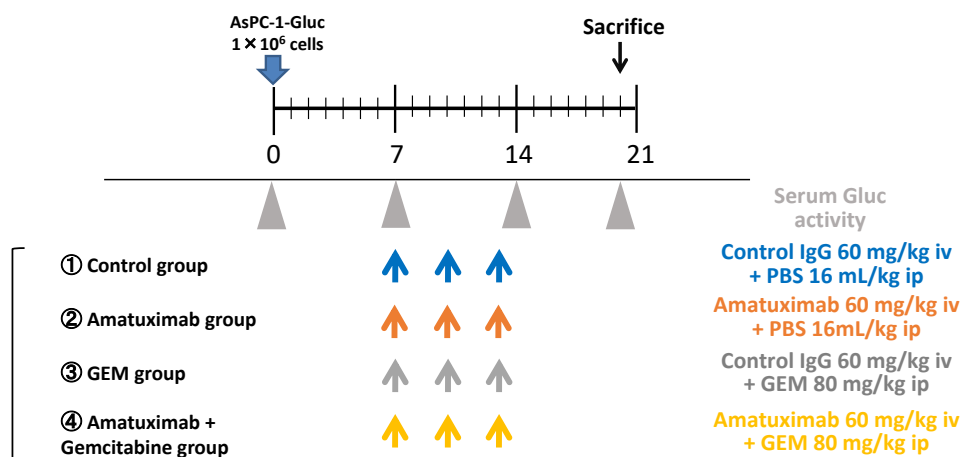


図5 AsPC-1-Gluc 細胞を用いた肝転移マウスモデルに対する Amatuximab、GEM 投与のプロトコール（本実験）

各治療群の肝転移巣における生物学的分子マーカーの変化の検討

上記実験で採取した肝転移組織より、タンパクを抽出してウエスタンブロット法を行った。コントロール抗体群、Amatuximab 治療群、コントロール抗体+GEM 治療群、Amatuximab+GEM 併用療法群の肝転移組織間で、癌幹細胞（CSC）マーカー（CD44, ALDH1, CXCR4）、上皮間葉転換（EMT）関連分子（E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Slug）、および c-Met/PI3K/Akt 経路のタンパク発現を評価した。

統計解析

二変量の相関はピアソンの相関係数で評価した。連続変数は平均 $\pm$ 標準誤差 (SE) で示した。2 群間の比較は Student の t 検定で、多群間の比較は one way ANOVA もしくは Tukey-Kramer 検定で行った。OS は手術日から犠牲死までの期間と定義し、生存解析は Kaplan-Meier 法により生存曲線を求め、Logrank 試験で比較を行った。統計解析はいずれも $P < 0.05$ を有意水準とし、JMP Pro 14.0.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を使用した。

結 果

膵癌細胞株におけるメソテリン発現の比較

今回の実験では、以前の実験で使用した AsPC-1、Capan-2、MIA PaCa-2、Panc-1 を用いた (Matsuzawa et al., 2021; Mizukami et al., 2018)。これら細胞株におけるメソテリンの発現はウェスタンブロット法、FACS 分析、免疫染色法で確認している。本実験を行うにあたり、再度ウェスタンブロット法を用いてメソテリン、および MUC16 (CA125) の発現を確認した (図 6)。AsPC-1、Capan-2 ではメソテリンが高発現していたが、MIA PaCa-2、Panc-1 ではメソテリンの発現は低かった。また、MUC16 の発現は、これら細胞株間では同等であった。

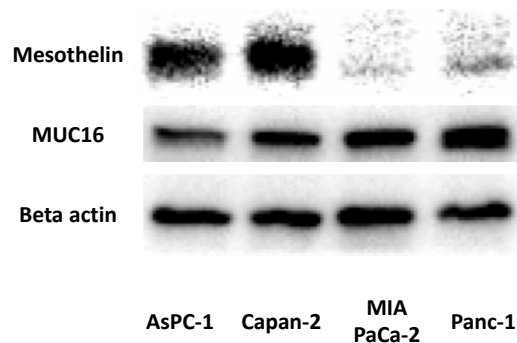


図 6 AsPC-1、Capan-2、MIA PaCa-2 および Panc-1 におけるメソテリン、MUC16 発現の比較

膵癌細胞株における肝転移形成能の比較

AsPC-1、Capan-2、MIA PaCa-2、Panc-1 を用いて、膵癌肝転移マウスモデルの作成を試みた。観察期間を 6 週間とした時、これら 4 つの細胞株における肝転移重量は、それぞれ 665.1 ± 249.2 mg、 6.8 ± 2.1 mg、 4.0 ± 3.9 mg、 9.3 ± 3.4 mg であり、AsPC-1 でのみ測定するのに十分な量の肝転移形成を認めた (図 7)。

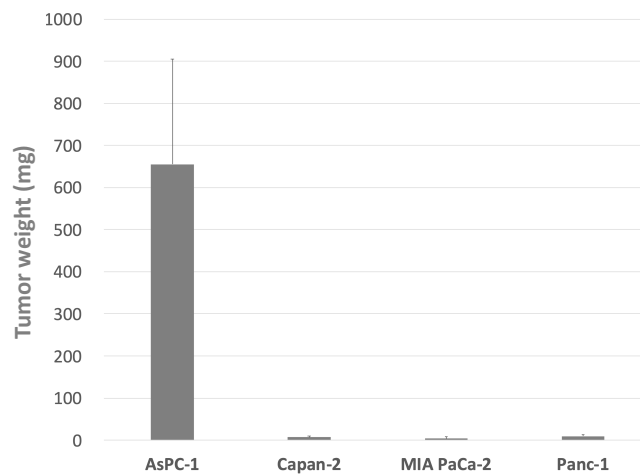


図7 AsPC-1、Capan-2、MIA PaCa-2 および Panc-1 を用いた肝転移マウスモデルにおける肝転移重量の比較

この結果より、Capan-2、MIA PaCa-2、Panc-1 を用いた肝転移マウスモデルは今後の実験に不適と考えられた。AsPC-1 を用いた肝転移マウスモデルでは、肝臓辺縁、肝臓背側を中心に、肝臓全体に白色の腫瘍形成を認めた (図 8A、B)。また、H&E 染色では、多中心性発育を示す腫瘍細胞集塊を認め (図 8C)、同腫瘍は抗メソテリン抗体を一次抗体として用いた免疫染色で、強陽性を示した (図 8D)。その他腹腔内臓器、リンパ節、肺、脳には転移所見を認めなかった。観察期間を 4 週間にした群と 6 週間にした群で腫瘍重量を比較したところ、それぞれ 160.4 ± 52.6 mg、 655.1 ± 249.2 mg であり、治療効果を測定することを考慮し、以降の実験の観察期間は 6 週間とした (図 8E)。

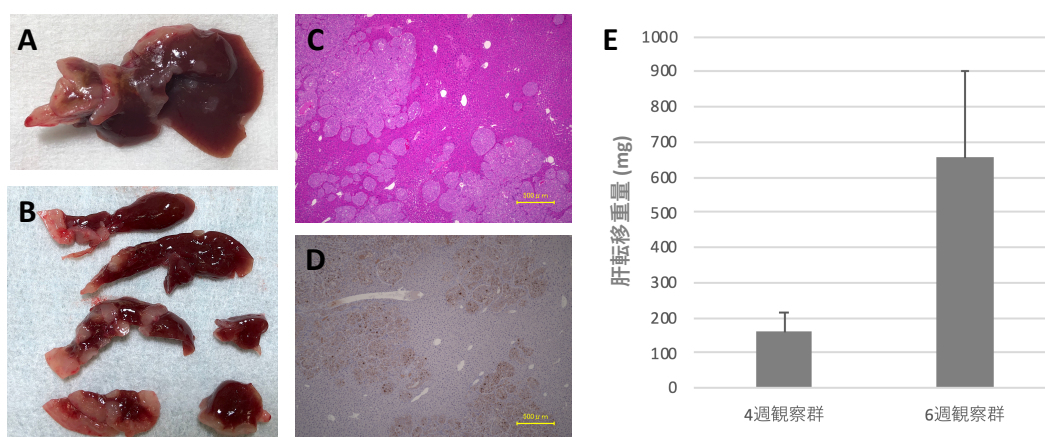


図8 AsPC-1-Gluc を用いた肝転移マウスモデル。(A) マウス肝臓、肝転移の肉眼的所見。(B) マウス肝臓の断面。(C) マウス肝臓の H&E 染色所見。(D) 抗メソテリン抗体を用いたマウス肝臓の免疫染色所見。(E) 観察期間ごとの肝転移重量の比較。

Gluc 導入膵癌細胞株 (AsPC-1-Gluc) を用いた評価系の確立

前述の方法により AsPC-1 に Gluc 発現ベクターを遺伝子導入した AsPC-1-Gluc 細胞株を樹立した。ウエスタンブロット法では、AsPC-1 野生株と AsPC-1-Gluc とで、メソテリンとそのリガンドである MUC16 の発現に差を認めなかった (図 9A)。また、FACS 分析を行い、Amatuximab が AsPC-1-Gluc に発現しているメソテリンに反応することを確認した (図 9B)。

続いて、AsPC-1-Gluc の培養細胞数と、培養上清中の Gluc 活性値の相関を調べた。すると、両者の間には強い正の相関が認められた (図 9C ; $R^2=0.981$ 、 $P<0.001$)。また、肝転移マウスモデルにおいても、同じ時点で採取した血清 Gluc 値と肝転移重量の相関を調べた。同様に、両者の間には強い正の相関を認めた (図 9D ; $R^2=0.972$ 、 $P<0.001$)。

以上の実験より、AsPC-1-Gluc が *in vivo* の系において腫瘍量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。

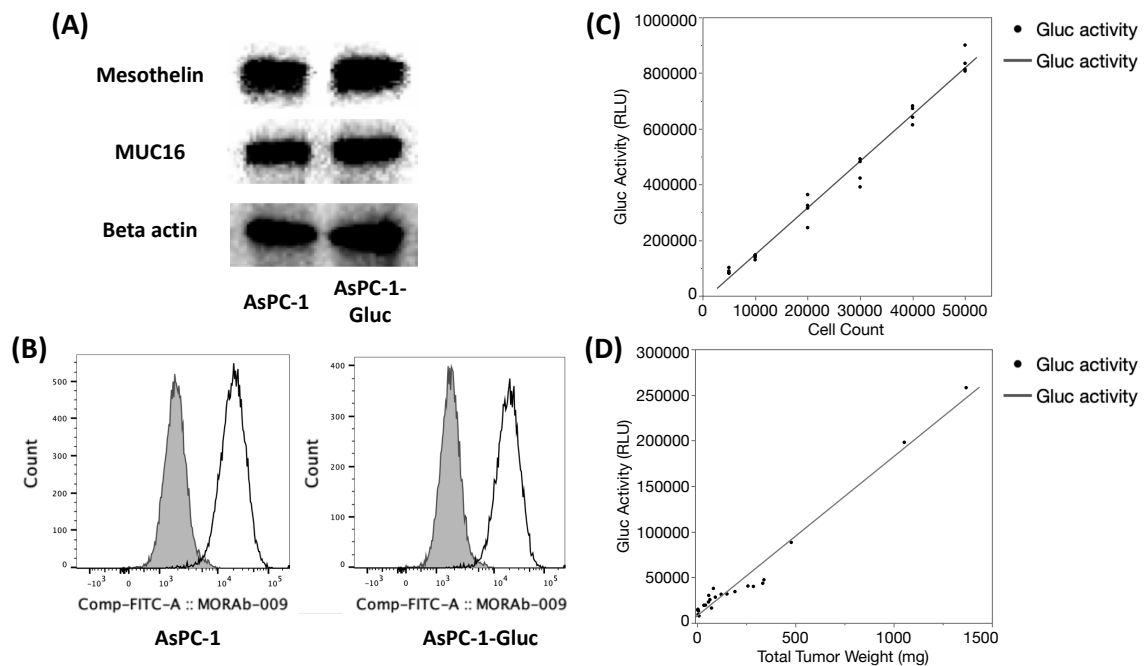


図9 (A) ウエスタンブロット法による、AsPC-1 と AsPC-1-Gluc におけるメソテリンと MUC16 のタンパク発現の比較。(B) FACS 分析による、AsPC-1 と AsPC-1-Gluc に発現しているメソテリンと Amatuximab との親和性の検討。(C) *In vitro* における AsPC-1-Gluc 細胞数と分泌型 Gluc 活性の相関関係。(D) 肝転移マウスモデルの腫瘍重量とマウス血清 Gluc 活性値との相関関係。

膵癌肝転移マウスモデルに対する Amatuximab の効果の評価、および投与間隔の検討 (予備実験)

AsPC-1-Gluc を用いた肝転移マウスモデルにおいて、Amatuximab 投与群はコントロール抗体群と比べ肝転移重量が小さい傾向にあった (図 10A ; コントロール抗体群 vs. Amatuximab q 5 群 vs. Amatuximab q 3 群 : 792.5 ± 268.4 mg vs. 355.6 ± 158.2 mg vs. 209.1 ± 53.7 mg, $P = 0.0501$)。しかし、腫瘍細胞播種後 21 日目、28 日目、42 日目の血清 Gluc 活性値を比較した場合、Amatuximab 投与群はコントロール抗体群より有意に低値を示した (図 10B, C ; 42 日目の Gluc 活性値 : コントロール抗体群 54355.3 ± 25068.6 relative light unit (RLU) vs. Amatuximab q 5 群 7620.4 ± 3366.7 RLU vs. Amatuximab q 3 群 3541.5 ± 985.0 RLU, $P = 0.031$)。

以上の実験で十分な抗腫瘍効果を認めたため、Amatuximab の投与量は先行研究と同様の 60 mg/kg に決定した。また、Amatuximab q 5 群と q 3 群を比較した場合、肝転移重量、血清 Gluc 活性値ともに有意差は認めなかったが、q 3 群で治療効果が大きい傾向があり、Amatuximab の投与間隔を 3 日おきと決定した。

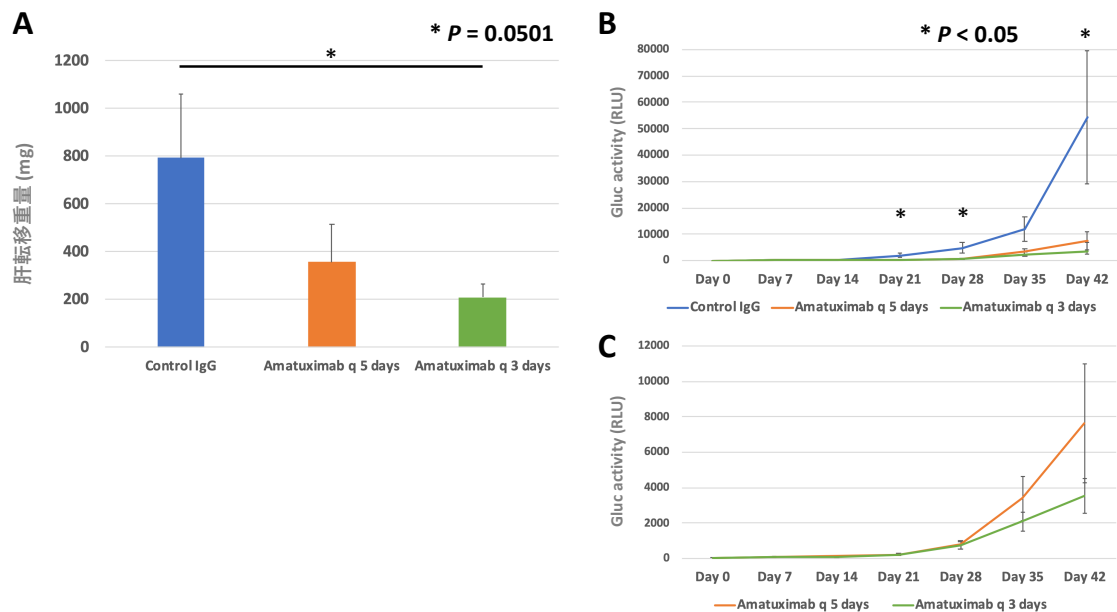


図 10 (A) 各群における肝転移重量の比較。(B) 各群における血清 Gluc 活性値の経時的変化の比較。(C) q 3 群と q 5 群における血清 Gluc 活性値の経時的変化の比較。

膵癌肝転移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 (本実験)

AsPC-1-Gluc 膵癌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較し、肝転移重量を有意に減少させた (図 11A, B ; 100.1 ± 52.4 mg vs. 489.1 ± 164.9 mg, $P = 0.041$)。また、腫瘍細胞播種後 21 日目、35 日目、42 日目の血清 Gluc 活性値は、コントロール抗体群と比べ Amatuximab 群で有意に低かった (図 11C ; それぞれ、 14321.3 ± 1134.4 RLU vs. 10899 ± 710.2 RLU ($P = 0.028$)、 41705 ± 10875.3 RLU vs.

16282.6 ± 2946.9 RLU ($P = 0.041$)、90350 ± 31267.6 RLU vs. 22282.9 ± 5170.1 RLU ($P = 0.0497$)。一方、腫瘍細胞播種後 14 日目を除いて、2 群間でマウスの体重に有意差は認めなかった (図 11D ; 14 日目のマウス体重 : コントロール抗体群 23.0 ± 0.38 g vs. Amatuximab 群 21.3 ± 0.57 g、 $P = 0.039$)。いずれの群においても、その他腹腔内臓器、リンパ節、肺、脳には転移所見を認めなかった。

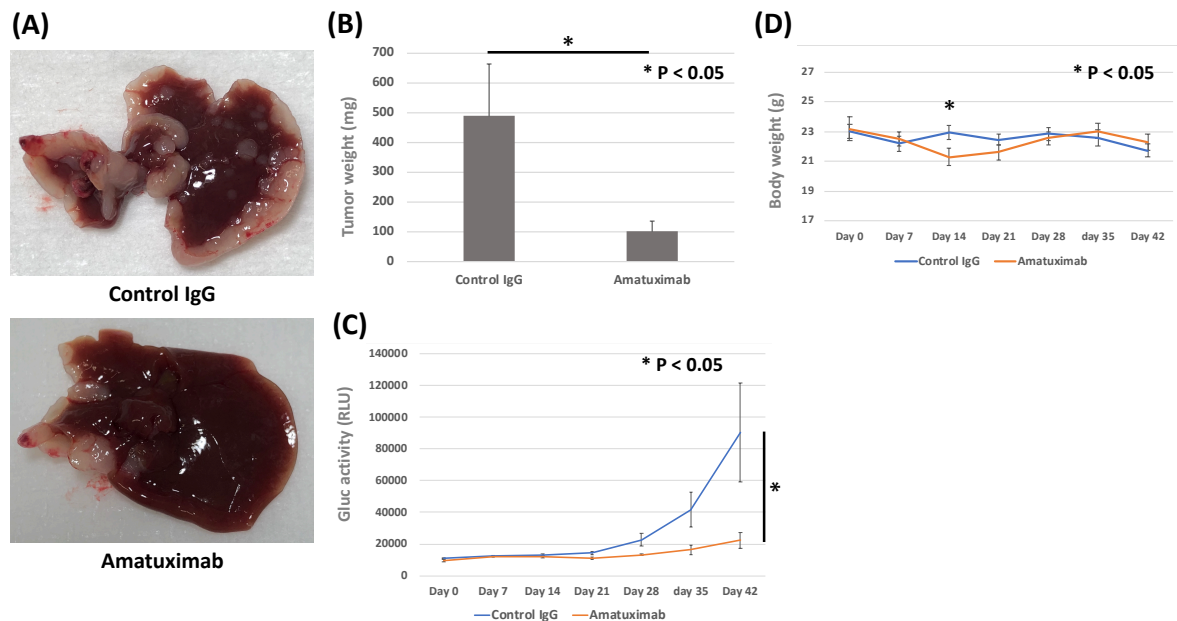


図 11 (A) 各群のマウス肝臓の肉眼的所見。(B) 各群における肝転移重量の比較。(C) 各群における血清 Gluc 活性値の経時的変化の比較。(D) 各群におけるマウス体重の経時的変化の比較。

膀胱癌肝転移マウスモデルにおける Amatuximab 治療による生存期間の評価

図 12 にコントロール抗体群、Amatuximab 群の全生存を示した Kaplan-Meier 曲線を示す。生存期間中央値は、コントロール抗体群で 54 日、Amatuximab 群で 61 日と、Amatuximab 群で有意に生存期間の延長を認めた ($P = 0.0256$)。全てのマウスで、下大静脈浸潤による多量血清腹水を認め、死因と考えられた。いずれのマウスでも、その他腹腔内臓器、リンパ節、肺、脳には転移所見を認めなかった。

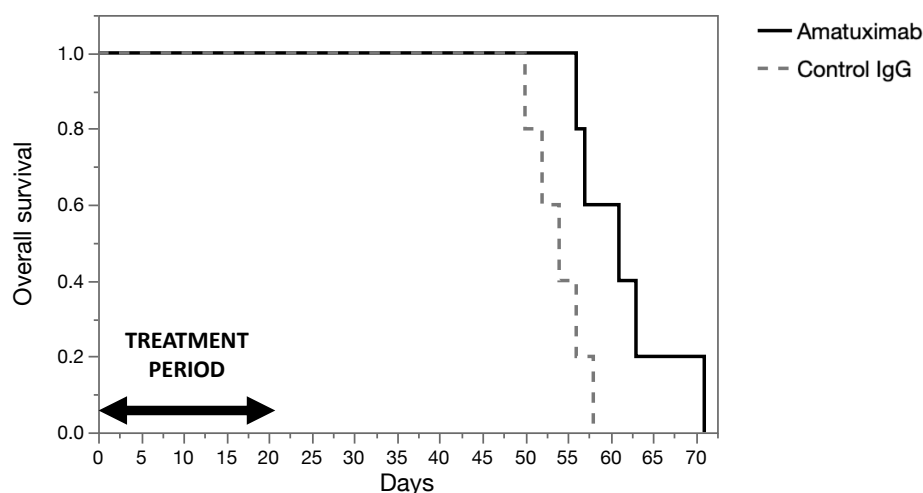


図 12 各群における全生存期間を比較したカプランマイヤー曲線

膵癌肝転移マウスモデルにおける Amatuximab と GEM の併用療法の評価(予備実験)

AsPC-1-Gluc 膵癌肝転移マウスモデルにおいて、各治療群（Amatuximab 群、Amatuximab+GEM 群）はコントロール抗体群と比較し、有意に肝転移重量を減少させた（図 13A；それぞれ、 113.7 ± 58.4 mg vs. 58.6 ± 10.3 mg vs. 541.5 ± 180.5 mg、 $P = 0.011$ ）。また、腫瘍細胞播種後 21 日目、28 日目、35 日目、42 日目の血清 Gluc 活性値は、Amatuximab 群、Amatuximab+GEM 群で、コントロール抗体群と比べ有意に低かった（図 13B；42 日目の Gluc 活性値： 24147.1 ± 5568.3 RLU vs. 24656 ± 3561.6 RLU vs. 98757.1 ± 34775.2 RLU、 $P = 0.028$ ）。Amatuximab 群と Amatuximab+GEM 群の血清 Gluc 活性値を比較すると、14 日目を除いて両群に有意差を認めなかった（図 13C；14 日目の Gluc 活性値： 12560.9 ± 538.4 RLU vs. 7143.8 ± 544.1 RLU、 $P < 0.0001$ ）。

予備実験のプロトコールでは、Amatuximab 単独療法による抗腫瘍効果が強く、GEM との併用療法の評価が困難であった。そのため、プロトコールを修正し、本実験を行うこととした。

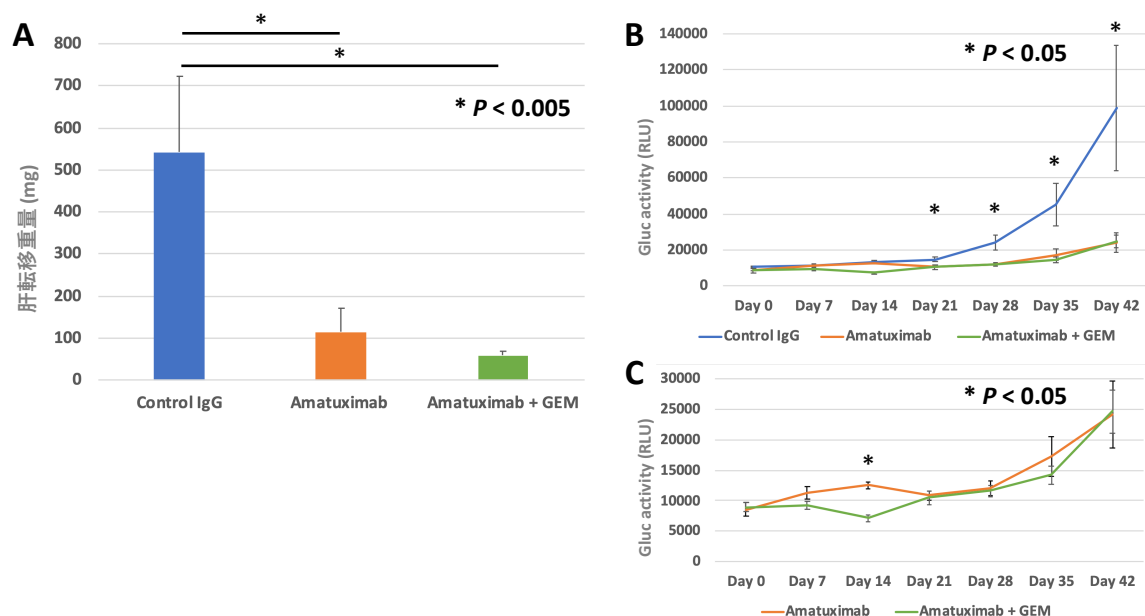


図 13 (A) 各群における肝転移重量の比較。(B) 各群における血清 Gluc 活性値の経時的変化の比較。(C) Amatuximab 群と Amatuximab+GEM 群における血清 Gluc 活性値の経時的変化の比較。

膵癌肝転移マウスモデルにおける Amatuximab と GEM の併用療法の評価 (本実験)

図 14A に各群の肝臓の H&E 所見を示す。AsPC-1-Gluc 膵癌肝転移マウスモデルにおいて、各治療群 (Amatuximab 群、コントロール抗体+GEM 群、Amatuximab+GEM 群) はコントロール抗体群と比較し、平均腫瘍面積 (図 14B ; それぞれ、 $8.4 \pm 1.2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ 、 $8.9 \pm 1.1 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ 、 $3.4 \pm 0.3 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ 、 $22.1 \pm 1.2 \times 10^5 \mu\text{m}^2$ 、 $P < 0.0001$) と平均腫瘍個数 (図 14C ; それぞれ、 19.5 ± 3.0 個、 21.2 ± 3.5 個、 12.5 ± 1.7 個、 33.5 ± 1.5 個、 $P < 0.0001$) を有意に減少させた。また、Amatuximab+GEM 群は Amatuximab 群、コントロール抗体+GEM 群と比べても腫瘍面積は有意に低値であった。さらに、腫瘍細胞播種後 20 日目の血清 Gluc 活性値は、コントロール抗体群と比べ Amatuximab+GEM 群で有意に低かった (図 14D ; 22566.7 ± 4610.8 RLU vs. 10910 ± 383.6 RLU、 $P = 0.012$)。すべての群で、マウスの体重に有意差は認めなかった (図 14E)。いずれの群においても、その他腹腔内臓器、リンパ節、肺、脳には転移所見を認めなかった。

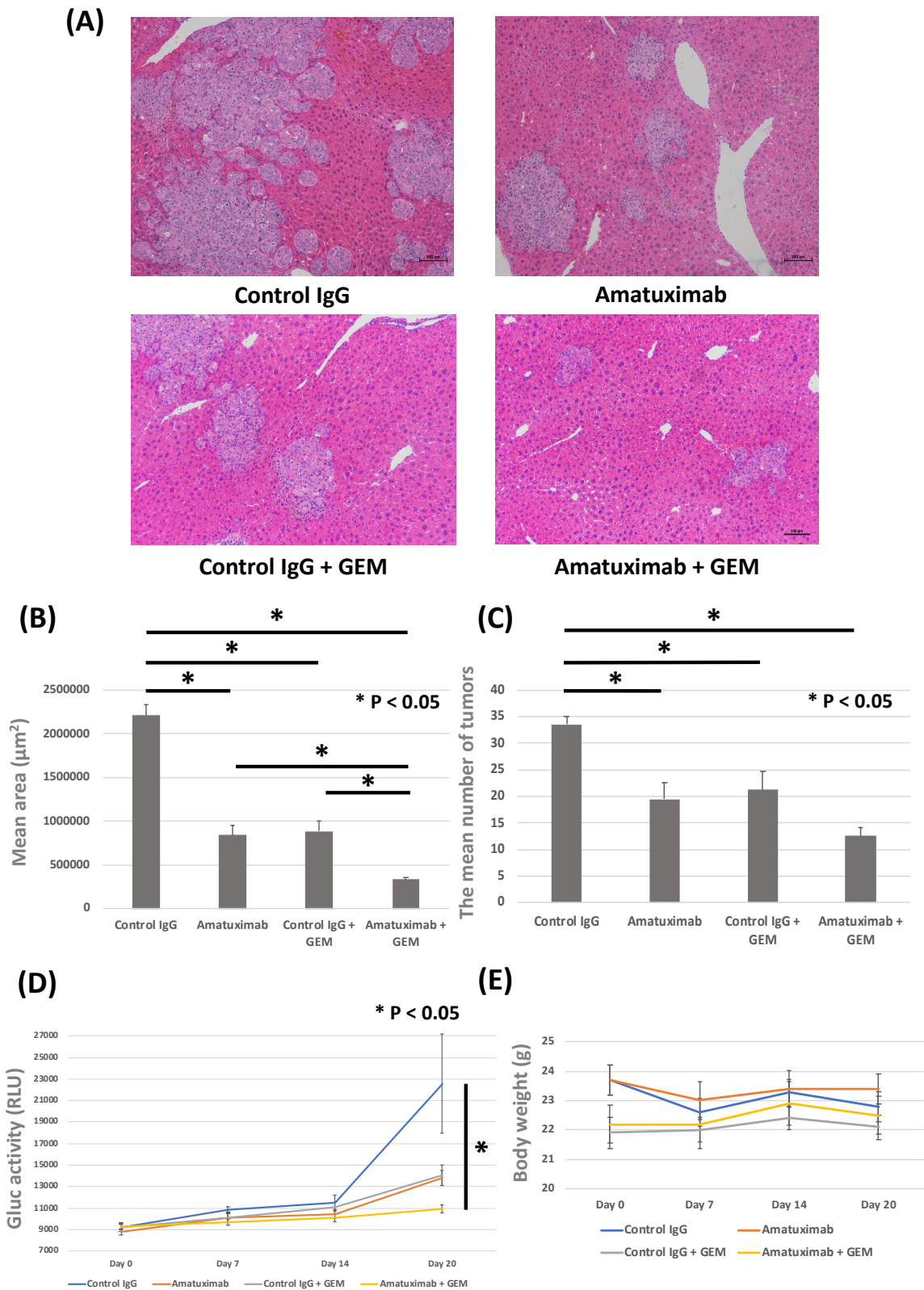


図 14 (A) 各群のマウス肝臓の H&E 所見。(B) 各群における平均腫瘍面積の比較。(C) 各群における平均腫瘍個数の比較。(D) 各群における血清 Gluc 活性値の経時的変化の比較。(E) 各群におけるマウス体重の経時的変化の比較。

各治療群の肝転移巣における生物学的分子マーカーの変化の検討

ウエスタンブロット法で、各治療群の肝転移組織のタンパク発現量を評価した。コントロール抗体+GEM 群は他 3 群と比べ、有意に高い p-c-Met、p-Akt の発現を認めたが、total c-Met、total Akt の発現量に有意差は認めなかった (図 15A,B)。一方で、ALDH1、CD44、CXCR4 などの膵癌 CSC マーカー、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、Slug など EMT 関連タンパクの発現は各群で有意差を認めなかった (図 15C-F)。

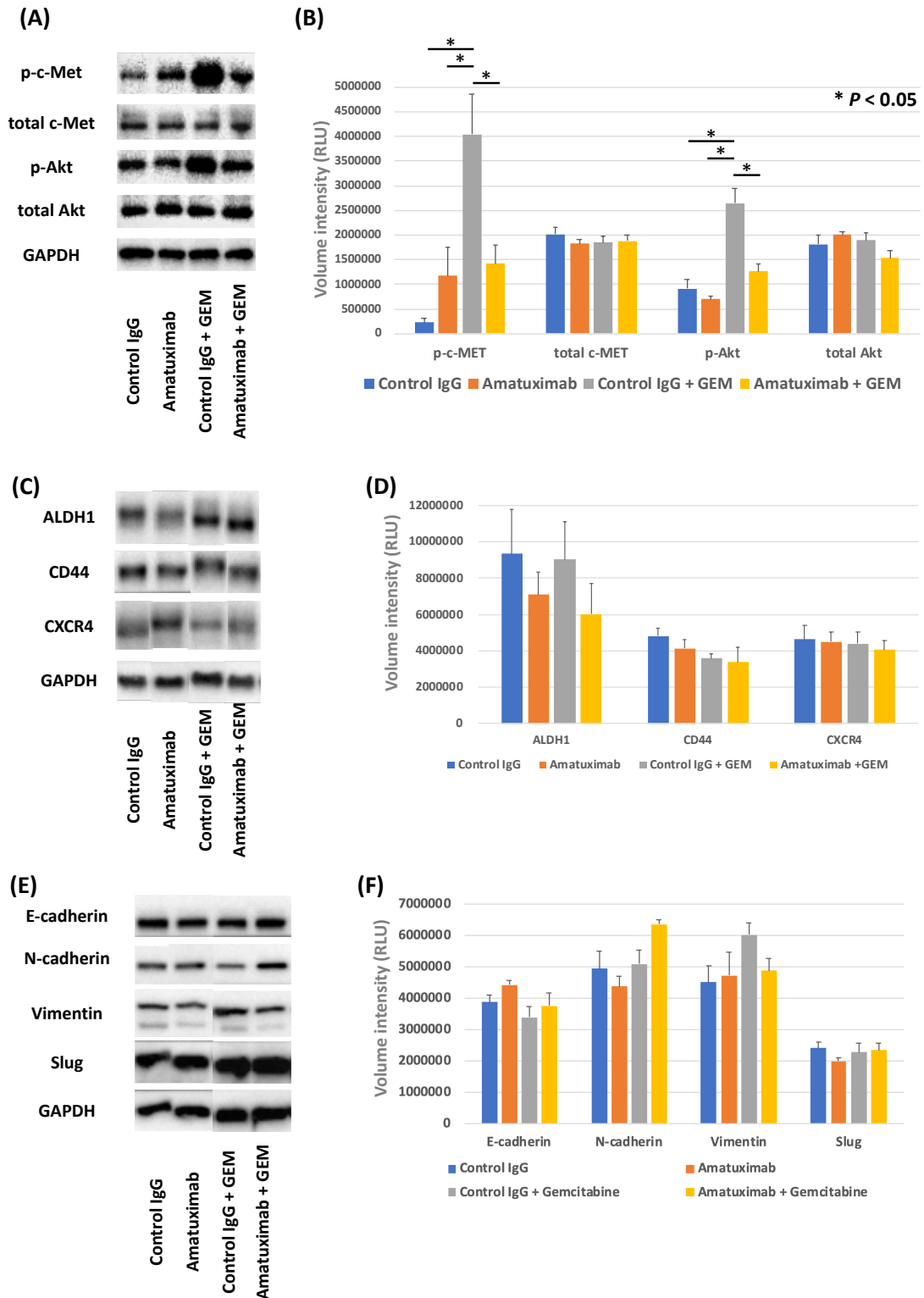


図 15 (A) ウェスタンブロット法を用いた各群の肝転移巣における c-Met/Akt とそのリン酸化タンパクの発現の比較。(B) それらタンパク発現の定量化。(C) ウェスタンブロット法を用いた各群の肝転移巣における膀胱癌 CSC マーカー発現の比較。(D) それらタンパク発現の定量化。(E) ウェスタンブロット法を用いた、各群の肝転移巣における EMT 関連タンパク発現の比較。(F) それらタンパク発現の定量化。

考 察

本研究において、Gluc アッセイ系を用いた膵癌肝転移マウスモデルを確立し、膵癌の肝転移を抑制するための補助化学療法としての Amatuximab の有用性を検討した。本実験の結果より、Amatuximab を腫瘍サイズが小さい時期に投与することによりメソテリン高発現株である AsPC-1 の肝転移を抑制し、生存率の改善に寄与する可能性が示された。また、Amatuximab と GEM との併用療法は膵癌肝転移に対し、相乗的治療効果を示すことが認められた。さらに興味深いことに、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を評価すると、GEM 治療群により上昇したリン酸化 c-Met、Akt が Amatuximab + GEM 併用療法群で低下する現象を捉えた。この現象は、GEM 投与により賦活化された c-Met/PI3K/Akt 経路が、Amatuximab により抑制された可能性を示唆しており、膵癌肝転移に対する相乗的治療効果を裏付ける所見であると考えられる。

各種癌細胞を用いた肝転移モデルでは、腫瘍細胞を門脈内経路、もしくは膵尾部、脾臓経路で播種させることが多い (Hamada et al., 2008; Li et al., 2004; Loukopoulos et al., 2004; Suzuki et al., 2013; Zou et al., 2015) 。しかし、手技的な難易度が高く、また腫瘍の腹腔内播種により Gluc アッセイ系の導入が困難である、といったデメリットが考えられた。半脾臓注射を用いた方法では、腫瘍の腹腔内播種が避けられるメリットに加え、ヌードマウスの自然免疫応答への影響を抑えられる利点がある (Soares et al., 2014) 。また、手技的に失敗が少なく、動物愛護の面からも優れた方法であると考えられた。

メソテリン高発現癌細胞株の皮下腫瘍、および腹膜播種マウスモデルを用いた先行基礎研究では、Amatuximab による抗腫瘍効果が報告されている (Hassan et al., 2007; Mizukami et al., 2018) 。これらの研究では、GEM との相乗的治療効果を認めるものの、Amatuximab の単独治療では腫瘍縮小効果は軽微なものであった。本研究では、これら先行研究と比べ Amatuximab 単独投与の治療効果がより顕著であり、その理由として Amatuximab の体内分布の違いが考えられる。マウス体内における Amatuximab の生理的分布はよく研究されており、Amatuximab は消化管や皮下軟部組織と比べ肝臓へより多く取り込まれることが知られている (Lee et al., 2015; Shin et al., 2011) 。さらに、腫瘍サイズが大きくなるほど肝臓への取り込みは増加するが、血流への分布は低下する。これらの研究結果は、肝臓内腫瘍、特に小さいサイズの腫瘍に対し、Amatuximab はより強く作用することを示唆しており、本研究の目的である早期 Amatuximab 投与による肝転移抑制作用を支持する知見である。一方で、ヌードマウスの自然免疫系が肝臓内とその他の臓器で異なることも理由として考えられる。Amatuximab の抗腫瘍作用として ADCC 活性が重要であり、土着の NK 細胞やマクロファージの数や機能により

その活性は左右される。ヒトとマウスのキメラ抗体である Amatuximab が、ヌードマウス生体内で ADCC 活性を引き起こすかについて明確なエビデンスはないが、*in vitro* の実験では、ヒト化キメラ抗体が免疫不全マウス由来の単核細胞を介して ADCC 活性を引き起こすことが報告されている (Flavell et al., 2006; Nishihara et al., 2000)。さらに、ヒト IgG とマウス Fc ガンマ受容体との高い親和性も報告されており (Dekkers et al., 2017)、本実験においても Amatuximab を介した ADCC 活性が関与し、高い抗腫瘍効果を示したことが示唆される。

本実験の結果で注目すべきこととして、Amatuximab と GEM の相乗的抗腫瘍効果に、Amatuximab による c-Met と Akt のリン酸化の抑制が関与する可能性が示されたことである。先行研究でも Amatuximab と GEM の相乗的抗腫瘍効果は認められていたが、そのメカニズムについては言及されていなかった (Hassan et al., 2007; Mizukami et al., 2018)。教室で行った *in vitro* の実験では、Amatuximab 投与によりメソテリン高発現膀胱癌細胞株の浸潤能・遊走能が抑制され、CSC マーカーや p-c-Met の発現を低下させることを示した (Matsuzawa et al., 2021)。また一方で、PI3K/Akt 経路の賦活化は膀胱癌の抗癌剤耐性メカニズムに関与していると報告されている (Ng et al., 2001; Ng et al., 2000)。さらに Chang らの報告では、メソテリンが PI3K/Akt 経路の活性化を介して、パクリタキセルによるアポトーシスを妨げることが示された (Chang et al., 2009)。これらの報告は、本実験で認められた結果を裏付ける内容であり、Amatuximab と GEM の併用療法がメソテリン高発現膀胱癌に対して有望な抗腫瘍効果を持つことを示唆している。本実験では、Amatuximab による膀胱癌 CSC マーカー、および EMT 関連タンパクの発現変化は確認することはできなかった。生体内では、治療修飾を加えることにより化学療法感受性の高い non-CSC は死滅し、治療抵抗性の CSC が多く残存する傾向が認められている (Mizukami et al., 2014)。そのため、Amatuximab が CSC への脱分化を抑制したとしても、non-CSC が優先的に排除されることで相対的な CSC population に差がつかなかった可能性が考えられた。*In vitro* の実験では、Amatuximab が CSC 特性に影響を与える可能性も示唆されており (Matsuzawa et al., 2021)、Amatuximab 投与による生体内での分子生物学的影響を検討する、さらなる研究が必要であると考えられる。

本研究では、Amatuximab を介した免疫系の反応については解析を行うことはできなかった。ヌードマウスにヒトの癌細胞株を移植し、ヒト-マウスのキメラ抗体を投与するという複雑なモデルのため、自然な免疫反応を観察することは困難と考えられた。より正確な Amatuximab を介した免疫反応を観察するためには、NOD/SCID/gammacnull (NOG) マウスなどを用い、ヒト免疫系マウスモデルを確立することが必要であると考えられる (Ashizawa et al., 2019)。また、生着率の問題により、本研究では AsPC-1 のみでしか肝転移マウスモデルを確立できなかった。本研究の結果をより確かなものにす

るためには、複数の細胞株や patient-derived xenograft (PDX) マウスモデルを用い、さらなる知見の集積が重要であると考えられた。

本研究では、Amatuximab の早期投与がメソテリン高発現膀胱癌細胞株の肝転移形成抑制に有用であることが示され、GEM との相乗的な抗腫瘍効果も確認された。先行研究で早期の Amatuximab 療法は腹膜播種にも有効であることが示されており、本研究の結果と合わせ、Amatuximab の臨床応用が強く期待される。Phase 1 試験では Amatuximab の安全性が示され、その薬物動態も明らかになってきた (Fujisaka et al., 2015)。今後、Amatuximab を術後補助療法として用いた phase 2 試験の開始が待たれる。

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肝転移マウスモデルにおいて、抗メソテリン抗体である Amatuximab を投与することにより肝転移形成が抑制された。

- ・ Amatuximab と GEM の併用療法は、同マウスモデルにおいて相乗的な抗腫瘍効果を示した。

- ・ GEM 投与により、肝転移巣におけるリン酸化 c-Met/Akt が増加したが、Amatuximab との併用療法ではこれらリン酸化が抑制されていた。

②新知見の意義

Amatuximab は、腫瘍塊が形成される以前の早いタイミングに投与されることで、膵癌の肝転移形成を著明に抑制した。これは、Amatuximab の単独療法および GEM との併用療法が術後の微小転移巣に有効に作用し、術後補助化学療法として有用である可能性を示唆するものである。また、Amatuximab がどのように GEM の抗腫瘍効果を増幅するかはこれまで示されていなかった。本研究により、Amatuximab が癌細胞の生存シグナルに影響を及ぼし、生体内で分子生物学的な変化を引き起こしている可能性が示唆された。これにより、Amatuximab の治療薬としての理解が深まり、最適なレジメンの開発につながる事が期待される。

③今後の研究の展開と課題

本研究では、Amatuximab を介した免疫系の反応について解析を行うことはできなかった。より正確な Amatuximab を介した免疫反応を観察するため、NOD/SCID/gammanull (NOG) マウスなどを用い、ヒト免疫系マウスモデルを確立することが重要であると考え。また、本実験で得られた結果をより確かなものにするため、複数の細胞株や PDX マウスモデルを用いた実験が必要である。さらに、Amatuximab の c-Met/Akt/PI3K 経路に対するメカニズムの解明のため、メソテリン強制発現細胞株やノックダウン細胞株を用いた *in vitro* の実験も有用であると考え。Phase 2 試験 (NCT00570713) の否定的な結果により、Amatuximab の膵癌に対する臨床試験はその後行われていない。本研究は Amatuximab の早期投与に関する有効性を示唆するものであり、今後 Amatuximab を術後補助療法として用いた phase 2 試験の開始が期待される。

謝 辞

大学院博士課程を終えるにあたり、本研究の機会を与えていただき、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武冨紹信教授ならびに蒲池浩文講師に深く感謝いたします。

また、御助言を賜りました北海道大学遺伝子病制御研究免疫機能学分野北村秀光准教授、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 Amatumaximab 等の試薬を御提供下さった Morphotek inc. Immuno-therapy 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院消化器外科学教室Ⅰの皆様にも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 は MORPHOTEK INC (Exton, PA, USA)より供与していただいたものです。

本研究に関して、研究にバイアスをもたらす可能性のある利害関係（金銭的・個人的関係）はありません。

引用文献

Ashizawa, T., Iizuka, A., Maeda, C., Tanaka, E., Kondou, R., Miyata, H., Sugino, T., Kawata, T., Deguchi, S., Mitsuya, K., et al. (2019). Impact of combination therapy with anti-PD-1 blockade and a STAT3 inhibitor on the tumor-infiltrating lymphocyte status. *Immunol. Lett.* *216*, 43-50.

Siegel, R.L., Miller, K.D., and Jemal, A. (2019). Cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* *69*, 7-34.

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.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., and Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* *68*, 394-424.

Chang, K., and 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.

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.

Cheng, W.F., Huang, C.Y., Chang, M.C., Hu, Y.H., Chiang, Y.C., Chen, Y.L., Hsieh, C.Y., and Chen, C.A. (2009). High mesothelin correlates with chemoresistance and poor survival in epithelial ovarian carcinoma. *Br. J. Cancer* *100*, 1144-1153.

Cheng, W.F., Hung, C.F., Chai, C.Y., Chen, C.A., Lee, C.N., Su, Y.N., Tseng, W.Y., Hsieh, C.Y., Shih Ie, M., Wang, T.L., et al. (2007). Generation and characterization of an ascitogenic mesothelin-expressing tumor model. *Cancer* *110*, 420-431.

Dekkers, G., Bentlage, A.E.H., Stegmann, T.C., Howie, H.L., Lissenberg-Thunnissen, S., Zimring, J., Rispens, T., and Vidarsson, G. (2017). Affinity of human IgG subclasses to mouse Fc gamma receptors. *MAbs.* *9*, 767-773.

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.

Feng, Y., Xiao, X., Zhu, Z., Streaker, E., Ho, M., Pastan, I., and Dimitrov, D.S. (2009). A novel human monoclonal antibody that binds with high affinity to mesothelin-expressing cells and kills them by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity. *Mol. Cancer Ther.* *8*, 1113-1118.

Ferrone, C.R., Brennan, M.F., Gonen, M., Coit, D.G., Fong, Y., Chung, S., Tang, L., Klimstra, D., and Allen, P.J. (2008). Pancreatic adenocarcinoma: the actual 5-year survivors. *J. Gastrointest. Surg.* *12*, 701-706.

Ferrone, C.R., Pieretti-Vanmarcke, R., Bloom, J.P., Zheng, H., Szymonifka, J., Wargo, J.A., Thayer, S.P., Lauwers, G.Y., Deshpande, V., Mino-Kenudson, M., et al. (2012). Pancreatic ductal adenocarcinoma: long-term survival does not equal cure. *Surgery* *152*, S43-49.

Flavell, D.J., Warnes, S.L., Bryson, C.J., Field, S.A., Noss, A.L., Packham, G., and Flavell, S.U. (2006). The anti-CD20 antibody rituximab augments the immunospecific

therapeutic effectiveness of an anti-CD19 immunotoxin directed against human B-cell lymphoma. *Br. J. Haematol.* *134*, 157-170.

Fujimori, K., Covell, D.G., Fletcher, J.E., and Weinstein, J.N. (1990). A modeling analysis of monoclonal antibody percolation through tumors: a binding-site barrier. *J. Nucl. Med.* *31*, 1191-1198.

Fujisaka, Y., Kurata, T., Tanaka, K., Kudo, T., Okamoto, K., Tsurutani, J., Kaneda, H., Okamoto, I., Namiki, M., Kitamura, C., et al. (2015). Phase I study of amatuximab, a novel monoclonal antibody to mesothelin, in Japanese patients with advanced solid tumors. *Invest. New. Drugs* *33*, 380-388.

Groot, V.P., Blair, A.B., Gemenetzi, G., Ding, D., Burkhart, R.A., Yu, J., Borel Rinkes, I.H.M., Molenaar, I.Q., Cameron, J.L., Weiss, M.J., et al. (2019). Recurrence after neoadjuvant therapy and resection of borderline resectable and locally advanced pancreatic cancer. *Eur. J. Surg. Oncol.* *45*, 1674-1683.

Groot, V.P., Rezaee, N., Wu, W., Cameron, J.L., Fishman, E.K., Hruban, R.H., Weiss, M.J., Zheng, L., Wolfgang, C.L., and He, J. (2018). Patterns, Timing, and Predictors of Recurrence Following Pancreatectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann. Surg.* *267*, 936-945.

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.

Hamada, K., Monnai, M., Kawai, K., Nishime, C., Kito, C., Miyazaki, N., Ohnishi, Y., Nakamura, M., and Suemizu, H. (2008). Liver metastasis models of colon cancer for evaluation of drug efficacy using NOD/Shi-scid IL2R γ manull (NOG) mice. *Int. J. Oncol.* *32*, 153-159.

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., 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. *American Journal of Clinical Pathology* *124*, 838-845.

Hassan, R., Thomas, A., Alewine, C., Le, D.T., Jaffee, E.M., and Pastan, I. (2016). Mesothelin Immunotherapy for Cancer: Ready for Prime Time? *J. Clin. Oncol.* *34*, 4171-4179.

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, J., Ahuja, N., Makary, M.A., Cameron, J.L., Eckhauser, F.E., Choti, M.A., Hruban, R.H., Pawlik, T.M., and Wolfgang, C.L. (2014). 2564 resected periampullary adenocarcinomas at a single institution: trends over three decades. *HPB (Oxford)* *16*, 83-90.

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.

Ho, M., Bera, T.K., Willingham, M.C., Onda, M., Hassan, R., FitzGerald, D., and Pastan, I. (2007). Mesothelin expression in human lung cancer. *Clin. Cancer Res.* *13*, 1571-1575.

Katz, M.H., Wang, H., Fleming, J.B., Sun, C.C., Hwang, R.F., Wolff, R.A., Varadhachary, G., Abbruzzese, J.L., Crane, C.H., Krishnan, S., et al. (2009). Long-term survival after multidisciplinary management of resected pancreatic adenocarcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* *16*, 836-847.

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.

Labori, K.J., Katz, M.H., Tzeng, C.W., Bjornbeth, B.A., Cvancarova, M., Edwin, B., Kure, E.H., Eide, T.J., Dueland, S., Buanes, T., et al. (2016). Impact of early disease progression and surgical complications on adjuvant chemotherapy completion rates and survival in patients undergoing the surgery first approach for resectable pancreatic ductal adenocarcinoma - A population-based cohort study. *Acta. Oncol.* *55*, 265-277.

Lee, J.H., Kim, H., Yao, Z., Lee, S.J., Szajek, L.P., Grasso, L., Pastan, I., and Paik, C.H. (2015). Tumor and organ uptake of (64)Cu-labeled MORAb-009 (amatuximab), an anti-mesothelin antibody, by PET imaging and biodistribution studies. *Nucl. Med. Biol.* *42*, 880-886.

Li, M., Bharadwaj, U., Zhang, R., Zhang, S., Mu, H., Fisher, W.E., Brunicardi, F.C., Chen, C., and Yao, Q. (2008). Mesothelin is a malignant factor and therapeutic vaccine target for pancreatic cancer. *Mol. Cancer Ther.* *7*, 286-296.

Li, Z.Y., Ni, S., Yang, X., Kiviat, N., and Lieber, A. (2004). Xenograft models for liver metastasis: Relationship between tumor morphology and adenovirus vector transduction. *Mol. Ther.* *9*, 650-657.

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.

Loukopoulos, P., Kanetaka, K., Takamura, M., Shibata, T., Sakamoto, M., and Hirohashi, S. (2004). Orthotopic transplantation models of pancreatic adenocarcinoma derived from cell lines and primary tumors and displaying varying metastatic activity. *Pancreas* *29*, 193-203.

Matsuzawa, F., Kamachi, H., Mizukami, T., Einama, T., Kawamata, F., Fujii, Y., Fukai,

M., Kobayashi, N., Hatanaka, Y., and Taketomi, A. (2021). Mesothelin blockage by Amatuximab suppresses cell invasiveness, enhances gemcitabine sensitivity and regulates cancer cell stemness in mesothelin-positive pancreatic cancer cells. *BMC Cancer* *21*, 200.

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.

National Cancer Center Japan (2019). Cancer Registry and Statistics. Cancer Information Service, National Cancer Center, Japan (Vital Statistics of Japan). Accessed on February 10th, 2021. https://ganjoho.jp/reg_stat/statistics/stat/summary.html

Ng, S.S., Tsao, M.S., Nicklee, T., and Hedley, D.W. (2001). Wortmannin inhibits pkb/akt phosphorylation and promotes gemcitabine antitumor activity in orthotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice. *Clin. Cancer Res.* *7*, 3269-3275.

Ng, S.S.W., Tsao, M.S., Chow, S., and Hedley, D.W. (2000). Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase enhances gemcitabine-induced apoptosis in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res.* *60*, 5451-5455.

Nishihara, T., Sawada, T., Yamamoto, A., Yamashita, Y., Ho, J.J., Kim, Y.S., and Chung, K.H. (2000). Antibody-dependent cytotoxicity mediated by chimeric monoclonal antibody Nd2 and experimental immunotherapy for pancreatic cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* *91*, 817-824.

Oettle, H., Neuhaus, P., Hochhaus, A., Hartmann, J.T., Gellert, K., Ridwelski, K.,

Niedergethmann, M., Zulke, C., Fahlke, J., Arning, M.B., et al. (2013). Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA* 310, 1473-1481.

Parikh, A.A., Maiga, A., Bentrem, D., Squires, M.H., 3rd, Kooby, D.A., Maithel, S.K., Weber, S.M., Cho, C.S., Katz, M., Martin, R.C., et al. (2016). Adjuvant Therapy in Pancreas Cancer: Does It Influence Patterns of Recurrence? *J. Am. Coll. Surg.* 222, 448-456.

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.

Shin, I.S., Lee, S.M., Kim, H.S., Yao, Z., Regino, C., Sato, N., Cheng, K.T., Hassan, R., Campo, M.F., Albane, E.F., et al. (2011). Effect of chelator conjugation level and injection dose on tumor and organ uptake of ¹¹¹In-labeled MORAb-009, an anti-mesothelin antibody. *Nucl. Med. Biol.* 38, 1119-1127.

Soares, K.C., Foley, K., Olino, K., Leubner, A., Mayo, S.C., Jain, A., Jaffee, E., Schulick, R.D., Yoshimura, K., Edil, B., et al. (2014). A preclinical murine model of hepatic metastases. *J. Vis. Exp.*, 51677.

Suzuki, K., Aiura, K., Matsuda, S., Itano, O., Takeuchi, O., Umezawa, K., and Kitagawa, Y. (2013). Combined effect of dehydroxymethylepoxyquinomicin and gemcitabine in a mouse model of liver metastasis of pancreatic cancer. *Clin. Exp. Metastasis* 30, 381-392.

Suzuki, T., Yamagishi, Y., Einama, T., Koiwai, T., Yamasaki, T., Fukumura-Koga, M., Ishibashi, Y., Takihata, Y., Shiraishi, T., Miyata, Y., et al. (2020). Membrane mesothelin expression positivity is associated with poor clinical outcome of luminal-type breast cancer. *Oncol. Lett.* 20, 193.

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.

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.

Ueno, H., Kosuge, T., Matsuyama, Y., Yamamoto, J., Nakao, A., Egawa, S., Doi, R., Monden, M., Hatori, T., Tanaka, M., et al. (2009). A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *Br. J. Cancer* *101*, 908-915.

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). *The Lancet* *388*, 248-257.

Uzunparmak, B., and Sahin, I.H. (2019). Pancreatic cancer microenvironment: a current dilemma. *Clin. Transl. Med.* *8*, 2.

Yen, M.J., Hsu, C.Y., Mao, T.L., Wu, T.C., Roden, R., Wang, T.L., and Shih Ie, M. (2006). Diffuse mesothelin expression correlates with prolonged patient survival in ovarian serous carcinoma. *Clin. Cancer Res.* *12*, 827-831.

Zou, Y., Li, J., Chen, Z., Li, X., Zheng, S., Yi, D., Zhong, A., and Chen, J. (2015). miR-29c suppresses pancreatic cancer liver metastasis in an orthotopic implantation model in nude mice and affects survival in pancreatic cancer patients. *Carcinogenesis* *36*, 676-684.