



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	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 : ノドマウスを用いたin vivoでの検討
Author(s)	岸本, 充
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	乙第5596号
Issue Date	2000-03-24
DOI	https://doi.org/10.11501/3168823
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/51663
Type	doctoral thesis
File Information	000000354015.pdf



①

はじめに

学位申請論文

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

北海道大学医学部 病理学第一講座

岸本 充

(指導教官：吉木 敬 教授)

はじめに

膵癌は予後不良な癌の代表である。画像診断、内視鏡的細胞診、生検など診断技術は進歩したものの、膵癌の早期発見は他の臓器に較べ難しい。膵癌は被膜をもたず浸潤性が強いこととともに、肝への血行性転移が予後不良の原因として上げられる。我々は膵癌の外科切除材料から新たに膵癌細胞株を樹立し、膵癌の血行性転移について研究してきた。多段階からなる癌転移のメカニズムのうち、膵癌細胞と血管内皮細胞との接着機構に注目し、幾つかの知見を得てきた。本論文では、序論として、我々が報告してきた膵癌細胞と血管内皮細胞との相互作用に関する *in vitro* での結果を述べ、本論として、その結果を踏まえ、主に *in vivo* での実験的検討を行ったので報告する¹⁾。

我々は膵癌細胞株 (PCI-5) とが樹立された (図 1)。HUVEC を Interleukin-1 β (IL-1 β) で処理したとき、SLC^x 陽性株には接着増強が認められたが、SLC⁻ 陽性株には接着増強が認められなかった (図 2)。IL-1 β あるいは Tumor necrosis factor (TNF- α) を処理して HUVEC 活性化および接着増強は誘導されたが、Interferon (IFN- γ) 処理では誘導されなかった。

この接着増強は抗 SLC^x 抗体 (あるいは抗 E-selectin 抗体) により抑制されたが、E-selectin のもう一つのリガンドの Sialyl Lewis x (SL^x) に対する抗体では有意な抑制は見られなかった (図 3)。

以上より、PCI-5 と HUVEC との接着は、IL-1 β あるいは TNF- α のようなサイトカインにより誘導され、PCI-5 側の SL^x と HUVEC 側の E-selectin との相互作用が重要であると考えられた。

序論

I 膵癌細胞と血管内皮細胞の接着における SLe^a および E-selectin の重要性²⁾

新たに樹立したヒト膵癌細胞株 PCI 6 株 (PCI-6, 10, 19, 24, 35 および 43) とヒト血管内皮細胞 (HUVEC) とを用い、膵癌と血管内皮細胞の接着に関与する接着分子を検討した。

間接フローサイトメトリー法による検討では、PCI 6 株には Sialyl Lewis a (SLe^a) を発現する株 (SLe^a 陽性株、PCI-10, 24, 43) と発現しない株 (SLe^a 陰性株、PCI-6, 19, 35) とが認められた (図 1)。HUVEC を Interleukin-1 β (IL-1 β) で処理したとき、SLe^a 陽性株には接着増強が認められたが、SLe^a 陰性株には接着増強が認められなかった (図 2)。IL-1 β あるいは Tumor necrosis factor (TNF)- α 処理にて HUVEC 活性化および接着増強は誘導されたが、Interferon (IFN)- γ 処理では誘導されなかった。

この接着増強は抗 SLe^a 抗体 あるいは抗 E-selectin 抗体 により抑制されたが、E-selectin のもう一つのリガンドの Sialyl Lewis x (SLe^x) に対する抗体では有意な抑制は見られなかった (図 3)。

以上より、PCI と HUVEC との接着は、IL-1 β あるいは TNF- α のようなサイトカインにより調節され、PCI 側の SLe^a と HUVEC 側の E-selectin との相互作用が重要であると考えられた。

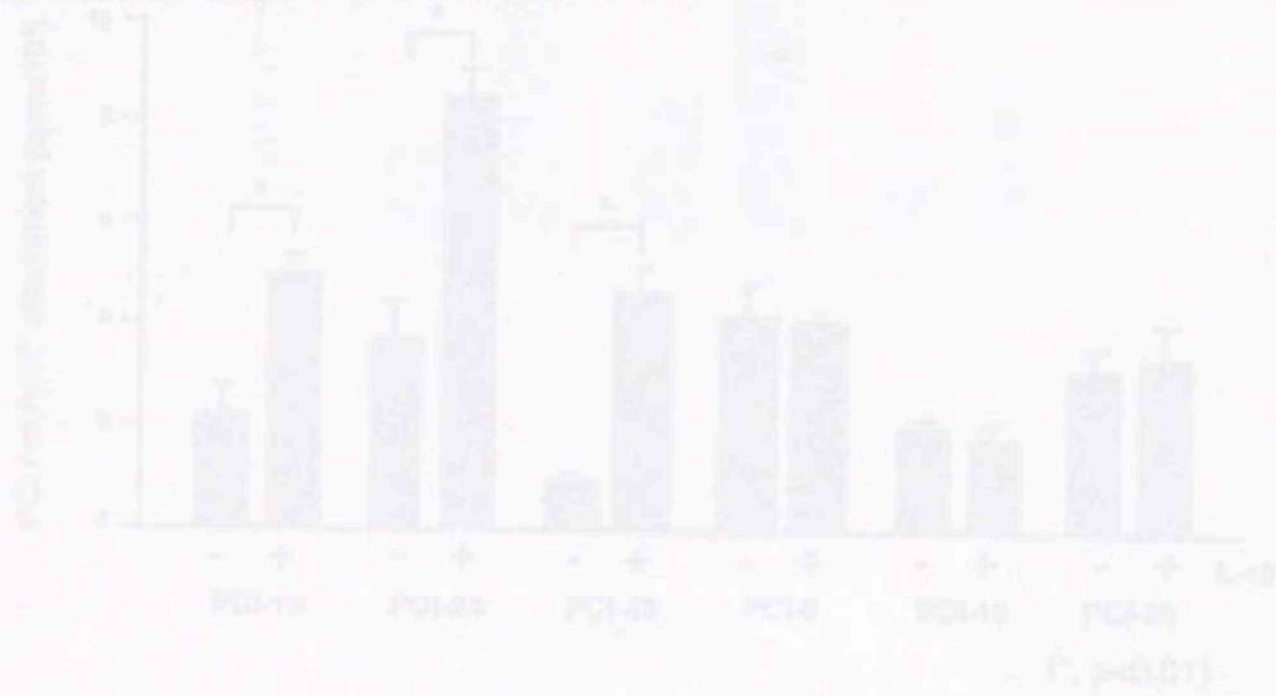


図1 PCI 6 株の SLe^a 発現

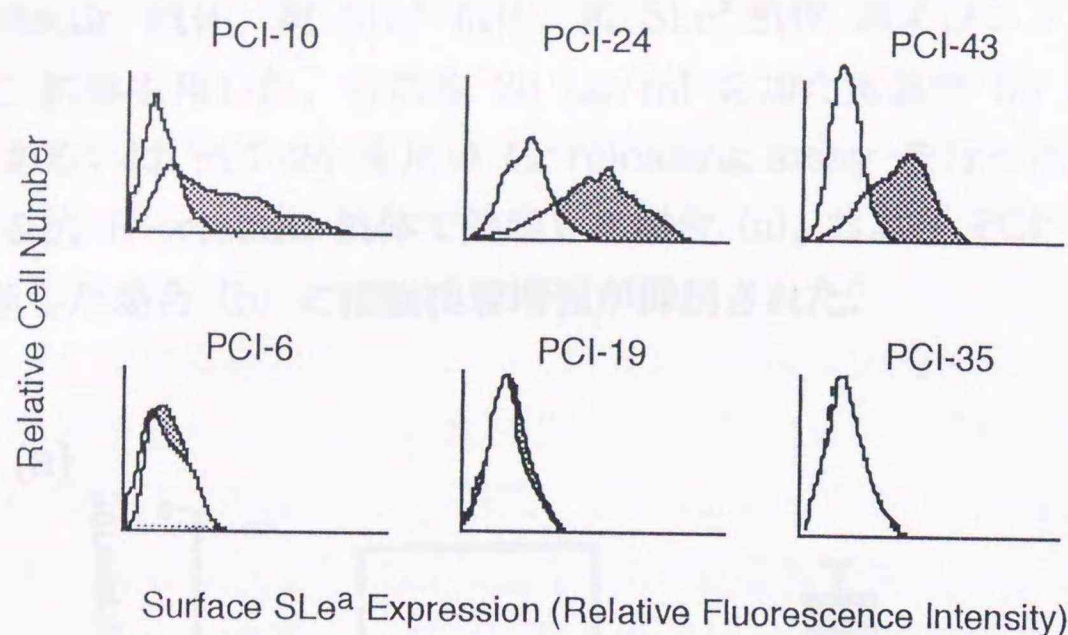


図2 PCI 株と HUVEC との細胞接着

96 穴のプレートに 単層培養した HUVEC に、⁵¹Cr でラベルした PCI 細胞 5×10^4 を各 well に加え、2 時間反応させた。反応終了後非接着細胞を除去するため、フィルターでシールした後にプレートを逆さにし、150 g、5 分間遠心した。接着細胞を NaOH (0.1 N) で溶解し、培養液中に遊離した ⁵¹Cr をガンマカウンターで測定した (Cr releasing assay)。

IL-1 β (25 U/ml) で 4 時間 HUVEC を処理した場合、SLe^a 陰性の PCI-6、19、35 では接着増強が見られなかったが、SLe^a 陽性の PCI-10、24、43 には接着増強が認められた。

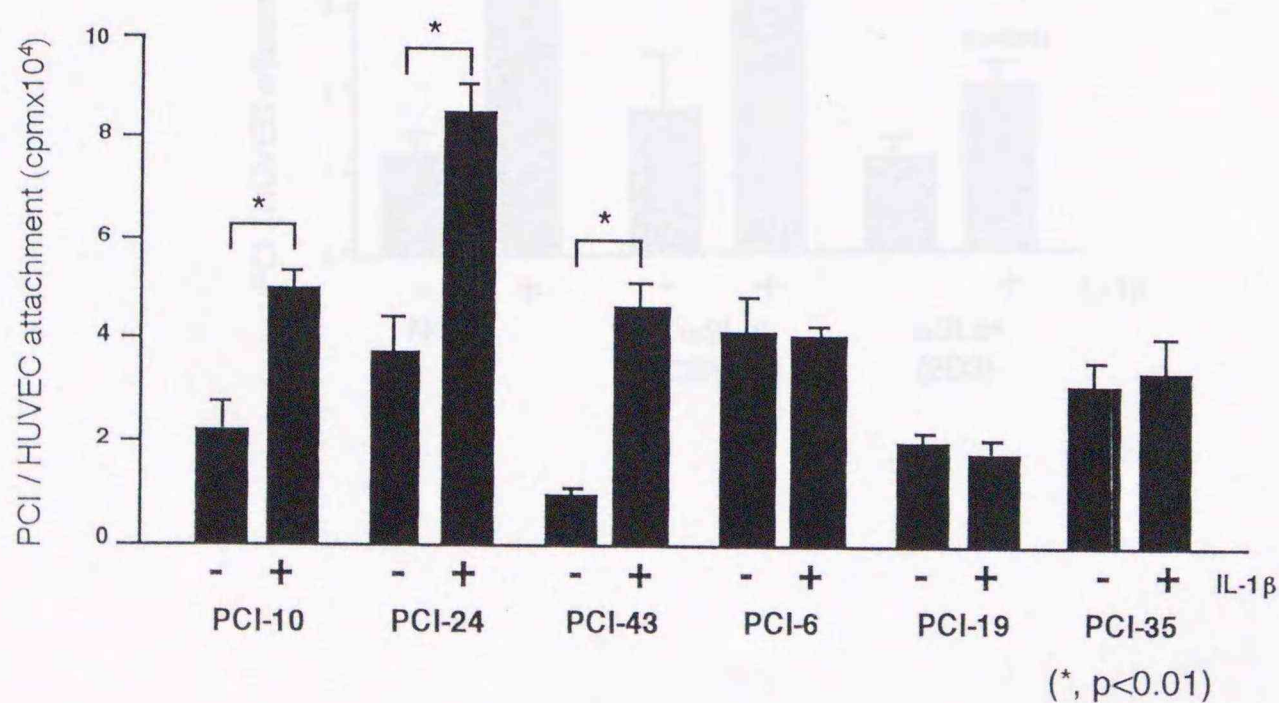
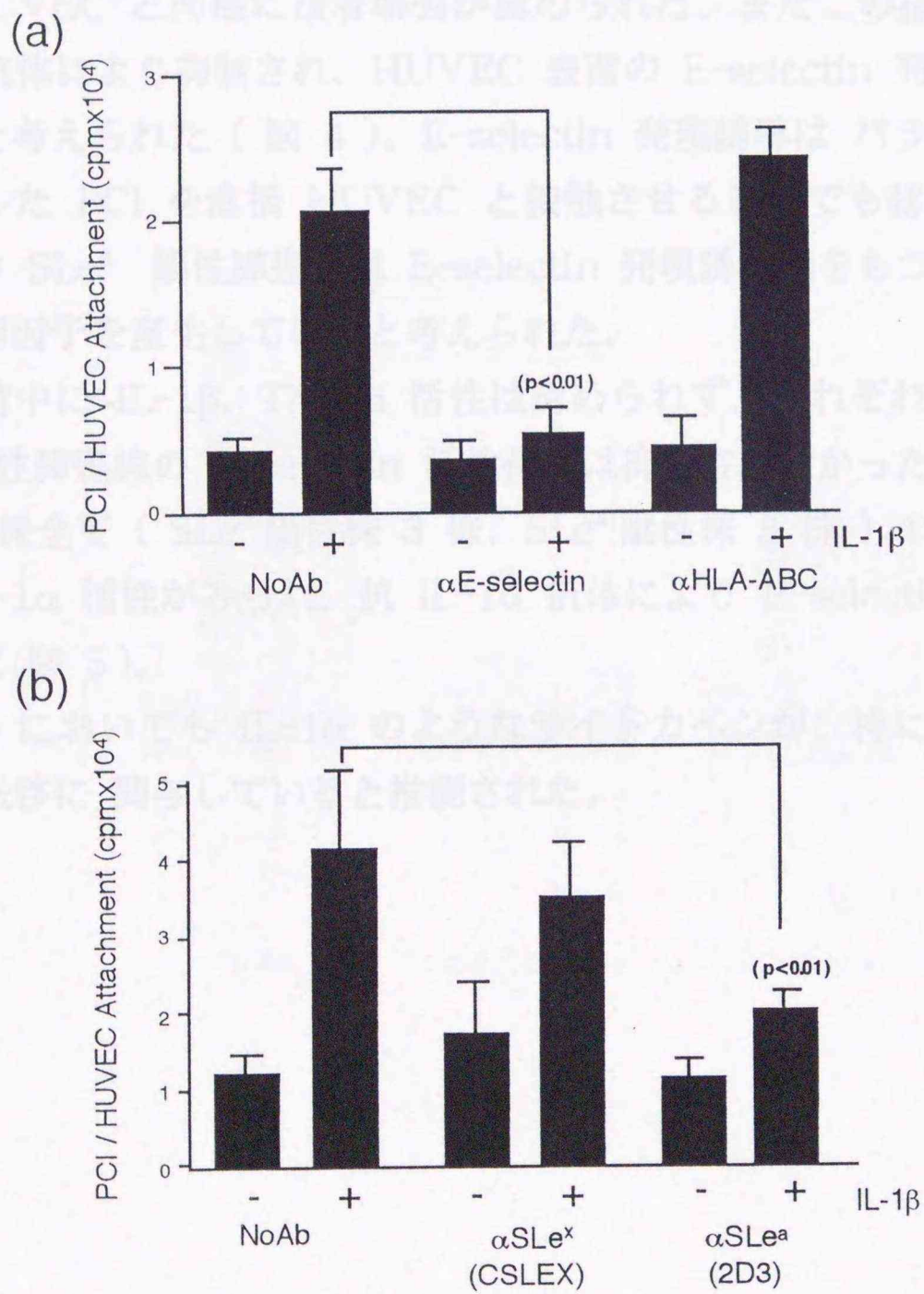


図3 単クローン抗体による接着抑制効果

抗 E-selectin 抗体、抗 SLe^a 抗体、抗 SLe^x 抗体 およびコントロールの抗 HLA-ABC 抗体を用いた。各抗体 20 µg/ml を加え室温で 30 分間反応した HUVEC あるいは PCI-24 を用い Cr releasing assay を行った。

HUVEC を抗 E-selectin 抗体で処理した場合 (a)、および PCI-24 を抗 SLe^a 抗体で処理した場合 (b) に細胞接着増強が抑制された。



II 膵癌と血管内皮細胞の相互作用における膵癌由来サイトカインの重要性³⁾

HUVEC を IL-1 β や TNF- α などで活性化することにより HUVEC 上に E-selectin が発現し、SLe^a 陽性膵癌株と HUVEC との細胞接着は増強する¹⁾。次に PCI による HUVEC 活性化の有無を検討した。HUVEC と PCI を共培養したのち SLe^a 陽性膵癌株と HUVEC の接着を測定したところ、IL-1 β で活性化した HUVEC と同様に接着増強が認められた。またこの接着増強は抗 E-selectin 抗体により抑制され、HUVEC 表面の E-selectin 発現誘導を介した接着増強と考えられた (図 4)。E-selectin 発現誘導は パラフォルムアルデヒド固定した PCI を直接 HUVEC と接触させることでも認められた。以上の結果より SLe^a 陽性膵癌株は E-selectin 発現誘導能をもつ可溶性因子および膜結合型因子を産生していると考えられた。

培養上清中に IL-1 β 、TNF- α 活性は認められず、それぞれに対する抗体でも SLe^a 陽性膵癌株の E-selectin 活性化能は抑制されなかった。しかし実験に用いた 6 株全て (SLe^a 陽性株 3 株、SLe^a 陰性株 3 株) の膵癌株の培養上清中に IL-1 α 活性がみられ、抗 IL-1 α 抗体により E-selectin 活性化能は抑制された (図 5)。

In vivo においても IL-1 α のようなサイトカインが、特に非炎症部への膵癌血行性転移に 関与していると推測された。

図4 膀胱癌細胞による内皮細胞活性化

HUVEC を単層培養したのち、IL-1 β (50 U/ml)、PCI 培養上清および少量の PCI 細胞 (5×10^3) を加え 4-6 時間反応させた。その後 ^{51}Cr でラベルした PCI 細胞 5×10^4 を加え室温にて 20 分間接着反応させ Cr releasing assay を行った。さらに抗 E-selectin 抗体、抗 ICAM-1 抗体 (HA58) の接着増強に及ぼす効果を検討した。

少量の PCI 細胞および PCI 培養上清で HUVEC を処理すると、HUVEC と PCI との接着増強がみられた。さらにこの接着増強は抗 E-selectin 抗体にて特異的に抑制された。

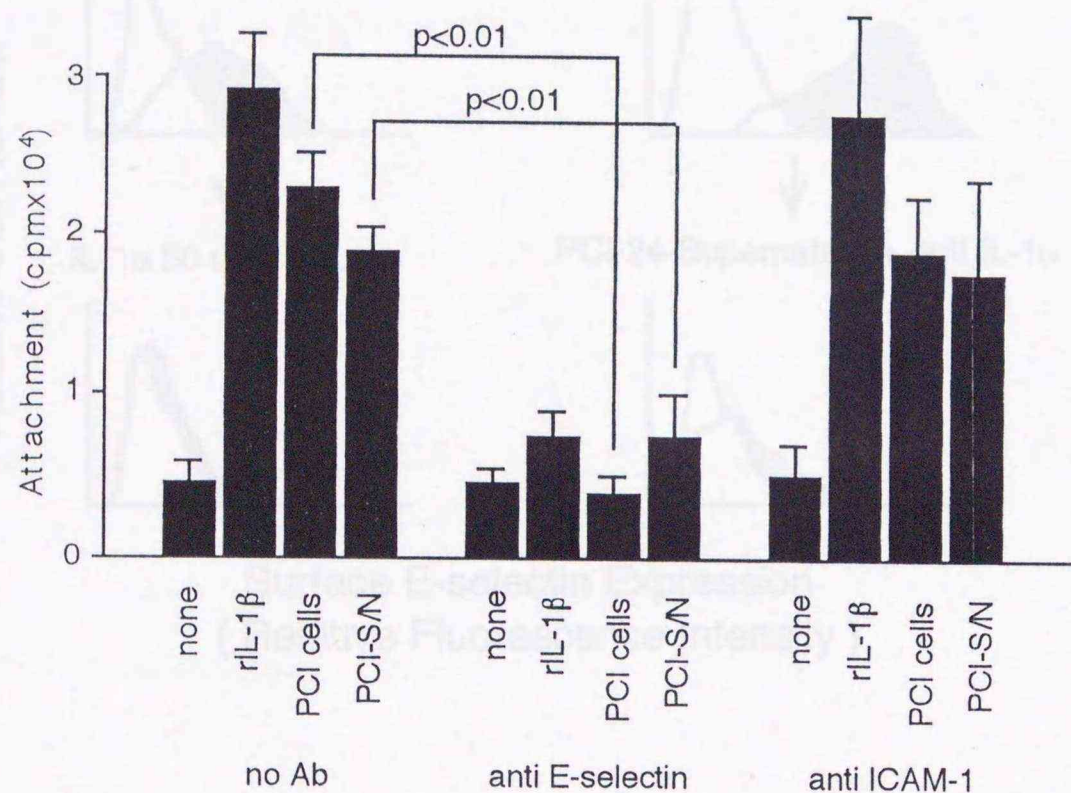
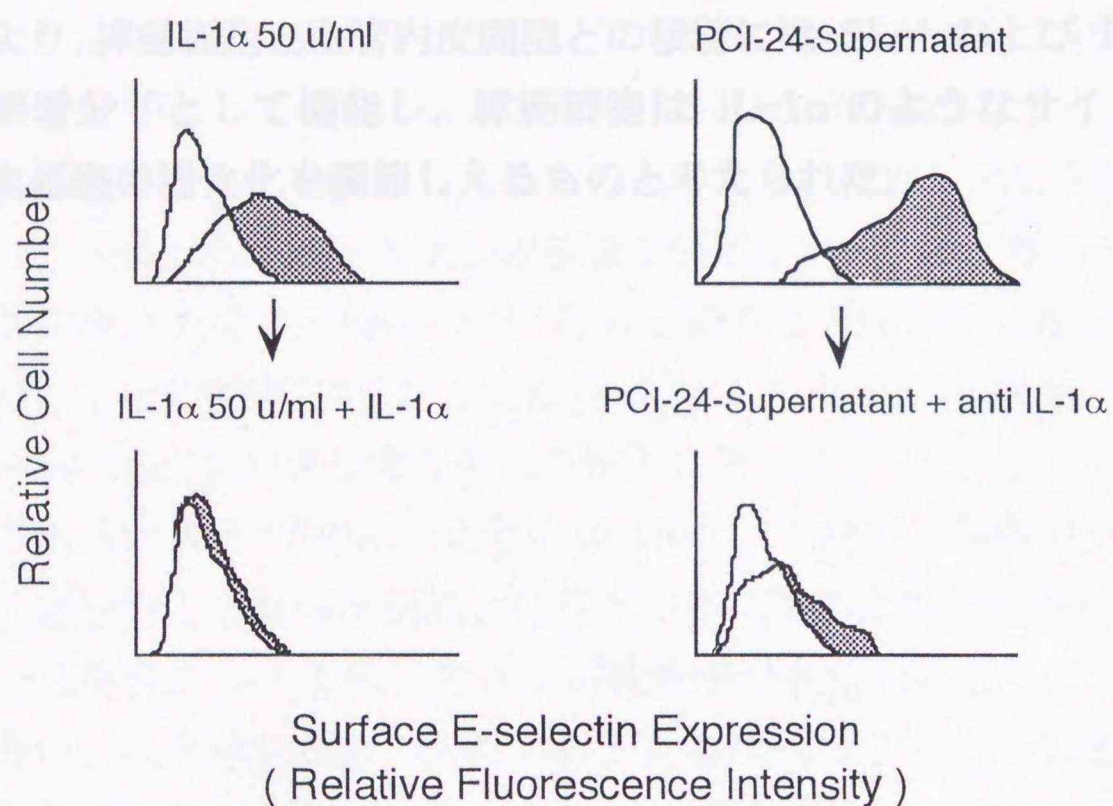


図5 抗 IL-1 α 抗体による活性阻害効果

特異抗体処理による PCI 培養上清中の HUVEC 上 E-selectin 誘導阻害効果を検討した。抗 IL-1 α 抗体 A38-3 (自治医科大学、笠原忠博士より供与) 500 neutral unit (Nu) / ml と PCI 培養上清とを 4 °C で 24 時間反応させた後、間接フローサイトメトリー法にて HUVEC 上の E-selectin 誘導能の変化をみた。

抗 IL-1 α 抗体 A38-3 により PCI 培養上清の E-selectin 発現誘導活性は著明に抑制された。



III まとめ

外科切除材料からヒト膵癌株 PCIs を樹立し、血管内皮細胞 (HUVEC) との相互作用を検討した。膵癌細胞株には、膜表面に SLe^a の発現がみられる株と発現がみられない株とが得られた。PCIs と HUVEC との接着を検討したところ、SLe^a 陽性株に限り、活性化された HUVEC に対し、接着の増強が認められた。この接着増強は抗 SLe^a 抗体あるいは抗 E-selectin 抗体により抑制された。また PCI から培養上清中に HUVEC を活性化し得る因子が放出され、この可溶性因子は IL-1 α であると考えられた。

以上より、膵癌細胞と血管内皮細胞との接着には SLe^a および E-selectin が重要な接着分子として機能し、膵癌細胞は IL-1 α のようなサイトカインを産生し内皮細胞の活性化を調節しうるものと考えられた。

本論

I はじめに

肝転移は膵癌患者の経過中にしばしば認められ、膵癌の予後を不良とする原因の一つと考えられる。我々は膵癌肝転移の分子生物学的機序を解明することを目的として、ヒト膵癌細胞株を外科手術材料から樹立し、膵癌肝転移における癌細胞と血管内皮細胞との相互作用に関して検討してきた²⁾³⁾。

癌細胞が標的臓器で転移巣を形成する過程において癌細胞と血管内皮細胞との接着が観察され、これは多段階よりなる癌の血行性転移成立における重要なプロセスのひとつであると考えられている。我々の樹立したヒト膵癌株を用い、*in vitro* において血管内皮細胞との接着を検討したところ、膵癌細胞上の SLe^a が血管内皮細胞上の E-selectin に対する重要な ligand であることが確認された²⁾。さらに膵癌細胞は *in vitro* において IL-1 α を産生し血管内皮細胞上に E-selectin を誘導し得ることを報告した³⁾。

これらの *in vitro* での結果より、*in vivo* においても膵癌細胞上の SLe^a の発現は、癌細胞と血管内皮細胞との相互作用に重要な役割をもち、膵癌血行性転移成立に影響を与える因子である可能性が考えられる。そこで まずヌードマウスを用いヒト膵癌細胞の肝転移モデルを作成したのち、9種類のヒト膵癌株の血行性肝転移能を評価した。さらに、膵癌細胞の 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、matrix metalloproteinase の産生など種々の形質と転移能の関係を検討し、*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た¹⁾。

II 材料と方法

1) ヒト膵癌細胞株

ヒト膵癌細胞株樹立は、北海道大学医学部第一病理学教室と第二外科教室との協同にて行った。膵癌患者の外科切除材料から無菌的に腫瘍部を一部切り出し、これを細片化したのち、collagenase (100mg/ml)、hyaluronidase (100 U/ml) および 20 % fetal bovine serum (FBS) を加えた RPMI 100 ml 中で 37 度、2 時間攪拌した。これを遠沈したのち 20 % FBS 添加 RPMI にて培養した。樹立後は 10 % FBS 添加 RPMI にて培養した。培養条件は 37 度、5 % CO₂ とした。

膵癌患者 66 例中 9 例よりヒト膵癌株 9 株 (PCI-6, 10, 19, 24, 35, 43, 55, 64 および 66) を樹立し得た⁴⁾²⁾⁵⁾。組織学的には中分化腺癌ないし低分化腺癌であった。すべての膵癌株 (1×10^7) はヌードマウスの皮下に異種移植可能で、組織学的には中ないし低分化腺癌の結節を形成する。

2) 表面抗原の検討

表面抗原として、Leukocyte-function-associated antigen (LFA)-1, LFA-2, 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, HLA-DQ, SLe^a および SLe^x の発現を FACSscan (Becton-Dickinson, Mountain View, CA) を用い間接フローサイトメトリーにて検討した。SM-27 (anti-VLA-4, Dr.T.Takeuchi, Saitama Medical College より供与), NS19-9 (anti-SLe^a), 2D3 (anti-SLe^a, Dr.R.Kannagi, Aichi Cancer Center より供与), HA58 (anti-ICAM-1⁶⁾, Dr.K. Imai, Sapporo Medical University より供与), anti-ICAM-2, anti-LFA-1, anti-LFA-3, anti-E-selectin, anti-VCAM-1, anti-NCAM, anti-VLA-6 (British Bio-Technology, London, UK), W6/32 (anti-HLA-ABC⁷⁾, 1984), HOK7 (anti-HLA-DR⁸⁾), SK10 (anti-HLA-DQ), anti-Mac-1 および anti-CEA (Becton-

Dickinson)を一次抗体として用いた。二次抗体として anti-Ig-FITC を用いた。Relative fluorescence intensity の平均値をそれぞれの表面抗原の発現強度とした。

3) *In vivo* 転移モデルの作成および肝転移能の評価

動物は BALB/c ノードマウス雄 6 週齢 (Clea Japan, Tokyo) を用いた。飼育は北海道大学医学部動物実験施設で実験動物飼育指針 (1988 年) に従い、specific-pathogen-free condition にて行った。Diethylether の吸入麻酔下、左側腹部より開腹し脾臓を腹腔外へ脱転した。PBS 100 μ l に懸濁した腭癌細胞 1×10^6 個を 27 G 針を用いて脾臓に接種した。圧迫止血後、脾臓を腹腔内へもどし 3-0 prolane 糸にて閉腹した。操作は全て可能な限り無菌的に行った。ノードマウスの natural killer (NK) 活性を抑制する目的で、抗アシアロ GM1 抗体 (Wako, Osaka, Japan) を PBS にて 1:20 に希釈し、腭癌細胞摂取の前日および 1、2、3、4 週後に尾静脈より投与した。ノードマウスを 6 週後に犠牲死させ肝臓および脾臓を摘出した。20 % ホルマリン固定後、3 等分し肝臓の H-E 染色標本を作成し、肝転移結節数を顕微鏡下で数えた。SLe^a の免疫染色には一次抗体として 2D3 あるいは NS19-9 を用い avidin-biotin 法にて染色した。

4) 抗 SLe^a 抗体投与による肝転移抑制効果の検討

抗 SLe^a 抗体として、*in vitro* にて PCI と血管内皮細胞との接着阻害効果が認められた、2D3 (IgM, monoclonal)⁹⁾ を用いた。2D3 と同じ IgM クラスのコントロール抗体として I-83 を用いた。I-83 は IFN- γ で処理した PCI-10 で BALB / c マウスを免疫することにより得られた IgM クラスの単クローン抗体である。I-83 が認識する抗原は同定し得ていないが、いくつかの腫瘍細胞株の発現パターンから SLe^a, SLe^x, ICAM-1 / 2, VCAM-1, HLA-ABC / DR / DQ, LFA-1 / 3, IFN- γ receptor とは異なる。また I-83 は *in vitro* で PCI と血管内皮細胞、PCI と NK cell、PCI と lymphokine activated killer (LAK) cell との接着に影響しない。間接フローサイトメトリーで 2D3 と I-83 は PCI-43 表面の発現はほぼ同程度である。2D3 (5 μ g /

100 μ l PBS)、I-83 (5 μ g / 100 μ l PBS) および PBS 100 μ l を、ヌードマウスに PCI-43 を接種後 -1, 1, 3, 5, 7, 14, 21 および 28 日目に腹腔内へ投与した。ヌードマウスは 2D3 投与群、I-83 投与群および PBS 投与群それぞれ 10 匹ずつ用いた。

5) 増殖能の検討

9 株の PCI 細胞をそれぞれ 5×10^3 / well となるように 96-well culture plate で triplicate に培養した。細胞数を 0, 1, 2 および 4 日目に Cell Counting Kits (Dojindo, Kumamoto, Japan) を用いて測定した。得られた増殖曲線より各細胞株の doubling time を計算した。

6) サイトカイン

9 株の PCI 細胞 1×10^5 個を RPMI 5 ml にて 7 日間培養し、それぞれの培養上清中の IL-1 α , TNF- α 濃度を ELISA kit (Amersham, Aylesbury, UK) にて測定した。

7) Matrix metalloproteinase 活性

FBS を含まない RPMI 5 ml にて PCI 9 株 1×10^5 個を 24 時間培養し、それぞれの培養上清を用い gelatin zymography¹⁰⁾を行った。

8) 統計学的解析

Student's t -test あるいは χ^2 test を用いた。

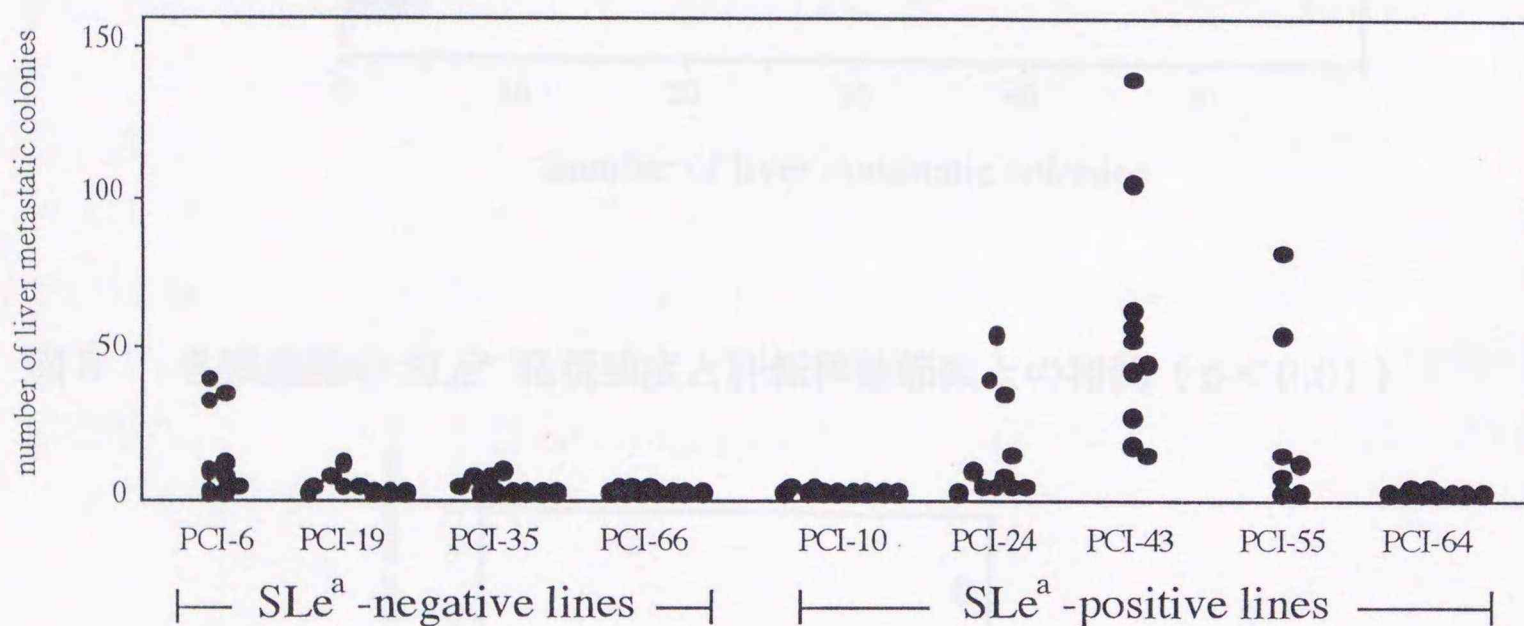
III 結果

1) PCI 9 株の肝転移能

9 株の PCI の肝転移能を抗アシアロ GM1 抗体を投与したヌードマウスを用いて検討した。抗アシアロ GM1 抗体投与により、脾臓に接種された PCI-24 は非投与時に比べて最大 6 倍の肝転移結節を形成した。

9 株の PCI (PCI-6, 10, 19, 24, 35, 43, 55, 64 および 66) の肝転移能はそれぞれ、 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 であった (図 6)。PCI-43, 55, 24 および 6 では高転移性が見られたが、PCI-10 および 66 ではほとんど転移は見られなかった。脾臓には腫瘍結節を形成する場合としない場合が見られたが、株間あるいは肝転移結節数との相関は見られなかった。

図 6 膵癌細胞株 PCI の肝転移能



2) 膵癌細胞上の SLe^a の発現と肝転移結節数との関係

SLe^a 陽性株 (PCI-10, 24, 43, 55 および 64) と SLe^a 陰性株 (PCI-6, 19, 35 および 66) との肝転移結節数を比較検討した (図 6)。SLe^a 陽性株群の肝転移結節数の平均は 21.0 ± 33.9 であったのに対し、SLe^a 陰性株群では 6.5

± 14.3 と有意に少なかった ($p < 0.01$) (図 7)。一方結節数を見れば、転移の有無を比較すると、SLe^a 陽性株群 (62.5 %, 30 / 46) と SLe^a 陰性株群 (67.9 %, 22 / 38) は差が見られなかった。

PCI-6, 10, 19, 24, 35, 43, 55, 64 および 66 の間接フローサイトメトリーによる SLe^a 発現強度はそれぞれ、34.88, 121.87, 20.33, 202.13, 20.95, 381.37, 329.93, 258.82 および 18.7 であった。SLe^a 発現強度と肝転移結節数とに有意な正の相関関係が認められた ($p < 0.01$) (図 8)。

図 7 SLe^a 陽性株群と陰性株群での肝転移結節数の比較

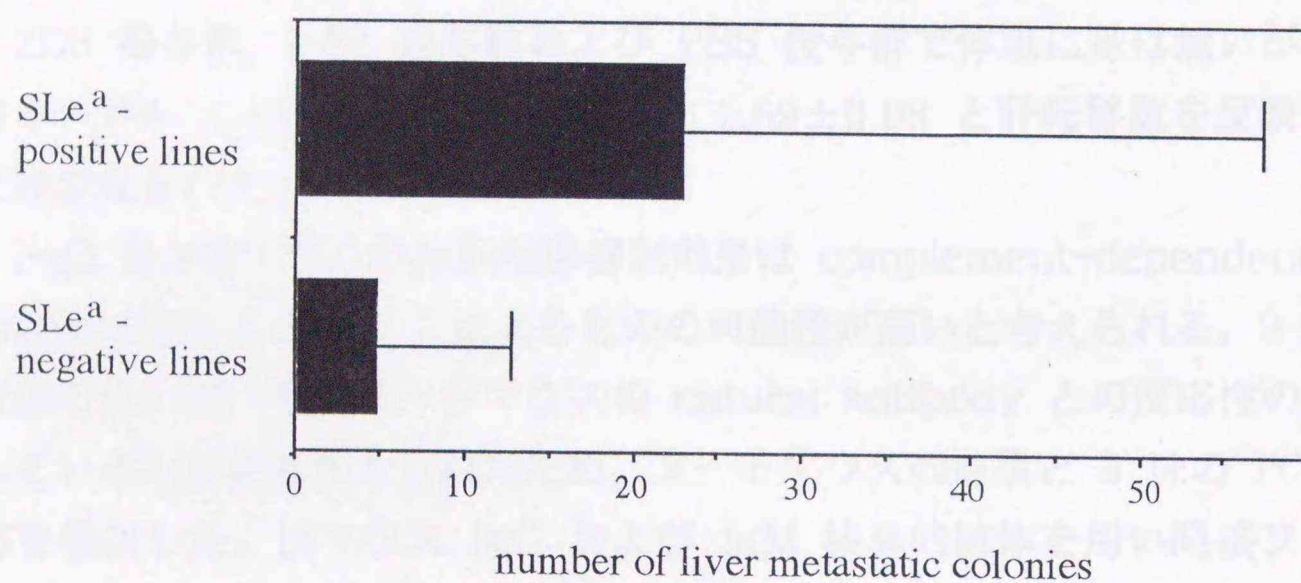
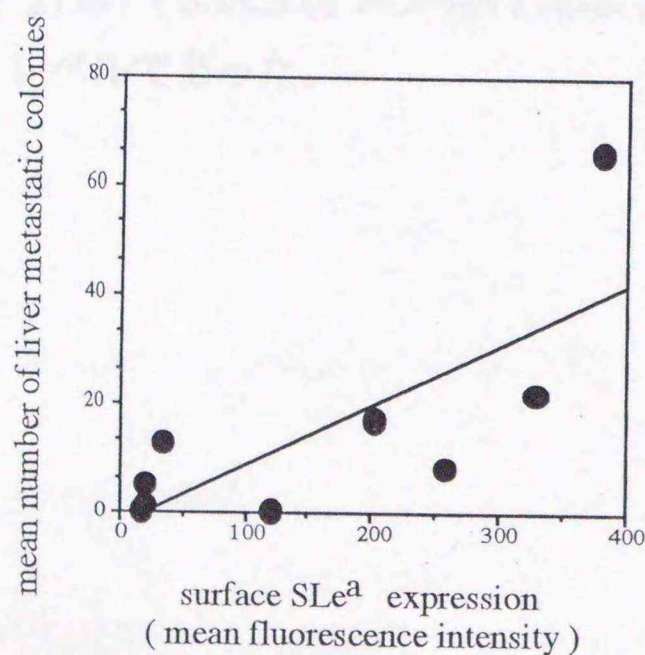


図 8 各腫瘍株の SLe^a 発現強度と肝転移結節数との相関 ($p < 0.01$)



3) 抗 SLe^a 抗体投与の膵癌肝転移への影響

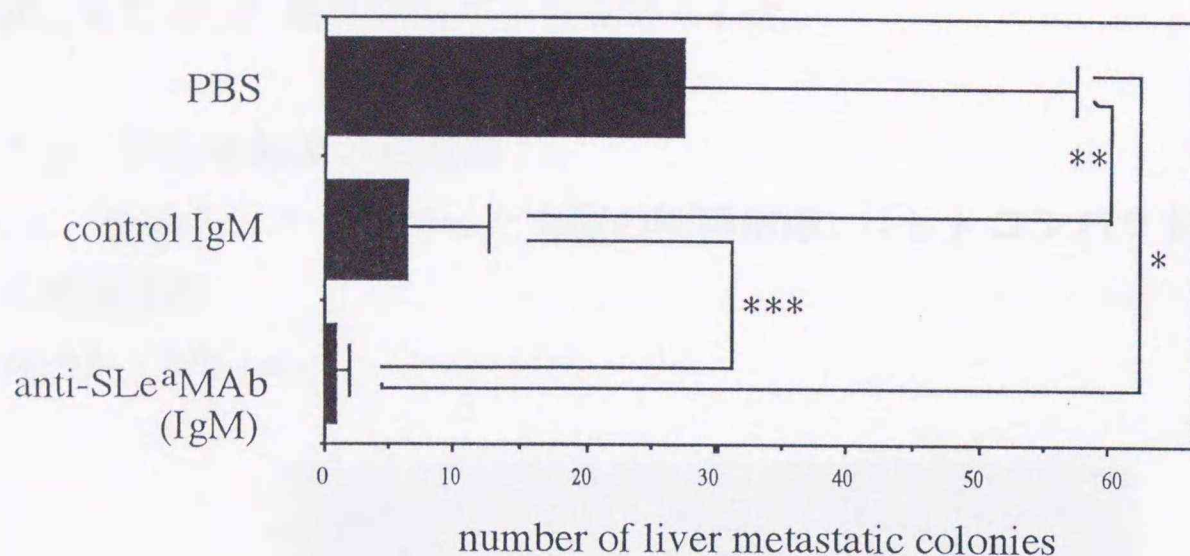
SLe^a 陽性株 と SLe^a 陰性株との間で形成された肝転移結節数に違いが見られたが、実際に膵癌細胞上の SLe^a 発現が関与するのかどうかを確かめるために、抗 SLe^a 抗体をマウスに投与することによる膵癌肝転移への影響を検討した。PBS を投与した群 (PBS 投与群) の 27.2 ± 30.4 に対し、抗 SLe^a 抗体 (2D3)、あるいはコントロール抗体 (I-83) の投与した群 (2D3 投与群、I-83 投与群) では PCI-43 の肝転移結節数は、それぞれ 0.8 ± 1.2 ($p < 0.01$) および 6.1 ± 6.5 ($p < 0.05$) と有意に減少していた。さらに 2D3 投与群では I-83 投与群よりも有為に減少していた ($p < 0.025$) (図 9)。

2D3 投与群、I-83 投与群および PBS 投与群で体重に差は無いが、肝重量はそれぞれ 1.56 ± 0.08 , 1.62 ± 0.11 , 1.69 ± 0.08 と肝転移数を反映するように差が見られた。

I-83 投与群で見られた肝転移抑制効果は complement-dependent cellular cytotoxicity (CDCC) によるものの可能性が高いと考えられる。9 株の肝転移能の違いが、単にヌードマウスの natural antibody との反応性の違いを表している可能性も考えられたため、ヌードマウスの血漿と 9 株の PCI との反応を検討した。抗マウス IgG および IgM 特異的抗体を用い間接フローサイトメトリーにて検討した結果、PCI と反応するヌードマウスの natural antibody は IgM であり、それぞれの PCI との反応性は株間で差がなく、肝転移能とも相関は見られなかった。PCI に対する natural antibody の発現強度は最大 21.1 で 2D3 (333.9 of PCI-43) および I-83 (445.2 of PCI-43) に比し無視できるレベルであった。

図9 SLe^a 陽性株 (PCI-43) の肝転移能に対する抗 SLe^a 抗体の抑制効果

*, $p < 0.01$; **, $p < 0.05$; ***, $p < 0.025$



4) その他の形質と肝転移能との関係

PCI-6, 10, 19, 24, 35, 43, 55 および 64 の doubling time はそれぞれ 5.3, 3.3, 4.4, 2.3, 3.7, 2.7, 2.2 および 5.6 であった。それぞれの doubling time と肝転移能とには有意な関係は見られなかった。

9 株すべてに IL-1 α の産生が見られたが、それぞれの産生量と肝転移能とには有意な関係は見られなかった。9 株すべて TNF- α の産生は見られなかった。

Gelatine zymography では 9 株のうち PCI-66 の培養上清中にのみ 72KDa の MMP-2 活性が見られたが、肝転移能とには有意な関係は見られなかった。

ICAM-1 の発現強度と肝転移能とに有意な負の相関関係が見られた ($p < 0.05$)。その他 VLA-4, VLA-6, LFA-1, LFA-3, CEA, E-selectin, VCAM-1, NCAM, Mac-1, HLA-ABC / DR / DQ および ICAM-2 の発現強度と肝転移能とには有意な関係は見られなかった。

5) 肝転移結節の組織学的検討

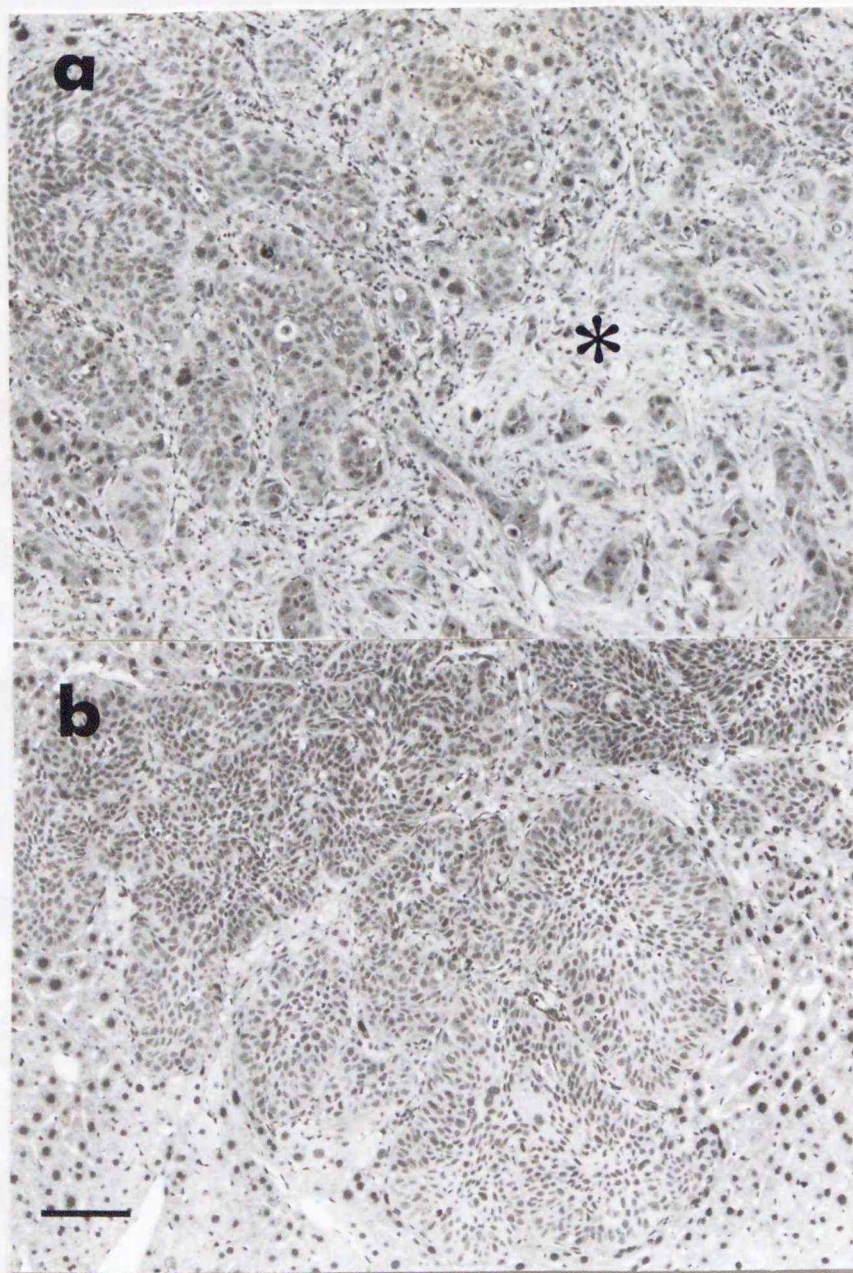
PBS 投与群の肝転移結節は最大径 3 mm と macroscopic なものも見られたのに対し、2D3 投与群、I-83 投与群では microscopic な結節しか見られ

なかった。組織型は 3 群とも低分化腺癌で増殖形態その他に差は見られなかった（図 10）。抗 2D3 抗体を用いた免疫染色では、2D3 投与群、I-83 投与群ともに SLe^a 陽性細胞が少数認められた。

図 10 肝転移結節の組織像

（a）線維化（*）を伴った大型の転移結節。（b）コンパクトに増殖する小型の癌細胞巣

scale bar, 100 μ m



IV 考察

ヌードマウスを用いた肝転移モデルで 9 株のヒト膀胱癌株の肝転移能を検討した。我々は膀胱癌細胞上の SLe^a 発現が血管内皮細胞との相互作用に重要であることを報告してきた²⁾³⁾。今回 5 株の SLe^a 陽性株と 4 株の SLe^a 陰性株の肝転移能を比較し、*in vivo* において SLe^a 発現と肝転移能との関係を明らかにした。さらに抗 SLe^a 抗体により肝転移結節が抑制された結果から、SLe^a 抗原が膀胱癌の肝転移能に直接的に関与していることを示した。

抗 SLe^a 抗体である 2D3 を *in vivo* で投与する場合、コントロール抗体が必要となり、1) 2D3 と同じ IgM クラスの単クローン抗体であること、2) その他の major な接着分子とは異なること、3) PCI と内皮細胞、PCI と NK 細胞、PCI と LAK との相互作用などに影響しないこと、4) PCI-43 における発現が 2D3 と同等であることなどの理由により I-83 を用いた。

I-83 投与群でも PBS 投与群と比較すると、肝転移結節数は減少していた ($p < 0.05$)。この理由として、CDCC による影響などが考えられる。そして間接フローサイトメトリーでは PCI-43 上の 2D3 の発現は I-83 のそれとほぼ同様であることより、2D3 投与群においても I-83 と同程度の CDCC による肝転移抑制があると考えられる。しかし本研究では 2D3 投与群は I-83 投与群に比べさらに転移抑制効果が強く ($p < 0.025$)、抗 SLe^a 抗体の CDCC などによる影響以上の転移抑制能が認められた。一方ヌードマウス血漿中の IgM クラスの自然抗体を介する CDCC 活性が PCI 株間の転移能に影響している可能性もあるが、間接フローサイトメトリーによる検討

では、自然抗体が認識する表面抗原の発現の違いは PCI 株間で見られず、肝転移能との関係は認められなかった。

抗 SLe^a 抗体投与による主要な肝転移能抑制効果は膀胱癌細胞上の SLe^a と血管内皮細胞上の E-selectin との相互作用を抗体がブロックすることによるものと考えられる。癌巣およびその周囲の血管内皮細胞には E-selectin の発現が見られ¹¹⁾、マウスの E-selectin はヒトの sialylated sugar antigen と反応する¹²⁾。血管内皮細胞の活性化は E-selectin と SLe^a との相互作用には必須であり、その機序としては、PCI が産生する血管内皮活性化作用をもつ IL-1 α などのサイトカインによる効果、あるいは、補体や血液凝固系を介する作

用などが考えられる。使用した PCI 株はすべて IL-1 α を産生してるが、今回の系では *in vitro* での産生能と転移能とに明かな関係は見られなかった。恐らく syngeneic な転移系ではより大きな影響を及ぼす因子になると思われる。

近年、血管新生は腫瘍の増殖、転移に重要であると考えられており¹³⁾、血管内皮上における SLe^a / SLe^x と E-selectin との相互作用が血管新生へ関与すること¹⁴⁾¹⁵⁾、*in vitro* のウシの実験系では 抗 SLe^a 抗体による毛細血管形成の抑制など¹⁴⁾、SLe^a が血管新生に関与するという報告が出ている。マウス血管内皮細胞上の発現は免疫組織化学的には証明しえなかったものの、今回用いた抗 SLe^a 抗体も癌細胞の接着阻害効果に加え、血管新生阻害にも働いていたのかもしれない。

PCI-10 と PCI-64 は SLe^a 陽性だが低い肝転移能を、また PCI-6 は SLe^a 陰性だが高い肝転移能を呈した。Integrin superfamily、immunoglobulin superfamily、CD44 とその splicing variants、matrix metalloproteinase の産生、angiogenic factors など¹⁶⁾¹⁷⁾¹⁸⁾、多段階の癌転移における重要な因子が報告されている。今回、PCI-10、PCI-64 および PCI-6 の転移能を説明しえるような SLe^a 以外の因子がないか、幾つかの因子と肝転移能の関係も検討した。しかし、VLA-4、VLA-6、LFA-1、Mac-1、VCAM-1、ICAM-2、*in vitro* の増殖能、MMP-2 活性、IL-1 α 産生性、TNF- α 産生性などと肝転移能とは有意な関係が見いだせなかった。種特異的な接着分子は今回の *in vivo* モデルでは機能していないと考えられる。ヒト ICAM-1 とマウス LFA-1 は接着しないという報告がある¹⁹⁾。ICAM-1 の発現と肝転移能に逆相関が見られたが、その解釈は難しく、恐らく、何か重要な因子が ICAM-1 の発現と逆相関していたのかもしれない。

V まとめ

- 1) ノードマウスを用い膵癌肝血行性転移モデルを作成し、ヒト膵癌細胞株 9 株の肝転移能を検討した。
- 2) 5 株の SLe^a 陽性株群と 4 株の SLe^a 陰性株群の肝転移能を比較しすると、SLe^a 陽性株群が有意に高転移性を示した。
- 3) 抗 SLe^a 単クローン抗体の静脈内投与により SLe^a 陽性株の肝転移結節数は有意に抑制された。
- 4) 以上の結果より、膵癌細胞上の SLe^a 発現は膵癌の血行性転移に影響する因子の一つであると考えられた。

- 3) Kaji M., Ishiguro H., Ishiguro T., Ochi M., Ohno A., Kimura C., Takahashi T., Kato H. and Yoshiki T. SLe^a expression induced by pancreas carcinoma cell line results in enhanced adhesion of pancreatic carcinoma cells to endothelial cells. *Int. J. Cancer*, 60, 711-714 (1995).
- 4) Takahashi T., Ishiguro M., Iwai K., Takahashi C., Kato H., Tanabe T. and Yoshiki T. Cytokine regulation of cell-cell interaction in LAK cell cytotoxicity *in vitro*. *Cancer Immunol. Immunother.*, 35, 76-82 (1986).
- 5) Saitoh H., Ishiguro H., Ochi M., Kaji M., Iwai K., Takahashi T., Takahashi T., Kimura C., Kato H. and Yoshiki T. SLe^a expression activation after cytotoxicity against pancreas adenocarcinoma cell lines and vascular endothelial cells. *Anticancer Res.*, 14, 2283-2286 (1994).
- 6) Takahashi M., Iwai K., Hirota M., Haragawa Y., Matsuya I., Akahara T., Sugiyama T., Matsui M., Hirohata Y. and Yoshiki T. Detection of circulating intercellular adhesion molecule-1 antigen in malignant diseases. *Clin. exp. Immunol.*, 76, 3-8 (1989).
- 7) Pridgen C.E., DeLong W.F., Brown G., Gallo G., Merson D., Williams A.S. and Ziegler A. Production of monoclonal

参考文献

- 1) Kishimoto, T., Ishikura, H., Kimura, C., Takahashi, T., Kato, H. and Yoshiki T. Phenotypes correlating to metastatic properties of pancreas adenocarcinoma *in vivo* : The importance of surface Sialyl Lewis a antigen. *Int. J. Cancer* , 69, 290-294 (1996).
- 2) Iwai, K., Ishikura, H., Kaji, M., Sugiura, H., Ishizu, A., Takahashi, C., Kato, H., Tanabe, T. and Yoshiki, T. Importance of E-selectin (ELAM-1) and sialyl Lewis a in the adhesion of pancreas carcinoma cells to activated endothelium. *Int. J. Cancer*, 54, 972-977 (1993).
- 3) Kaji, M., Ishikura, H., Kishimoto, T., Omi, M., Ishizu, A., Kimura, C., Takahashi, T., Kato, H. and Yoshiki, T. E-selectin expression induced by pancreas-carcinoma-derived interleukin-1 α results in enhanced adhesion of pancreas-carcinoma cells to endothelial cells. *Int. J. Cancer*, 60, 712-717 (1995).
- 4) Takahashi, T., Ishikura, H., Iwai, K., Takahashi, C., Kato, H., Tanabe, T. and Yoshiki, T. Cytokine regulation of cell-to-cell interaction in LAK cell cytotoxicity in vitro. *Cancer Immunol. Immunother.*, 36, 76-82 (1993).
- 5) Sugiura, H., Ishikura, H., Omi, M., Kaji, M., Iwai, K., Kishimoto, T., Takahashi, T., Kimura, C., Kato, H. and Yoshiki, T. Lymphokine-activated killer cytotoxicity against pancreas-adenocarcinoma cell lines and vascular endothelial cells. *Pathol. Int.*, 44, 688-696 (1994).
- 6) Tsujisaki, M., Imai, K., Hirata, H., Hanzawa, Y., Masuya, J., Nakano, T., Sugiyama, T., Matsui, M., Hinoda, Y. and Yachi, A. Detection of circulating intercellular-adhesion-molecule-1 antigen in malignant diseases. *Clin. exp. Immunol.*, 85, 3-8 (1991).
- 7) Barnstable, C.J., Bodmer, W.F., Brown, G., Galfre, G., Milstein, C., Williams, A.F. and Ziegler, A. Production of monoclonal

- antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human antigens. New tools for genetic analysis. *Cell*, 14, 9-18 (1978).
- 8) Kasahara, M. and 13 others. Inhibition of autologous mixed lymphocyte reaction by monoclonal antibodies specific for the beta chain of HLA-DR antigens. *Immunology*, 53, 79-86 (1984).
 - 9) Takada, A., Ohmori, K., Takahashi, N., Tsuyuoka, K., Yago, A., Zenita, K., Hasegawa, A. and Kannagi, R. Adhesion of human colon-cancer cells to vascular endothelium mediated by a carbohydrate antigen, sialyl Lewis a. *Biochem. biophys. Res. comm.*, 179, 713-719 (1991).
 - 10) Heussen, C. and Dowdel, E.B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal. Biochem.*, 102, 196-202 (1980).
 - 11) Ye, C., Kiriya, K., Mitsuoka, C., Kannagi, R., Ito, K., Watanabe, T., Kondo, K., Akiyama, S. and Takagi, H. Expression of E-selection on endothelial cells of small veins in human colorectal cancer. *Int. J. Cancer*, 61, 455-460 (1995).
 - 12) Taniuchi, Y., Tsuji, T. and Irimura, T. Adhesion of human colon carcinoma cells to mouse hepatic sinusoidal endothelial cells. (Abstract, in Japanese). *Proc. Jap. Soc. Immunol.*, 22, 638 (1992).
 - 13) Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other diseases. *Nature Med.*, 1, 27-31 (1995).
 - 14) Nguyen, M., Strubel, N.A. and Bischoff, J. A role for sialyl Lewis-X/A glycoconjugates in capillary morphogenesis. *Nature (Lond.)*, 365, 267-269 (1993).
 - 15) Koch, A.E., Halloran, M.M., Haskell, C.J., Shah, M.R and Polverini, P.J. Angiogenesis mediated by soluble forms of E-selectin and vascular cell adhesion molecule-1. *Nature (Lond.)*, 376, 517-519 (1995).
 - 16) Fujita, S., Suzuki, H., Kinoshita, M. and Hirohashi, S. Inhibition of cell attachment, invasion and metastasis of human carcinoma cells

- by anti-integrin $\beta 1$ subunit antibody. *Jap. J. Cancer Res.*, 83, 1317-1326 (1992).
- 17) Weinder, N., Semple, J.P., Welch, W.R. and Folkman, J. Tumor angiogenesis and metastasis - correlation in invasive breast carcinoma. *New Engl. J. Med.*, 324, 1-8 (1991).
- 18) Seiter, S., Arch, R., Reber, S., Komitowski, D., Homann, M., Ponta, H., Herrlich, P., Matzku, S. and Zoller, M. Prevention of tumor metastasis formation by anti-variant CD44. *J. Exp. Med.*, 177, 443-455 (1993).
- 19) Galili, U., Galili, N., Vanky, F. and Klein, E. Natural species-restricted attachment of human and murine T lymphocytes to various cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Wash.)*, 75, 2396-2400 (1978).

謝辞

稿をおえるにあたり、本研究の機会を与えて下さり、日頃より親身な御指導を賜りました北海道大学医学部病理学第一講座 吉木 敬教授に深く感謝いたします。直接の御指導、常に適切な御助言をしていただきました 石倉 浩助教授に心から感謝いたします。

また、実験に際し、多くのご助力をいただいた病理学第一講座の皆様にも心から感謝いたします。

鉛筆

鉛筆

鉛筆

鉛筆

鉛筆

鉛筆

鉛筆



