

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：24701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861096

研究課題名(和文) IPMN由来浸潤癌に対する新規治療標的遺伝子の検証とペプチドワクチン療法の開発

研究課題名(英文) Development of cancer peptide vaccine therapy against newly target gene for invasive intraductal papillary mucinous carcinoma

研究代表者

清水 敦史 (SHIMIZU, Atsushi)

和歌山県立医科大学・医学部・その他

研究者番号：00637910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：IPMN由来浸潤癌に対する新規がんペプチドワクチン療法の開発を目的とし、浸潤性膵管癌の新規治療標的遺伝子として期待されているMUC16/mesothelinをtargetとして臨床病理学的検討および分子生物学的検討を行った。当科で切除したIPMN症例223例を対象にMUC16およびmesothelin蛋白発現解析を行うと、low～high grade dysplasia症例では発現を認めず、IPMN由来浸潤癌となって初めて発現することが分かったが、MUC16/mesothelin高発現は独立した予後不良因子とはならなかった。摘出標本より細胞培養を行い、蛋白発現解析、共発現解析を行った。

研究成果の概要(英文)：MUC16 and mesothelin has been hopeful as a newly target gene for pancreatic ductal adenocarcinoma. In this study, we investigated the clinicopathological and molecular biological function of MUC16 and mesothelin for the intraductal papillary mucinous neoplasm (IPMN) to develop the cancer peptide vaccine therapy. In the result, MUC16/mesothelin were not expressed in the low-, intermediate, and high-grade dysplasia, but expressed invasive IPMC. However, MUC16/mesothelin high expression was not an independent prognostic factor for overall survival. We cultured the cell line of IPMC derived from surgical specimens and performed the expression and co-expression analyses of MUC16/mesothelin.

研究分野：膵臓外科学

キーワード：MUC16 mesothelin IPMN ペプチドワクチン療法

### 1. 研究開始当初の背景

われわれは網羅的遺伝子発現解析を用いて同定した膵癌の浸潤規定遺伝子の中うち、MUC16 と mesothelin は相互作用により膵癌の浸潤能を増強し、その高発現は独立した予後不良因子であることを解明し、報告した(*Cancer Sci.* 2012)。一方膵管内乳頭粘液性腫瘍 (Intraductal papillary mucinous neoplasm; IPMN) 由来浸潤癌は近年症例数が増加しているが、その切除不能進行再発例に対して有効な治療法は確立していない。試験的に蛋白発現解析を試みると、IPMN 由来浸潤癌において高率に MUC16/mesothelin を高発現していることが判明した。

IPMN は当初浸潤性膵管癌の前駆病変と捉えられてきたが、分子生物学的検討により、浸潤性膵管癌との関連がある *Kras oncogene* の point mutation は IPMN でも同様にみられるものの、*p16* や *SMAD4* の発現消失などの変化は低頻度であり(*Ann Surg* 2009)、対して浸潤性膵管癌ではみられない *GNAS* mutation が IPMN では高頻度にみられることが報告され(*Sci Transl Med* 2011)、その生物学的な相違が明らかとなりつつある。IPMN 症例に対しては浸潤性膵管癌に従い、gemcitabine や TS-1 による化学療法が行われているが、IPMN 由来浸潤癌に対して validate された治療法とは言えず、分子標的治療を含めた新たな治療法の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

本研究は症例の増加にも関わらずいまだに治療法が確立していない進行・再発 IPMN 由来浸潤癌に対する新規分子標的治療の開発を目的とし、MUC16/mesothelin を target として臨床病理学的検討および分子生物学的検討を行い、がんペプチドワクチン療法の開発を IPMN 由来浸潤癌に応用し、発展させることを目的とする。

### 3. 研究の方法

#### (1) IPMN 切除症例における MUC16/mesothelin の蛋白発現解析

1999年7月から2013年5月に和歌山県立医大第2外科で切除した IPMN 症例 223 例 (invasive IPMC 68 例、high-grade dysplasia 74 例、low-, intermediate-grade dysplasia 81 例) を対象に MUC16 および mesothelin の免疫染色を用いた蛋白解析を行い、臨床病理学的、生命予後との相関について検討する。

#### (2) 摘出標本による IPMN 由来浸潤癌細胞培養

当科で切除した IPMN 由来浸潤癌組織 3 症例に対し、組織片を採取し 3 次元初代がん細胞培養キット (Scivax Life Science 社) 用いて細胞培養を行った。組織片をミンス後酵素処理を行い、細胞混濁液をセルストレーナーにてろ過し、細胞分散液を作成する。遠心後上清を除去し、初代培養専用培地を加え、 $2 \times 10^5$  cells/ml とし、100 $\mu$ l ずつ NanoCulture Plate に播種する。培地交換を行いながら培養する。得られた培養細胞を免疫染色、RT-PCR、Western blotting により MUC16 および mesothelin の蛋白発現解析を行った。

#### 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 (MUC16 抗体 (abcam)、抗 mesothelin 抗体 (Thermo)) をアプライして 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。

#### PCR

RT-PCR に用いる primer および hybridization probe をそれぞれ作成し、それぞれの分子に対して、リファレンス (total human RNA) を用いた定量検量線を作成すべく、RT-PCR の条件設定と測定感度設定を行う。Reverse Transcription System (Promega) を用いて逆転写を行い、cDNA を作成。Light Cycler (Roche Applied Science) を用いて RT-PCR を行い、それぞれの分子の mRNA 発現を評価した。

#### Western blotting 法

培養細胞 30 $\mu$ g を SDS-PAGE (invitrogen) にアプ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) IPMN 由来浸潤癌における MUC16/mesothelin 相互作用の検討

われわれは以前の実験にて、浸潤性膵管癌において MUC16 と mesothelin は共に結合することで、相互作用により増殖、転移、および Epithelial mesenchymal transition に寄与することを報告した。同機序の MUC16/mesothelin 発現 IPMN 由来浸潤癌における作用を検討する目的で、免疫沈降法による結合実験を行った。Universal Co-IP Kit (Active motif) を使用して培養細胞ライセートに抗 MUC16 抗体、抗 mesothelin 抗体、rabbit IgG control をそれぞれ混和し、4 時間反応後 Magnetic Protein G Beads を加えて反応させた。洗浄後、免疫沈降試料を抽出し、Western

blotting 法により MUC16 および mesothelin 蛋白発現について検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) IPMN 切除症例における MUC16/mesothelin の蛋白発現解析

当科で切除を行った IPMN 症例 223 例 (invasive IPMC 68 例、high-grade dysplasia 74 例、low-, intermediate-grade dysplasia 81 例) を対象に MUC16 および mesothelin の免疫染色を行った。MUC16 は invasive IPMC 68 例中 62 例に蛋白発現しており、mesothelin は 68 例中 64 例に発現を認めた。しかし、high-grade dysplasia、および low-, intermediate-grade dysplasia の 155 例では MUC16, mesothelin の発現を認めなかった。このことは、われわれが以前行った浸潤性膵管癌および、PanIN3 病変に対する蛋白発現解析結果と同様、invasive cancer となって初めて MUC16, mesothelin ともに発現することと同じ結果であり、MUC16, mesothelin ともに浸潤化に深く関与している可能性が考えられた。invasive IPMC 症例 68 例の蛋白発現解析において、その発現の割合 (%) と、強度 (0-3) を測定し、その積を用いてスコアリングを行った。MUC16, mesothelin の発現スコアの中央値を cut off 値とし、MUC16/mesothelin 高発現群と低発現群に分類して解析を行った。MUC16/mesothelin 高発現群の MST は 38 ヶ月、低発現群の MST は 49 ヶ月と、高発現群で短い傾向があったが、 $P=0.12$  と有意差を認めなかった。この理由としては、浸潤性膵管癌と比べて IPMC は比較的予後がよいことが考えられた。予後因子について多変量解析を行うと膵前方浸潤と後方浸潤が独立した予後不良因子であったが ( $P=0.04$ ,  $P=0.03$ )、MUC16/mesothelin 高発現は独立した予後不良因子とはならなかった。

##### (2) 摘出標本による IPMN 由来浸潤癌細胞培養、および MUC16/mesothelin 発現解析

当科で切除した IPMN 由来浸潤癌組織 3 症例に対し、組織片を採取し 3 次元初代がん細胞培養キット (Scivax Life Science 社) 用いて細胞培養を行った。

得られた 3 検体の培養細胞を用いて免疫染色、RT-PCR、Western blotting を行うと、培養細胞の細胞膜に一致して MUC16, mesothelin ともに発現を認め、PCR、Western Blotting にて mRNA レベル、蛋白レベルとともに発現を認めることが分かった。

##### (3) 共免疫沈降法による IPMN 由来浸潤癌における MUC16/mesothelin 相互作用の検討

IPMN 由来浸潤癌培養細胞 3 検体ともに、抗 MUC16 抗体により抽出した免疫沈降試料において mesothelin が検出され、また、抗 mesothelin 抗体を用いて抽出した免疫沈降試

料において MUC16 蛋白の発現を認めた。このことは、IPMN 由来浸潤癌において MUC16 と mesothelin は結合して発現していることが分かった。腫瘍細胞の細胞膜に発現しているそれぞれの蛋白により細胞同士が結合し、なんらかの機序で MUC16 と mesothelin の結合は離れた際に EMT が起こり、正常腹膜などの中皮に存在する mesothelin 蛋白へ腫瘍細胞の MUC16 が結合することで MET を起こして生着し、転移、播種が形成されることが予想された。

培養細胞株に対して shRNA for MUC16 および mesothelin を用いて、増殖能、浸潤能、遊走能といった機能解析を行うべくそれぞれの knockdown 細胞株の作成を試みたが、培養細胞への knock down を行うと細胞株が死滅し、培養株の継代が行えなかった。

#### 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 1 件)

1. Long-term surveillance is necessary after operative resection for intraductal papillary mucinous neoplasm of the pancreas. Hirono S, Kawai M, Okada KI, Miyazawa M, Shimizu A, Kitahata Y, Ueno M, Yanagisawa A, Yamaue H. Surgery 2016 May 25[Epub ahead of print]

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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)

和歌山県立医科大学医学部・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：