

学位論文題名

Importance of E-Selectin (ELAM-1) and Sialyl Lewis^a in the Adhesion of Pancreatic Carcinoma Cells to Activated Endothelium

(膵癌細胞の活性化血管内皮細胞への接着における
EセレクトインとシアリルルイスAの重要性)

学位論文内容の要旨

I. 目的

癌細胞と血管内皮細胞の接着は癌の血行性転移において重要な段階のひとつであり、生体内における転移能と関係している。炎症のある場所では血管内皮細胞は炎症性サイトカインにより活性化され、多核白血球やリンパ球は活性化血管内皮細胞に接着したのち組織内に侵入する。同様に内皮細胞の活性化はメラノーマ、白血病、骨肉腫、大腸癌などの腫瘍細胞株の接着に関与しており、サイトカインによるその調節は、炎症の場における癌転移の増加に重要と考えられている。大腸癌株では、活性化血管内皮細胞との接着に後者の E-selectin と前者の Sialyl Lewis a (以下 SLe^a) が関与していることが示されている。膵癌は予後不良であり、肝への血行性転移がそのひとつの理由である。大部分の膵癌は膵管由来であり、しばしば CA19-9 というかたちで、SLe^a 抗原を産生している。そこでこれらの表面抗原が膵癌細胞と活性化血管内皮細胞との接着に関与しているかどうかを明らかにするために検討をおこなった。

II. 方法

膵癌細胞株として、独自に樹立した管状腺癌由来ヒト膵癌細胞培養株 PCI-6, 10, 19, 24, 35, 43 を用いた。血管内皮細胞はヒト臍帯を酵素処理のうえ分離した。血管内皮細胞の同定は Factor VIII の蛍光染色にて確認した。サイトカインとして interleukin 1- β (以下 IL1- β) および tumor necrosis factor- α (以下 TNF- α) を用いた。

- (1) 膵癌細胞および血管内皮細胞の表面抗原の発現と IL1- β , TNF- α による調節を検討した。
細胞表面抗原の測定には間接フローサイトメトリー法を用いた。

- (2) 膀胱癌細胞の血管内皮細胞への接着を形態学的に観察した。
- (3) 膀胱癌細胞の血管内皮細胞への接着を定量的に検討した。定量にはクロム放出法を用いた。さらに膀胱癌細胞、血管内皮細胞の表面抗原との関連につき検討した。
- (4) 膀胱癌細胞の血管内皮細胞に対する接着の温度依存性を定量的に検討した。
- (5) 膀胱癌細胞の血管内皮細胞に対する接着の IL1- β , TNF- α 濃度依存性, 時間依存性, 相乗効果につき検討した。
- (6) 膀胱癌細胞の血管内皮細胞に対する接着に関与する細胞表面分子の単クローン抗体による blocking の影響を検討した。

Ⅲ. 結 果

- (1) 膀胱癌細胞は6株ともに intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), lymphocyte-function-associated antigen-3 (LFA-3) を発現していたが, very late antigen-4 (VLA-4), LFA-1 は発現していなかった。SLe^x, SLe^a は PCI-10, 24, 43 のみに発現していた。SLe^x, SLe^a の発現は IL1- β , TNF- α により影響を受けなかった。血管内皮細胞は ICAM-1 を発現しており, IL1- β , TNF- α 24 時間処理により発現が増加したが, 4 時間処理にては変化を受けなかった。E-selectin, vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) は IL1- β , TNF- α 処理をしていない血管内皮細胞上には発現していなかった。VCAM-1 は 4 時間処理で軽度発現し, 24 時間処理でさらに発現が増強した。E-selectin は 4 時間処理で発現が最高となり 24 時間処理では発現は減少し, 48 時間処理では発現はほぼ消失した。
- (2) 膀胱癌細胞の血管内皮細胞に対する接着を形態学的に観察したところ, SLe^x, SLe^a 陽性株である PCI-24 は, IL1- β , TNF- α 非処理血管内皮細胞に比べて IL1- β , TNF- α 処理血管内皮細胞に対し多くの細胞の接着が観察された。
- (3) 膀胱癌細胞は6株ともに血管内皮細胞に対し接着したが, IL1- β , TNF- α 処理した血管内皮細胞に対しては SLe^x, SLe^a 陽性株である PCI-10, 24, 43 の3株のみ接着が有意に増加した。
- (4) 膀胱癌細胞の IL1- β , TNF- α 処理血管内皮細胞への接着の増加は温度非依存性であった。
- (5) 膀胱癌細胞の血管内皮細胞への接着に対する IL1- β , TNF- α の濃度依存性を検討したところ, IL-1 β で 25u/ml, TNF- α で 50u/ml で最高となった。また時間依存性を検討したところ IL1- β , TNF- α 処理 4 時間後で最高となり, 24 時間後では接着の低下を示した。この結果は血管内皮細胞上の E-selectin の発現と相関していた。
- (6) 膀胱癌細胞の IL1- β , TNF- α 処理血管内皮細胞に対する接着は抗 E-selectin 抗体にてほぼ完全に阻害された。また, 抗 SLe^x 抗体にては阻害されなかったが, 抗 SLe^a 抗体にて接着は有意に阻害された。

IV. 考 察

本研究において、SLe^x/SLe^a陽性膵癌細胞株はIL1- β , TNF- α 処理血管内皮細胞に対し接着の増強を示した。種々の細胞接着分子の発現の程度、接着の時間及びサイトカイン濃度依存性、温度非依存性などの解析から接着に血管内皮細胞上のE-selectinと膵癌細胞上のSLe^x/SLe^aが関与していることが示唆された。抗E-selectin抗体が接着の増加を完全に阻止したことは、より直接的にE-selectinの関与を示している。抗SLe^x抗体は接着を阻止しなかったが、抗SLe^a抗体は部分的に接着を阻止した。膵癌細胞のSLe^xとSLe^aの発現量の違いや、SLe^xとSLe^aのE-selectinへの親和性の違いなどがこの現象に関与している可能性が考えられる。SLe^aは膵癌をはじめとする消化器癌に多く出現するCA19-9の抗原決定基である。多くの膵癌患者の血清中に溶存型のCA19-9がみいだされる。血清CA19-9値が高い場合には細胞表面上のCA19-9の発現も高いことが予測され、SLe^a/E-selectinを介した癌細胞の血管内皮細胞への接着が、膵癌細胞の血行性転移を規定する重要な因子である可能性がある。細胞接着の増加にはIL1- β , TNF- α が必要であった。このことは、さまざまなサイトカインが局所的に産生されている炎症部位に腫瘍細胞の転移が多いという古典的な観察を説明している。時間依存性の検討では、単一のサイトカイン処理では血管内皮細胞上のE-selectinの発現は4時間以後低下し、膵癌細胞株の接着もサイトカイン未処理のレベルまで低下した。しかし、サイトカインを混合した検討では血管内皮細胞上のE-selectinの発現および細胞接着は延長した。生体内における炎症の部位ではサイトカインは複数で存在し、血管内皮細胞上のE-selectinの発現も4時間以上継続すると考えられ、慢性炎症の場でもE-selectinの恒常的な発現が明らかにされている。一方、ヒト癌細胞株の中には、サイトカインを産生するものもあり、SLe^a陽性膵癌細胞自身がサイトカインを産生し、局所的に血管内皮細胞を活性化しE-selectin/SLe^a抗原結合を介して血行性転移に関与する可能性も考えられる。

V. 結 語

膵癌細胞と活性化血管内皮細胞との接着はサイトカインによる調節を受けており、膵癌細胞上のSLe^aと血管内皮細胞上のE-selectinを介している。これらの接着分子の発現は膵癌細胞の血行性転移において重要な因子である可能性がある。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之
副 査 教 授 葛 巻 暹
副 査 教 授 武 市 紀 年

学 位 論 文 題 名

Importance of E-Selectin (ELAM-1) and Sialyl Lewis^x in the Adhesion of Pancreatic Carcinoma Cells to Activated Endothelium

(膵癌細胞の活性化血管内皮細胞への接着における
EセレクトインとシアリルルイスAの重要性)

癌細胞と血管内皮細胞の接着は癌の血行性転移において重要な段階のひとつであり、生体内における転移能と関係している。炎症のある場所では血管内皮細胞は炎症性サイトカインにより活性化され、多核白血球やリンパ球は活性化血管内皮細胞に接着したのち組織内に侵入する。同様に内皮細胞の活性化はメラノーマ、白血病、骨肉腫、大腸癌などの腫瘍細胞株の接着に関与しており、サイトカインによるその調節は、炎症の場における癌転移の増加に重要と考えられている。大腸癌株では、活性化血管内皮細胞との接着に後者のE-selectinと前者のSialyl Lewis^x(以下SLe^x)が関与していることが示されている。膵癌は予後不良であり、肝への血行性転移がそのひとつの理由である。大部分の膵癌は膵管由来であり、しばしばCA19-9というかたちで、SLe^x抗原を産生している。そこでこれらの表面抗原が膵癌細胞と活性化血管内皮細胞との接着に関与しているかどうかを明らかにするために検討を行った。

実験方法としては、膵癌細胞として、独自に樹立したヒト膵癌細胞培養株PCI-6, 10, 19, 24, 35, 43を、血管内皮細胞はヒト臍帯を酵素処理の上、分離し使用した。サイトカインとしてIL-1 β 及びTNF- α を用いた。膵癌細胞、血管内皮細胞の表面抗原の発現とIL-1 β 、TNF- α による調節、膵癌細胞の血管内皮細胞への接着の形態学的観察、膵癌細胞の血管内皮細胞への接着の定量的検討、膵癌細胞の血管内皮細胞に対する接着の温度依存性の検討、膵癌細胞の血管内皮細胞に対する接着のIL-1 β 、TNF- α 濃度依存性、時間依存性、相乗効果の検討、膵癌細胞の血管内皮細胞に対する接着に関与する細胞表面分子の単クローン抗体によるblockingの影響の検討を行った。その結果、膵癌細胞は6株ともにICAM-1を発現

していたが、VLA-4、LFA-1は発現していなかった。SLe^x、SLe^aはPCI-10、24、43のみに発現していた。血管内皮細胞はICAM-1を発現しており、IL-1 β 、TNF- α 処理により発現が増加した。E-selectin、VCAM-1はIL-1 β 、TNF- α 処理をしていない血管内皮細胞上には発現していなかった。E-selectinは4時間処理で発現が最高となり24時間処理では発現は減少し、48時間処理では発現はほぼ消失した。脾癌細胞の血管内皮細胞に対する接着の形態学的観察では、SLe^x、SLe^a陽性株であるPCI-24は、IL-1 β 、TNF- α 非処理血管内皮細胞に比べてIL-1 β 、TNF- α 処理血管内皮細胞に対し多くの細胞の接着が観察された。脾癌細胞は6株ともに血管内皮細胞に対し接着したが、IL-1 β 、TNF- α 処理した血管内皮細胞に対してはSLe^x、SLe^a陽性株であるPCI-10、24、43の接着が有意に増加した。脾癌細胞のIL-1 β 、TNF- α 処理血管内皮細胞への接着の増加は温度非依存性であった。脾癌細胞の血管内皮細胞への接着に対するIL-1 β 、TNF- α の濃度依存性を検討したところ、IL-1 β で25u/ml、TNF- α で50u/mlで最高となった。また時間依存性を検討したところIL-1 β 、TNF- α 処理4時間後で最高となり、24時間後では接着の低下を示した。この結果は血管内皮細胞上のE-selectinの発現と相関していた。脾癌細胞のIL-1 β 、TNF- α 処理血管内皮細胞に対する接着は抗E-selectin抗体にてほぼ完全に阻害された。また、抗SLe^x抗体にては阻害されなかったが、抗SLe^a抗体にて接着は有意に阻害された。本研究において脾癌細胞と活性化血管内皮細胞との接着はサイトカインによる調節を受けており、脾癌細胞上のSLe^aと血管内皮細胞上のE-selectinを介していることが判明した。これらの接着分子の発現は脾癌の血行性転移において重要な因子である可能性があると考えられた。

口頭発表において葛巻 暹教授よりSLe^a抗原の発現と予後、肝転移との関連、SLe^a、SLe^xの発現量と細胞接着との関連、SLe^a、SLe^x発現調節因子としての糖転移酵素について、武市紀年教授より生体内におけるE-selectinの発現状況、細胞外基質と脾癌細胞の接着について、小林邦彦教授より脾癌患者血清中のCA19-9と脾癌細胞表面SLe^aの発現の関連について、E-selectinに対するCA19-9によるblockingの可能性について、細胞接着に及ぼす抗SLe^x抗体の効果、脾癌細胞表面分子の酵素処理の影響について、西 信三教授より脾癌患者血清中CA19-9と脾癌細胞表面SLe^aの発現の差異について、血液型物質Lewis^{a-b}患者の予後に関して質問があったが、申請者はおおむね妥当な回答をした。また、葛巻 暹、武市紀年両教授には個別に審査をいただき、合格と判定された。

脾癌細胞と活性化血管内皮細胞の接着におけるSLe^aとE-selectinの関与について検討した本研究の意義は大きく、本論文は博士(医学)の学位授与に値するものとする。