日消外会誌　29（4）：868～872，1996年

特集3

膵癌肝転移におけるELAM-1接着とサイトカインの関与および糖鎖合成阻害剤による転移抑制

大阪市立大学医学部第1外科
澤田　鉄二　鄭　容錫　山田　靖哉　高塚　聡
櫻井　康弘　有本　裕一　八代　正和　西村　重彦
池田　光慶　曽和　融生

膵癌細胞を用い，肝転移における糖鎖抗原発現，ELAM-1接着との関連，サイトカインの関与ならびに糖鎖合成阻害剤（BZN）による転移抑制の可能性を検討した．

SW1990は約90％と高率に肝転移をきたし，sialyl-Le^a，Le^{x}発現およびヒト臍帯血管内皮細胞（HUVECs）ならびにELAM-1への接着性と相関した．末梢血単核球とSW1990との混合培養にて，サイトカイン（TNF-α，IL-1β）の上澄み中への強い産生がみられ，同上澄みにてHUVECs上にELAM-1の発現が誘導された．

SW1990のBZN処理にて，糖鎖抗原発現およびELAM-1接着，さらにヌードマウス脾内注射による肝転移は有意に抑制され，BZNの新しい転移抑制法としての応用の可能性が示唆された．

Key words: ELAM-1, cytokine, glycosylation inhibitor

はじめに

近年，消化器癌の浸潤，転移機序は，さまざまな角度よりの解析がなされ，その詳細が明らかとなりつつある．複雑な転移過程にかかわる種々の接着因子とその機能の重要性が注目されているが，癌細胞上の糖鎖抗原であるシアリルルイス-X（sLe^x）やシアリルルイス-A（sLe^a）も血管内皮細胞上の接着分子であるEndothelial Leukocyte Adhesion Molecule-1（ELAM-1）のligandとして血行性転移に大きく関与している[1]．

膵癌は消化器癌のなかでも予後不良であり，高度の局所浸潤のほかに肝転移も予後を左右する因子であると考えられており，今回膵癌細胞を用い糖鎖抗原発現とELAM-1接着，肝転移との関連，ELAM-1発現誘導および転移形成における末梢血単核球の関与ならびに糖鎖合成阻害剤による転移抑制の可能性について検討を行った．

＊第46回日消外会総会シンポ1・消化器癌転移の機序と対策
＜1995年11月15日受理＞
別刷請求先：澤田　鉄二
〒545　大阪市阿倍野区旭町1－5－7　大阪市立大学医学部第1外科

材料および方法

1．細胞培養法および糖鎖抗原発現検討

実験に用いた細胞は，ヒト膵癌細胞株；SW1990，CAPAN-2（高/中分化型腺癌）およびPANC-1（低分化型腺癌）で10％FCS加DMEMにて5％CO_2条件下にて培養を行った．各細胞表面上糖鎖抗原の発現は，細胞を96 well microplate上に0.25％グルタルアルデハイドにて固相化し，sLe^a，sLe^{x}の発現をELISA法にて検討した．

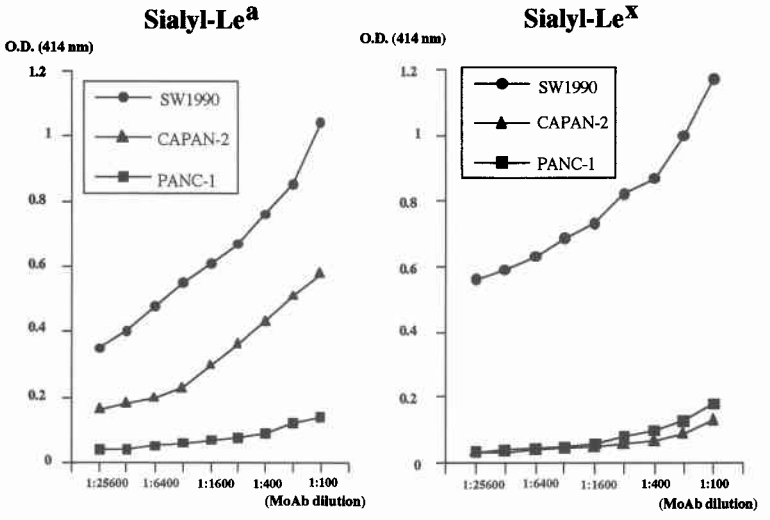
2．in vivo肝転移能の検討

6週齢BALB/cヌードマウス脾臓内に各細胞の7.0×10^5cells/0.1mlを注射後，摘脾を行い，5週後に肝における転移結節数を測定，liver colonization assayにて検討した．

3．Adhesion assay法

ヒト臍帯血管内皮細胞（HUVECs）を96 well microplate上に培養し，無処理および1ng/ml recombinant TNF-αで3時間刺激したHUVECsに各細胞5×10^4 cells/wellを室温，30分間接着させ，非接着細胞を洗浄除去後，接着細胞数を3-(4,5-dimethylthiazol)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide（MTT）を用いて定量した．また同様にrecombinant ELAM-1およびコント

Fig. 1 Cell surface carbohydrate antigen expression in pancreatic cancer cells by ELISA.



ロールとしてCD-7を固相化したプレートへの各細胞の接着能も検討した.

4. 癌細胞—末梢血単核球混合培養時におけるサイトカイン産生とELAM-1発現誘導の検討

健常人末梢血よりFicol遠心分離法にて単核球を分離培養し，SW1990細胞と10：1の割合で混合培養した際の培養上澄み中へのTNF-α, IL-1βの経時的産生をELISA kit（R & D Systems, Inc. USA）を用い測定した．またこの培養上澄みでHUVECsを3時間刺激した際のELAM-1発現誘導を抗ELAM-1モノクローナル抗体を用いELISA法にて検討した.

5. 糖鎖合成阻害剤による糖鎖発現，接着および転移能への影響の検討

O結合型糖鎖合成阻害剤；Benzyl-α-N-acetylgalactosamine[2]（BZN）（Sigma Chemical Co.）を2mM培養液中に添加し，48時間SW1990細胞を処理した後のsLe^{a}およびsLe^{x}発現，ELAM-1接着能およびヌードマウス肝転移能におよぼす影響を検討した.

なお成績はMean±SDで表し，統計学的処理はStudent t検定を用い，危険率5％未満を有意差ありとした.

結　果

ヒト膵癌細胞株の糖鎖抗原発現をELISA法にて検討した結果，SW1990ではsLe^a, sLe^{x}両者の強い発現を認めたのに対し，CAPAN-2でsLe^{a}の若干の発現を認めるのみで，PANC-1ではいずれの発現も認めなかった(**Fig. 1**)．各細胞のヌードマウス脾内注射によるin vivo肝転移能の検討では，SW1990に90％と高率に転移がみられたが，CAPAN-2およびPANC-1では転移は認められなかった（**Table 1**）．接着能の検討では，無処理のHUVECsへはいずれの細胞も接着を示さないのに対し，TNF-αで活性化したHUVECsへはSW1990が強い接着能を示し，他の細胞では極弱い接着を認めるのみであった(**Fig. 2**)．またELAM-1への接着能は，HUVECs同様SW1990で強く，CAPAN-2およびPANC-1ではコントロールのCD-7と同程度でありELAM-1接着能はほとんど認められなかった(**Fig. 3**).

Table 1 Metastatic abilities of pancreatic cancer cell lines

Cell line	Number of metastasis bearing mice
SW1990	9/10(90%)
Capan-2	0/6 (0%)
PANC-1	0/7 (0%)

Macroscopic liver colonization 5 week after splenic injection

つぎにSW1990と単核球を混合培養した際のサイトカイン産生を検討した結果，TNF-αおよびIL-1βの培養上澄み中への産生は培養開始後約2～4時間より急激に上昇し，TNF-αでは1,200pg/ml，IL-1βで400 pg/mlに達し，その後約72時間持続した(**Fig. 4**)．ま

Fig. 2 Adhesion assay of pancreatic cancer cells to HUVECs.

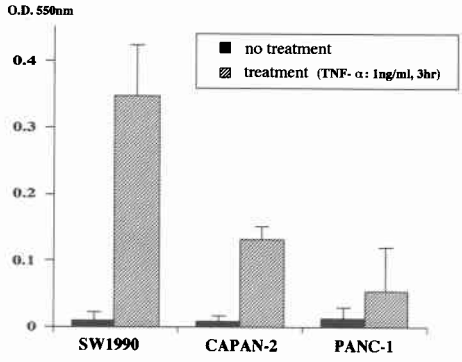
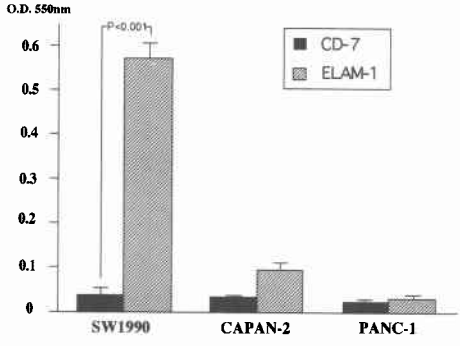


Fig. 3 ELAM-1 binding assay of pancreatic cancer cells.



たHUVECsへのELAM-1発現誘導を検討した結果，単核球あるいはSW1990各単独培養上澄みでは発現誘導はみられなかったが，上記混合培養上澄みでHUVECsを3時間刺激したところ細胞上へのELAM-1発現誘導がELISA法にて認められた（**Fig. 5**）.

最後に糖鎖合成阻害剤；BZN処理によるSW1990の糖鎖発現，ELAM-1接着能および肝転移能への影響を検討した結果，SW1990の強い糖鎖抗原発現およびELAM-1接着性は，無処理に対しBZN処理にて有意に抑制され(**Fig. 6**)，さらにヌードマウス肝転移能も肝重量には差はないものの，転移結節数において明らかな抑制が認められた（**Table 2**）.

考　察

癌の血行性転移は非常に複雑な過程を経て形成されることが明らかとなりつつあるが，原発巣より遊離し，血管内に侵入した癌細胞は，遠隔臓器における血管内皮細胞と接着，さらに血管外へ浸潤，増殖する．大腸

Fig. 4 Time course production of cytokines in the media by co-culture of SW1990 cells with MNL (Mononuclear leukocytes)

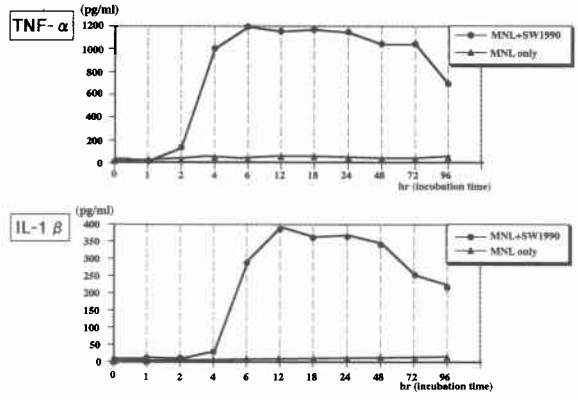


Fig. 5 ELAM-1 expression by ELISA on HUVECs induced by 3hr incubation with supernatant.

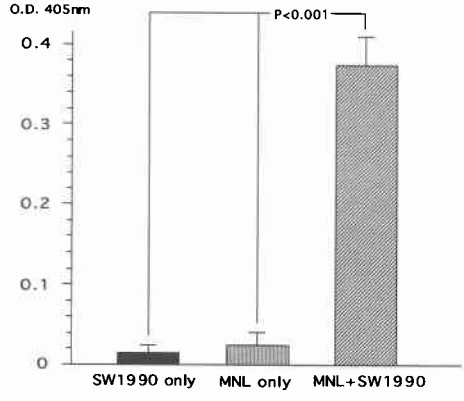
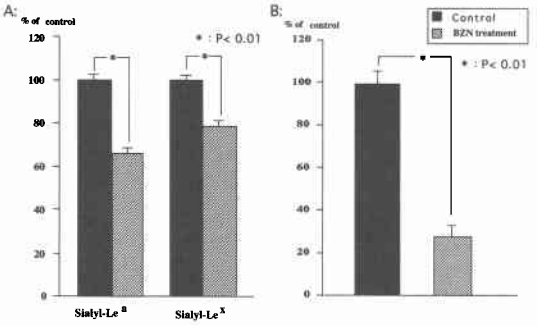


Table 2 Inhibition of in vivo liver metastasis by BZN treatment of SW1990 cells

	Nude mouse	B.W. of mouse	B.W. of liver	Number of metastatic nodule
Control (n=4)	No. 1	25.5(g)	1.56(g)	11
	No. 2	21.0	1.28	9
	No. 3	22.0	1.27	7
	No. 4	17.7	1.39	15
BZN treatment (n=4)	No. 1	21.1	1.17	0
	No. 2	21.0	1.30	0
	No. 3	20.5	1.19	0
	No. 4	20.0	1.20	0

SW1990 cells were treated by BZN (2mM, 48hr) before splenic injection.
All nude mice were sacrificed 5 weeks after injection.

Fig. 6 inhibition of carbohydrate antigen expression (A) and ELAM-1 binding (B) by glycosylation inhibitor (BZN) treatment in SW1990 cells.



癌において血管内皮細胞上のELAM-1が，癌細胞上のsLe^{a}やsLe^{x}をリガンドとした癌細胞—血管内皮細胞接着に関与し，肝転移に重要な役割を果たしていると報告されている[3]．

今回ヒト膵癌細胞株を用いた検討から，ヌードマウス脾臓内注射による肝転移能において高率に肝転移をきたすSW1990細胞は，細胞表面上sLe^a，sLe^{x}両者の強い発現を示し，またHUVECsおよびELAM-1に強い接着性を示すことが明らかとなり，膵癌においても糖鎖発現，ELAM-1接着を介した血管内皮接着と肝転移との強い相関が認められた．またこれまでの検討からSW1990のELAM-1接着は，特に抗sLe^{a}モノクローナル抗体にて著明に抑制されることが明らかとなっており[4]，膵癌においては，細胞上のとくにsLe^{a}発現がELAM-1を介した血管内皮接着さらに肝転移能に関与していると考えられる．

炎症部位における白血球と血管内皮細胞間の接着機構には，種々のサイトカイン刺激による内皮上ELAM-1，VCAM-1，ICAM-1，GMP-140などの接着分子発現が関与していることが明らかとなっている．しかし癌細胞—血管内皮細胞間の接着における接着分子発現誘導については，癌細胞自体より産生されるサイトカインが関与しているとの報告もみられるが[5]，その詳細はいまだ明らかでない．今回，末梢血単核球を分離し高肝転移性膵癌細胞SW1990と混合培養し，培養上澄み中へのサイトカインの産生を測定した結果，TNF-α，IL-1β産生は共に培養開始後2～4時間より上昇し約72時間持続した．またこの培養上清で3時間HUVECsを刺激したところ，細胞上にELAM-1の強い発現誘導が確認され，癌細胞が血管内へ侵入し転移臓器へ到達した際の単核球との相互作用により短時間で産生されるサイトカインも血管内皮細胞上ELAM-1発現誘導さらには転移形成機構に大きく関与していると考えられた．

癌の転移機序の解明が進むとともに様々な転移抑制の試みがなされつつある．今回，糖鎖合成阻害剤(BZN)を用い，膵癌の実験的転移抑制を試みた結果，高肝転移性SW1990をBZNで前処理したところsLe^a，sLe^{x}発現は低下し，またELAM-1接着も著明に抑制され，さらにヌードマウス脾内注射による肝転移モデルにおいても明らかな転移の抑制が認められた．かかる転移抑制は，ELAM-1接着の低下が主たる機序であると考えられるが，一方で癌細胞上のムチン，糖鎖抗原が高発現するとリンパ球との接着が阻害され，免疫機構からの回避につながるとの報告もあり[6]，これらの関与も示唆される．しかし臨床応用への可能性については，糖鎖合成は正常細胞においても機能上必要であり，また副作用など種々な問題点の検討が必要であると考えられるが，癌細胞の糖鎖抗原発現を変化させる薬剤は，新しい癌の転移抑制法として，今後十分その応用が期待できるものと思われる．

なお，本論文の要旨は第46回日本消化器外科学会総会シンポジウム1—消化器癌転移の機序とその対策において発表した．

文　献

1) Phillips ML, Nudelman E, Gaeta FCA et al: ELAM-1 mediates cell adhesion by recognition of a carbohydrate ligand, sialyl-Le^x. Science **250**: 1130—1132, 1990
2) Kuan SF, Ho JJL, Basbaum CB et al: Inhibition of mucin glycosylation by aryl-N-acetyl-a-galactosaminidases in human colon cancer cells. J Biol Chem **264**: 19271—19277, 1989
3) Nakamori S, Kameyama M, Imaoka S et al: Increased expression of sialyl Lewis^x antigen correlates with poor survival in patients with colorectal carcinoma: Clinicopathological and immunohistochemical study. Cancer Res **531**: 3632—3637, 1993
4) Sawada T, Ho JJL, Chung YS et al: E-selectin binding by pancreatic tumor cells is inhibited by cancer sera. Int J Cancer **57**: 901—907, 1994
5) Burrows FJ, Haskard DO, Hart IR et al: Influence of tumor-derived interleukin 1 on melanoma-endothelial cell interactions in vitro. Cancer Res **51**: 4768—4775, 1991
6) Kemenade EW, Ligtenberg MJL, Boer AJ et al: Episialin (MUC1) inhibits cytotoxic lymphocyte target cell interaction. J Immunol **151**: 767—776, 1993

Role of ELAM-1 Binding and Cytokines in Liver Metastasis of Pancreatic Cancer and Possible Therapeutic Application of a Glycosylation Inhibitor

Tetsuji Sawada, Yong-Suk Chung, Nobuya Yamada, Satoshi Takatsuka, Yasuhiro Sakurai, Yuichi Arimoto, Masakazu Yashiro, Shigehiko Nishimura, Teruyoshi Ikeda and Michio Sowa
The First Department of Surgery, Osaka City University Medical School

In this study, using pancreatic cancer cell lines, we investigated the role of carbohydrate expression, ELAM-1 binding and cytokines in liver metastasis of pancreatic cancer, and the possible therapeutic application of a glycosylation inhibitor. SW1990 cells revealed a high metastatic potential (90%) in the intrasplenic injection model, and this metastatic ability was correlated with its high carbohydrate expression (sialy-Le^a & Le^x) and high adhessiveness to HUVECs and ELAM-1. By coculture of SW1990 cells with peripheral mononuclear leukocytes, high production of TNF-$\alpha$and IL-1β occurred in the medium, and this medium could induce expression of ELAM-1 on HUVECs. A glycosylation inhibitor (BZN) inhibited carbohydrate expression, ELAM-1 binding and liver metastasis of SW1990. These findings suggest a possible new therapeutic application of BZN for metastasis.

Reprint requests: Tetsuji Sawada The First Department of Surgery, Osaka City University, Medical School
1-5-7 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka, 545 JAPAN