

## 学位論文題名

## 消化器癌におけるMesothelin発現の分子病理学的検討

## 学位論文内容の要旨

【背景と目的】 Mesothelin 遺伝子は 71 kDa の前駆体蛋白 (Full-ERC/mesothelin) をコードしており、これは酵素によって切断され、膜結合型蛋白の 40 kDa の C-ERC/mesothelin と分泌型蛋白の 31 kDa の N-ERC/mesothelin よりなる。Mesothelin は悪性中皮腫、卵巣癌など多くの癌で発現が認められ、過去に免疫組織化学染色にて膀胱癌の Mesothelin の高発現が臨床病理学的悪性度と相関することが報告されている。また、胃癌の免疫組織化学染色にて Mesothelin の細胞膜発現が非細胞膜発現と比較し、有意に予後不良であることが報告され、膜発現型の C-ERC/mesothelin の発現の増強が癌の悪性度と関わることが示唆された。本研究では、肝外胆管癌、大腸癌の臨床検体を用いて Mesothelin の発現とその局在、病理学的因子との関係を明らかにし、Mesothelin が消化器癌領域の新たなバイオマーカーになりうるか否かについて検討する。また、大腸癌のリンパ節転移は予後を最も規定する因子の一つであることから、大腸癌細胞株を用いて mesothelin の発現を比較検討し、それぞれの mesothelin の遺伝子 (Full-ERC/mesothelin、C-ERC/mesothelin、N-ERC/mesothelin) の導入における mesothelin 過剰発現大腸癌細胞株を用いたリンパ管への浸潤機構についても明らかにする。

【対象と方法】 (1) 臨床病理学的検討：北海道大学病院消化器外科 I にて施行された 2000 年から 2008 年までの肝外胆管癌切除 61 症例および 2002 年から 2004 年までの大腸癌切除 91 症例を対象とした。抗 Mesothelin 抗体にて免疫組織化学染色を行い、Mesothelin の発現（高発現：腫瘍細胞の染色割合が 50%以上もしくは染色強度が 2+以上のものと定義）および局在（細胞膜発現および細胞質発現）に着目し、臨床病理学的因子や予後との相関を検討した。(2) 分子病理学的検討：5 種類の大腸癌細胞株 (WiDr、LoVo、CaCo2、T84、HCA7) における Mesothelin の発現を比較検討した。それぞれの mesothelin 過剰発現プラスミド (Full-, N- or C-ERC/mesothelin) を導入した mesothelin 高発現大腸癌細胞株 (Full-, N-, C-, Mock-WiDr) を作成し、リンパ管内皮細胞への接着能を adhesion assay にて浸潤能を invasion assay にて比較検討した。

【結果】臨床病理学的検討では、肝外胆管癌の Mesothelin 高発現は 61 例中 29 例 (47.5%) に認め、Mesothelin 高発現は肝転移 ( $P = 0.013$ ) と相関を示した。また、Mesothelin の細胞膜発現群は 61 例中 32 例 (52.5%) に認められ、肝転移 ( $P = 0.006$ ) および腹膜播腫 ( $P = 0.024$ ) と相関を示した。予後に関する検討では Mesothelin の細胞膜発現群は、Mesothelin 非細胞膜発現群と比較して有意に予後が不良であり (5 年生存率 18% 対 29%、 $P = 0.017$ )、多変量解析でも Mesothelin の細胞膜発現群が独立した予後不良因子となった (RR 2.964, 95% CI, 1.401-6.296,  $P = 0.0045$ )。大腸癌においては、Mesothelin 高発現は、91 例中 45 例 (49.5%) に認め、

Mesothelin 細胞質発現は 38 例 (41.8 %) に認められたが、どちらも臨床病理学的因子および予後との相関は認められなかった。一方、Mesothelin の細胞膜発現は、34 例 (37.4 %) に認められ、リンパ管浸潤 ( $P = 0.009$ ) およびリンパ節転移 ( $P = 0.048$ ) と相関を認めた。さらに予後に関しては、リンパ節転移陽性 38 症例において、Mesothelin の細胞膜発現群は Mesothelin 非細胞膜発現群と比較し、有意に予後不良であった ( $P = 0.033$ )。分子病理学的検討では、5 種類の大腸癌細胞株において、内在性の Full-ERC/mesothelin の発現は CaCo2 細胞にのみ高発現が認められたが、40 kDa の C-ERC/mesothelin の発現は認められなかった。そこで mesothelin 高発現大腸癌細胞株 (Full-, N-, C-, Mock-WiDr) によるリンパ管浸潤を比較検討したリンパ管接着アッセイでは、C-WiDr ( $60.0 \pm 4.9$  cells /HPF) および Full-WiDr ( $60.6 \pm 4.9$  cells /HPF) は、Mock-WiDr ( $51.1 \pm 3.4$  cells /HPF) と比較し、有意にリンパ管内皮細胞への接着が強かった ( $P < 0.01$ )。また、リンパ管浸潤アッセイでは、特に、C-WiDr ( $614 \pm 74$  cells /FF) は N-WiDr ( $430 \pm 31$  cells /FF) および Mock-WiDr ( $412 \pm 50$  cells /FF) と比較し、有意にリンパ管内皮細胞への浸潤を認めた ( $P < 0.001$ )。

【考察】本研究では肝外胆管癌において Mesothelin の高発現が予後不良であることを示し、さらに Mesothelin 発現の細胞内局在 (細胞膜発現および細胞質発現) が癌の悪性度に重要であり、より詳細な予後を反映するマーカーと成りうることを示した。さらに、大腸癌にて Mesothelin の細胞膜発現がリンパ管浸潤やリンパ節転移と相関することを明らかにし、*in vitro* において細胞膜に局在する C-ERC/mesothelin が、リンパ管内皮細胞への接着や浸潤を引き起こすことを明らかにした。近年 Epidermal growth factor receptor や vascular endothelial growth factor に対する分子標的治療の有効性が示されているが、分子標的治療薬の効果の検討には、ターゲット分子の病理組織学的な細胞膜上の発現の評価が重要になっている。それは、分子標的治療薬の標的が、その細胞膜上に存在する特定の分子をターゲットとしているからである。現在、米国にて Mesothelin を分子標的とした臨床試験が第 II 相試験に入っている。本研究による検討にて C-ERC/mesothelin は肝外胆管癌、大腸癌において高率に細胞膜上に発現していることを明らかにした。また C-ERC/mesothelin の高発現は臨床病理学的悪性度と相関し、大腸癌においては高率にリンパ管浸潤を引き起こすため、C-ERC/mesothelin が今後、消化器癌領域における診断・治療への応用が期待される新たなバイオマーカーとなりうると思われた。

【結論】消化器癌において今後、C-ERC/mesothelin を分子標的とした新たな治療の発展が期待される。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	平野	聡
副査	教授	武富	紹信
副査	教授	坂本	直哉
副査	教授	岩永	敏彦

## 学位論文題名

### 消化器癌における Mesothelin 発現の分子病理学的検討

Mesothelin は 40 kDa の細胞膜糖蛋白であり、膵癌、胃癌において Mesothelin の発現が臨床病理学的に血管浸潤やリンパ管浸潤と相関し、予後不良であることが報告されている。Mesothelin の遺伝子は 71 kDa の前駆体蛋白 (Full-ERC/mesothelin) をコードしており、これは furin-like protease によって切断され、glycosyl-phosphatidylinositol (GPI) anchor による細胞膜結合型蛋白の 40 kDa の C-ERC/mesothelin と分泌型蛋白の 31 kDa の N-ERC/mesothelin よりなる。本研究では Mesothelin の免疫組織化学染色における細胞内の局在に着目し、肝外胆管癌 61 例、大腸癌 91 例にて Mesothelin 発現を検討したところ、Mesothelin の細胞膜発現が非細胞膜発現群と比較し有意に予後不良であることを見出した。また、大腸癌細胞株を使用した分子病理学的検討にて、細胞膜発現型の mesothelin (C-ERC/mesothelin) がリンパ管への接着、浸潤を引き起こすことを明らかにした。

発表後、副査の坂本教授から①Mesothelin と血管内皮細胞を使用した実験結果について、② furin-like protease の機序について、③C-ERC/mesothelin 過剰発現大腸癌細胞株(C-WiDr)の Western blotting による 70 kDa のバンドが検出される理由についての質問がなされた。申請者は①については mesothelin 過剰発現大腸癌細胞株は、血管内皮細胞 (HUVEC) との接着や浸潤能に差を認めなかったこと、②については furin-like protease の cleavage site の報告があるものの、その機序については内在性の furin-like protein の発現や cleavage site の mutation も含めた検討が今後必要であること、③については C-ERC/mesothelin の形質導入により、WiDr 細胞の内在性の Full-ERC/Mesothelin(70 kDa)が positive feedback 機構により発現が増強した可能性があることと回答を行った。

次に、副査の岩永教授から④Mesothelin の免疫染色における細胞質発現の評価について、⑤ Mesothelin のワクチン療法について、⑥Mesothelin ノックアウトマウスについての質問がなされた。申請者は④については細胞質発現陽性の評価は「細胞質が淡く染色されるものもしくは細胞質中に顆粒状に染色される部分を認めるもの」としたこと、⑤については Phase I の Mesothelin のワクチン療法(CRS-207)の報告において、mesothelin 特異的 T 細胞免疫応答が誘導され、治療効果を認めた症例があること、⑥については Mesothelin ノックアウトマウスがコントロールマウ

スと比較し、解剖学的・組織学的異常を認めず、さらに成長や繁殖にも異常を認めなかった事を回答して述べた。

また、副査の武富教授から⑦Mesothelinのプロモーターについて、⑧Mesothelinのtranslocationについて、⑨リンパ管内皮細胞のCA125の発現についての質問がなされた。申請者は⑦のMesothelinのプロモーターについては未だ解明されていないが、文献的(Cancer Res. 2007、J Biol Chem. 2011)にMesothelinの高発現を認める癌細胞には20塩基のsequence(Conscript, TCTCCACCCACACATTCCTG)があり、このConscriptはSP1-like element(TCTCCACCC)とMCAT element(ACATTCCT)を持つとされていること、このMCAT elementはtranscription enhancer factor(TEF)-1(TEAD1)によって制御されており、TEF-1の発現がMesothelinの過剰発現に必須であると報告されている事を回答した。⑧については、細胞質に存在する71 kDaの前駆体蛋白(Full-ERC/mesothelin)がfurin-like proteaseによって切断され、40 kDaの膜発現型のC-ERC/mesothelinとなることでMesothelinの活性型のフォームとして機能し、細胞の浸潤能力や遊走能力を増加させ、癌の転移を引き起こしている可能性が推測されると述べた。また、Beta-cateninが細胞内の局在を細胞質から核内へ移行することで癌の悪性度が変化するように、Mesothelinにおいても細胞内でのtranslocationにより癌の悪性度が異なる可能性があるかと付け加えた。⑨についてはMesothelinはCA125などの糖鎖と結合することが既に報告されており、本研究においてMesothelinはリンパ管内皮細胞の接着や浸潤に関与するという結果が明らかになったが、リンパ管内皮細胞におけるCA125の発現についての報告は無く、今後CA125や接着分子であるIntegrin等を含めた検討が必要であると回答した。

最後に主査の平野教授から⑩免疫染色の評価の精度について、⑪代表切片の選定について、⑫Mesothelinの細胞膜および細胞質の共に発現している症例について質問がなされた。申請者は⑩については染色性の評価は臨床データ情報を持たない2人の病理医と共に実施したこと、⑪については、悪性腫瘍の組織型が混在している場合はそれぞれの組織型を良好に観察できる代表的な切片を選定していること、⑫については免疫染色において胆管癌23.0%(14/61例)、大腸癌11.0%(10/91例)が細胞膜および細胞質に共に発現している症例であったと回答した。

いずれの質問に対しても、申請者はInternational journal of oncology誌にも発表した自らの実験結果や既報の論文等を引用し、適切に回答した。本研究の結果、消化器癌領域において、今後、細胞膜発現型のC-ERC/mesothelinを分子標的とした新たな治療の発展が期待された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院における研鑽や単位取得なども併せ申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。