

学位論文題名

ヒト膵癌由来細胞株の LAK 感受性

学位論文内容の要旨

ヒト膵癌細胞培養株 6 株を樹立し、膵癌細胞の生物学的特性の解明および lymphokine-activated killer (LAK) 療法に関する基礎的研究を行なった。

50人の膵癌患者を対象に、膵癌原発巣より組織片を採取して膵癌細胞培養株の樹立を試み、6株の培養株 (PCI-6, 10, 19, 24, 35, 43) を樹立した。樹立可能であった膵癌培養株の患者は男性 5 人、女性 1 人で、年齢は 54~64 歳、平均 61 歳であった。Stage 分類は II, III 期が各 1 例、IV 期が 4 例と進行癌が多く、切除可能症例は 6 例中 3 例のみであった。血中の腫瘍マーカーは CA19-9 がいずれにおいても高値で、SLe^x は測定している 2 例中 1 例において高値であった。膵癌の組織型は中分化型管状腺癌が 4 例、低分化型管状腺癌が 2 例であった。樹立された PCI 株の doubling time は 33.6~52.8 時間、平均 36.0 時間であった。また、PCI の染色体分析では、染色体数が 68~84、平均 75 で、染色体 1 番の異常を検索した 5 例全例に、11 番の異常を 5 例中 3 例に認めた。

PCI 6 株は *in vitro* でいずれも、多角形ないし紡錘形の腫瘍細胞が巨細胞を交えて敷石状の配列を示した。また、PCI 細胞 1×10^7 個をヌードマウスに皮下注すると、いずれにおいても tumorigenesis が得られ、その組織像はいずれも原発巣に類似した管状腺癌で、原発巣の特徴をよく保持していた。ヌードマウス皮下腫瘍結節はその透過電顕において、いずれも大型の核小体をもつ核、細胞間接合装置、比較的短い微絨毛などが観察された。

さらに、PCI 6 株に対し、*in vivo* に近い三次元的培養法としてコラーゲン・ゲル包埋培養を試みたところ、原発巣が中分化型管状腺癌であった PCI-6, 10, 24, 43 で spheroid の形成がみられたのに対し、低分化型管状腺癌であった PCI-19, 35 では腫瘍細胞が遊離状に増殖し、spheroid の形成はみられなかった。また、コラーゲン・ゲル包埋培養 PCI-24 は分化誘導物質 hexamethylene bisacetamide (HMBA) (10^{-2} M) の添加によって大型の spheroid が形成され、個々の腫瘍細胞内には粘液貯留が顕著であった。腫瘍細胞の原発巣の分化度とコラーゲン・ゲル包埋培養における spheroid 形成の有無とが相関する傾向がみられたことは、このコラーゲ

ン・ゲル包埋培養系が *in vivo* での分化度に応じた実験系を提供し得る可能性を示したと考える。また、HMBA などによる分化誘導操作に応じた形態的变化がコラーゲン・ゲル包埋培養でみられたことは、この培養系が分化誘導に伴う機能的な変化と形態的な変化を同時に観察し得ることも示したと考える。

PCI の細胞表面分子の解析を間接フリーサイトメトリー法を用いておこなったところ、6 株いずれにおいても、class I ヒト主要組織適合抗原である HLA-ABC, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), lymphocyte function-associated antigen-3 (LFA-3) の発現を強く認めた。また、CA19-9, SLe^x は PCI-10, 24, 43 に、carcinoembryonic antigen (CEA) は PCI-24, 43 に、Le^x は PCI-10, 19, 35, 43 に、neural cell adhesion molecule (NCAM) は PCI-43 に、それぞれ発現を認めた。PCI 6 株に腫瘍マーカーを含む種々の細胞表面抗原の発現がみられたことから、PCI 株は生体内での生物学的特性の多くを保持していると考えられる。CA19-9 および SLe^x は血管内皮細胞上に発現する endothelial-leukocyte adhesion molecule-1 (ELAM-1) がリガンドであることが報告されており、また、Le^x はやはり、血管内皮細胞上に発現する granular membrane protein 140 (GMP-140) がリガンドであることが報告されている。膵癌細胞上に発現するこれらの接着分子が膵癌の血行性転移に関与していることが充分考えられ、PCI 株は今後、膵癌の血行性転移の機序を解明する上で有用と思われる。また、NCAM は広く神経組織に発現し、NCAM 自身をリガンドとする homotypic な接着分子であり、膵癌細胞上に NCAM の発現があれば、周囲の神経組織と容易に接着し浸潤することが予想される。PCI 上に NCAM の発現がみられたことは今後、膵癌の神経周囲浸潤の機構を解明する上で興味深い。また、コラーゲン・ゲル包埋培養 PCI-24, 43 における上記の各種細胞表面分子の発現は、平板培養 PCI-24, 43 の発現と同様の結果であったが、コラーゲン・ゲル包埋培養によって平板培養では発現を認めなかった laminin の発現誘導が認められた。以上から、PCI 株は形態学的にも、細胞表面抗原的にも原発巣の特徴をよく保持しており、今後、様々な膵癌研究に有用であると考えられる。

PCI 6 株はいずれも、natural killer (NK) 細胞に対して非感受性であったが、LAK 細胞に対しては感受性を示した。単クローン抗体による細胞表面分子ブロッキングの実験により、LAK 細胞の PCI との接着および細胞傷害反応には、LAK 細胞上の LFA-1 と PCI 上の ICAM-1 を介する接着が重要であることが示され、他の CD2/LFA-3 を介する接着、ICAM/Mac-1 を介する接着が殆ど関与していないことが示された。また、LAK・PCI 細胞上の NCAM/NCAM, LAK 細胞上の very late activation antigen-6 (VLA-6) とコラーゲ

ン・ゲル包埋培養 PCI 上の laminin を介する接着も殆どみられず、以上から、LFA-1 / ICAM-1 による接着は LAK・膀胱癌接着に major な役割をもつことが判明した。

さらに、LAK 細胞と膀胱癌細胞の相互作用において、膀胱癌細胞上の ICAM-1 が非特異的な接着分子としてのみ働いているのか、あるいは標的分子としても働き得るのか検討した。PCI 6 株の LAK 感受性と各 PCI 細胞に発現する ICAM-1 分子の mean intensity との相関係数を調べたところ、両者に有意な相関関係は認めなかった。また、LAK 細胞と繰り返し混合培養することで LAK 抵抗性を獲得した株 (PCI-24R) は、間接フローサイトメトリー法によるその細胞表面分子の解析で ICAM-1 分子の発現に変動を認めず、親部 (PCI-24) と同一であった。また、抗 ICAM-1 単クローン抗体によるブロッキングの実験にて、PCI-24R 上に発現する ICAM-1 分子の機能的な変化も認めなかった。以上の結果を総合し、膀胱癌表面上の ICAM-1 分子は LAK 細胞と膀胱癌細胞との接着に重要な役割を示すものの、LAK 細胞により直接的な標的分子として認識される抗原ではないことが示された。

以上の結果をまとめると、(1)樹立された PCI 6 株はいずれも形態学的にも、表面抗原的にも膀胱癌原発巣の特徴をよく保持しており、様々な膀胱癌研究に有用と考えられた。(2)PCI のコラーゲン・ゲル包埋培養では原発巣の分化度に応じた spheroid の形成がみられ、この培養系が in vivo での分化度に応じた実験系を提供し得る可能性が示された。(3)PCI 6 株はいずれも、NK 細胞に対して非感受性、LAK 細胞に対しては感受性を示した。(4)LAK 細胞と PCI との接着反応には LAK 細胞上の LFA-1 と PCI 上の ICAM-1 を介する細胞接着が重要であることが示され、他の CD2 / LFA-3, Mac-1 / ICAM-1 などを経る接着の関与を殆ど認めなかった。この際、PCI 上の ICAM-1 分子は、LAK 細胞により直接的な標的分子として認識される抗原ではなく、非特異的な接着分子として働くことが示された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	田邊達三
副査	教授	内野純一
副査	教授	小林邦彦

膀胱癌の治療成績は未だ良好とは言えず、補助治療としての免疫療法にも期待が寄せられている。

本研究ではヒト膵癌細胞培養株（PCI）6株を樹立し、膵癌細胞の生物学的特性の解析とLAK療法に関する基礎的研究をおこなった。

PCI 6株は *in vitro* でいずれも、多角形ないし紡錘形の腫瘍細胞が敷石状の配列を示した。ヌードマウスに 1×10^7 個の PCI 細胞を皮下注すると腫瘍結節を形成し、その組織像はいずれも原発巣に類似した管状腺癌であった。また、PCI 細胞をコラーゲン・ゲル包埋培養すると、原発巣が中分化型管状腺癌であった PCI-6, 10, 24, 43 では spheroid が形成されるのに対し、低分化型腺癌であった PCI-19, 35 では個々の腫瘍細胞が遊離状に増殖して spheroid は形成されず、原発巣の腫瘍細胞の分化度と spheroid 形成とが密接に相関していることが示された。間接フローサイトメトリー法を用いた PCI 表面抗原の解析で、HLA-ABC, ICAM-1, LFA-3 の発現を6株すべてに認め、CEAは PCI-24, 43に、CA19-9 と SLe^x は PCI-10, 24, 43に、Le^x は PCI-10, 19, 35, 43に、NCAM は PCI-43にそれぞれ発現を認めた。以上から、PCI 6株は形態学的に原発巣の特徴をよく保持しており、表面抗原的にも今後様々な膵癌研究に有用と考えられた。

PCI 6株はいずれもNK細胞に対して非感受性、LAK細胞に対して感受性を示した。単クローン抗体を用いた表面分子ブロッキングの実験により、PCIとLAK細胞との接着および細胞傷害反応にはPCI上のICAM-1とLAK上のLFA-1とを介する細胞接着が重要であることが示された。この際、PCI上のICAM-1がただ単に接着分子としてのみ働いているのか、あるいは標的分子としても働き得るのかをさらに検討した。各PCI上のICAM-1の発現強度とPCIのLAK感受性との間に有意な相関関係はみられなかった。また、頻回のLAK細胞との混合培養によって樹立されたLAK抵抗性PCI株の細胞表面ICAM-1の発現は、親株PCIと比較して有意な低下が認められなかった。以上から、LAK細胞との相互作用におけるPCI上のICAM-1の役割は、LAK細胞により直接的な標的分子として認識される抗原ではなく、非特異的な接着分子であることが示された。

口頭発表において内野教授より、培養株は何人の膵癌患者から得られたものか、膵癌の悪性度、分化度と培養株樹立の関係、コラーゲン・ゲル包埋培養法およびspheroid形成状況、LAK細胞の作製と膵癌細胞の傷害程度、また、小林教授よりコラーゲン・ゲル包埋培養におけるspheroid形成能と膵癌細胞上の蛋白あるいはコラーゲンをreceptorとする表面抗原の発現の関係、膵癌細胞表面抗原の発現状況などについて詳細な質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。また、内野、小林両教授には個別に審査を頂き、合格と判定された。膵癌細胞の生物学的特性を追求し、LAK療法をめざす本研究は膵癌に対する新しい治療法を樹立するための基礎的研究として意義は大きく、学位授与に値するものとする。