

学位論文題名

ヒト膵癌血行性転移における膵癌細胞表面

Sialyl Lewis a 抗原発現の意義

ヌードマウスを用いた *in vivo* での検討

学位論文内容の要旨

I 背景

膵癌は予後不良な癌の一つでありその臨床経過において高率にみられる血行性肝転移は予後を左右する重要な因子であると考えられる。癌血行性転移成立には多段階の課程が考えられており、それぞれの課程に重要な因子が報告されている。膵癌においては内皮細胞との接着には膵癌細胞上のSialyl Lewis^a (SLe^a)と活性化内皮細胞上のE-selectinとの相互作用の重要性が *in vitro* の実験系で報告されている。

II 目的

In vivo において血行性肝転移に影響を及ぼす膵癌細胞形質を調べるため、9種類のヒト膵癌株の血行性肝転移能を評価し、SLe^aの発現を中心に、他の表面抗原、doubling time、サイトカイン産生能、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP)の産生など種々の形質と転移能の関係を検討した。

III 材料と方法

- 1) 細胞： ヒト膵癌株9株 (PCI-6, 10, 19, 24, 35, 43, 55, 64 および66) は我々が手術切除材料から樹立したオリジナル株を用いた。
- 2)膵癌血行性転移モデル： 膵癌細胞 1×10^6 個をPhosphate buffered saline (PBS)(0.1ml) に懸濁したものを6週齢雄のBALB/c nu/nu ヌードマウスの脾臓に接種し、6週後に肝臓を摘出し顕微鏡下に転移結節数を数えた。抗アジアロGM1抗体を膵癌細胞接種前日、1、2、3および4週後に投与し、ヌードマウスのnatural killer 活性を抑制した。
- 3)転移抑制実験： 抗SLe^a抗体として *in vitro* にてSLe^a陽性株の活性化内皮細胞への接着阻害効果のある単クロン抗体 2D3 (IgM)を用いた。コントロール抗体としてI-83 (IgM) を用いた。これは interferon- γ で処理したPCI-10でマウスを免疫して得られた単クロン抗体であり、PCI-43表面上にSLe^aと同程度の発現がみられるが、SLe^a陽性株の活性化内皮細胞への接着阻害効果、増殖能への影響は認められない。2D3 (500 μ g), I-83 (500 μ g) およびPBS を癌細胞接種前日、1, 3, 5, 7, 14, 21 および28日後に静脈内投与し、

肝転移抑制効果を検討した。

4)表面抗原： SLe^a, SLe^x, leukocyte-function-associated antigen (LFA)-1, LFA-3, intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, ICAM-2, very late antigen (VLA)-4, VLA-6, carcinoembryonic antigen (CEA), E-selectin, vascular-cell-adhesion molecule-1 (VCAM-1), neural-cell-adhesion molecule (NCAM), Mac-1, human leukocyte antigen (HLA)-ABC, HLA-DRおよびHLA-DQの発現を間接フローサイトメトリー法にて調べ、mean fluorescence intensityを発現強度とした。

5)その他の癌形質： 膵癌細胞株9株の細胞数を培養後0日、1日、2日および4日にカウントし増殖曲線を作成しdoubling timeを算出した。膵癌細胞株の産生するサイトカインとしてInterleukin-1 α (IL-1 α)およびTumor necrosis factor- α (TNF- α)をELISA kitにて測定し検討した。MMPの産生はゼラチンザイモグラフィにて検討した。

IV 結果

ヌードマウス肝転移モデルにおける膵癌細胞株9株、PCI-6,10,19,24,35,43,55,64 および66の肝転移結節数はそれぞれ12.7 \pm 12.8, 0.3 \pm 0.7, 5.0 \pm 3.7, 17.0 \pm 19.2, 1.2 \pm 2.2, 65.9 \pm 39.9, 22.0 \pm 31.2, 8.3 \pm 23.2および0.3 \pm 0.5 (mean \pm standard deviation)個であった。

間接フローサイトメトリー法にて膵癌細胞表面のSLe^aの発現をみると9株のうち5株(PCI-10, 24, 43, 55 および64)は陽性で、他の4株(PCI-6,19,35 および66)は陰性であった。SLe^a陽性の5株と陰性の4株とで肝転移結節数を比較すると、陽性株群21.6 \pm 33.9に対して陰性株群6.5 \pm 14.3とSLe^a陽性株群が有意に(p<0.01)肝転移結節を多発している傾向が見られた。SLe^aの発現強度(mean intensity)と転移結節数の間には正の相関傾向が見られた。

2D3投与群, I-83投与群, PBS投与群の肝転移結節数はそれぞれ0.8 \pm 1.2, 6.1 \pm 6.5, 27.2 \pm 30.4とPBS投与群に比しI-83投与群(p<0.05)、2D3投与群(p<0.01)で抑制効果が得られ、さらに2D3投与群ではI-83投与群に比しても高度の抑制効果が得られた(p<0.025)。ICAM-1の発現と転移結節数とに負の相関関係がみられた(p<0.05)。その他の表面抗原、IL-1 α 、TNF- α 、doubling time、MMPなどと有意な関係は見られなかった。

V 考察

膵癌上のSLe^aの発現は*in vivo*において血行性肝転移に関係する因子であることが示された。*In vivo*での転移抑制実験においてIgMクラスのコントロール抗体においても転移抑制効果がみられた。これはcomplement dependent cell cytotoxicity(CDCC)による非特異的な癌細胞障害の影響が考えられる。抗SLe^a単クローン抗体2D3(IgM)の静脈内投与により、さらに肝転移は抑制され、これは2D3特異的效果によると考えられる。ICAM-1の発現と肝転移結節数に逆相関がみられた。しかしヒトICAM-1はマウスLFA-1とは相互作用しないため、この作用機序を推測するのは困難である。他の重要な因子がICAM-1の発

現と相関していたためかもしれない。その他の表面抗原、増殖能、MMP、サイトカイン産生などには、検討しえた限りでは有意な関係はみられなかった。

今回の検討により膵癌細胞上のSLe^a発現は肝転移形成に関与する重要な因子の一つであることが明らかにされた。

学位論文審査の要旨

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

学 位 論 文 題 名

ヒト膵癌血行性転移における膵癌細胞表面

Sialyl Lewis a 抗原発現の意義

ヌードマウスを用いた *in vivo* での検討

多段階よりなる癌血行性転移のうち、癌細胞と標的臓器の血管内皮細胞との接着も重要な因子の一つである。当教室では既に試験管内において、膵癌細胞と内皮細胞との接着には、膵癌細胞上のSialyl Lewis^a (SLe^a)と活性化内皮細胞上のE-selectinとの相互作用が重要であること、膵癌細胞株はIL-1 α を産生し、内皮細胞上にE-selectin を発現誘導し得ることを報告してきた。本研究はSLe^a の発現、IL-1 α の産生能などが*in vivo*において血行性肝転移にどのように影響するかを、ヌードマウスを用いた膵癌血行性転移モデルを作成し検討したものである。

ヒト膵癌株は手術切除材料から樹立した9株のオリジナル株 (PCI-6, 10, 19, 24, 35, 43, 55, 64 および66) を用いた。抗アジアロGM1抗体投与によりnatural killer 活性を抑制したヌードマウスの脾臓に膵癌細胞 1×10^6 個を接種し、6週後に肝臓を摘出し顕微鏡下に転移結節数を数えた。膵癌細胞株9株、PCI-6, 10, 19, 24, 35, 43, 55, 64 および66 の肝転移結節数はそれぞれ 12.7 ± 12.8 , 0.3 ± 0.7 , 5.0 ± 3.7 , 17.0 ± 19.2 , 1.2 ± 2.2 , 65.9 ± 39.9 , 22.0 ± 31.2 , 8.3 ± 23.2 および 0.3 ± 0.5 (mean \pm standard deviation) 個であった。SLe^a 陽性株群5株 (PCI-10, 24, 43, 55 および64) と陰性株群4株 (PCI-6, 19, 35 および66) とで肝転移結節数を比較すると、それぞれ 21.6 ± 33.9 , 6.5 ± 14.3 とSLe^a 陽性株群が有意に

($p < 0.01$) 肝転移結節を多発している傾向が見られた。間接フローサイトメトリーにより膵癌細胞表面のSLe^aの発現強度と転移結節数の間には正の相関傾向が見られた。

抗SLe^a単クローン抗体 2D3 (IgM)による *in vivo*での肝転移抑制実験では、2D3投与群、control IgM 抗体 I-83 投与群、PBS 投与群の肝転移結節数はそれぞれ 0.8 ± 1.2 , 6.1 ± 6.5 , 27.2 ± 30.4 と PBS投与群に比し I-83投与群($p < 0.05$)、2D3投与群($p < 0.01$)で抑制効果が得られ、さらに2D3投与群ではI-83投与群に比しても高度の抑制効果が得られた($p < 0.025$)。この結果より2D3特異的な抑制効果があると考えられた。

その他、IL-1 α 、TNF-1 α 産生、doubling time、SLe^a以外の表面抗原の発現、matrix metalloproteinase の産生などと転移結節数には明かな関係はみられなかった。

以上の結果より、膵癌上のSLe^aの発現は *in vivo*において血行性肝転移に関係する因子であることが示された。

審査に当たって、副査細川教授より、抗アジアロGM1抗体投与は必要か、SLe^aの発現のみで転移能を説明することが困難である株では他にどのような因子が関与する可能性があるか、脾臓の結節形成の有無と転移能の関係、それぞれの株の担癌患者の臨床像との関係について質問があった。また副査加藤教授より、多様な癌形質のうちSLe^aだけに注目することが意義のあることか、癌細胞が接着増強因子を産生するのは一般的なことかなどの質問があった。主査吉木教授より、細胞株を樹立した患者の臨床像と基礎実験結果との対比解析、SLe^a陽性株で転移しない株の検討などが今後重要であろうと示唆された。申請者は概ね妥当な回答をなし得た。

本論文は *in vitro* の実験系で膵癌血行性転移に重要な因子と考えられた結果を *in vivo*で検証し得た点で高く評価される。今後、血行性転移に影響する他の因子の究明にも有用な実験系であり成果が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、また申請者は研究者として誠実かつ熱心であり、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。