日消外会誌　33（4）：549～553，2000年

特集 8

膵癌肝転移能に関与する分子生物学的因子の解析

大阪市立大学医学部第１外科
澤田　鉄二　寺岡　均　西原　承浩　須浪　毅
八代　正和　山下　好人　山田　靖哉　前田　清
仲田　文造　平川　弘聖

膵癌細胞を用い，微小環境における宿主免疫応答に関わる接着分子であるICAM-1発現の意義および転移に関与する因子として注目されているTGF-β1に着目し，肝転移形成能におよぼす影響について分子生物学的解析を行った．ヌードマウス肝転移モデルにおいて高転移能を有するSW1990ではICAM-1発現が低率で，末梢血単核球の癌細胞に対する接着性，細胞障害活性も低かった．TGF-β1処理にて膵癌細胞のICAM-1発現は抑制され，また浸潤能は亢進し，肝転移能もSW1990，CAPAN-2で促進された．TGF-β1などの因子によるICAM-1発現低下は免疫担当細胞よりの回避から転移形成に深く関与し，ICAM-1遺伝子導入や抗TGF-β1抗体による転移抑制への応用の可能性が示唆された．

はじめに

消化器癌の中でも膵癌は難治性であり，その予後を左右する因子である肝転移機序の解明および転移抑制法の開発が望まれている．これまで膵癌肝転移機序に関し膵癌細胞株を用い多角的な検討を行い，膵癌細胞上の糖鎖抗原発現によるendothelial leukocyte adhesion molecule-1（ELAM-1）を介した血管内皮細胞接着や細胞遊走能，プロテアーゼ産生能が転移形式に重要な役割を果たしていることを明らかとしてきた[1)~3)]．しかしこれら癌細胞特性のみならず転移形成に関与する新たな因子の役割について不明な点も多く残されている．特に癌の進展，転移形成には局所での微小環境も大きく関与していることが解明されつつあり，宿主免疫応答や種々のサイトカインもその一因を担っていると考えられる．

今回，腫瘍拒絶反応に関わる接着分子の一つであり，イムノグロブリンスーパーファミリーに属するintercellular adhesion molecule-1（ICAM-1）の癌細胞における発現の意義および転移に関与する因子として注目されているtransforming growth factor-β1（TGF-β1）に着目し，膵癌肝転移形成能におよぼす影響について検討を行った．

材料および方法

1．細胞培養法およびICAM-1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．各細胞表面上のICAM-1発現は抗ICAM-1（CD54）モノクローナル抗体（Genzyme，Immunotech）を用いフローサイトメトリーによる陽性細胞率の検討および96 well microplate上に0.25%グルタルアルデヒドにて細胞を固相化しELISA法による発現定量を行った．

2．末梢血単核球の癌細胞接着能および癌細胞障害活性の検討

健常人末梢血よりFicol遠心分離法にて末梢血単核球（MNL）を分離し，マイクロプレート上に固相培養した癌細胞に37℃にて30分間接着させ，非接着MNLを洗浄除去後，接着したMNL数を3-(4, 5-dimethylthiazol)-2，5-diphenyl tetrazolium bromide（MTT）を用いて定量，総細胞数に対する接着細胞数の割合（% of adhesion）を算出し，検討した．

次に，MNLによる癌細胞に対する細胞障害活性を，MNLと各癌細胞を12時間混合培養（effector/tumor cell ratio：10）し，cytolysisに伴うLDHを測定し障害活性を定量するNon-Radioactive Cytotoxicity Assay Kit（Promega Co., USA）を用い検討した．

＊第54回日消外会総会シンポ５・消化器癌転移能の分子生物学的側面（肝胆膵）

＜1999年12月22日受理＞別刷請求先：澤田　鉄二
〒545-8585　大阪市阿倍野区旭町1―4―3　大阪市立大学医学部第１外科

さらに接着能，障害活性いずれについても検討時に抗 ICAM-1中和抗体（2μg/ml）を添加した際の影響を検討した．

3．TGF-β1による ICAM-1発現，癌細胞障害活性および浸潤能への影響の検討

各癌細胞を TGF-β1（Austral Biologicals，CA，USA），20ng/ml 存在下に48時間培養処理した後，各細胞上の ELISA による ICAM-1発現変化および MNL 混合培養時の癌細胞障害活性の変化を無処理（コントロール）群と比較検討した．

また，同様に TGF-β1処理による癌細胞の浸潤能におよぼす影響を，Matrigel を coating した8μm，pore size の filter を装着した transwell double chamber を用い，filter 下面に浸潤した細胞数を MTT 法にて定量し，全細胞数に対する浸潤細胞数，% of invasion を算出，コントロールと比較検討した．

4．in vivo 肝転移能の検討

6週齢 BALB/c ヌードマウスにエーテル麻酔下に小切開を加え開腹，脾臓内に各癌細胞の7.0×10^5cells/0.1ml を注射後，摘脾を行い，5週後に犠牲死させ，肝における転移結節の有無を判定し，肝転移形成率を各癌細胞間で比較検討した．

さらに癌細胞を in vitro の検討同様に抗 ICAM-1抗体および TGF-β1にて前処理した後に脾内注射し，肝転移能をおよぼす影響について無処理群と比較検討した．

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 ICAM-1発現のフローサイトメトリーによる検討では，SW1990での ICAM-1陽性細胞は27.1%と低率であり，CAPAN-2，PANC-1では73.2，94.1%と高い発現がみられ（**Fig. 1A**），ELISA による発現定量でも SW1990では他の癌細胞に比べ有意に ICAM-1発現が低値であった（**Fig. 1B**）．

MNL の in vitro での癌細胞への接着能および癌細胞障害活性は，SW1990に対しては他の細胞に比し有意に低値であり，CAPAN-2，PANC-1に対する高い接着能，細胞障害活性は抗 ICAM-1抗体添加により有意に抑制された（**Fig. 2**）．

in vivo における肝転移能では，SW1990で90%に転移形式がみられたのに対し，CAPAN-2で18.2%，PANC-1で0%と，SW1990で他の細胞に比し高い転移

Fig. 1　ICAM-1 expression on the surface of pancreatic cancer cells by flowcytometric analysis (A) and ELISA (B).

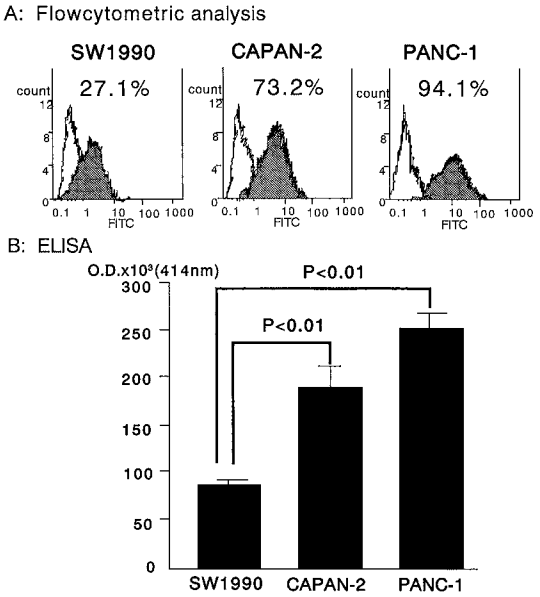


Fig. 2　Adhesion assay of mononuclear leukocytes (MNL) to pancreatic cancer cells (A) and cancer cell cytotoxicity during co-culture with MNL (B).

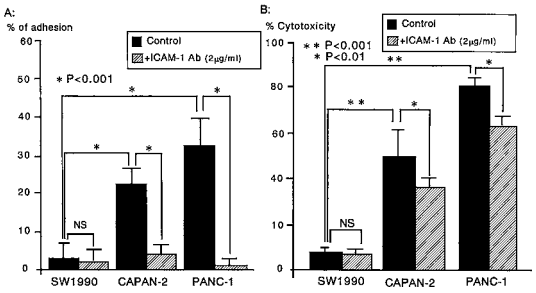


Table 1　Effect of TGF-β1 on in vivo liver metastatic ability

	The ratio of liver metastasis bearing nude mice		
Cell line	no treatment	anti-ICAM-1 MAb treatment	TGF-β1 treatment
SW1990	90.0%(9/10)	not tested	100%(10/10)
CAPNA-2	18.2%(2/11)	66.7%(6/9)*	84.6%(11/13)*
PANC-1	0%(0/10)	0%(0/8)	0%(0/5)

5 weeks after splenic injection, *p< 0.01；compared with no treatment

Fig. 3 Alteration of ICAM-1 expression on pancreatic cancer cells treated with TGF-β1 by ELISA (A) and effect of TGF-β1 on cancer cell cytotoxicity received by mononuclear leukocytes (B).

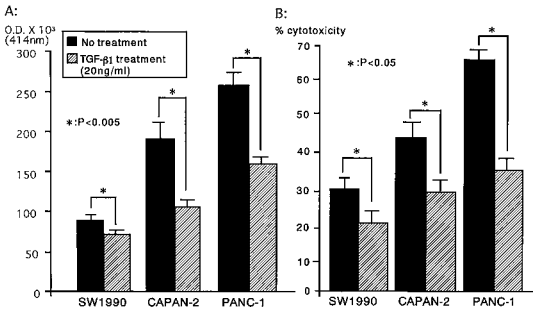
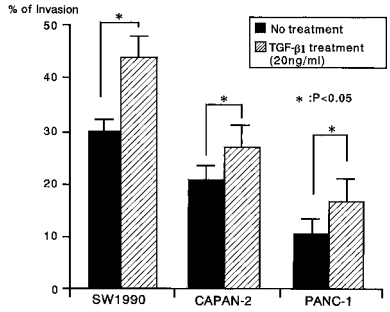


Fig. 4 Effect of TGF-β1 on invasion assay of pancreatic cancer cells.



能が認められた(**Table 1**). また抗ICAM-1抗体の転移能への影響では，PANC-1では処理にても転移形式はみられなかったものの，CAPAN-2では抗ICAM-1抗体処理群の転移形成率は66.7%と無処理群に比べ有意な転移増強が認められた.

つぎにTGF-β1処理による各癌細胞上のICAM-1発現の変化を検討した結果，いずれの細胞においてもコントロールに比べ有意な発現低下が認められ（**Fig. 3 A**)，またMNLによる癌細胞障害活性もいずれの細胞においてもTGF-β1処理にて有意な低下が認められた(**Fig. 3B**).

in vitroにおける浸潤能はSW1990が他の細胞に比べ高い浸潤能を示したが，いずれの細胞の浸潤能もTGF-β1処理にてコントロールに比べ有意な増強が認められた(**Fig. 4**). なお，TGF-β1処理による癌細胞増殖能への影響も検討したが，20ng/mlの濃度ではいずれの細胞においても若干の増殖抑制がみられたが，有意な変化は認められなかった.

TGF-β1によるin vivo肝転移能への影響では，PANC-1ではTGF-β1前処理にても転移形成はみられなかったものの，SW1990では形成率ならびに転移結節数の増強が認められ，CAPAN-2ではコントロールの18.2%に比べ，TGF-β1処理群では84.6%と有意な転移能の増強が認められた（**Table 1**).

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，膵癌の肝転移過程においても種々の因子が深く関与している．中でもin vivo高肝転移能を有するSW1990を用いた検討から，血管内皮細胞上に発現するELAM-1のリガンドである糖鎖抗原(シアリルルイスA，X)発現が血管内皮細胞接着に関与し，また遊走刺激因子産生あるいはプロテアーゼ特にurokinase type plasminogen activator (u-PA) 産生能が癌細胞の浸潤能にそれぞれ重要な機能を果たしていることを明らかとしてきた[1)~3)].

しかし，これら因子のみで転移能は規定されるものではなく，今回検討に用いたCAPAN-2でもSW1990に比べ若干弱いもののシアリルルイスAの発現や遊走能，あるいはSW1990より強いu-PA産生がみられるにもかかわらずin vivoでは低転移性であり，このことからも転移形成に関わる更なる因子の存在が示唆される.

宿主免疫機構における癌細胞の免疫担当細胞による認識機構にはさまざまな接着分子が関与していることが明らかとなってきているが，ICAM-1はこの腫瘍拒絶反応に関わる接着分子の一つであり，leukocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) のリガンドとして知られている．癌細胞表面上に発現するICAM-1は，ICAM-1/LFA-1システムを介し，LFA-1依存性細胞接着を示すナチュラルキラー (NK) 細胞，lymphokine activated killer (LAK) 細胞による癌細胞認識，あるいは細胞障害性Tリンパ球 (CTL) による認識機構におけるcostimulatorとして作用している.

このICAM-1の癌細胞における発現変化が，微小環境における免疫機構からの回避に関与し，転移形成に重要な役割を果たしていることが推察される．今回の検討結果からも高転移性SW1990のICAM-1発現は低く，これを反映しMNLの接着性および細胞障害活性も低値であり，このICAM-1低発現も転移形成に深く関与していると考えられた．一方，CAPAN-2, PANC-1ではICAM-1発現が強く，抗ICAM-1抗体にて抑制される高いMNL接着能，細胞障害活性からも

ICAM-1を介した免疫認識機構により転移形成に至らなかったと考えられた．実際 in vivo での検討でも CAPAN-2においては抗 ICAM-1抗体により認識機構をブロックすることにより転移形成率の増強がみられ，ICAM-1発現の強い関与が示唆された．

癌の転移形成には局所の微小環境において種々の細胞より産生されるサイトカインや増殖因子などが autocrine，paracrine に相互的に作用し，癌の転移形成に促進的に作用することが明らかとなりつつあるが，TGF-β1もその一つとして近年注目されており，膵癌同様に難治癌として知られているスキルス胃癌では同所線維芽細胞より産生される TGF-β1がその進展に深く関与していることが判明している[4]．

TGF-β1は正常細胞のみならず癌細胞からも産生され multi-functional factor として知られており，腫瘍増殖には抑制的に作用するものの，そのレセプター機能異常から発癌過程や増殖進展に関与し，その他免疫抑制，創傷治癒や線維化にも関与し，近年では癌の転移促進に作用することが注目されている．急性膵炎の修復時に TGF-β1の発現増強がみられるとの報告[5]がみられるが，膵癌組織においても癌細胞自体や同所膵組織の種々の細胞や間質線維芽細胞からの TGF-β1の産生が推測される．

今回，TGF-β1の膵癌細胞への影響を検討した結果では，前述の ICAM-1は TGF-β1にて発現低下が誘導され，それに伴い MNL による癌細胞障害活性も低下，また，癌細胞の浸潤能も増強し，増殖能にはやや抑制的に作用するものの転移形成には促進的に作用することが示唆された．さらに癌細胞のマトリックス接着能，プロテアーゼ産生能や血管新生にも促進的に作用することが判明しており[6]，これらの作用により実際 in vivo 肝転移能への TGF-β1の影響では，高転移性 SW 1990では転移のさらなる増強が，また低転移性 CAPAN-2では転移形成率の有意な増強が認められた．一方，PANC-1では TGF-β1にて ICAM-1発現は低下，浸潤能は増強するものの，元来糖鎖抗原発現がなく ELAM-1を介した血管内皮細胞接着がみられないことから TGF-β1処理にても転移形成は認められなかったものと考えられた．

以上のように，膵癌組織の微小環境において癌細胞自体から autocrine に産生あるいは paracrine に種々の細胞から産生される TGF-β1は宿主自体の免疫活性を抑制するのみならず，癌細胞 ICAM-1発現低下による抗腫瘍免疫機能をも抑制し，さらに癌細胞自体の浸潤，転移機構に関わる特性を変化させることにより，膵癌の転移形成に深く関与していることが示唆された．また TGF-β1の多くは潜在型で産生されるが，膵癌細胞より産生される u-PA などの活性化機序への関与や，増殖抑制作用と転移促進作用におけるレセプターあるいはシグナル伝達機能の差異などについてが今後検討課題であると考えられる．

しかし転移は多彩な因子が複雑に関与し形成され，これらの中の単独因子のみで規定される訳ではないが，今回の検討から癌細胞自体の糖鎮抗原発現を介した ELAM-1接着および ICAM-1の低発現性が肝転移形成能において中心的な役割を果たしているキーポイントであり，また TGF-β1もさまざまな諸因子の修飾的作用により転移促進機能を果たしていると考えられ，ICAM-1低発現腫瘍に対する ICAM-1遺伝子導入あるいは抗 TGF-β1抗体や TGF-β1産生抑制物質などによる膵癌肝転移抑制への応用が期待されるところであり，今後さらなる検討を行いたい．

文　献

1) 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
2) Sakurai Y, Sawada T, Chung YS et al：Identification and characterization of motility stimulating factor secreted from pancreatic cancer cells：role in tumor invasion and metastasis. Clin Exp Metastasis **15**：307—317, 1997
3) Kawazoe Y, Sawada T, Chung YS et al：Role of urokinase-type plasminogen activator and inhibitory effect of protease inhibitor in invasion and metastasis of pancreatic cancer. Int J Oncol **10**：983—987, 1997
4) Inoue T, Chung YS, Yashiro M et al：Transforming growth facor-β and hepatocyte growth factor produced by gastric fibroblasts stimulate the invasiveness of scirrhous gantric cancer cells. Jpn J Cancer Res **88**：152—159, 1997
5) Friess H, Lu Z, Riesle E et al：Enhanced expression of TGF-βs and their receptors in human acute pancreatitis. Ann Surg **227**：95—104, 1998
6) Teraoka H, Sawada T, Yamamoto A et al：Mechanism of enhanced liver metastasis induced by TGF-β1 on pancreatic cancer. Proc Am Assoc Cancer Res **40**：331, 1999

The Functioning Role of Biological Factors Involved in the Liver Metastasis Ability of Pancreatic Cancer

Tetsuji Sawada, Hitoshi Teraoka, Tamahiro Nishihara, Takeshi Sunami, Masakazu Yashiro, Yoshito Yamashita, Nobuya Yamada, Kiyoshi Maeda, Bunzo Nakata and Kosei Hirakawa
The First Department of Surgery, Osaka City University Medical School

We investigated the biological role of the expression of ICAM-1, which is an adhesion molecule involved in host immunodefense in the microenvironment, and of TGF-β1 in the liver metastasis ability of pancreatic cancer cells. The highly metastatic, SW1990 cells in a nude mouse liver metastasis model had the lowest expression of ICAM-1, and the adhesiveness and cytotoxicity of mononuclear leukocytes against SW1990 were suppressed. Treatment of pancreatic cancer cells with TGF-β1 decreased their expression of ICAM-1 and increased their invasiveness, and it enhanced the in vivo liver metastasis ability of SW1990 and CAPAN-2. These findings suggested that decreased cancer cell expression of ICAM-1 induced by various factors, such an TGF-β1, plays an important role by allowing cancer cells to escape from the immune defense system, and ICAM-1 gene transfection or anti-TGF-β1 antibody may be applicable as a means of inhibiting metastasis.

Key words：pancreatic cancer, ICAM-1, TGF-β1

〔Jpn J Gastroenterol Surg 33：549—553, 2000〕

Reprint requests：Tetsuji Sawada The First Department of Surgery, Osaka City University, Medical School
1-4-3 Asahi-machi, Abeno-ku, Osaka, 545-8585 JAPAN