

学位論文題名

膵癌血行性転移における膵癌細胞由来IL-6の意義

学位論文内容の要旨

膵癌は日本に於いて増加の傾向を示しているが、今日に於いてもなお予後が極めて不良な疾患である。膵癌が予後不良となっている大きな要因の一つが門脈を経由した血行性肝転移の頻発である。我々は、これまで膵癌細胞株の樹立とその解析、これを用いた門脈血行性転移動物モデルの確立を行ってきた。その結果、特に腫瘍細胞と血管内皮細胞の接着に関して、膵癌細胞表面のsialyl Lewis^aと(SLe^a)と、血管内皮細胞上のE-selectinとの接着が重要であり、その際膵癌細胞株由来のサイトカインIL-1 α が機能的修飾を加えることを既に示した。

IL-6は1986年にその塩基配列が解明されたサイトカインで、従来の様々の報告からIL-6は単独あるいは他のサイトカインと連合して腫瘍細胞のbiologyを修飾している可能性がある。我々の以前の研究に於いても膵癌由来IL-6はin vitroにおける腫瘍由来血管透過能調節因子の主体をなしていた。従って今回我々はin vivoの転移における膵癌細胞由来IL-6の重要性に関し検討を加える事とした。そのために膵癌細胞株のIL-6の産生の有無と肝転移能との相関関係を検討した。またIL-6非産生性の膵癌細胞株を用い、これに発現プロモーターを備えたhuman IL-6 (hIL-6)のcDNAを組み込んだプラスミドを導入した株をヌードマウス肝転移モデルに応用し、その肝転移結節の形成に関して解析したので報告した。

今回我々は、樹立したヒト膵癌細胞株9株のIL-6産生の有無と抗アジアロGM1抗体処理したヌードマウス実験系での肝転移結節数との間に相関関係を認めた。すなわち、IL-6産生性を示す膵癌細胞株群の肝転移結節数が、産生性を持たない細胞株群に比して有意に少ないという結果である。しかしながらこれだけではほかの要素の関与も考えられるため、膵癌の血行性転移に対するhIL-6の関与をより明確にすべく、遺伝子導入法を用いた一連の実験を行った。まずhIL-6を産生せず高転移性を示すPCI-43に対し、hIL-6遺伝子を導入した。導入の有無及び産生するhIL-6の量の多少に関わらず、試験管内での腫瘍細胞の増殖・浸潤能には殆ど影響がなく、低発現性のhIL-6導入株を除き運動能にも大きな変化はなかった。また表面抗原の変化もFACSscanによる検索では検出されず、遺伝子導入の前後いずれに於いてもマウスNK細胞に対する感受性は認められなかった。

これらhIL-6遺伝子導入株を用いてin vivo血行性転移モデルでの実験を行った結果、IL-6高産生株が、親株であるPCI-43及びIL-6低産生株に比して有意に肝転移結節形成数が低下し、IL-6無産生株に対しても減少傾向を示した。このことはIL-6の産生が、何らかの形で膵癌細胞のin vivo血行性転移に対し抑制的に働くことを示唆する。in vitroながら、膵癌細胞

胞の増殖・運動・浸潤能の変化が認められなかったことから、hIL-6が腫瘍細胞本体ではなく周辺の宿主微小環境に影響を与えた結果であることが推定される。また、腫瘍細胞を直接移植された脾臓内での結節形成数は親株及びいずれのhIL-6導入株に於いても有意差を示さなかった事により、癌そのものの腫瘍原性にたいする遺伝子導入の影響も無かったと考えられよう。

本実験はヌードマウスを用いており、hIL-6高発現株の転移能軽減効果はT細胞系の免疫反応とは関係がないと考えられる。更に本研究での転移系はNK活性を抗アシアロGM1抗体である程度抑制したものであるため、NK活性を介した抗転移効果も考えなければならぬ。しかしin vitroでのNK細胞に対する感受性もhIL-6遺伝子導入により変化がなかったことから、NK細胞による抗腫瘍効果によって媒介された可能性は低い。

今回の実験でhIL-6遺伝子導入の有無に関わらず、自然抗体と思われる腫瘍宿主血中の腫瘍反応性IgM 力価には全く変化がなかったが、IgGクラスの腫瘍反応性抗体活性は高発現株の血漿中にのみ認められた。この抗体は我々が樹立した腫瘍細胞株すべてに対して反応性を持っており (data not shown), hIL-6導入により移植された腫瘍細胞の液性免疫原性が亢進した可能性が高いと思われる。この増強された腫瘍反応性IgGが転移抑制に介入する機序の可能性として、抗体依存性細胞傷害作用 (ADCC) や補体依存性細胞傷害作用 (CDC) といった抗体の存在によって機能する免疫効果が考えられた。ゆえに、腫瘍反応性抗体活性の上昇したマウス血漿を抗体として用い、PCI-43株を標的細胞としたADCCを⁵¹Cr遊離試験によって測定した結果、このIgGクラス腫瘍反応性抗体活性の増強につれてADCCも有意に亢進した。この結果、とりもなおさずADCCが今回の転移抑制効果の一翼を担っている可能性を表すものとなった。この腫瘍反応性抗体がADCCに関与するという結果により、IgG1, IgG2a, IgG2b或いはIgG3いずれかのサブクラスであると推定され、CDCにおいても関与し得ると思われる。今後より免疫機能欠損の強いSCID-beigeマウスなどを用いた肝転移モデルで、この腫瘍反応性IgGの転移に対する影響を検索する予定である。

一方、IL-6の転移能に対する影響の一つとして考えられるのが、血管内皮細胞に対する作用である。我々の以前の研究から、腫瘍細胞株由来のIL-6が容量依存性にin vitroで血管内皮細胞の透過性を亢進させている事が示されている。肝臓と同じin vivo条件下で、腫瘍を移植された脾臓に於いて腫瘍結節形成数に有意差がなかったことは、腫瘍細胞が転移する過程で何らかの影響を受けた可能性を示しており、抗体活性増強による細胞性免疫作用以外の関与を否定することはできない。IL-6による血管透過性調節作用が転移形成とどのような関連があるかは不明であるが、一連の転移成立の過程において何らかの影響を及ぼしていることも考えられよう。

hIL-6自体は、極めて多様な効果を持ったサイトカインであり、マクロファージやkiller細胞などに対する直接効果など今回述べた以外にも様々な要素を更に検討していく必要がある。これらの諸問題が明らかにされれば、hIL-6遺伝子の腫瘍細胞導入によるワクチン作成の可能性も期待できるものと思われる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 加 藤 紘 之
副 査 教 授 吉 木 敬
副 査 教 授 細 川 眞澄男

学 位 論 文 題 名

膵癌血行性転移における膵癌細胞由来IL-6の意義

本研究は、既に樹立された膵癌細胞株9株を用い、抗アシアロGM1抗体処理したヌードマウス実験系での血行性肝転移に影響する形質を検討する事から開始された。そして膵癌細胞によるhuman IL-6 (hIL-6) 産生能の有無と肝転移結節数との間に逆相関関係を認め、hIL-6が腫瘍細胞のbiologyを修飾している可能性を示すものと考えられた。ゆえにhIL-6の関与をより明確にすべく、遺伝子導入法を用いた一連の実験を行った。すなわち、hIL-6非産生性の膵癌細胞株を用い、これに発現プロモーターを備えたhIL-6のcDNAを組み込んだプラスミドを導入した株をヌードマウス肝転移モデルに応用し、その肝転移結節の形成に関して解析した。

その結果、hIL-6高産生株にて親株であるPCI-43及びhIL-6低産生株に比して有意に肝転移結節形成数が低下し、IL-6無産生株に対しても減少傾向を示した。これに関して、膵癌細胞の増殖・運動・浸潤能には大きな変化が認められず、また表面抗原の変化やマウスNK細胞に対する感受性の変化も見られなかったことは、hIL-6が膵癌細胞本体ではなく周辺の宿主微小環境に影響を与えた結果であることを示唆するものである。本実験はヌードマウスを用いており、hIL-6高発現株の転移能軽減効果はT細胞系の免疫反応とは関係がなく、また抗アシアロGM1抗体による抑制を免れたNK細胞活性を考慮する必要があるが、in vitroでのNK細胞に対する感受性もhIL-6遺伝子導入により変化がなかったことから、NK細胞による抗腫瘍効果によって媒介された可能性は否定的である。

今回の実験でIgGクラスの膵癌反応性抗体活性は高発現株の血漿中にのみ認められ、hIL-6導入により移植された膵癌細胞への免疫応答が亢進した可能性が高い。さらにこの膵癌反応性IgGの増強につれてADCCも有意に亢進したため、ADCCが今回の転移抑制効果の一翼を担っている可能性を示すものとなった。

上記の主旨の発表に対し、副査の細川眞澄男教授より、抗アシアロGM1抗体処理の根拠とその効果、ヌードマウスでの抗体産生の根拠、膵癌反応性IgGが抗体であることの証明とそれに関してhIL-6直接投与による抗体産生の可能性について質問があった。申請者は、抗アシアロ抗体処理によるマクロファージに対する抑制の可能性を根拠の一つに挙げた上で経験的事実による転移能亢進を示し、ヌードマウスに関する報告を引用して抗体産

生の可能性を示したが、hIL-6直接投与による抗体産生の可能性については今後の課題とした。次いで同副査の吉木敬教授から、脾癌反応性IgGの特異性、hIL-6の血管透過性に対する影響と本研究との整合性についての疑問が提起され、これに対し脾癌細胞に対する特異性の根拠が完全ではないことを認めた上で、他の固形癌細胞株、或いは非癌細胞に対する反応性の検討を今後の課題と規定した。一方、hIL-6による血管透過性亢進が癌細胞の浸潤を容易にする事により、高転移性の指標となりうるという指摘に対しては、それがin vitroにおける癌細胞と血管内皮細胞のみの関係を評価したものであり、in vivoにおいては血管透過性亢進による免疫系を含む多数の因子への影響が加わることを挙げ、これらの総体的影響の結果として、転移が抑制される可能性を指摘した。脇坂明美助教授からはhIL-6産生量の差の根拠、及び産生能の継続性についての質問があり、申請者はhIL-6の産生能の違いは導入効率の差によるという見解を示し、産生能については8週間にわたる継続性を確認していることを示した。また、高橋利幸講師から提起された脾癌株のhIL-6産生能が臨床患者の血中hIL-6と相関が認められないことについては、その理由の可能性の一つとして実際の癌組織がheterogenousであることを挙げた。最後に池田仁助手よりなされたhIL-6臨床応用に対する方法についての質問に対しては、癌ワクチンなどへの可能性を示した。以上、いずれの質問者に対しても概ね妥当と思われる回答を示した。

本研究はhIL-6の転移能に対する影響をより明確に証明し、B細胞系免疫に対する効果の可能性を実証した点で学術的価値が高く、今後の脾癌治療の展望を開くものと期待される。ゆえに審査員一同は、本研究を博士（医学）の学位に値するものと判定した。