

論文の内容の要旨

論文題目 Expression and function of tumor antigens
CA125/MUC16 and mesothelin

和訳 癌抗原 CA125/MUC16 と mesothelin の発現と機能解析

指導教官 栗原裕樹教授

東京大学大学院医学系研究科

平成10年4月1日入学

医学博士課程

分子細胞生物学専攻

氏名 Armin Rump

本研究は腫瘍抗原として良く知られている CA125 と Mesothelin の発現と両者の分子間相互作用を解析したものである。

CA125 は、モノクローナル抗体 OC125 で認識される腫瘍抗原として同定され、卵巣癌の診断及び治療後の再発の監視に広く用いられている。CA125 は細胞表面に発現しているだけでなく、酵素反応により切断されて可溶性フラグメントとして細胞外にも存在する。ごく最近、CA125 遺伝子が同定され、I 型膜蛋白質で短い細胞内ドメインと巨大な細胞外ドメインを持つことが明らかとなった。細胞外ドメインはセリン、トレオニン、プロリンに富む 156 アミノ酸からなる反復配列を 60 個以上含んでおり、高度に O-グリコシル化されている。卵巣癌以外にも、CA125 は羊膜、ミュラー管、及び成体の胸腔、心外膜、アポクリン汗腺及び乳腺で発現しているが、正常な卵巣上皮では発現していない。

Mesothelin は中皮細胞、中皮腫、及び卵巣癌に対する抗体 CAK-1 で同定された腫瘍抗原である。Mesothelin は分泌蛋白質で細胞膜には GPI-リンクで結合している。全長 69 kDa から N 末端の 31 kDa が酵素的に切断され、40 kDa の C 末端側フラグメントが細胞膜上に残る。これらのフラグメントは共に N-グリコシル化部位を含んでいる。全ゲノム発現プロファイル法を用いた最近の研究では膵臓、胃、肺、及び子宮内膜の腺癌で Mesothelin の過剰発現が報告されている。Mesothelin の発現は、生理的な状況では発生過程で発現が調節されており胎生 7 日で強く、胎生 11 日では発現が消失し、胎生 15 日で弱く、胎生 17 日で強い発現が認められる。Mesothelin 欠損マウスは健康で生殖可能であり目立った表現型を持たない。

Mesothelin の生物学的な機能をさらに解析するために、私は Mesothelin に対する受容体

/結合蛋白質を同定し、CA125 が Mesothelin 結合分子であることをみいだした。Mesothelin は CA125 に結合し、この相互作用が細胞間接着をもたらす。CA125 を発現している卵巣癌は Mesothelin を発現している腹腔中皮細胞への高率に転移することから、CA125-Mesothelin による細胞間接着は重要な意義があると考えられる。さらに、私は悪性度の高い漿液性乳頭状腺癌の生検試料で CA125 と Mesothelin が共発現していることを示した。これまでの文献と合わせて、私の結果は以下で議論するように幾つかの臨床医学に対する示唆を含んでいる。

本研究における最も重要な発見は CA125 が Mesothelin 結合分子であることである。私はこの分子間結合の存在を幾つかの独立した証拠から示した。

1. 発現クローニング法により卵巣癌細胞株 (OVCAR-3) の発現 cDNA ライブラリーから Mesothelin の結合蛋白質として二つの独立したクローンを分離した。すなわち、スフェロプラスト融合で形質導入した COS 細胞にエピトープタグをつけた Mesothelin 蛋白質を反応させ、Mesothelin 結合細胞をセルソーターで分取して導入遺伝子を回収するものである。この方法により得られた二つのクローンは同一の遺伝子・CA125 の部分配列であり、短い方のクローンは CA125 の反復配列しか含んでいない。このことから Mesothelin は CA125 の反復配列と結合することが明らかとなった。
2. フローサイトメトリー法によって、ヒト及びマウスの Mesothelin と OVCAR-3 細胞との結合が示された。さらにマウス Mesothelin と OVCAR-3 との結合は Mesothelin 特異的なモノクローナル抗体 B35 で阻害された。逆に、CA125 は Mesothelin を強く発現しているマウス L0 細胞株と結合し、B35 抗体はこの結合を阻害した。CA125 は Mucin ファミリーに属する蛋白質だが、Mesothelin は他の Mucin 分子とは結合しなかった。したがって観察された結合は特異的なものである。
3. Mesothelin と CA125 とを同時に形質導入した COS 細胞から OC125 抗体で Mesothelin が免疫沈降されるが、Mesothelin または CA125 を単独で形質導入した COS 細胞では Mesothelin が免疫沈降されない。

Mesothelin を発現している腹腔中皮が CA125 を発現している卵巣癌細胞の転移好発部位であることから、転移の初期過程に必要な異なる細胞間の接着に CA125 及び Mesothelin が関与していると考え、細胞間接着アッセイ法を開発した。L0 細胞を 6 ウェルプレートで単層に培養した。この L0 細胞に、 10^6 個の OVCAR-3 細胞を加えた後、緩やかに遠心して OVCAR-3 細胞を単層の L0 細胞に接触させた。短時間の培養後、付着しなかった OVCAR-3 細胞を除くために培養プレートを十分に洗い、残りの細胞をディッシュからはがし取って、L0 細胞に付着した OVCAR-3 細胞の数をフローサイトメーターで測定した。

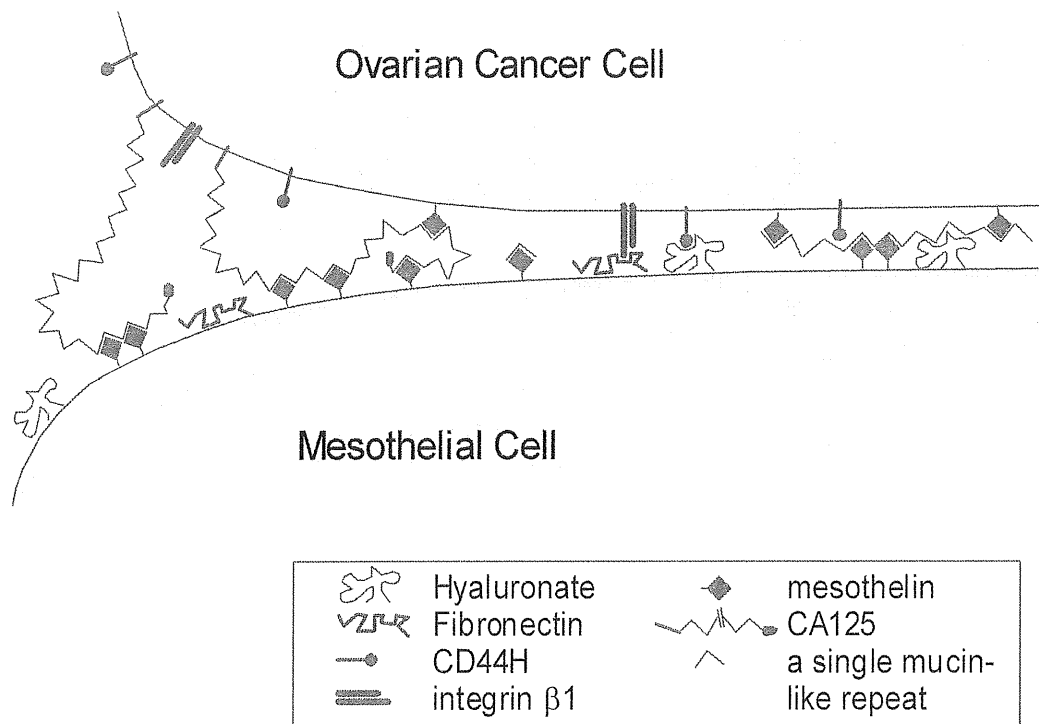
このアッセイ法によって、私は OVCAR-3 細胞と L0 細胞との異細胞間接着が B35 抗体によって用量依存的に阻害されることを見出した (抗体非存在下では 9% の OVCAR-3 細胞が L0 細胞に結合するのに対して、高濃度の B35 抗体存在下では 1% 以下しか結合しなかった)。同様の OVCAR-3 との細胞間接着実験を L0 細胞の代わりにマウス胎仔横隔膜細胞初代培養を

用いて繰り返した。横隔膜は両面が中皮細胞で覆われており、培養した横隔膜細胞の 15% が Mesothelin を発現していた。LO 細胞と同様に、OVCAR-3 細胞は横隔膜培養細胞に付着し、この結合は B35 抗体で阻害された。

さらに、CA125 と Mesothelin は卵巣漿液性嚢状腺癌で共発現していた。サンプル数は少ないが、Mesothelin の発現と漿液性嚢状腺癌の病理組織学的な悪性度との関連が認められた。卵巣上皮の癌化過程で、Mesothelin の発現は CA125 の発現よりも遅い過程で起こる可能性が示唆された。公開されているデータベースを検索したところ、多くの卵巣癌、膵臓癌のみならず中皮腫や進行した乳癌でも Mesothelin と CA125 の共発現が極めて高く認められることが明らかとなった。

本論文で私は CA125 が Mesothelin に結合し、この分子間の相互作用が異細胞間の接着を媒介することを示した。さらに CA125 と Mesothelin はしばしば同一の細胞で発現していることを見出した。このことから、Mesothelin は CA125 の反復配列に結合しており、従ってこの結合は非常に多価である可能性が高いということは重要である。Mesothelin は卵巣癌細胞に発現しており、蛋白質分解後も CA125 分子を二次的に細胞膜上に結合することによって CA125 を発現している癌細胞と中皮細胞との結合を競合的に阻害するよりはむしろ増強すると思われる。

CA125-Mesothelin を介した卵巣癌の腹腔中皮への転移性の接着に関して次のようなモデルが考えられる〔図参照〕。CA125 分子は、プロリン残基と糖鎖を多く含むことから、特定の蛋白構造を取るよりはむしろ伸長した構造を取ると予想される。22097 アミノ酸からなる CA125 は伸展した状態では赤血球の直径より大きな 11 μm の長さで予想される。腹水中に剥離した卵巣癌細胞の表面から、CA125 は”釣り糸 “のように伸び、免疫系に認識されないようにカモフラージュしながら、60 個の反復配列の一つを介して近くの中皮細胞上の Mesothelin に結合する。いったん結合すると、”釣り糸 “状の CA125 分子は中皮細胞と癌細胞の両方に発現している Mesothelin 分子とさらに結合することによって引き寄せられ、細胞間を多価に結合させる。可溶性の CA125 フラグメントもまた Mesothelin を介した細胞間の結合に関与すると考えられる。CD44H-ヒアルロン酸及びインテグリン β 1-フィブロネクチンといった他の既知の卵巣癌細胞-中皮細胞間の結合機構に対して巨大な CA125 が阻害的に作用する可能性も考えられる。このことは、OVCAR-3 細胞と横隔膜初代培養細胞を一時間以上結合させると B35 抗体で阻害できなかったという私の観察結果と一致する。これに対して、LO 細胞では阻害効果は培養時間によらないことから、二次的な結合分子が LO 細胞上には発現していない可能性が示唆される。



私の実験結果は、CA125 と Mesothelin の C 末端とが細胞の接着に関与しており、卵巣癌の転移に重要な役割をしていることを示唆するものである。本研究は、Mesothelin の C 末端を含む部分の機能を初めて明らかにしたものであり、癌化における CA125 の役割を示唆する。これら二つの分子に関してはより一層の研究が必要であるが、以下のような臨床的な応用が考えられる。

1. Mesothelin は卵巣癌の危険性の高い患者の転移を防ぐ薬剤のターゲットとなる。
2. 日常的に行われている CA125 の血清濃度の検査に加えて Mesothelin の血中濃度も測定すべきである。この点は他の研究者も提案していることであるが、血清中の Mesothelin 濃度がどの程度組織での発現を反映しているかは明らかでなく、本研究はこの CA125 と Mesothelin の複合検査法に生物学的な裏付けを与えるものである。特に、Mesothelin は癌組織において CA125 を保持することで血清 CA125 の測定で偽陰性をもたらす可能性がある。
3. 卵巣癌における Mesothelin 陽性は、卵巣癌の悪性度が高いことに示唆する可能性がある。
4. Mesothelin 及び CA125 は、これらが共発現している他の癌や子宮内膜症においても同様の役割を果たしている可能性がある。

こうした患者にとって潜在的な有用性を実証するためには、動物実験による私の発見と大規模な臨床データとの臨床的な関連の検討が必要であろう。

本論文では、卵巣癌とは無関係ではあるが、NLRR4 と名付た胸腔、心外膜及び腹腔の中皮細胞層に発現している新規遺伝子のクローニングについても述べている。