

学 位 論 文 題 名

膵癌血行性転移の分子機構：－膵癌・血管内皮相互作用
における膵癌由来サイトカインの重要性－

学位論文内容の要旨

【はじめに】

膵癌患者の予後を不良にする一要因として遠隔臓器への血行性転移があげられる。近年接着分子の関与が、多段階よりなる癌の血行性転移においても重要と考えられている。これまでに我々は、膵癌細胞株において細胞表面上に 1) sialyl Lewis a(SLe^a)およびsialyl Lewis x (SLe^x)を発現している株（陽性株）と両方共に発現していない株（陰性株）が存在し、2) 陽性株は外来性炎症性サイトカイン（IL-1 β 、TNF- α ）で活性化された血管内皮細胞に対し接着増強を示すこと、3) このときの接着増強は抗SLe^aおよび抗E-selectin抗体により阻害されるため、膵癌細胞上のSLe^aが活性化内皮細胞との接着に重要であることを報告してきた。このことは、既存の炎症局所への膵癌細胞の血行性転移のメカニズムを示唆する実験事実と考えられる。一方実際の症例では、必ずしも炎症局所にのみ転移を起こしているとは限らないと思われる。このため今回の実験では、膵癌細胞自体からの血管内皮細胞活性化物質産生能およびその物質により媒介される膵癌・内皮細胞接着増強の機構につき検討した。

【材料と方法】

- 1) 膵癌細胞株は、我々が樹立したヒト膵癌培養株 6 株 PCI-6,10,19,24,35,43 を用いた。細胞表面上の SLe^a/SLe^x は PCI-10,24,43 の 3 株にのみ陽性であり、PCI-6,19,35 は陰性である。血管内皮細胞（HUVEC）はヒト臍帯静脈より単離し得た。
- 2) 膵癌細胞による内皮細胞上表面分子の発現調節をみるため、膵癌細胞培養上清液（PCI-S/N）または HUVEC の 1/10 量の膵癌細胞（以下少量 PCI）を HUVEC と反応させ、HUVEC 上の E-selectin, ICAM-1 の発現を蛍光免疫染色、間接フローサイトメトリー法にて検討した。また HUVEC を PCI-S/N または少量 PCI にて処理後の PCI との接着を ⁵¹Cr アッセイ法にて検討し、さらに内皮細胞上に抗 ICAM-1, 抗 E-selectin 抗体、膵癌細胞上に抗 SLe^a, SLe^x 抗体をそれぞれ添加し各抗体が接着に及ぼす効果につき検討した。
- 3) 膵癌由来可溶性因子の検索のため PCI-S/N の熱処理・酸処理を行い内皮細胞活性化作用を検討した。次に内皮細胞上に E-selectin, ICAM-1 を誘導する既知のサイトカインである IL-1 α , β 、TNF- α の ELISA により PCI-S/N 中のサイトカインを測定した。またこれらサイトカインの特異抗体による PCI-S/N の中和効果も併せて検討した。
- 4) 上記内皮細胞活性化因子の PCI 表面上の膜結合型の有無を、固定後 PCI の内皮細胞上

E-selectin誘導能を指標として検討した。

【結果】

1) 膵癌細胞との相互作用による内皮細胞上の接着分子の発現調節

蛍光免疫染色、フローサイトメトリー法いずれによっても、PCI-S/N、少量PCI処理にてHUVEC上のE-selectin, ICAM-1の発現増強を認めた。この発現誘導作用は強度に多少の差はあるもののSLe^a/SLe^x陽性・陰性を問わず樹立された6株すべてのPCIに認められた。

2) 膵癌細胞と内皮細胞の接着

PCI-S/Nまたは少量PCIを事前に処理したHUVECではPCIとの接着の増強が認められた。この接着増強はPCI側に抗SLe^a抗体を、HUVEC側に抗E-selectin抗体を作用させることにより著明に抑制された。

3) 膵癌由来内皮細胞活性化(可溶性)因子の検討

PCI-S/NによるHUVECに対するE-selectin誘導能は70℃以上の熱処理にて失活した。また酸処理後の誘導能は非処理群と同程度に認められた。内皮細胞活性化作用を有するサイトカインのうちIL-1 β , TNF- α に関してはELISAによってPCI-S/N中に検出できず、各々の特異抗体によっても発現誘導活性は吸収できなかった。一方ELISAによりIL-1 α は6株すべてのS/Nにおいて1000-2000pg(10-20u)/mlの範囲で検出された。また、抗IL-1 α 抗体によりPCI-S/NのHUVEC上のE-selectin発現誘導活性は著明に抑制され、この抗体処理により、PCI-S/NによるPCIとHUVECの接着増強はほぼ完全に抑制された。

4) E-selectin発現誘導物質の膜結合型の有無

PCIを固定後HUVECと接触させることによっても、HUVEC上にE-selectinは誘導され、この誘導効果は抗IL-1 α 特異抗体処理により消失した。

【考察】

近年、腫瘍自らの産生するサイトカインが報告されており、このサイトカインが腫瘍細胞のautocrineな増殖を誘導したり、腫瘍細胞自身および周辺細胞の表面分子の発現を調節する可能性が示唆されている。今回我々の樹立した膵癌株においても腫瘍由来のサイトカイン様血管内皮活性化因子の存在が明らかになった。この因子はSLe^a/SLe^x陽性株・陰性株いずれも産生しており、これにより血管内皮細胞表面上のE-selectinの発現が増強し、陽性株とHUVECとの接着も増強した。ELISA、特異抗体による活性吸収効果により、この腫瘍由来物質の主要な有効成分としてIL-1 α の存在が示された。このことから非炎症部位においても膵癌細胞自体の産生するサイトカインを通して血行性転移を起こす可能性が示唆された。またこの腫瘍由来物質が機能的な膜結合型として存在することは、血液の流動状態の環境内での膵癌細胞と血管内皮細胞のdirect contact, rollingにより近傍の内皮細胞を次々と活性化する可能性を示唆している。

癌血行性転移のプロセスは多段階よりなっており、今回の実験は総合的な転移能の一局面についてのものである。しかし临床上においてSLe^aがその抗原決定基であるCA19-9が血行性転移の有効なマーカーとなっており、CA19-9高値例が明らかに予後が不良であるという報告は、临床上でもSLe^aが重要な生物活性分子であることを物語っている事実

と考えられる。

【結語】

1. 樹立した膵癌株6株すべてにおいて、膵癌細胞自体の産生する血管内皮活性化サイトカインの存在が明らかにされた。
2. この因子の主体はIL-1 α であることが判明し、これにより内皮細胞が活性化され既存の炎症を欠く部位においてもSLe^a依存性の接着増強が起こる可能性が示唆された。またこのとき、膵癌表面膜結合型のIL-1 α の作用も重要である可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之

副 査 教 授 細 川 真澄男

副 査 教 授 武 市 紀 年

学 位 論 文 題 名

膵癌血行性転移の分子機構：－膵癌・血管内皮相互作用 における膵癌由来サイトカインの重要性－

膵癌は消化器癌のうち最も予後不良の癌の一つであり、その予後を不良とする一要因として遠隔臓器への血行性転移があげられる。また近年接着分子の関与が、多段階よりなる癌の血行性転移においても重要と考えられている。本研究では膵癌血行性転移の基礎的検討として、膵癌細胞と内皮細胞の接着および接着を媒介する膵癌細胞自体からの血管内皮活性化物質産生能につき検討した。

膵癌細胞は我々が樹立したヒト膵癌培養株6株PCI-6,10,19,24,35,43を用いた。細胞表面上のSLe^x/SLe^xはPCI-10,24,43の3株のみに陽性でありPCI-6,19,35は陰性である。血管内皮細胞(HUVEC)はヒト臍帯静脈より単離し得た。SLe^x陽性膵癌株と内皮細胞の接着は、外来性サイトカイン(IL-1 β 、TNF- α)で内皮細胞上にE-selectinを発現誘導することにより増強を示す。一方少量の膵癌細胞(内皮細胞の約1/10量)を事前に内皮細胞と反応させておくことによっても、SLe^x陽性株と内皮細胞の接着は増強を示した。この膵癌細胞を事前にパラホルムアルデヒドで固定した後内皮細胞と反応させても、E-selectin誘導能を認めた。また、われわれの樹立した膵癌細胞6株の培養上清液いずれもが、内皮細胞上のE-selectin,ICAM-1誘導能を有していた。SLe^x陽性株と内皮細胞の接着は、陽性株側のSLe^x、内皮細胞側のE-selectinをそれぞれ単クローン抗体にてブロックすることにより著明に抑制された。一方抗SLe^x抗体、抗ICAM-1抗体処理によっては抑制は認めなかった。このことより膵癌株は培養上清中に血管内皮細胞にE-selectinを発現させる可溶性因子を自ら産生しており、この因子は膵癌細胞表面上に機能的な膜結合型としても存在することが示された。この因子は70℃で失活し、ELISA,nothern blot analysis、特異抗体による吸収によりIL-1 β 、TNF- α とは異なる物質であることが明らかになった。一方膵癌株6株すべてにELISAにてIL-1 α の蛋白が検出され、nothern解析においてIL-1 α 特異的mRNAの存在も確認された。さらにIL-1 α の特異抗体により培養上清による内皮細胞上のE-selectin誘導能はほぼ完全に抑制された。

以上のことより膵癌細胞自身の産生するサイトカイン(IL-1 α)による血管内皮活性化現象が確かめられ、既存の炎症以外の部位においてもSLe^x陽性膵癌が、血管内皮と接着して転移結節を作る可能性が示唆された。

口頭発表において細川教授より、SLe⁺/SLe⁺ 陽性株・陰性株間で実際の臨床上で他臓器転移に差がみられたか、in vivoでの転移の確認の有無、脾細胞がサイトカイン産生能を獲得する時期はいつか、自己産生サイトカインで発現増強される他の接着分子の可能性を、武市教授より他臓器転移の接着の次のstepである浸潤能についてはどうか、TNF- α 産生の可能性がないかを、皆川教授より接着分子の転移促進・抑制への意義について、牧田教授より脾癌細胞側のSLe⁺とSLe⁺の発現のcorrelationについて、SLe⁺/SLe⁺ 発現を増強もしくは減弱させる条件について、阿部和厚教授よりE-selectinは脾癌細胞と接着していないfreeな内皮細胞上にも認められるか、金田教授より他臓器転移の際の転移先の臓器特異性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、細川、武市両教授には個別に審査をいただき、合格と判定された。脾癌血行性転移の基礎的検討として新たに脾癌自己産生のサイトカインを関連させた本研究の意義は大きく、学位授与に値するものとする。