

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：24701

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24890208

研究課題名(和文)膵癌におけるMUC16, mesothelinによる浸潤能促進メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the mechanism for invasive ability by MUC16 and mesothelin in the pancreatic cancer.

研究代表者

清水 敦史 (SHIMIZU, Atsushi)

和歌山県立医科大学・医学部・学内助教

研究者番号：00637910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円、(間接経費) 720,000円

研究成果の概要(和文)：網羅的遺伝子発現解析を用いて膵癌浸潤規定遺伝子としてMUC16とmesothelinを同定した(Cancer Sci, 2012)。本研究では、MUC16/mesothelinによる膵癌の浸潤・転移メカニズムの全容を解明することを目的とし、特に、浸潤・転移能獲得に大きな役割を担っているEpithelial-mesenchymal transition(EMT)に注目し、MUC16/mesothelinによる作用について研究を行った。本研究結果により、ペプチド免疫療法などのMUC16/mesothelinをターゲットとした新規膵癌治療開発に繋がると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have identified two specific genes, MUC16 and mesothelin, associated with the invasion process in patients with pancreatic cancer using genome-wide expression profiling (Cancer Sci, 2012). In this study, it was intended to elucidate the mechanism of the invasion and metastasis, associated with EMT, induced by MUC16/mesothelin. By in vitro examination using pancreatic cancer cell line, it was suggested that the presence (and binding) of MUC16 and mesothelin in pancreatic cancer might affect the acquisition of high invasion and metastasis ability through the EMT. MUC16 and mesothelin clinically represent new prognostic biomarkers for PDAC and might be new therapeutic targets for patients with PDAC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器外科学

キーワード：膵癌浸潤規定遺伝子 MUC16 mesothelin

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は予後不良な癌腫のひとつで、5年生存率は5%未満である。膵癌が予後不良である原因は、早期より浸潤・転移を来し、切除不能な進行膵癌の状態で見られることが多く、また外科的切除した症例においても術後早期に再発する頻度が高いためと考えられている。

Pancreatic intraepithelial neoplasms (PanIN) と称される膵癌の前駆病変である細分枝膵管細胞の異型 (PanIN-1A, -1B, -2, -3) が進行し、浸潤癌へと進展することが知られている。PanIN grade が進むに従って p16 や SMAD4 の発現消失 (*Nat Genet, 1994, Mod Pathol, 2003*) など様々な分子異常が蓄積されることが報告されている。PanIN-3 は異型細胞の乳頭状増殖を呈し、従来の上皮内癌に相当し、この異型細胞が基底膜を破って周囲に浸潤することで浸潤癌となり、周囲の臓器への直接浸潤能、リンパ行性あるいは血行性転移能を獲得する。しかし、PanIN-3 と浸潤癌の遺伝子発現を比較した報告は今までになく、PanIN-3 から浸潤癌へ進む段階に關与する遺伝子については明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

新規膵癌治療の標的分子を開発する目的で、われわれは膵癌の浸潤過程に着目し、網羅的遺伝子発現解析を用いて膵癌浸潤規定遺伝子の同定を行った。その結果、PanIN-3 より浸潤癌で高発現を認めた MUC16 と mesothelin を同定し、さらに切除標本を用いた検討により MUC16 および mesothelin の高発現は、独立した予後不良因子であることがわかり報告した (*Cancer Sci, 2012*)。本研究では、*in vitro* および *in vivo* における MUC16/mesothelin による膵癌の浸潤・転移メカニズムの全容を解明することを目的とした。特に、浸潤・転移能獲得に大きな役割を担っている Epithelial-mesenchymal transition (EMT) に注目し、MUC16/mesothelin による作用について研究を行った。本研究結果により、ペプチド免疫療法などの MUC16/mesothelin をターゲットとした新規膵癌治療開発に繋がると考えられる。

## 3. 研究の方法

(1) shRNA を用いた MUC16 単独、mesothelin 単独、および MUC16, mesothelin double knockdown 膵癌細胞株の樹立

既に10種類の膵癌細胞株 (PANC1, PK1, PK8, PK9, CfPAC1, BxPC3, Capan-1, Capan-2, MIAPaCa2, AsPC1) において RT-PCR, Western blotting, 免疫細胞染を行い、膵癌細胞株における MUC16/mesothelin 発現を解析した結果、PK9 は MUC16, mesothelin とともに RNA お

よび蛋白レベルにおいて高発現を認めた。そのため、この2種の膵癌細胞株に対して shRNA を用いてリポフェクタミン法にてまず MUC16 単独、mesothelin 単独抑制膵癌細胞株を作成する。SureSilencing™ shRNA Plasmid for Human MUC16 (Neomycin 耐性) および mesothelin (Puromycin 耐性) (SABiosciences) を *E. coli* DH5 Competent Cell を用いて精製し、膵癌細胞株 PK9 に Lipofectamine2000™ (Invitrogen) を用いて Plasmid 導入を行った。導入した細胞をそれぞれ Neomycin, Puromycin を用いて選択、限界希釈を行いクローン化し、遺伝子抑制は Real-time RT-PCR, Western Blotting にて確認した。MUC16 単独抑制膵癌細胞株が stable となった後、さらに mesothelin shRNA を使用して double-knockdown を行った。

(2) 膵癌における MUC16/mesothelin 発現と EMT との関連の探索

膵癌細胞株 PK9、樹立した MUC16 抑制膵癌細胞株、mesothelin 抑制膵癌細胞株、および MUC16/mesothelin double knockdown 膵癌細胞株 (PK9) とそれぞれの vector control 細胞株について、免疫蛍光染色および Western blotting を用いて EMT との関連を探索した。

### 免疫蛍光染色

カバーガラス上で1日細胞培養を行い、洗浄後4%ホルマリンにて固定、洗浄後、0.2% TritonX を含んだ PBS にて permeabilization を行いヤギ血清でブロッキングを行った後に、Zenon Alexa Fluor488 (Invitrogen) にてラベリングを行った各抗体 (抗 E-cadherin 抗体 (BD)、抗 Cytokeratin-18/8 抗体 (Zymed)、抗 N-cadherin 抗体 (BD)、抗 Vimentin 抗体 cloneV9 (MILLIPORE)、抗 Snail-1 抗体 (Santa-Cruz)) をアブライして60分 incubate する。その後洗浄固定、DAPI 染色、封入を行い蛍光顕微鏡にて観察した。

### Western blotting

膵癌細胞株より抽出した蛋白 30 μg を SDS-PAGE (Invitrogen) にアブライして蛋白電気泳動を行って蛋白質を分離、PVDF メンブレンにトランスファーし、各抗体 (抗 E-cadherin 抗体 (BD)、抗 Cytokeratin-18/8 抗体 (Zymed)、抗 N-cadherin 抗体 (BD)、抗 Vimentin 抗体 cloneV9 (MILLIPORE)、抗 Snail-1 抗体 (Santa-Cruz)) にて一次反応、二次反応を行い、ECL plus (GEヘルスケアバイオサイエンス) を用いて Light Capture (ATTO) にて検出した。

(3) 浸潤能、遊走能アッセイ

膵癌細胞株 PK9、樹立した MUC16 抑制膵癌細胞株、mesothelin 抑制膵癌細胞株、および MUC16/mesothelin double knockdown 膵癌細胞株 (PK9) とそれぞれの vector control 細

胞株につき、それぞれ浸潤能、遊走能アッセイを行った。BD BioCoat マトリゲルインベーションチャンバー(BD Biosciences)を用い、24well のセルカルチャーインサートにマトリゲル基底膜マトリックスでコートされた 8 $\mu$ m のポアサイズの PET メンブレンに 5x10<sup>4</sup> 細胞を加え、37<sup>o</sup>C、5%CO<sub>2</sub> の加湿培養インキュベーターで 22 時間インキュベーション後、非浸潤細胞を擦過除去し、Diff-Quik 液にて染色、浸潤細胞数を測定する。また、マトリゲル基底膜マトリックスでコートされていないメンブレンを用い、同様の手法で遊走細胞数を測定した。

(4) 膵癌切除症例における MUC16/mesothelin の免疫染色による蛋白解析

1999年~2007年の膵癌切除症例224例を対象に免疫染色を行い、生存因子解析を行った。

#### 4. 研究成果

(1)

MUC16 抑制膵癌細胞株、mesothelin 抑制膵癌細胞株、および MUC16/mesothelin double knockdown 膵癌細胞株 (PK9) とそれぞれの vector control 細胞株を作成、安定化させた後、遺伝子抑制は Real-time RT-PCR、Western Blotting にて確認した。

(2)

膵癌細胞株 PK9、樹立した MUC16 抑制膵癌細胞株、vector control 細胞株に対し、E-cadherin、Cytokeratin-18/8、N-cadherin、Vimentin、Snail-1 の発現を免疫蛍光染色、Western-blotting にて確認した。PK9、vector control 細胞株に比べて、MUC16 抑制膵癌細胞株で E-cadherin、Cytokeratin-18/8 が高発現し、N-cadherin、Vimentin の発現が低下していた。また、Snail 蛋白は PK9、vector control 細胞株の核内に発現を認めたものの、MUC16 抑制膵癌細胞株では発現を認めず、MUC16 を knockdown することで Snail 発現が抑制されるという結果となった。Snail 遺伝子は EMT の master regulator のひとつであり、MUC16 は Snail 遺伝子発現による EMT に関与していることが考えられた。

mesothelin 抑制膵癌細胞株、MUC16/mesothelin double knockdown 膵癌細胞株についても同じ検討を行ったが、いずれも同様の結果となった。また、MUC16 抑制膵癌細胞株における mesothelin 発現を調べると、mesothelin の発現減弱がみられ、mesothelin 抑制膵癌細胞株においても MUC16 発現の減弱がみられた。われわれは以前行った膵癌細胞株、膵癌切除標本を用いた共免疫沈降法による検討で、膵癌において MUC16、mesothelin は互いに ligand-receptor の関係で結合していることを報告してきた。本研究

の結果により、MUC16、mesothelin は膵癌において互いが必要な存在であり、両者の存在(結合)により EMT を誘導することが膵癌にとって高い浸潤能、転移能獲得の重要なメカニズムであることが示唆された。

(3)

膵癌細胞株 PK9、MUC16 抑制膵癌細胞株、mesothelin 抑制膵癌細胞株、および MUC16/mesothelin double knockdown 膵癌細胞株 (PK9) とそれぞれの vector control 細胞株につき、それぞれ浸潤能、遊走能アッセイを行うと、parent PK9 細胞株、それぞれの vector control 株に比べて各抑制膵癌細胞株では有意に浸潤能、遊走能が抑制された。

(4)

当科で切除した膵癌症例 224 例を用いて免疫染色を行った。その結果は陽性細胞占有率、陽性細胞染色強度を判定し、スコアリングを行い、それぞれの中央値をもって Cut off とし、MUC16/mesothelin 共に高発現した群と、それ以外に分けて生存因子解析を行った。MUC16/mesothelin 共に高発現した群は 43%で、共に発現が低かった群は 43%であった。一方は高発現で一方は低発現であった例は計 14%にしか認めず、免疫染色の結果からも、両者の発現は互いにとって必要であることが示唆された。MUC16/mesothelin 共に高発現した群は有意に生存期間が短く、生存因子解析を行うと、独立した予後不良因子であった。(P=0.131, HR 1.9385, 95%CI 1.155-3.412)

#### 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 0 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

(1) Atsushi Shimizu, Seiko Hirono, Masaji Tani, Manabu Kawai, Ken-ichi Okada, Motoki Miyazawa, Yuji Kitahata, Hiroki Yamaue. The specific genes related to the invasion process in pancreatic cancer, as demonstrated by genome-wide expression profiling - the role of MUC16 and mesothelin. 11<sup>th</sup> World Congress of the International Hepato-Pancreato-Biliary Association 2014.3.23 Seoul

(2) 清水敦史、廣野誠子、谷眞至、川井学、岡田健一、宮澤基樹、北畑裕司、山上裕機. 網羅的遺伝子発現解析を用いた新規膵癌治療標的遺伝子の同定 第 44 回膵臓学会 2013.7.26 仙台

(3) Atsushi Shimizu, Seiko Hirono, Masaji Tani, Manabu Kawai, Ken-ichi Okada, Motoki Miyazawa, Yuji Kitahata, Hiroki Yamaue. The specific genes related to the

invasion process in pancreatic cancer、 as demonstrated by genome-wide expression profiling - the role of MUC16 and mesothelin, Pancreas cancer in Kyoto、 2012.10. Kyoto

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

清水 敦史 (SHIMIZU, Atsushi)  
和歌山医科大学 医学部・学内助教  
研究者番号：00637910

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：