

表 題 原発性十二指腸癌におけるムチンタンパク発現と悪性化機序  
解明および診断・新規治療ターゲットの可能性

論文の区分 博士課程

著 者 名 芝 聡美

担当指導教員氏名 佐田 尚宏教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科  
地域医療学系専攻  
病態機能外科学分野  
乳腺内分泌外科学

2019年1月10日申請の学位論文

## 目次

略語一覧	2
1. はじめに	3
2. 実験材料と方法	6
2-1. 細胞培養	
2-2. Quantitative real-time PCR	
2-3. フローサイトメトリー	
2-4. RNA 干渉	
2-5. 細胞増殖アッセイ	
2-6. 細胞周期解析	
2-7. Scratch wound healing assay	
2-8. Invasion assay	
2-9. ALDH 活性の検討	
2-10. 細胞死の検出	
2-11. 免疫逃避機構の解析	
2-12. 動物実験	
2-13. 臨床研究による免疫組織学的検討	
2-14. 統計解析	
3. 結果	16
3-1. 十二指腸癌細胞株における MUC1 発現解析	
3-2. MUC1 発現と増殖能の検討	
3-3. MUC1 発現と遊走能・浸潤能の検討	
3-4. MUC1 発現と幹細胞性の検討	
3-5. MUC1 発現と化学療法抵抗性の検討	
3-6. MUC1 発現と免疫逃避機構の検討	
3-7. MUC1 阻害ペプチドによる効果	
3-8. MUC1 発現と臨床検体の検討・生存解析	
4. 考察	34
5. おわりに	38
6. 謝辞	39
7. 参考文献	40

## 略語一覽

略語	名稱
ALDH	aldehyde dehydrogenase
APC	allophycocyanin
CPA	cyclophosphamide
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMEM	Eagle's Minimum Essential Medium
FBS	fetal bovine serum
FITC	fluorescein isothiocyanate
HE	Hematoxylin-Eosin
IL-2	interleukin-2
LAK	lymphokine-activated killer
PE	phycoerythrin
PBMC	peripheral blood mononuclear cells
ROS	reactive oxygen species
PBS	phosphate-buffered saline
5-Fu	5-fluorouracil
7AAD	7-Aminoactinomycin D

## 1. はじめに

十二指腸癌は消化器悪性腫瘍のうち 0.4% を占める稀な疾患である [1]。近年、診断技術や外科的手技の進歩に伴い、消化器癌患者全体の予後の向上や周術期死亡率の低下が得られているが、十二指腸癌患者の 5 年生存率は 45-55% と従来の成績と大きな変化はみられていない [1-4]。十二指腸癌の治療の主体は領域リンパ節郭清術を伴う膵切除術であるが、治癒切除が可能な段階での確定診断が困難であるため、手術に至る症例は全体の 45% -87% に留まっている [3,5-9]。一方、その希少性ゆえ、術後放射線療法や化学療法の効果に関する臨床情報は少なく、抗癌剤治療の標準プロトコールも未だ確立されてはいない [10]。また、予後因子に関しても、術後のリンパ節転移の有無や切除断端の病理学的所見が患者予後と関係するという報告はある程度で [4,7,11]、合理的な集学的治療体系を構築するためには、より有用な分子マーカーの探索が必要である。

そこで、消化管の上皮性組織の細胞に広汎に発現するムチン分子に着目した。ムチンは巨大な糖タンパク質で、ムチンコア蛋白とその表面を覆う多数の糖鎖から構成される。ヒトのムチンは 21 種類報告されており、さらに分泌型ムチンと膜結合型ムチンに大別される。ムチン 1 (Mucin1:MUC1) は膜貫通型ムチンで、様々

な分泌型上皮および造血細胞に通常発現を認める [12]。MUC1 は非共有結合が会合した MUC1N 末端と MUC1C 末端の 2 つのサブユニットからなる [13]。MUC1N 末端 (>250kDa) は、数百の O-グリカンに連結された 20 個のアミノ酸タンデムリピート (tandem repeats: TRs) からなる。MUC1C 末端におけるサブユニットは細胞外領域、膜貫通領域、細胞質内領域から構成され、EGFR ファミリー、c-Src、PKC- $\delta$ 、 $\beta$ -カテニンなどの細胞増殖、接着に関与する様々なタンパク質と相互作用することができる、CQC モチーフを含んでいる [14-17]。MUC1 は正常分泌上皮細胞に存在するが、癌細胞には MUC1 が過剰発現している。グリコシル化された MUC1N 末端の TRs は、悪性化に伴い糖鎖構造が変化し、異常な糖鎖が発現する。

過去の研究で、MUC1 は上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition : EMT) [18-22]、幹細胞性特徴 [23、24] などの癌の悪性形質と深く関連することを示唆する基礎的知見が得られている。事実、ヒト胃癌 [25]、大腸癌 [26]、乳癌 [27]、肺癌 [27]、膵臓癌 [28] において、MUC1 の発現が転移能や予後不良と相関することが報告されている。しかし、十二指腸癌における MUC1 の機能や臨床的意義は不明である。そこで本研究では、ヒト十二指腸癌細胞における MUC1

の機能および発現解析を行うとともに、MUC1が新たな治療ターゲットとしてなりうるかを検討した。

## 2. 実験材料と方法

### 2-1. 細胞培養

ヒト十二指腸癌細胞株 HuTu80、ヒト膵臓癌細胞株 PANC-1、子宮頸癌細胞株 HeLa、ヒト乳癌細胞株 MCF7 および MDA-MB231、ヒト大腸癌細胞株 Caco-2、は American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA)より購入した。HuTu80 細胞、PANC-1 細胞、HeLa 細胞は 10% ウシ胎仔血清 (fetal bovine serum: FBS)、1% Pen-Strep-Glut (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA)含有 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, glucose 1000mg/L, Sigma-Aldrich, St.Louis, MO, USA)で培養した。Caco-2 細胞は 20% FBS、1% Pen-Strep-Glut 含有 Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM, ATCC)で培養した。温度 37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で維持した。

HuTu80 の細胞の真正性は、STR 細胞認証テストキット (ATCC)を用いて、Short Tandem Repeat (STR)解析で検証した。

### 2-2. Quantitative real-time PCR

24 ウェル培養プレートで細胞を 80% コンフルエントまで培養した後、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Limburg, The Netherlands)を用いて RNA を抽出した後、Superscript-VILO MasterMix (Thermo Fisher

Scientific)により逆転写を行い、cDNAを合成した。合成したcDNAはThe QuantiTect SYBR Green PCR Assay Kit (Qiagen, Venlo, Limburg)を用い、the Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific)でmRNAを検出した。MUC1のプライマーは、  
forward primer: 5'-ACCTACCATCCTATGAGCGAG-3';  
MUC1,  
reverse primer; 5'-GGTTTGTGTAAGAGAGGCTGC-3'を用いた。コントロールとして、  
human-glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase (GAPDH)を用いた。MUC1の発現量は、Caco-2あるいはMockを1とした場合の相対発現量を $\Delta\Delta CT$ 法で求めた。

### 2-3. フローサイトメトリー

細胞におけるMUC1タンパク発現をフローサイトメトリーで解析した。細胞は $5 \times 10^5/2.5 \text{ cm dish}$ の濃度で播種し、PBSで2回洗浄後、0.25% (w/v)トリプシン溶液を用いて回収した。その後の全ての工程は氷上で行った。細胞をPE-conjugated monoclonal antibody (mAb) against MUC1 (BioLegend)によって60分間暗所で染色した。2回stain buffer (5% FBS含有PBS)で洗浄し、7AAD (Thermo Fisher)で15分暗所に静置し、



FACS Fortessa (BD Bioscience, New Jersey, USA) および Flow Jo analysis software (TreeStar, OR, USA) を用いて解析した。

非特異的な染色を除外するため、アイソタイプコントロール抗体を陰性コントロールとして使用した。

#### 2-4. RNA 干渉

ヒト MUC1 siRNA (Thermo Fisher Scientific) を、Opti-MEM 及び RNAiMAX (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて 50nM の最終濃度で添加して lipofectamine 法で癌細胞にトランスフェクションした。共培養の 72 時間後に細胞を回収し機能アッセイに用いた。

DNA の標的配列を選択し、MUC1 siRNA を以下のように設計した。

5'-CCAGCACCGACTACTACCAAGAGCT-3'.

MUC1 に対するコントロールは、siRNA and control small interfering RNA (siRNA; Stealth RNAi Negative Control Medium GC Duplex #2, Invitrogen) を用いた。

#### 2-5. 細胞増殖アッセイ

細胞は 96 ウェルプレートに、各ウェル  $2.5 \times 10^3$  個の濃度で播種し、37°C の 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 12 時間培養した。その後 MUC1-C 阻害ペプチド

GO-203 を添加し 48 時間後、または siRNA を添加し 72 時間後に Cell Counting Kit-8 (CCK-8) (Dojindo、熊本)を 10ul ずつ添加し、さらに 2 時間インキュベーター内で培養した。その後マイクロプレートリーダー (Model 680 Microplate Reader, Bio-Rad)を用いて、655nm の吸光度を参照波長として、450nm の吸光度を測定し、細胞生存率を算出した。

## 2-6. 細胞周期解析

細胞周期解析は、FITC BrdU flow kit (BD Bioscience, New Jersey, USA)を用いて行なった。細胞の BrdU 標識は細胞培養液中に最終濃度 10mM の BrdU を添加し、37°C 5% CO<sub>2</sub> 下で 40 分間インキュベートした。その後細胞を 1×perm/wash buffer で洗浄し、cytofix/cytoperm bufferd で固定した。DNase 処理後、細胞を 37°C 1 時間水浴させることで、細胞内に取り込まれた BrdU のエピトープを露出した。細胞を洗浄し、FITC 結合抗 BrdU 抗体を用いて室温暗所で 20 分間染色した。その後 DNA 染色のために 7-AAD を 20ul 添加し、FACS Fortessa を用いて測定した。各細胞周期について FlowJo で解析した。

## 2-7. Scratch wound healing assay

細胞遊走能は創傷治癒アッセイで評価した。siRNAをトランスフェクションした細胞を24wellに播種し、コンフルエントになるまで培養した。その後1-200 $\mu$ lのピペットチップでScratchを行い、培養培地を直ぐに交換し、48時間培養した。創傷範囲は、倒立顕微鏡(BZ-X710; KEYENCE, 大阪, 日本, 対物レンズ10倍)を用いて観察した。創傷範囲はImageJ (National Institutes of Health Bethesda, MD)を用いて5つのランダムに選択した視野で定量し、創傷範囲の閉鎖率を初期時点の範囲に対する未修復範囲の割合で示した。

## 2-8. Invasion assay

細胞浸潤能の評価は、Corning®BioCoat™Matrigel® Invasion Chambers (24-Well Plate with 8.0 $\mu$ m pore) (Corning, Bedford, US)を用いて行なった。siRNAで処理した細胞( $2.5 \times 10^4$ )を500 $\mu$ lの無血清培地に懸濁し、インサートに添加した。下部のチャンバーには750 $\mu$ lの化学誘導物質(DMEM+10%FBS)を添加した。37°C 5%CO<sub>2</sub>下で22時間インキュベートを行った。その後インサートの膜上にある非浸潤細胞を綿棒で擦ることで非浸潤細胞を除去し、膜の下面にある細胞はHematoxylin-Eosin (HE)染色を行った。浸潤細胞は、倒立顕微鏡(BZ-X710; KEYENCE, 対物レンズ10倍)を

用いて、ランダムに選択した 5 つの視野で細胞数を計測した。

## 2-9. ALDH 活性の検討

高い aldehyde dehydrogenase (ALDH) 活性を有する細胞集団を検討するために、ALDEFUOR assay kit (STEMCELL Technologies Inc.) を用いた。PBS で 2 回洗浄し、トリプシン処理後、細胞を ALDH 酵素基質 BODIPY-aminoacetaldehyde (BAAA) を含む

ALDEFULOR Assay Buffer と混合し、37℃ で 40 分間インキュベートした。その後 FITC-ALDEFUOR 陽性細胞の割合を FACS Fortessa を用いて測定し、FlowJo で解析した。

ALDEFUOR の陰性コントロールとして、ALDEFULOR Assay Buffer と混合しインキュベートした細胞に、ALDH 阻害剤である diethylaminobenzaldehyde (DEAB) を添加した細胞を準備し、検討した。

## 2-10. 細胞死の検出

細胞 ( $2 \times 10^5$  細胞/ウェル) を 24 ウェルプレートに播種し、12 時間 37℃、5% CO<sub>2</sub> 下でインキュベーションした。その後細胞を siRNA で 72 時間トランスフェクションし、細胞 ( $2.5 \times 10^4$  細胞/ウェル) を 24 ウェル

プレートに再度懸濁し、5-Fu で 48 時間 37℃、5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。Stain buffer (5% FBS 含有 PBS) で 2 回洗浄後、細胞を 7-AAD および annexine (K101, BioVision, Milpitas, USA) を添加し、氷上暗所で 15 分間インキュベートした。7AAD および annexine 陽性細胞は、FACS Fortessa を用いて測定し、FlowJo で解析した。

GO-203 投与後の細胞死の形態について、HuTu80 をチャンバースライド (Matsunami Glass Ind., Ltd. 大阪) に  $2.5 \times 10^4$  細胞/ウェルの濃度で播種し、12 時間後 GO-203 を 50 $\mu$ M 投与した。48 時間後に、Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection Kit (TAKARA BIO INC., 滋賀) を用いて、Hoechst 陽性細胞は生細胞、annexinV 染色陽性細胞はアポトーシス細胞、Ethidium Homodimer III 染色陽性細胞はネクローシス細胞として評価した。染色した細胞は倒立顕微鏡 (BZ-X710; KEYENCE) で観察した。

#### 2-11. 免疫逃避機構の解析

健常なボランティア由来の末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells: PBMC) を 20U/ml rIL-2 含有 RPMI+10% FBS 中で培養した。腫瘍細胞は siRNA を 72 時間でトランスフェクションした。

IL-2 活性化リンパ球と腫瘍細胞を、12.5:1の割合で、37℃ 5% CO<sub>2</sub> 下で 4 時間共培養した。全細胞を回収し、洗浄し、Pacific Blue 結合抗 CD45 抗体 (BioLegend) とともに氷上暗所で 60 分間インキュベートし、その後 2 回 stain buffer で洗浄後、annexin および 7-AAD と氷上暗所にて 15 分間インキュベートした。FACS Fortessa を用いて CD45 陰性細胞のうち、annexin 陽性細胞、7AAD 陽性細胞を測定した。

## 2-12. 動物実験

全ての動物実験は自治医科大学動物実験規定 (平成 22 年規定第 51 号) に従い施行した。

実験動物として、Balb-c nu/nu を日本クレアから購入した。明暗時間 (各 12 時間) を一定にした環境で、自由飲水・自由摂食下で飼育した。

6 週齢 20g 雌性マウスに  $3 \times 10^6$  個の HuTu80 細胞を右大腿皮下に注射した。皮下注射 3 日後に 3-6mm の長径に達したマウスをランダムに 2 つの群に分類し、GO-203 または CP-2 (control peptide) で処置した。GO-203 または CP-2 は 14mg/kg の投与量で 100 $\mu$ l ずつ (0.28mg/100 $\mu$ l)、腫瘍形成から 21 日間連続で腫瘍近傍皮下に連日投与を行った。マウスは週に 2 回の頻度で体重と腫瘍体積 (tumor volume:TV) の測定を行った。腫瘍体積は、 $TV = \text{長径} \times \text{長径} \times \text{短径} / 2$  を用いて計算し

た。また CT 撮影で腫瘍の経時的変化を確認した。CT 撮影には IVIS Spectrum CT (PerkinElmer INC.,MA,USA)を用いた。この実験は、自治医科大学の動物実験委員会 17-085 の承認を得て行なった。

### 2-13. 臨床研究による免疫組織学的検討

自治医科大学附属病院で 1989 年から 2014 年の間に、十二指腸癌に対して手術加療を行った 18 名の患者を対象に (臨 A15-237)、また 2005 年から 2009 年の間に十二指腸腫瘍に対して内視鏡的切除術を行った 24 名を対象に (臨 A17-184)、MUC1、MUC2、MUC5AC、MUC6 の免疫組織学的染色を行った。ヘルシンキ宣言の指針に基づいて実施した。

ホルマリンで固定し、パラフィン包埋されたブロックから切片を 4 $\mu$ m 厚で作成し、HE 染色および免疫組織化学染色 (immunohistochemistry : IHC)を行った。

IHC は脱パラフィン後、1mM EDTA、pH8.0 (Corning,NY,USA)中で 10 分間圧力釜を用いて抗原賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼブロッキングはペルオキシダーゼブロッキング溶液 (DAKO,SantaClara,CA)で行った。その後抗 MUC1 抗体 (Ma552, mouse IgG, Leica Biosystem, Nussloch, Germany)、MUC2 抗体 (CLH2, mouse IgG, Leica Biosystem)、MUC5AC 抗体 (CLH5, mouse IgG, Leica

Biosystem)、MUC6 抗体 (Ma695, mouse IgG, Leica Biosystem)を 1:100 で添加し、室温で 2 時間湿潤箱の中でインキュベートした。PBS で 3 回洗浄後、切片を抗マウス二次抗体入りの Polymer を用いて室温 30 分間反応させた。いずれも、Dako REAL<sup>TM</sup>EnVision<sup>TM</sup>Detection System (DAKO)を用いて検出を行った。対比染色には、Meyer のヘマトキシリンを用いた。染色した検体は倒立顕微鏡 (BZ-X710; KEYENCE)で解析した。各検体において対物レンズ 4 倍で観察した際に染色された細胞の占有率が 5% 以上の場合を、陽性と判断した。

#### 2-14. 統計解析

データは Prism6 (Graph Pad Software, USA)を用いて解析し、値は平均値±標準偏差で表記した。統計解析は、独立 2 群間の比較には t 検定を用い、多群間比較には一元配置分散分析を用いた。患者背景の解析において、名義尺度に関しては  $\chi^2$  検定、順序尺度に関しては、Mann-Whitney の U 検定を用いた。p<0.05 を統計学的に有意差ありと判断した。



### 3. 結果

#### 3-1. 十二指腸癌細胞株における MUC1 発現解析

様々な癌細胞における MUC1 の mRNA レベルとタンパク質発現について検討した。MUC1 mRNA レベルは、CaCo2 と比較し、強く検出された (図 1A)。MUC1 タンパク質発現も同様に、HuTu80、PANC-1、HeLa ともに強く認められたが、CaCo2 は弱発現であった (図 1B)。

次に HuTu80 に siRNA を導入したところ、MUC1 の mRNA レベルとタンパク質発現は抑制されることが明らかとなった (図 1C,D)。これらの結果により、HuTu80 細胞においても MUC1 の遺伝子およびタンパク質発現があることが明らかとなった。

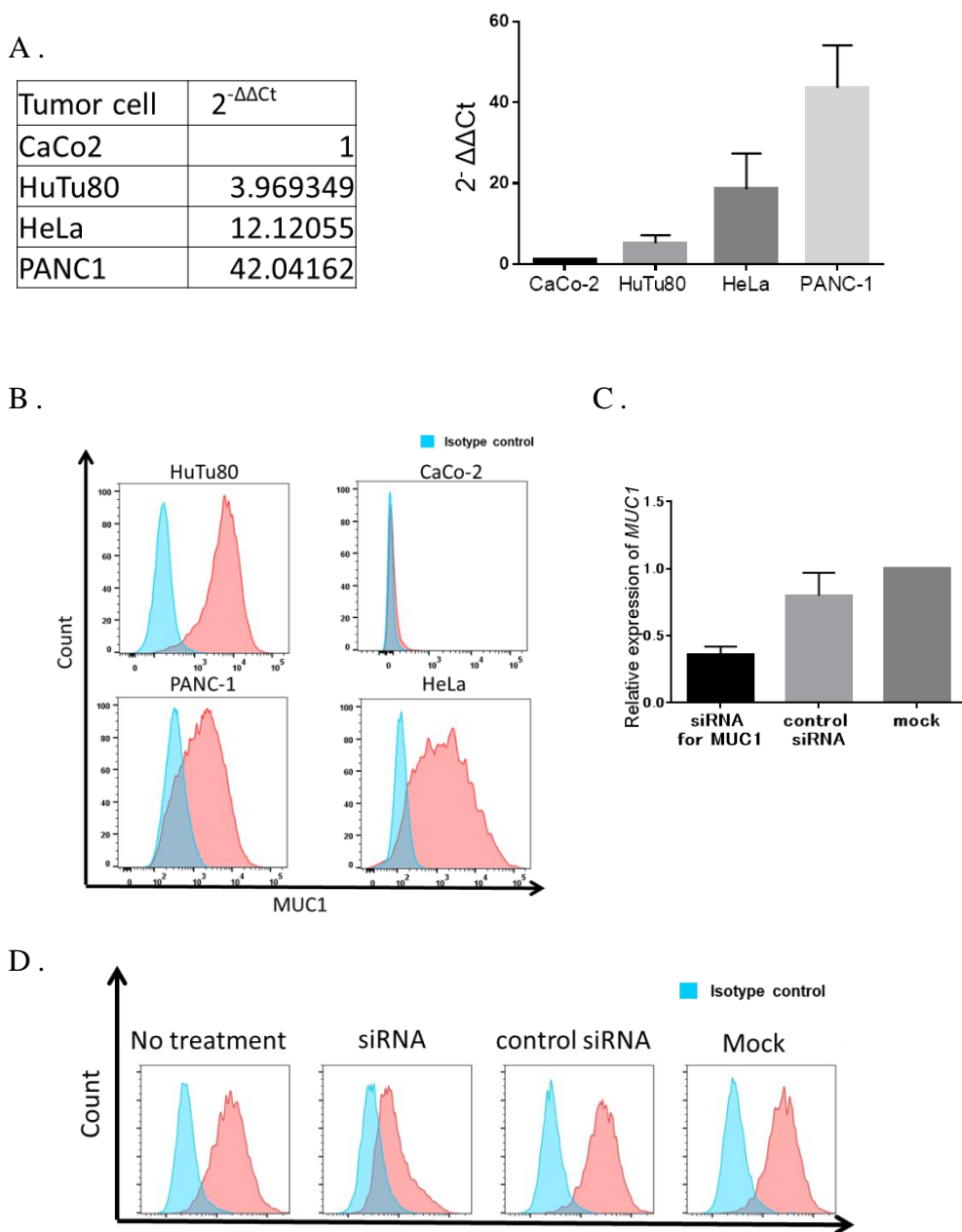


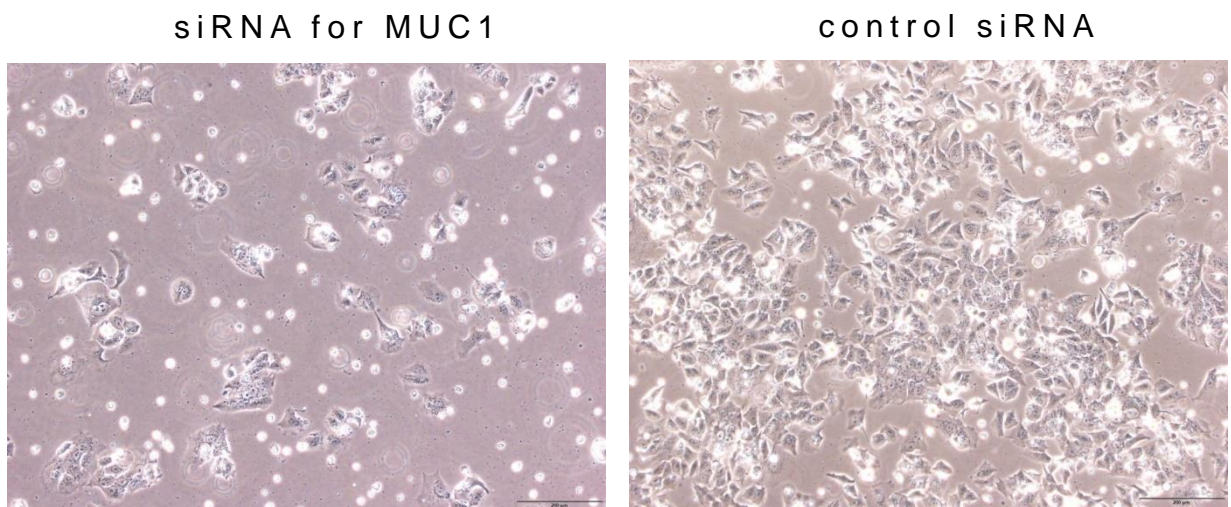
図 1 癌細胞株における MUC1 発現

- A. 癌細胞株の mRNA 発現を qRT-PCR 法で測定した。
- B. フローサイトメトリーで癌細胞株の MUC1 タンパク質発現を解析した。
- C. 培養した HuTu80 細胞を MUC1 siRNA (50nM) あるいはコントロール siRNA (50nM) で 72 時間処理し、qRT-PCR 法で MUC1 mRNA 発現を測定した。
- D. フローサイトメトリーを用いて、MUC1 siRNA (50nM) あるいはコントロール siRNA (50nM) で 72 時間処理した HuTu80 細胞の MUC1 タンパク質発現を評価した。

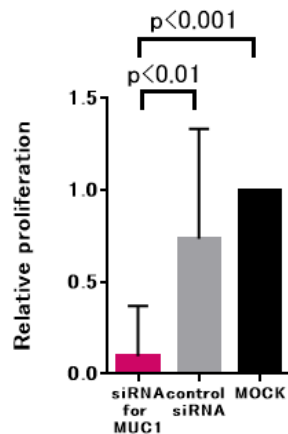
### 3-2. MUC1 発現と増殖能の検討

HuTu80 細胞に siRNA あるいはコントロール siRNA をトランスフェクションし、増殖能を検討した。その結果、siRNA をトランスフェクションし MUC1 を抑制した細胞は、コントロール siRNA 導入細胞と比較して、増殖が抑制された (図 2A,B)。細胞周期を解析すると、siRNA 導入し MUC1 を抑制した HuTu80 細胞において、G0/G1 期における細胞が有意に多い割合で存在し、S 期においては有意に少ない割合であった (図 2C,D)。

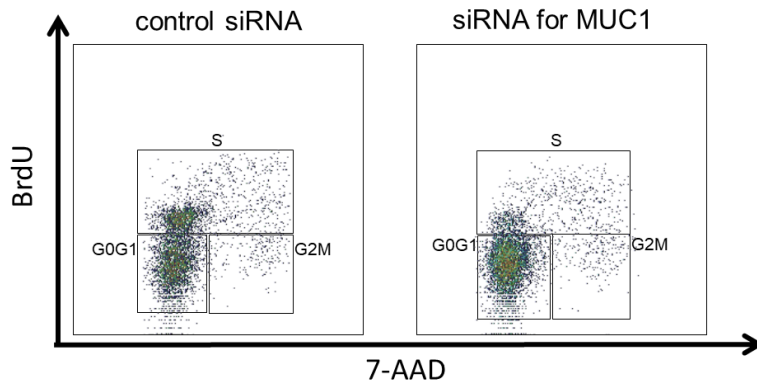
A.



B.



C.



D.

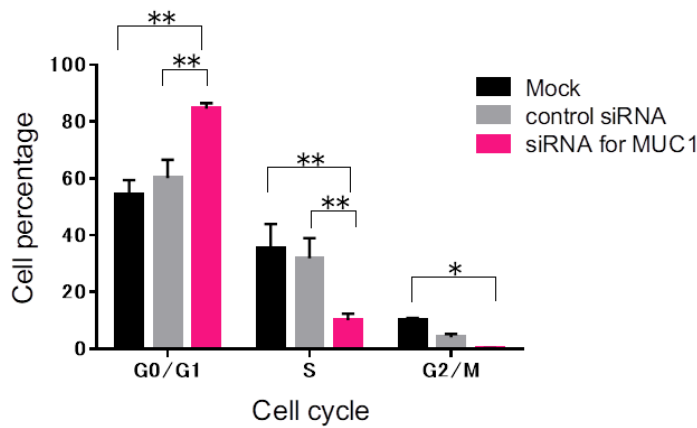


図 2. MUC1 発現と増殖能

A. HuTu80 細胞を MUC1 siRNA (50nM)あるいはコントロール siRNA (50nM)で 72 時間処理した細胞の代表的な形態写真。

B. CCK-8 を用いて、MUC1 siRNA (50nM)あるいはコントロール siRNA (50nM)で 72 時間処理した細胞の生細胞数を計測した (n=3、各群 quintuplicate)。

C. フローサイトメトリーを用いて、細胞周期を解析した (各 n=3)。

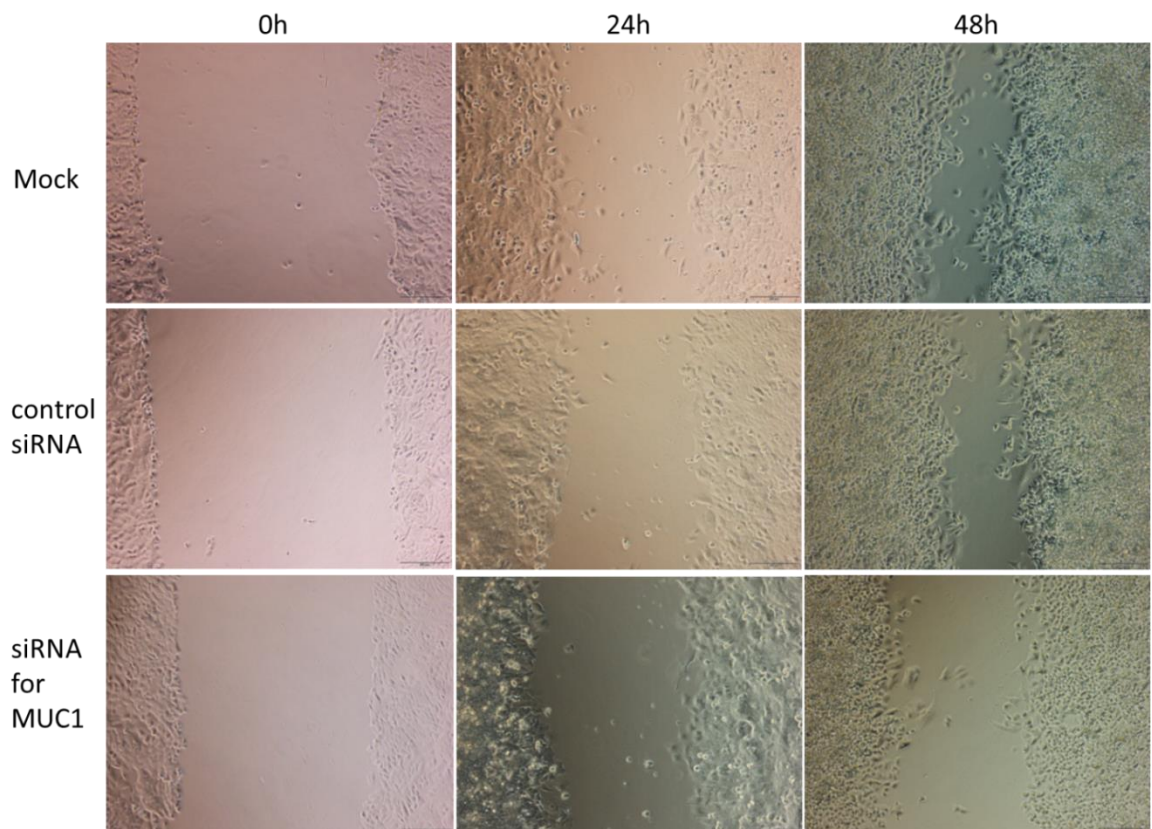
D. 細胞周期比率を示す (各 n=3)。

\*\*p<0.01, \*p<0.05

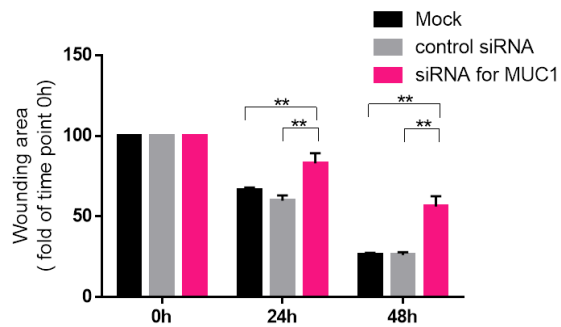
### 3-3. MUC1 発現と遊走能・浸潤能の検討

遊走能の検討は、創傷治癒アッセイで評価した。  
siRNA を導入した細胞は、コントロール siRNA を導入した細胞と比較し、経時的に創傷治癒遅延を認めた (図 3A,B)。浸潤能に関しても、siRNA 導入細胞は、コントロール siRNA 導入細胞と比較し、浸潤した細胞数は少なかった (図 3C,D)。以上の結果から、MUC1 は細胞遊走能及び浸潤能に関与することが明らかとなった。

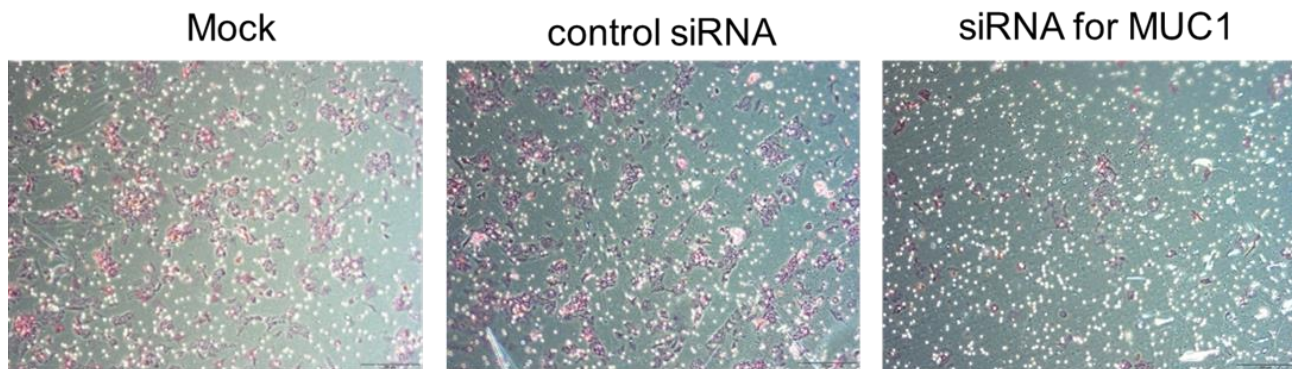
A.



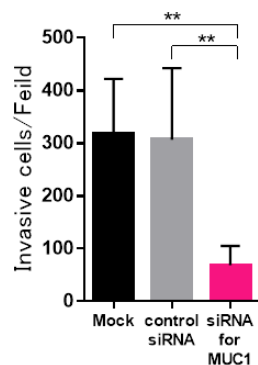
B.



C.



D.



### 図 3. MUC1 発現と遊走能・浸潤能

A. HuTu80 細胞を MUC1 siRNA (50nM) あるいはコントロール siRNA (50nM) で処理した細胞に創傷を作成し、0 時間後、24 時間後、48 時間後の代表的な写真を示す。

B. 0 時間後を基準として、24 時間後、48 時間後の創傷範囲の割合を示す (n=2、各群 sextuplicate)。

C. HuTu80 細胞を MUC1 siRNA (50nM) あるいはコントロール siRNA (50nM) で処理した細胞をマトリゲルコートしたインサートに投与し、22 時間後浸潤した細胞の代表的な写真を示す。

D. 浸潤細胞数をカウントし定量した (n=2、各群 sextuplicate)。

\*\*p<0.01, \*p<0.05



### 3-4. MUC1 発現と幹細胞性の検討

ALDHは様々な癌で cancer stem cell-like cell のマーカーとして浸潤能、転移、治療抵抗性に関与していると報告されている [29,30,31]。そこで、MUC1 発現と ALDH 発現の関連について検討した。その結果、siRNA を導入した細胞は、コントロール siRNA を導入した細胞と比較し、ALDH 活性が抑制されていた (図 4A,B)。以上の結果から、MUC1 陽性細胞は幼弱な性質を有することが示唆された。

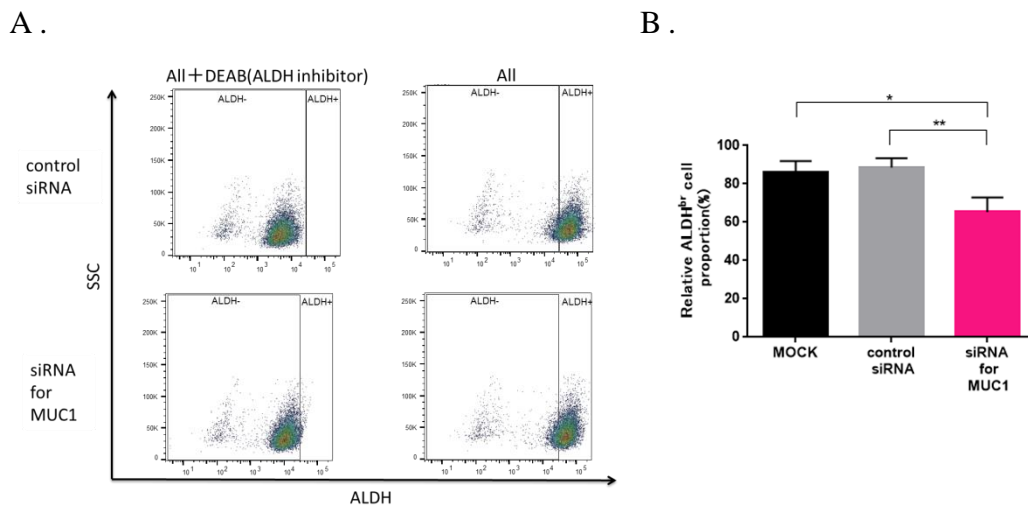


図 4. MUC1 発現と ALDH 活性

A. HuTu80 細胞を MUC1 siRNA (50nM)あるいはコントロール siRNA (50nM)で処理した細胞の ALDH 活性をフローサイトメトリーで解析した。DEAB は ALDH 阻害剤。

B. ALDH 陽性細胞の比率を示す (各 n=4-6)。

\*\*p<0.01, \*p<0.05

### 3-5. MUC1 発現と化学療法抵抗性の検討

MUC1 発現が幹細胞性と関連する可能性があることから、抗癌剤に対して抵抗性を有するかについて検討した。

250 $\mu$ M の 5-Fu を投与すると、siRNA で処理し MUC1 を阻害した細胞は、コントロール siRNA で処理した細胞と比較し、アポトーシスが有意に誘導された (図 5A,B)。しかし、CPA に関しては、アポトーシスに至る細胞の増加は見られなかった (図 5C)。



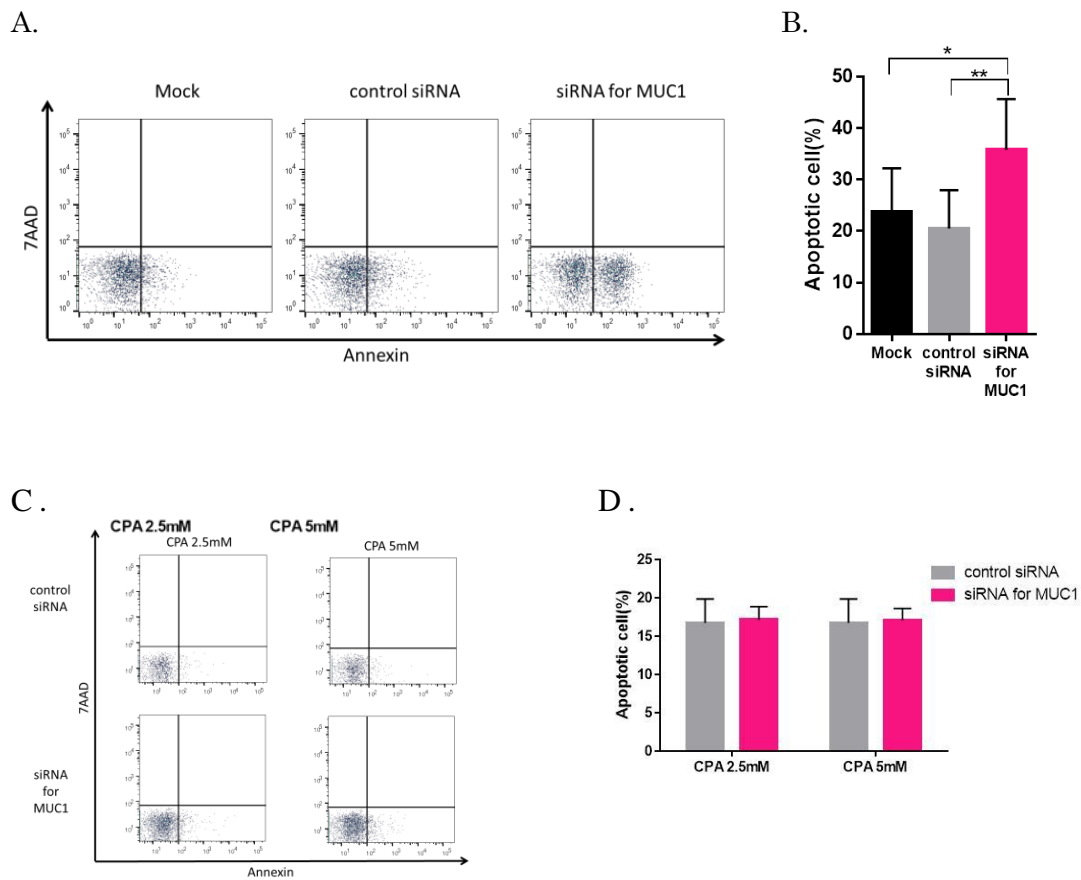


図 5. MUC1 発現と化学療法抵抗性

A. HuTu80 細胞を MUC1 siRNA (50nM)あるいはコントロール siRNA (50nM)で処理した細胞に 5-Fu250uM を投与し 48 時間後にフローサイトメトリーで解析した。

B. 5-Fu250uM 投与し 48 時間後のアポトーシス細胞の比率を示す (各 n=3)。

C. HuTu80 細胞を MUC1 siRNA (50nM)あるいはコントロール siRNA (50nM)で処理した細胞に CPA2.5mM あるいは 5mM を投与し 48 時間後にフローサイトメトリーで解析した。

D. CPA2.5mM あるいは 5mM 投与し、48 時間後のアポトーシス細胞の比率を示す (各 n=3)。

\*\*p<0.01, \*p<0.05

### 3-6. MUC1 発現と免疫逃避機構の検討

次に、リンパ球を用いた cytotoxic assay を行った。IL-2 で刺激し活性化させた PBMC (Lymphokine-activated killer: LAK) と HuTu80 を共培養して、細胞死に関して検討した。siRNA で処理した細胞は、コントロール siRNA と比較して、活性化したリンパ球による細胞死が有意に増加することが明らかとなった (図 6A,B)。

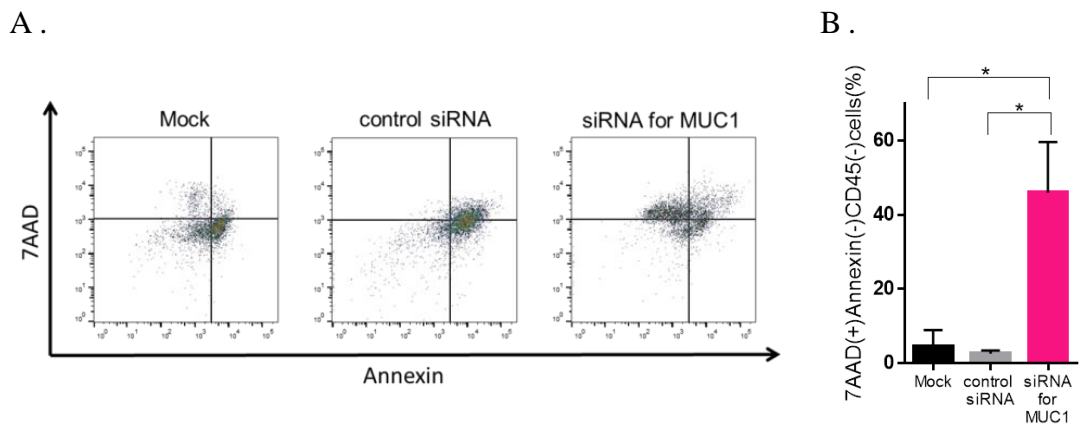


図 6. MUC1 発現と免疫逃避機構

A. HuTu80 細胞を MUC1 siRNA (50 nM) あるいはコントロール siRNA (50 nM) で処理した細胞に PBMC を 1:12.5 の割合で 4 時間共培養し、フローサイトメトリーで解析した。

B. 死細胞の比率を示す (各 n=4)。

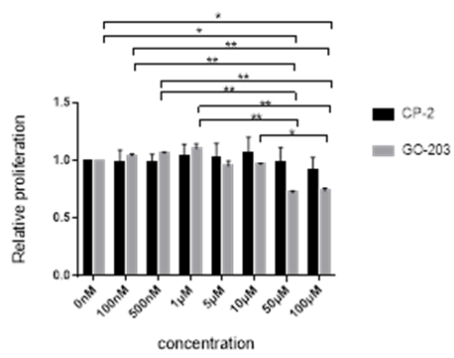
\*p<0.05

### 3-7. MUC1 阻害ペプチドによる効果

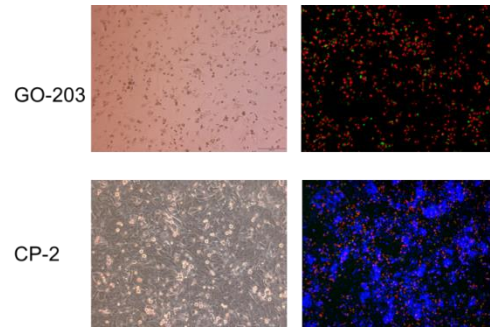
GO-203 は、MUC1 シグナルの下流エフェクターへの相互作用に必要な二量体化をブロックし、PI3K-AKT シグナルを抑制する新規合成ペプチドである [36]。 *In vitro* の検討で、HuTu80 に GO-203 を投与することで、細胞増殖が抑制され、細胞死が誘導された (図 7A,B)。

次に、*nude mice* に HuTu80 細胞を接種し、皮下腫瘍を作成し、GO-203 の腫瘍増殖抑制効果を *In vivo* で検討した。GO-203 投与開始 14 日目から腫瘍体積 (Tumor volume: TV) は、control peptide-2 (CP-2) と比較して有意に減少していた (図 7C,D,E,F)。また 28 日目の腫瘍の組織学的検討では、GO-203 を投与された腫瘍で内部壊死が進行していた (図 7H)。

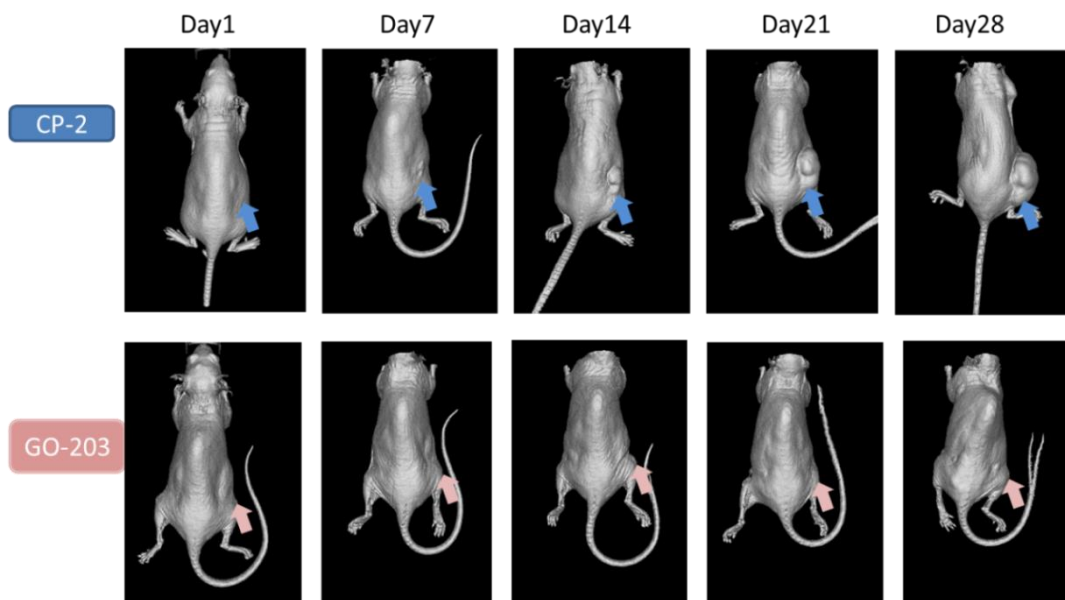
A.



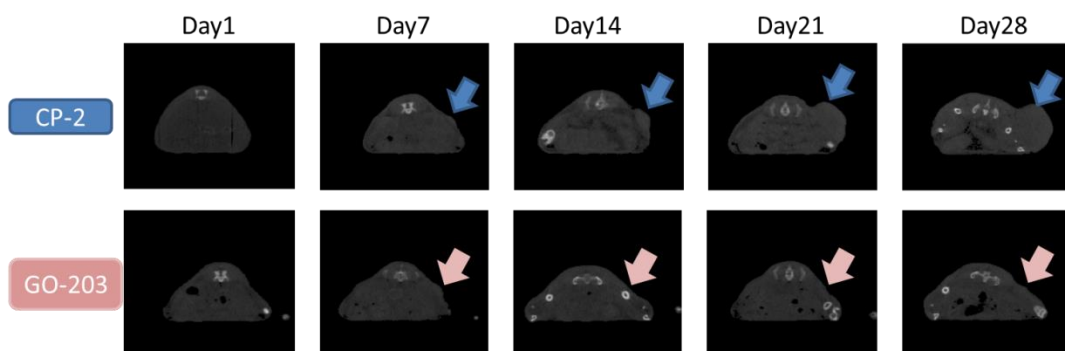
B.



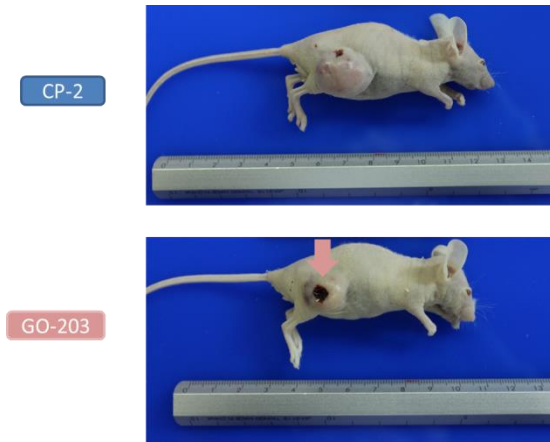
C.



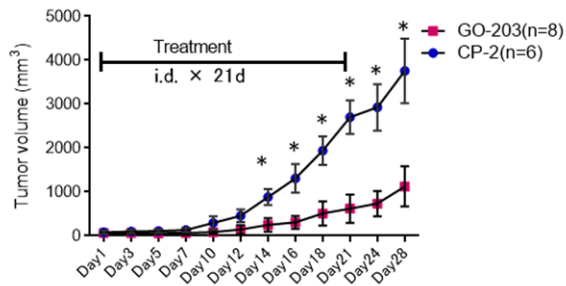
D.



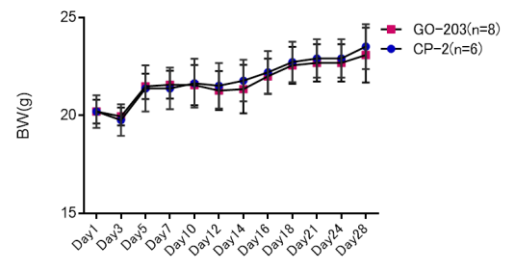
E.



F.



G.



H.

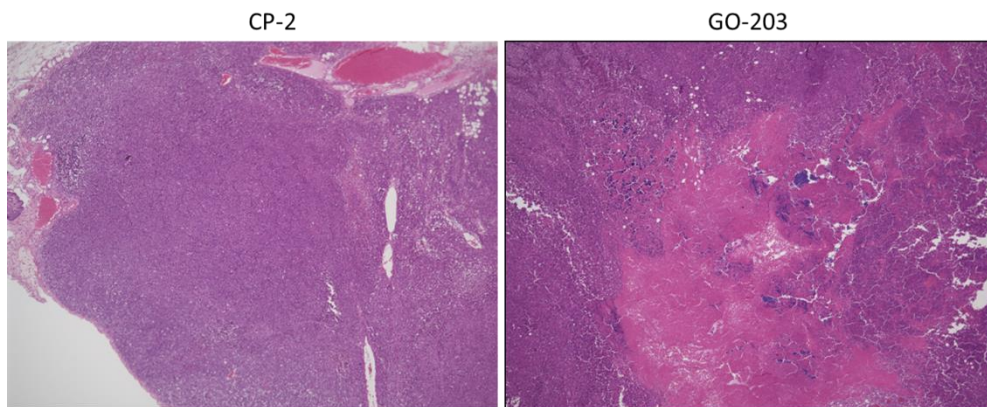


図 7. MUC1 阻害剤の効果

A. HuTu80 細胞を MUC1 阻害ペプチド GO-203 あるいはコントロールペプチド CP-2 で処理し、48 時間後に生細胞数を測定した (各 n=3 triplicate)。

B. HuTu80 細胞を MUC1 阻害ペプチド GO-203 あるいはコントロールペプチド CP-2 で処理した際の明視野 (左図)および蛍光免疫染色 (右図)。生細胞は Hoechst 陽性 (青色)、アポ

トーシス細胞は annexinV 染色陽性 (緑色)、ネクローシス細胞は Ethidium Homodimer III 染色陽性 (赤色)で示す。

C. HuTu80 細胞をヌードマウスに皮下注射し、腫瘍を形成させ、GO-203 あるいは CP-2 で処理し、経時的な変化を CT 撮影 (全体像) で評価した。

D. HuTu80 細胞をヌードマウスに皮下注射し、腫瘍を形成させ、GO-203 あるいは CP-2 で処理し、経時的な変化を CT 断層像で評価した。

E. HuTu80 細胞をヌードマウスに皮下注射し、腫瘍を形成させ、GO-203 あるいは CP-2 で処理し 28 日目の代表的な写真を示す。

F. 腫瘍容量を経時的な推移を示した。データは平均値±標準誤差で表示し、 $p < 0.01$  であるものを\*で示した。

G. 体重の推移を示した。

H. GO-203 あるいは CP-2 で処理した腫瘍の HE 染色を行った。代表的な組織像を示す (×4 倍)。

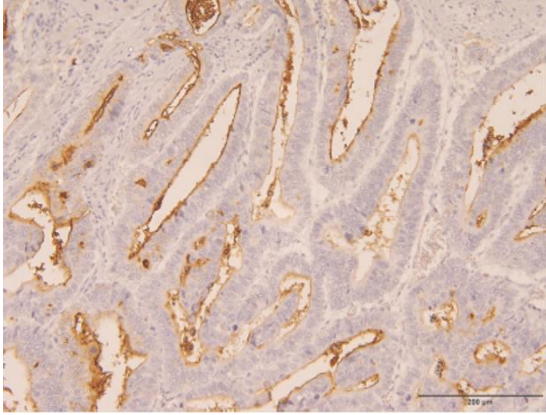
### 3-8. MUC1 発現と臨床検体の検討・生存解析

実際のヒト十二指腸癌切除検体を用いて、MUC1 発現と臨床病理学的因子、患者予後を検討した。

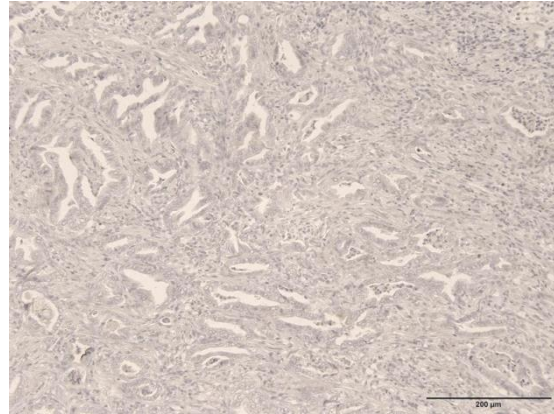
十二指腸癌に対して外科切除を行った 18 症例の手術標本における MUC1 発現を IHC 法で評価した。7 症例で MUC1 発現が陽性であり (図 8A)、11 症例が陰性であった (図 8B)。患者背景、病理学的検討を行うと、MUC1 陽性は、深達度、リンパ節転移、病期と有意に相関を認めた (表 1)。生存曲線では、MUC1 陽性患者は、陰性患者と比較し、有意に生存期間が短縮していた (図 8C)。しかし、MUC2、MUC5AC、MUC6 と生存期間との関連は認めなかった (図 8D,E,F)。

次に、十二指腸腫瘍に対して内視鏡的切除を施行した 24 症例についても同様の検討を行った。腺腫は 12 例、十二指腸癌は 10 例、carcinoid tumor は 2 例であった (表 2)。24 症例のうち MUC1 陽性症例は 2 例であり (図 9A)、十二指腸癌、carcinoid tumor それぞれ 1 症例であった。十二指腸癌に限定すると、MUC1 陽性症例は深達度 sm に対して、陰性症例はいずれも m であった (表 3)。

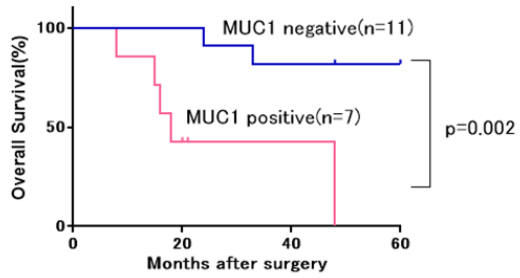
A.



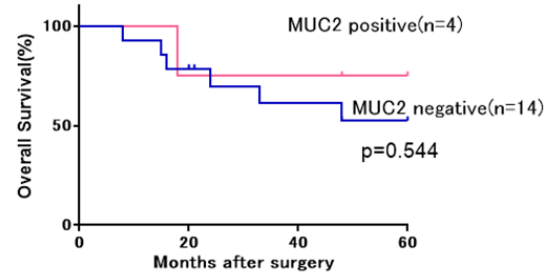
B.



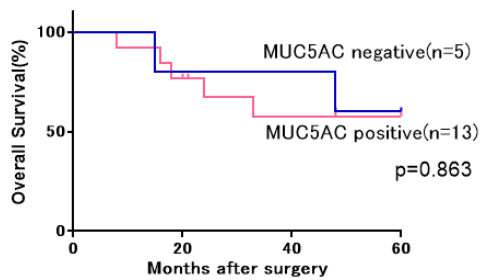
C.



D.



E.



F.

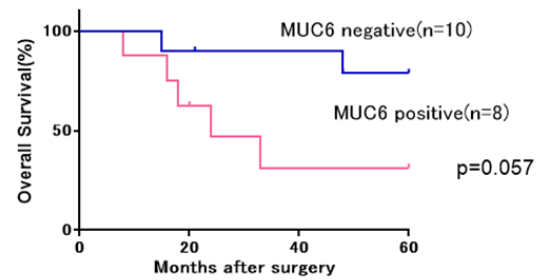


図 8. MUC1 発現と手術施行した十二指腸癌症例

A. MUC1 蛋白陽性患者の代表的な IHC 像を示す。

B. MUC1 蛋白陰性患者の代表的な IHC 像を示す。

C. MUC1 蛋白発現と術後生存曲線。

D. MUC2 蛋白発現と術後生存曲線。

E. MUC5AC 蛋白発現と術後生存曲線。

F. MUC6 蛋白発現と術後生存曲線。



表 1 MUC1 発現別の十二指腸癌症例の患者背景

Variables		MUC1 Negative (n=11)	MUC1 Positive(n=7)	P-value
Age median(range)		67(53-77)	63(35-70)	0.380
Gender				
	Male/Female	8/3	5/2	0.952
Tumor size,cm		5.1±3.5	3.5±1.3	0.030
Histology				
	Differentiated	10	4	0.145
	Moderate	0	2	
	Undifferentiated	1	1	
Depth of invasion				
	T0/T1/T2/T3/T4	1/4/1/4/1	0/1/0/0/6	0.026
Lymph node metastasis				
	Positive/Negative	1/10	5/2	0.006
Lymphatic invasion	Positive/Negative	4/7	5/2	0.147
Venous invasion	Positive/Negative	5/6	6/1	0.088
Stage				
	0/ I / II / III / IV	1/4/5/1/0	0/1/2/4/0	0.024
Margin				
	R0/R1/R0	11/0/0	6/1/0	0.380
Adjuvant chemotherapy	yes/no	1/10	2/5	0.197

表 2 内視鏡的切除を行った十二指腸腫瘍 24 症例の患者背景

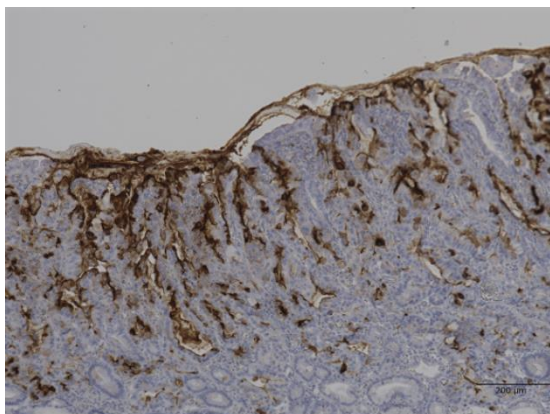
Variables(n=24)		
Age median(range)		56.8(22-83)
Gender		
	Male/Female	15/9
Tumor size,mm(range)		11(3-67)
Histology		
	adenoma	12
	carcinoma	10
	cartinoide tumor	2
Depth of invasion		
	m	22
	sm1	1
	sm2	1
Region		
	bulb	3
	descending part	12
	papilla Vater	4
	superior duodenal angulus	2
	inferior duodenal angulus	2
	unknown	1

表 3 内視鏡的切除術を行った十二指腸癌 10 症例の MUC1 発現別の患者背景

Variables		MUC1 Negative (n=9)	MUC1 Positive(n=1)
Age median(range)		65(45-83)	67
Gender			
	Male/Female	7/2	1/0
Tumor size,mm(range)		27.8(10-67)	20
Depth of invasion	m	9	0
	sm	0	1
Region	bulb	0	0
	descending part	6	1
	transverse part	0	0
	papilla Vater	1	0
	superior duodenal angulus	0	0
	inferior duodenal angulus	2	0

図 9

A.



B.

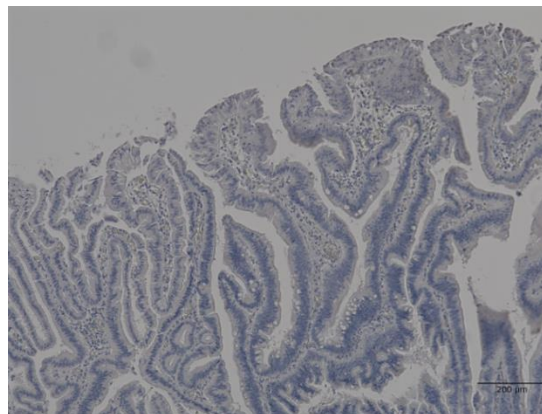


図 9. MUC1 発現と内視鏡的に切除した十二指腸癌症例

A. MUC1 蛋白陽性患者の代表的な IHC 像を示す。

B. MUC1 蛋白陰性患者の代表的な IHC 像を示す。

#### 4. 考察

MUC1は高度にグリコシル化されたヘテロ二量体膜貫通タンパク質で、種々の悪性腫瘍において過剰発現していることが報告されている[25-28]。また、これまでの基礎的研究の結果から、MUC1コアタンパク質が腫瘍細胞の悪性の誘導に重要な役割を果たしていることが示唆されており[18-22]、そこで、今回の検討では、ヒト十二指腸癌由来の培養細胞、HuTu80を用いてMUC1コアタンパク質をsiRNAで抑制することで、悪性形質の変化を検討した。

MUC1-Cが増殖能に関連することは種々の癌細胞で既に報告されている。[32-41]。また、Fujiiらは膀胱癌細胞株においてMUC1発現がG1停止をもたらすことを報告している[34]。今回の検討でも、MUC1コアタンパク質を抑制することで細胞周期がG0/G1期で停止し、増殖を有意に低下させることが確認された。

またMUC1コアタンパク質をsiRNAで抑制することで、遊走および浸潤も抑制された。遊走能に関しては、口腔扁平上皮癌[42]、大腸癌[37]、膵臓癌[39,43]で報告があり、浸潤能に関しても口腔扁平上皮癌[42]、膵臓癌[43-45]、乳癌[46]で同様の報告があり、MUC1コアタンパク質は十二指腸癌の転移段階でも重要な役割を演じている可能性が示唆された。実際に、十二指腸癌手術症例の免疫染色結果においても、MUC1の発現は深達度、臨床病期と

正の相関を示しており、MUC1の機能阻害が十二指腸癌の治療のターゲットとなる可能性が示唆された。

本研究では、MUC1コアタンパク質の抑制によりALDH活性を低下することも見出した。乳癌細胞を用いたAlamらの報告によると、MUC1コアタンパク質はALDH発現を誘導するERK-C/EBPBシグナル伝達を活性化することが解っている[47]。これは本研究の結果と一致し、MUC1が癌細胞の幹細胞性と関連していることを示唆する。また、最近の研究では、MUC1発現が抗癌剤抵抗性と関係する事実が報告がされている[43,48-51]。今回の研究でも、MUC1コアタンパク質の抑制が5-Fuによるアポトーシスの誘導を増強した。これらの結果を総合すると、MUC1コアタンパク質のシグナルが癌の幹細胞性の維持させることによって、薬剤抵抗性を誘導している可能性があることが推測された。

近年、免疫チェックポイント阻害抗体薬の画期的な臨床効果が報告され、がん免疫療法の重要性が注目されてきている。今回の検討で、標的細胞におけるMUC1の発現低下が活性化リンパ球による細胞障害活性を大きく高める新たな知見が得られた。最近、MUC1と腫瘍免疫逃避機構との関連性を検討した二つの論文が発表されているが[52,53]、これらの結果は本研究結果と合致する。

これらの結果から、MUC1阻害が化学療法および免疫療法に対する抗腫瘍効果を増強し、この併用が十二指腸

癌の治療に有用である可能性があると考えられる。そこで、急性骨髄性白血病[54]や非小細胞性肺癌[32]の治療のために臨床試験に使用されている MUC1 阻害薬 GO-203 に着目し、*in vivo* での治療効果を検討することにした。現在、GO-203 は成人再発性急性骨髄性白血病患者の第 2 相試験の段階である (NCT02204085)。今回の異種移植実験では、GO-203 投与により、皮下に形成した HuTu80 腫瘍の増殖が有意に抑制されることが明らかとなった。GO-203 は、ROS の産生増加が報告されており [32,55]、この効果は ROS 依存性機構によって誘発されることが推測される。

本研究では、他のヒト十二指腸腺癌細胞株は入手できなかったため、単一の細胞株のみで検討しているが、STR 解析による細胞株の認証を行っており、使用した HuTu80 細胞の遺伝子変化等の影響は除外している。

HuTu80 にレンチウイルスを導入することにより、MUC1 強制細胞株の作成を試みたが、親株と比較し、MUC1 タンパク発現の十分な発現を認めた細胞は得られなかった。またソーティングにより MUC1 強発現細胞、MUC1 弱発現細胞を分取し、異種移植実験を予定したが、細胞への損傷が強く、皮下腫瘍の形成が得られなかった。しかし胃癌、膵臓癌、乳癌、子宮頸癌の細胞株で増殖の実験を行い同様の結果を得られていることや、増殖能、遊走能、浸潤能に関しては他の癌腫による報告と同等であること、

*in vitro*、*in vivo*、臨床検体における結果が一貫性を持って理解できることから、今回の結果が HuTu80 単一の細胞株の特徴ではなく、十二指腸癌を含めた癌全般について外挿しうる知見であると考えている。

## 5. おわりに

本研究は、原発性十二指腸癌において MUC1 の発現が、増殖能、浸潤能、幹細胞性、薬剤抵抗性、免疫逃避機構と深く関連し、予後不良因子となることを明らかにするとともに、MUC1 阻害剤の臨床的有用性を示唆した初めての報告である。MUC1 発現が、抗癌剤やリンパ球による細胞障害性と関連することから、従来の化学療法や免疫療法に MUC1 阻害剤を付加した十二指腸癌に対する新規治療法の開発につながることが期待される。

## 6. 謝辞

本研究を進めるにあたり、ご指導を頂いた自治医科大学大学院消化器・一般外科佐田尚宏教授、北山丈二教授に深く感謝申し上げます。

また研究の遂行にあたり様々な御助言を頂き、日々の研究生活を支えて下さった自治医科大学消化器・一般外科学教室の皆様にご心より御礼申し上げます。



## 7. 参考文献

1. Struck A, Howard T, Chiorean EG, Clarke JM, Riffenburgh R, Cardness HR. Non-ampullary duodenal adenocarcinoma: factors important for relapse and survival. *J Surg Oncol* 100:144-148,2009.
2. Howe JR, Karnell LH, Menck HR, Scott-Conner C The American College of Surgeons Commission on Cancer and the American Cancer Society. Adenocarcinoma of the small bowel: review of the National Cancer Data Base, 1985-1995. *Cancer* 86:2693-2706,2009.
3. Sohn TA, Lillemoe KD, Cameron JL, Pitt HA, Kaufman HS, Pitt HA, Kaufman HS, Hruban RH, Yeo CJ. Adenocarcinoma of the duodenum: factors influencing long-term survival. *J Gastrointest Surg* 2:79-87,1998.
4. Meijer LL, Alberga AJ, de Bakker JK, van der Vliet HJ, Le Large TYS, et al. Outcomes and Treatment Options for Duodenal Adenocarcinoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Ann Surg Oncol* 25:2681-2692,2018.
5. Hurtuk MG, Devata S, Brown KM, Oshima K, Aranha GV, Pickleman J, Shoup M. Should all patients with duodenal adenocarcinoma be considered for aggressive surgical resection? *Am J Surg* 193:319-324; discussion 324-315,2007.
6. Onkendi EO, Boostrom SY, Sarr MG, Farnell MB, Nagorney DM, Donohue JH, Kenfrick ML, Reid-Lombardo KM, Hamsen WS, Que FG. 15-year experience with surgical treatment of duodenal carcinoma: a comparison of periampullary and extra-ampullary duodenal carcinomas. *J Gastrointest Surg* 16:682-691,2012.
7. Lee HG, You DD, Paik KY, Heo JS, Choi SH, Choi DW. Prognostic factors for primary duodenal adenocarcinoma. *World J Surg* 32:2246-2252,2008.
8. Solej M, D'Amico S, Brondino G, Ferronato M, Nano M Primary duodenal adenocarcinoma. *Tumori* 94:779-786,2008.
9. Delcore R, Thomas JH, Forster J, Hermreck AS Improving resectability and survival in patients with primary duodenal carcinoma. *Am J Surg* 166:626-630; discussion 630-621,1993.
10. Swartz MJ, Hughes MA, Frassica DA, Herman J, Yeo CJ, Riall TS, Lillemoe KD, Donehower RC, Laheru DA, Hruban RH, Abams RA. Adjuvant concurrent chemoradiation for node-positive adenocarcinoma of the duodenum. *Arch Surg*

142:285-288,2007.

11. Gold JS, Tang LH, Gonen M, Coit DG, Brennan MF, Allen PJ. Utility of a prognostic nomogram designed for gastric cancer in predicting outcome of patients with R0 resected duodenal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 14:3159-3167,2007.
12. Gendler SJ MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6:339-353,2001.
13. Ligtenberg MJ, Kruijshaar L, Buijs F, van Meijer M, Litvinov SV, Hilkens J. Cell-associated episialin is a complex containing two proteins derived from a common precursor. *J Biol Chem* 267:6171-6177,1992.
14. Merlin J, Stechly L, de Beauce S, Monte D, Leteurtre E, van Seuningen I, Huet G, Pigny P. Galectin-3 regulates MUC1 and EGFR cellular distribution and EGFR downstream pathways in pancreatic cancer cells. *Oncogene* 30:2514-2525,2011.
15. Yamamoto M, Bharti A, Li Y, Kufe D Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion. *J Biol Chem* 272:12492-12494,1997.
16. Li Y, Liu D, Chen D, Kharbanda S, Kufe D Human DF3/MUC1 carcinoma-associated protein functions as an oncogene. *Oncogene* 22:6107-6110,2003.
17. Schroeder JA, Thompson MC, Gardner MM, Gendler SJ Transgenic MUC1 interacts with epidermal growth factor receptor and correlates with mitogen-activated protein kinase activation in the mouse mammary gland. *J Biol Chem* 276:13057-13064,2001.
18. Kharbanda A, Rajabi H, Jin C, Alam M, Wong KK, Kufe D. MUC1-C confers EMT and KRAS independence in mutant KRAS lung cancer cells. *Oncotarget* 5:8893-8905,2014.
19. Takahashi H, Jin C, Rajabi H, Pitroda S, Alam M, Ahmad R, Raina D, Hasegawa M, Suzuki Y, Tagde , Bronson RT, Weichselbaum R, Kufe D. MUC1-C activates the TAK1 inflammatory pathway in colon cancer. *Oncogene* 34:5187-5197,2015.
20. Roy LD, Sahraei M, Subramani DB, Besmer D, Nath S, Tinder TL, Bajaj E, Shanmugam K, Lee YY, Hwang SI, Gndler SJ, Mukherjee P. MUC1 enhances invasiveness of pancreatic cancer cells by inducing epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene* 30:1449-1459,2011.
21. Ahmad R, Alam M, Rajabi H, Kufe D The MUC1-C oncoprotein binds to the BH3

- domain of the pro-apoptotic BAX protein and blocks BAX function. *J Biol Chem* 287:20866-20875,2012.
22. Rajabi H, Alam M, Takahashi H, Kharbanda A, Guha M, Ahmad R, Kufe D. MUC1-C oncoprotein activates the ZEB1/miR-200c regulatory loop and epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* 33:1680-1689,2014.
23. Agata N, Ahmad R, Kawano T, Raina D, Kharbanda S, Kufe D. MUC1 oncoprotein blocks death receptor-mediated apoptosis by inhibiting recruitment of caspase-8. *Cancer Res* 68:6136-6144,2008.
24. Alam M, Rajabi H, Ahmad R, Jin C, Kufe D Targeting the MUC1-C oncoprotein inhibits self-renewal capacity of breast cancer cells. *Oncotarget* 5:2622-2634,2014.
25. Utsunomiya T, Yonezawa S, Sakamoto H, Kitamura H, Hokita S, Akio T, Tanaka S, Irimura T, Kim YS, Sato E. Expression of MUC1 and MUC2 mucins in gastric carcinomas: its relationship with the prognosis of the patients. *Clin Cancer Res* 4:2605-2614,1998.
26. Baldus SE, Monig SP, Huxel S, Landsberg S, Hanisch FG, Engelmann K, Schneider PM, Thiele J, Holscher AH, Dienes HP. MUC1 and nuclear beta-catenin are coexpressed at the invasion front of colorectal carcinomas and are both correlated with tumor prognosis. *Clin Cancer Res* 10:2790-2796, 2004.
27. Khodarev NN, Pitroda SP, Beckett MA, MacDermed DM, Huang L, Kufe DW, Weichselbaum RR. MUC1-induced transcriptional programs associated with tumorigenesis predict outcome in breast and lung cancer. *Cancer Res* 69:2833-2837,2009.
28. Remmers N, Anderson JM, Linde EM, DiMaio DJ, Lazenby AJ, Wandall HH, Mandel U, Clausen H, Yu F, Hollingsworth MA. Aberrant expression of mucin core proteins and o-linked glycans associated with progression of pancreatic cancer. *Clin Cancer Res* 19:1981-1993,2013.
29. Timita H, Tanaka K, Tanaka T, Hara A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget* 7:11018-11032,2016.
30. Ishiguro T, Dato A, Ohata H, Ikarashi Y, Takahashi RU, Ocguta T, oshida M, Tsuda H, Onda T, Kato T, Kasamatsu T, Enomoto T, Tanaka K, Nakagama H, Okamoto K. Establishment and Characterization of an In Vitro Model of Ovarian Cancer Stem-like Cells with an Enhanced Proliferative Capacity. *Cancer Res* 76:150-160,2015.

31. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, Houvenaeghel G, Extra JM, Bertucci F, Jacquemier J, Xerri L, Dontu G, Stassi G, Xiao Y, Barsky SH, Birnbaum D, Viens P, Wicha MS. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. *Clin Cancer Res* 16:45-55,2010.
32. Raina D, Kosugi M, Ahmad R, Panchamoorthy G, Rajabi H, Alam M, Shimamura T, Shapiro GI, Supko J, Kharbanda S, Kufe D. Dependence on the MUC1-C oncoprotein in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer Ther* 10:806-816,2011.
33. Yuan Z, Liu X, Wong S, Machan JT, Chung MA. MUC1 Knockdown With RNA Interference Inhibits Pancreatic Cancer Growth. *J Surg Res* 157:e39-46,2009.
34. Fujii T, Shimada K, Fujimoto K, Konishi N. ALKBH, a novel AlkB homologue, contributes to human bladder cancer progression by regulating MUC1 expression. *Cancer Sci* 104:321-327,2013.
35. Xu T, Li D, Wang H, Zheng T, Wang G, Xin Y. MUC1 downregulation inhibits non-small cell lung cancer progression in human cell lines. *Exp Ther Med* 14:4443-4447,2017.
36. Kharbanda A, Rajabi H, Jin C, Alam M, Wong KK, Kufe D. MUC1-C confers EMT and KRAS independence in mutant KRAS lung cancer cells. *Oncotarget* 5:8893-8905,2014.
37. Wang Z, Sun J, Hu X, Huang S. Interference of Mucin 1 Inhibits Progression of Colon Carcinoma by Repression of Wnt/b-Catenin Signaling. *DNA Cell Biol* 34:162-170,2014.
38. Li ZR, Wei JL, Li ZZ, Li SF. Mucins 1-shRNA inhibit the proliferation and HIF-1alpha protein expression on human cholangiocarcinoma cells. *Cell Biol Int* 37:121-125,2013.
39. Kitamoto S, Yokoyama S, Higashi M, Yamada N, Takao S, Yonezawa S. MUC1 enhances hypoxia-driven angiogenesis through the regulation of multiple proangiogenic factors. *Oncogene* 32:4614-4621,2013.
40. Hasegawa H, Komoda M, Yamada Y, Yonezawa S, Tsutsumida H, Nagai K, Atogami S, Tsuruda K, Osaka A, Sasaki D, Yanagihira K, Imaizumi Y, Tsukasaki K, Miyazaki Y, Kamihira S. Aberrant overexpression of membrane-associated mucin contributes to

- tumor progression in adult Tcell leukemia/lymphoma cells. *Leuk Lymphoma* 52:1108-1117,2011.
41. Raina D, Uchida Y, Kharbanda A, Rajabi H, Panchamoorthy G, Jin C, Kharbanda S, Scaltriti M, Baselga J, Kufe D. Targeting the MUC1-C oncoprotein downregulates HER2 activation and abrogates trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Oncogene* 33:3422-3431,2014.
42. Li P, Xiao LY, Tan H. Muc-1 promotes migration and invasion of oral squamous cell carcinoma cells via PI3K-Akt signaling. *Int J Clin Exp Pathol* 8:10365-10374,2015.
43. Trehoux S, Duchene B, Jonckheere N, Van Seuning I. The MUC1 oncomucin regulates pancreatic cancer cell biological properties and chemoresistance. Implication of p42-44 MAPK, Akt, Bcl-2 and MMP13 pathways. *Biochem Biophys Res Commun* 16:757-762,2015.
44. Xu H, Inagaki Y, Seyama Y, Hasegawa K, Sugawara Y, Du G, Wang F, Tang W, Kokudo N. Expression of KL-6/MUC1 in pancreatic ductal carcinoma and its potential relationship with  $\beta$ -catenin in tumor progression. *Life Sci* 88:1063-1069,2011.
45. Xu H, Inagaki Y, Seyama Y, Du G, Wang F, Kokudo N, Tang W, Expression of KL-6/MUC1 in pancreatic cancer tissues and its potential involvement in tumor metastasis. *Oncol Rep* 26:371-376,2011.
46. Hatstrup CL, Gendler SJ. MUC1 alters oncogenic events and transcription in human breast cancer cell. *Breat Cancer Res* 8:R37,2006.
47. Alam M, Ahmad R, Rajabi H, Kharbanda A, Kufe D MUC1-C oncoprotein activates ERK-->C/EBPbeta signaling and induction of aldehyde dehydrogenase 1A1 in breast cancer cells. *J Biol Chem* 288:30892-30903,2013.
48. Ham SY, Kwon T, Bak Y, Yu JH, Hong J, Lee SK, Yu DY, Yoon DY. Mucin 1-mediated chemo-resistance in lung cancer cells. *Oncogenesis* 5:e185,2016.
49. Thulasiraman P, Johnson AB. Regulation of Mucin 1 and multidrug resistance protein 1 by honokiol enhances the efficacy of doxorubicin-mediated growth suppression in mammary carcinoma cells. *Int J Oncol* 49:479-486,2016.
50. Xu X, Wells A, Padilla MT, Kato K, Kim KC, Lin Y. A signaling pathway consisting of miR-551b, catalase and MUC1 contribute to acquired apoptosis resistance and chemoresistance. *Carcinogenesis* 35:2457-2466,2014.
51. Siragusa M, Zerilli M, Iovino F, Francipane MG, Lombardo Y, Ricci-Vitiani L, Di

gesu G, Todaro M, De maria R, Stassi G. MUC1 oncoprotein promotes refractoriness to chemotherapy in thyroid cancer cells. *Cancer Res* 67:5522-530,2007.

52. David JM, Hamilton DH, Palena C MUC1 upregulation promotes immune resistance in tumor cells undergoing brachyury-mediated epithelial-mesenchymal transition. *Oncoimmunology* 5:e1117738,2016.

53. Pyzer AR, Stroopinsky D, Rosenblatt J, Anastasiadou E, Rajabi H, Washington A, Tagde A, Chu JH, Coll M, Jiao AL, Tsai LT, Tenen DE, Cole L, Palmer K, Ephraim A, Leaf RK, Nahas M, Apel A, Bar-Natan M, Jain S, McMasters M, Mendez L, Arnason J, Raby BA, Slack F, kufe D, Avigan D. MUC1 inhibition leads to decrease in PD-L1 levels via upregulation of miRNAs. *Leukemia* 31:2780-2790,2017.

54. Jain S, Stroopinsky D, Yin L, Rosenblatt J, Alaam M, Bhargava P, Clark RA, Kupper TS, Palmer K, Coll MD, Rajabi H, Pyzer A, Bar-Natan M, Luptakova K, Arnason J, Joyce R, Kufe D, Avigan D. Mucin 1 is a potential therapeutic target in cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 126:354-362,2015.

55. Yin L, Kufe D MUC1-C Oncoprotein Blocks Terminal Differentiation of Chronic Myelogenous Leukemia Cells by a ROS-Mediated Mechanism. *Genes Cancer* 2:56-64,2011.