

学 位 論 文 題 名

Inteleukin(IL)-6 as a Pancreas Carcinoma-Derived
Vascular Permeability Regulator in vitro

(膵癌細胞培養株産生 IL-6 による血管透過性亢進能の検討)

学位論文内容の要旨

[目的]

癌細胞と癌宿主細胞との相互作用は、癌の臨床経過の大きな鍵を握っており、特に血管との相互作用は癌の進展増殖に大きく関与していると思われる。

そこで、その相互作用を媒介する物質の一つとして微量で顕著な作用を発揮するサイトカイン、IL-6に注目し膵癌細胞と血管内皮細胞の相互作用を血管透過性を指標に検討した。

[材料と方法]

1. 膵癌産生可溶性物質の血管透過性調節活性の検討

0.45 μ m pore size の filter 付きの内筒を持った trans well を使用し実験を行った。

内筒内に HUVEC 単層培養し、そこに PCI-6,10,24,35 の細胞培養上清と Evans blue albumin を添加した培養液を加える。12時間培養した後、620nm の吸光度を測定することにより外筒に漏出した Evans blue albumin を定量した。HUVEC は出産当日の臍帯より酵素灌流法を用いて採取した内皮細胞を5日間培養し使用した。

膵癌細胞培養上清は PCI-6,10,24,35 (1 $\times$ 10⁷個) を confluent の状態で2日間培養したものを使用した。

Permeability Index (%) =

$$\frac{(\text{experimental clearance} - \text{spontaneous clearance}) \times 100}{(\text{clearance of filter alone} - \text{spontaneous clearance})}$$

2. 膵癌培養上清の透過性亢進の蛋白リン酸化阻害剤による抑制効果の検討。

実験1にて透過性亢進を示した PCI-10 の細胞培養上清に W7, H7, HA1004 をそれぞれ 30 μ M 加え 12 時間培養した後培養上清を採取、実験1と同様の実験系にて透過性の変化を検討した。

3. 膵癌細胞のサイトカイン産生性の検討。

Northern blot 法にて IL-1 α , IL-1 β , IL-6, TNF- α , bFGF, TGF- β のサイトカインメッセージの発現を検討し、細胞株間でメッセージ発現の差が見られた IL-6 の蛋白量を ELISA 法にて測定した。

4. ヒト IL-6 の血管透過性亢進活性と実験系の精度の検討

リコンビナントヒト IL-6 の HUVEC に対する血管透過性亢進活性と実験系の鋭敏性を検討した。

実験1と同様にHUVECを内筒内に単層培養し内筒内の培養液にリコンビナントIL-6を25,50,100,250,500,1000U/mlの濃度で添加し12時間後に外筒に漏出してきたEvans blue albuminを測定した。また、mouse IgGをコントロールにとり、抗IL-6抗体が直接特異的にIL-6を吸収するか否かを検討した。実験はIL-6(500/ml)を抗IL-6抗体(1000 neutralizing unit/ml)で吸収することにより行った。

5. ヒトIL-6による透過性亢進の蛋白リン酸化阻害剤による抑制効果の検討。
リコンビナントヒトIL-6(500U/ml)に30 μ MのW7,H7,HA1004Nを単独及び複合し加え12時間培養した後上清を採取、実験1と同様の実験系にて透過性の変化を検討した。
6. ヒトIL-6の透過性亢進作用の抗IL6抗体による吸収
リコンビナントヒトIL-6(500U/ml)に過剰量の抗IL-6抗体(5000U/ml)を加え12時間培養。上清を採取し透過性を検討した。コントロールとしてマウスIgGを使用した。
7. 肺癌培養上清中のIL-6の透過性亢進活性の抗IL-6抗体による吸収
PCI-10細胞培養上清に抗IL-6抗体を過剰量(5000U/ml)加えIL-6を吸収し実験1と同様の実験系で透過性の変化を検討した。

[結 果]

- (1) PCI-6,10の細胞培養上清はHUVECに対し血管透過性亢進活性を示し、PCI-24,43では透過性亢進活性を示さなかった($p<0.05$)。また500U/mlのリコンビナントIL-6は透過性を亢進させた。
- (2) PCI-10細胞培養上清の透過性亢進はW7にて抑制され、H7,HA1004では抑制されなかった。
- (3) northern blot 法にてIL-6 mRNAはPCI-6,10,19,35においてのみ発現しPCI-24,43ではみられなかった。ELISAにてPCI-6,10,19,35の細胞培養上清に多量のIL-6を認めた。
PCI-6,10,19,24,35,43の全ての株においてIL-1 α 、TGF- β メッセージ発現を認め、一方何れの株に於いても株でIL-1 β 、TNF- α 、bFGFのmRNA発現は認められなかった。
- (4) リコンビナントIL-6は500U/ml以上に有意にHUVECの透過性を亢進させ、濃度依存性に透過性は亢進した。
- (5) ヒトリコンビナントIL-6の透過性亢進作用はW7,H7,HA1004何れにも抑制された。
- (6) マウスモノクローナル抗体である抗IL-6抗体自身やコントロールとして用いたmouse IgGは血管内皮透過性に影響を殆ど与えず、抗IL-6抗体は実験条件の中でリコンビナントIL-6の血管透過性亢進を特異的に抑制することが示された。
- (7) 肺癌細胞培養上清の血管透過性亢進活性は抗IL-6抗体にてほぼ完全に吸収され、肺癌の産生するIL-6は肺癌細胞培養上清中の血管透過性亢進物質の主成分であることが示された。

[まとめ]

一部の肺癌培養上清(PCI-6,10)にて血管内皮細胞透過性の亢進を認めた。この透過性の亢進はnorthern blotおよびELISAの検討により、IL-6の産生と一致していた。

この透過性の亢進は、抗IL-6抗体により抑制され、透過性亢進の主体がIL-6であることが示唆された。また、この透過性亢進は蛋白リン酸化阻害剤であるW7により抑制され、IL-6レセプターを介した反応であることが予測されたが、リコンビナントIL-6による実験結果ではW7のみならずH7,HA1004にて抑制されており両者に違いが見られた。

この違いは肺癌産生IL-6の構造上の変化、肺癌培養上清中にH7,HA1004を抑制する何らかの物質が含まれるためと考えられるが今後更なる検討が必要である。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 今 村 雅 寛

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 加 藤 紘 之

学 位 論 文 題 名

Interleukin(IL)-6 as a Pancreas Carcinoma-Derived Vascular Permeability Regulator in vitro

(膵癌細胞培養株産生 IL-6 による血管透過性亢進能の検討)

癌細胞と血管内皮細胞との相互作用は癌の進展増殖に大きく関与していると思われる。本実験は相互作用を媒介する物質のひとつとしてサイトカインに注目し、膵癌細胞の産生するIL-6の作用を血管透過性を指標に検討した。

実験は膵癌細胞株(PCI-6,10,19,24,35,43)と酵素灌流法にて採取したヒト臍帯静脈内皮細胞を用いて行った。血管内皮細胞透過性の実験はfilter 付きの内筒を持った trans well を使用し、アルブミンの透過性をアルブミンに結合させたEvans blue の吸光度を測定することにより定量した。

検討は下に示す Permeability Indexを算出することにより行った。

Permeability Index (%) =

$$\frac{(\text{experimental clearance} - \text{spontaneous clearance})}{(\text{clearance of filter alone} - \text{spontaneous clearance})} \times 100$$

実験にて一部の膵癌培養上清で血管内皮細胞透過性の亢進を認めた。この透過性亢進はNorthern blotおよびELISA による検討にて、IL-6 の産生と一致していた。

リコンビナントIL-6を用いた実験にて、IL-6は500U/ml以上にて有意に血管透過性を亢進させ濃度依存性に透過性を亢進させた。

またマウスモノクローナル抗体である抗IL-6抗体自身やコントロールとして用いた mouse IgG は血管内皮透過性に影響を殆ど与えず、抗 IL-6 抗体は実験条件の中でリコンビナントIL-6 の血管透過性亢進を特異的に抑制することを確認したのち、膵癌細胞培養上清にこの抗IL-6抗体を加えたところ透過性の亢進が抑制され、透過性亢進の主体がIL-6であることが示唆された。

またこの透過性亢進はcalmodulin antagonistであるW7により抑制され、IL-6レセプターを介したタンパク質リン酸化に関与する反応であることが推測されたが、リコンビナント

IL-6による実験結果ではW7のみならずprotein kinase inhibitorであるH7,HA1004にても抑制されており両者に違いが見られた。この相違は膵癌産生IL-6の構造上の変化、膵癌培養上清中にprotein kinase inhibitorであるH7,HA1004を抑制する何らかの物質が含まれることなどに由来すると考えられるが今後更なる検討を要する。

口頭発表に於いて、加藤紘之教授より膵癌細胞株間のIL-6産生能の違いの理由、癌細胞自体のIL-6産生能の多様性と治療への展望、in vivo における検討の有無について質問があった。吉木 敬教授よりヒト膵癌患者におけるIL-6産生の報告と他のIL-6産生腫瘍患者に見られる病態の有無及び構造異常を有するIL-6産生の可能性について質問があった。今村雅寛教授より膵癌の産生するIL-6とrIL-6におけるタンパク質リン酸化阻害剤による抑制の違いを説明する機序及びそれとin vivoにおける両者の透過性亢進の差との相関性についての質問があった。

また池田 仁講師よりIL-6産生膵癌と非産生膵癌における組織型の差、臨床経過の差、血中のIL-6濃度における差について、薮中宗之助手より膵癌産生IL-6の糖鎖の変化について質問があった。

以上の質問に対し申請者は概ね妥当と思われる回答をした。

この実験系を用いることにより、癌細胞の産生するサイトカインのin vivoにおける役割をさらに解明することが期待される。

膵癌細胞が産生するIL-6が血管内皮細胞透過性を亢進させることを明らかにした本実験の意義は癌の進展増殖を理解する上で大きく、審査員一同は申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。