

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592017

研究課題名(和文) 消化器癌における Mesothelin 分子発現の意義と癌悪性度との関係

研究課題名(英文) Significance of Mesothelin expression in gastrointestinal cancer and relation with cancer malignancy

研究代表者

蒲池 浩文 (Kamachi, Hirofumi)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：60374237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円

研究成果の概要(和文)：消化器癌における mesothelin 分子の発現と癌悪性度の関係に関し検討した。膵癌(66例)、胆管癌(61例)、胃癌(110例)、大腸癌(91例)、膵管内乳頭粘液性腫瘍(37例)の切除検体を用いて mesothelin の免疫組織学的染色を行い、発現強度・発現部位と病理学的因子・予後との比較検討を行ったところ、いずれの癌腫においても mesothelin 発現症例の予後は不良であることが判明した。また、膵癌においては CA125 の共発現が、胃癌、胆管癌においては細胞膜発現が予後不良因子であった。大腸癌ではリンパ管侵襲への関与を臨床病理、in vitro の系で明らかとした。

研究成果の概要(英文)：We investigated the relationship of cancer malignancies and mesothelin expression in the gastrointestinal cancer. Mesothelin expression was examined by immunohistochemical staining of surgical specimens of pancreas cancer (n=66), bile duct cancer (n=61), gastric cancer (n=110), colorectal cancer (n=91), and IPNMs (n=37). We compared between clinicopathological parameter, prognosis and mesothelin expression intensity and location, respectively. In all carcinomas, high-level of mesothelin expression was correlated with poor patient outcome. Moreover, co-expression with CA125 was poor prognostic factor in pancreas cancer, and luminal mesothelin expression was also poor prognostic factor in gastric cancer and in bile duct cancer. In colorectal cancer, mesothelin expression was correlated with lymphatic invasion in vitro study and clinicopathological findings.

研究分野：消化器癌

キーワード：mesothelin cancer

1. 研究開始当初の背景

Mesothelin は胸膜、腹膜、心膜などの正常上皮細胞表面に発現している 40kDa の糖蛋白だが、その生物学的機能はよくわかっていない。近年、悪性中皮腫、卵巣癌、膵癌、肺癌などの悪性腫瘍に Mesothelin が高発現していることが報告されている。我々は、膵癌において Mesothelin 発現および、リガンドである CA125 発現が強力な予後不良因子であることを報告した。

2. 研究の目的

消化器癌における Mesothelin 発現の生物学的意義に関してはほとんど解析されておらず、本研究では Mesothelin 発現と癌化および悪性度との関連を分子生物学的に明らかにする。また、抗 Mesothelin 抗体の臨床応用に向けた基礎実験を行う。

3. 研究の方法

(1) 胆管癌、胃癌、大腸癌、膵管内乳頭粘液性腫瘍における Mesothelin 発現と臨床病理学的因子、予後等の解析を行う。

(2) 膵癌細胞株に siRNA を用いて Mesothelin 発現を抑制した細胞株、および Mesothelin 遺伝子を導入し過剰発現株を作成し、癌細胞悪性度(増殖能、浸潤能、遊走能等)の変化を観察し、癌細胞における Mesothelin 発現の意義と機能を明らかにする。

(3) Mesothelin を標的とした cancer immunotherapy に向け、癌移植モデルにおいて抗 Mesothelin 抗体による増殖・転移の変化を検討する

4. 研究成果

(1) 切除検体を用いた胆管癌、胃癌、大腸癌、膵管内乳頭粘液性腫瘍における Mesothelin 発現と臨床病理学的因子、予後等の解析を行った。いずれの癌腫においても Mesothelin 発現は予後不良因子となることが判明した。また、Mesothelin 発現の局在による予後に関して大きな変化が生じていることが判明した。具体的には胃癌、胆管癌において Mesothelin の細胞膜発現は Mesothelin 発現群の中での予後が非常に悪い因子となること、胆管癌においては Mesothelin の細胞質発現が予後良好な因子となった。Mesothelin 発現の局在による細胞学的悪性度に変化が生じることが示唆された。

(2) 4種類の膵癌細胞株から FACS、免疫組

織学的解析により Mesothelin 高発現株として AsPC1 と BXPC3 を選定した。AsPC1 に対し siRNA を用いて Mesothelin 発現を抑制したところ十分な抑制効果を得ることができなかった。一方、BXPC3 に対しては Mesothelin 発現を抑制することが可能となり増殖能/浸潤能を検討した。増殖能には差を認めなかったが浸潤能に関しては Mesothelin 発現を抑制することで有意に浸潤能の低下を認めた。また EMT 関連の遺伝子変化を Real-time Micro Array にて検討したところ、幾つかの候補遺伝子発現の増減を確認できたが、形態学的、タンパクレベルでの発現に変化を認めなかった。

強制発現株として HEK 293 細胞に 71KDa の Mesothelin 全長、30KDa の N 末端、40KDa の C 末端をそれぞれ pCX4-puro ベクターを用いて導入した。いずれも蛋白レベルでの発現を確認できたが一時的であり、恒常的発現細胞株の樹立が困難であった。

大腸癌における Mesothelin 発現を臨床病理学的に検討したところリンパ管侵襲と相関することがわかり、in vitro の系を用いて検討した。大腸癌細胞株である WiDR に Mesothelin の全長、C 末端、N 末端、MOCK を導入し、リンパ管上皮細胞との共培養系を用いて浸潤等の検討を行った。Mesothelin 全長、C 末端導入細胞株はリンパ管内皮細胞への浸潤が高く、また MOCK と比較し Mesothelin 導入細胞株はリンパ管上皮細胞との接着能が亢進することが確認された。癌細胞における Mesothelin 発現はリンパ管上皮細胞への親和性が亢進することでリンパ管浸潤を来しやすいことが確認でき、細胞学的に悪性度を高める因子となることが示唆された。

(3) まず Mesothelin 高発現株である AsPC1 に分泌型 Gluc 蛋白を導入した細胞株を作成し、皮下移植モデルで血清中の luciferase 活性を測定することで腫瘍細胞数を評価可能な系を作成した。

この系を用いて AsPC1 の腹膜播種モデルにおける抗 mesothelin 抗体の効果を検証した。抗体存在下では腹腔内の腫瘍結節体積の抑制が観察されたが、腹腔内の腫瘍細胞がシャーベット状に浮遊している状況が確認でき、これらの個体での血中 luciferase 活性には変化がなかったことから、抗 mesothelin 抗体による腹膜との癌細胞の接着阻害が腫瘍塊形成を阻害している可能性が示唆された。

抗癌剤である gemcitabine を腹腔内投与し抗

mesothelin 抗体投与下での抗癌剤増強作用を観察したところ、抗 mesothelin 抗体存在下では腫瘍体積、血中 luciferase 活性の低下が観察でき、シャーベット状の浮遊癌細胞はほぼ観察されなかった。このことより、抗 mesothelin 抗体による癌細胞の腹膜着床抑制により結節形成腹膜播種モデルにおいては抗 mesothelin 抗体と抗癌剤併用による抗腫瘍増強作用が確認できた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 4 件)

1. T Einama, H Kamachi, H Nishihara, S Honma, H Kannno, M Ishikawa, F Kawamata, Y Konishi, M Sato, M Tahara, K Okada, S Muraoka, T Kamiyama, A Taketomi, Y Matsuno, H Furukawa and S Todo

Importance of luminal membrane mesothelin expression in intraductal papillary mucinous neoplasms

ONCOLOGY LETTERS(2015)9:1583-1589

DOI: 10.3892/ol.2015.2969、査読有

2. F Kawamata, S Honma, H Kamachi, T Einama, Y Kato, M Tsuda, S Tanaka, M Maeda, K Kajino, O Hino, N Takahashi, T Kamiyama, H Nishihara, A Taketomi, S Todo.

C-ERC/mesothelin provokes lymphatic invasion of colorectal adenocarcinoma

J Gastroenterol (2014) 49:81-92

DOI 10.1007/s00535-013-0773-6、査読有

3. T Einama, S Honma, H Kamachi, F Kawamata, K Takahashi, N Takahashi, M Taniguchi, T Kamiyama, H Furukawa, Y Matsuno, S Tanaka, H Nishihara, A Taketomi, S Todo

Luminal membrane expression of mesothelin is a prominent poor prognostic factor for gastric cancer

British Journal of Cancer (2012) 107, 137-142. doi:10.1038/bjc.2012.235、査読有

4. F Kawamata, H Kamachi, T Einama, S Honma, M Tahara, M Miyazaki, S Tanaka, T Kamiyama, H Nishihara, A Taketomi and S Todo

Intracellular localization of mesothelin predicts patient prognosis of extrahepatic bile duct cancer

INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY (2012) 41: 2109-2118. DOI: 10.3892/ijo.2012.1662、査読有

[学会発表](計 5 件)

1. 西原広史、川俣太、永生高広、津田真寿美、王磊、樋野興夫、武富紹信、田中伸哉: Molecular and clinicopathological analysis for ERC/Mesothelin in digestive cancers (消化器癌における ERC/Mesothelin の分子病理学的検討)

第 72 回日本癌学会学術総会 2013.10.3-5 パシフィコ横浜 (横浜市)

2. 川俣太、蒲池浩文、永生高広、西原広史、田原宗徳、神山俊哉、藤堂省、武富紹信
細胞内の局在に着目した肝外胆管癌における Mesothelin 発現の免疫組織学的検討(会議録)

第 25 回日本肝胆膵外科学会 2013.6.12-14 ホテル東日本宇都宮・栃木県総合文化センター (宇都宮市)

3. 西原広史、樋野興夫、藤堂省、田中伸哉: ERC/Mesothelin is one of principle biomarkers for digestive cancer to predict patients' prognosis (ERC/Mesothelin は消化器癌における重要な予後予測因子である)

第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会 2013.6.12-14 国立京都国際会館 (京都市)

4. 西原広史、川俣太、永生高広、加藤容崇、樋野興夫、武富紹信、田中伸哉
消化器癌における ERC/mesothelin 発現の分子病理学的解析

第 102 回日本病理学会総会 2013.6.6-8 ロイトン札幌、ホテルさっぽろ芸文館 (札幌市)

5. 永生高広、蒲池浩文、西原広史、本間重紀、田原宗徳、岡田邦明、村岡俊二、神山俊哉、松野吉宏、谷口雅彦、古川博之、武富紹信、藤堂省

Intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMNs)における Mesothelin 発現様式の検討
第 113 回日本外科学会 2013.4.11-13 福岡国際会議場、福岡サンパレス、マリンメッセ福岡 (福岡市)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

蒲池 浩文 (KAMACHI, Hirofumi)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号 : 60374237

(2)研究分担者

神山 俊哉 (KAMIYAMA, Toshiya)

北海道大学・医学研究科・准教授

研究者番号 : 80322816

西原 広史 (NISHIHARA, Hiroshi)

北海道大学・医学研究科・特任准教授

研究者番号 : 50322805

尾崎 倫孝 (OZAKI, Michitaka)

北海道大学・保健科学研究所・教授

研究者番号 : 80256510