

論文の内容の要旨

論文題目 癌のリンパ節転移に関わる諸因子の検討
—癌細胞のリンパ節着床機構と局所での免疫応答の特殊性について

指導教官 名川弘一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成9年4月入学

医学博士課程

外科学専攻

氏名 中山 洋

<研究の目的> 癌のリンパ節転移は臨床的に重要な現象であるにもかかわらず、そのメカニズムについての基礎的研究はほとんど行なわれていない。リンパ節転移が生じるためには、癌細胞が原発巣でリンパ管内に浸潤し、遊離してリンパ節へ着床し、さらに浸潤し、かつリンパ節内での免疫機構を回避して増殖するという、複数のステップが必要と考えられる。本研究では、癌細胞のリンパ節への着床機構の解明、及び、免疫寛容のうちリンパ節でのヘルパーT (Th) 細胞の比率の変化をテーマとし、癌のリンパ節転移のメカニズムの解明の一助とすることを目的とした。

I. リンパ管内皮に対する胃癌細胞 BV9 の動的条件下における接着とそのメカニズム

<目的> 癌のリンパ節転移は、その初期にはリンパ節の辺縁洞に小さな細胞集塊を作って見られる場合が多い。しかしその癌細胞の、辺縁洞への接着機構については明らかにされていない。本研究では、癌細胞がリンパ系の内皮に特異的に接着しうるか、また、その場合には、如何なる分子機構が働いているのかを明らかにすることを目的とした。

<方法> リンパ管内皮細胞はラットの胸管から分離・培養し、癌細胞はラット由来の胃癌細胞株である BV9 を使用した。BV9 の細胞懸濁液をフローチャンバーシステムを使用して、リンパ流を模した動的条件下でリンパ管内皮上に灌流し、内皮と BV9 の接着が生じるかを観察した。また、内皮細胞へのサイトカイン刺激により接着に変化が生じるかを観察すると共に、フロー液の組成や癌細胞の抗体処理等によって接着が抑制されるかについても調べた。

<結果> 胸管を切除・切開し、内腔側を下にしてディッシュに貼り付け、ディッシュに移行した細胞の培養を行なった。この細胞は acetylated low density lipoprotein の取り込みが陽性であり、リンパ管内皮であると判断された。フローの条件下で BV9 の接着を観察したところ、 465.85 ± 29.28 個/mm² と、多数の細胞の接着が観察され、比較としてラット下大静脈から採取した血管内皮細胞の約 8 倍の接着数であった。この接着はリンパ管内皮細胞を IL1- β 10 ng/ml もしくは TNF- α 500 ng/ml で 24 時間刺激することによって有意に増加したが、IFN- γ 150 u/ml 及び IL4 500 ng/ml の刺激では増加は見られなかった。フロー液から Ca²⁺, Mg²⁺ を除き、EDTA を加えたところ、刺激していない内皮への接着は変化しなかったが、IL1- β で刺激した内皮への接着は減少し、刺激していない内皮への接着とほぼ同じになった。このため、IL1- β による接着の増強機構にインテグリンの関与を疑い、BV9 を抗インテグリン α_2 抗体で処理したところ、IL1- β で刺激した内皮への接着は減少し、非刺激内皮への接着とほぼ同等になった。一方、非刺激内皮については BV9 懸濁液中にヒアルロン酸を加えたところ、有意な接着の低下が観察された。

<考察> BV9 は胸管由来のリンパ管内皮細胞に多数接着し、癌細胞のリンパ管内皮への選択的接着という現象が存在することが明らかになった。これは、リンパ節転移が生じる際に、リンパ管内皮への癌細胞の接着というステップの存在を示唆するものである。リンパ管内皮を IL1- β や TNF- α で刺激することで、接着細胞数が増加することから、炎症性サイトカインの存在がリンパ節転移に促進的に作用する可能性が示唆された。この接着の増加は Ca²⁺, Mg²⁺ 依存性であり、また、抗インテグリン α_2 抗体によるブロックで抑制されたことから、インテグリン α_2 を介していると考えられた。一方、刺激していないリンパ管内皮への接着は Ca²⁺, Mg²⁺ 非依存性であり、少なくとも一部にはヒアルロン酸を認識する分子が関与しているものと考えられた。

II. 腫瘍所属リンパ節における Th1 細胞の減少

<目的> 癌患者では Type 1 のサイトカインが減少して、Type 2 のサイトカイン優位になっていると言われている。しかし、それが Th 細胞自体の機能の変化により生じているのか、Th 細胞の数のバランスに変化が生じているのかは明らかでない。このため、細胞内サイトカインを CD4 と共に 2 重染色してフローサイトメトリーで解析し、Th 細胞の中で Th1 及び Th2 の割合に変化が生じているかを調べた。

<方法> 胃癌及び大腸癌の進行癌患者 16 名、及び健常人ボランティア 10 名を対象とした。患者群は末梢血及び切除標本のリンパ節からリンパ球を分離した。健常群では末梢血からリンパ球を分離した。PMA と ionomycin を使用してリンパ球を刺激すると同時に Brefeldin A を加えてサイトカインの輸送を阻害した。細胞膜の透過を行なった後、FITC でラベルした抗 CD4 抗体及び PE でラベルした抗サイトカイン (IL2, IFN- γ , IL4) 抗体で 2 重染色を行ない、CD4 陽性細胞中のサイトカイン陽性細胞の割合をフローサイトメーターで解析した。

<結果> 癌患者の末梢血においては、IL2 を産生する Th 細胞の比率が健常人の末梢血に比して有意に低下していた。また、リンパ節においては、IL2・IFN- γ の両方で産生 Th 細胞の比率が有意に低下していた。一方で IL4 を産生する Th 細胞の比率は癌患者の末梢血でもリンパ節でも有意な変化は見られなかった。しかしながら、リンパ節を転移の有無で 2 群に分けた場合、IL2・IFN- γ を産生する Th 細胞の比率には有意差がなかったが、IL4 を産生する Th 細胞の比率は転移陽性群で有意に低下していた。

<考察> 癌患者では末梢血でも腫瘍所属リンパ節でも Th1 細胞の比率が低下していた。一方で、Th2 の比率に変化は見られなかった。従って、癌患者で見られる Type 2 サイトカインの優位性は Th1 細胞の比率の低下がその一因となっていると考えられた。また、腫瘍所属リンパ節においては、Th1 細胞が減少しているために I 型サイトカインの供給が十分に出来ず、腫瘍細胞を拒絶するための細胞性免疫を惹起できない可能性が考えられた。

<まとめ>

本研究により、以下の結論が得られた。1. リンパ管内皮に癌細胞の接着は生じうる。2. この接着は IL1- β ・TNF- α により増強される。3. IL1- β で増強される接着にはインテグリン α_2 が関与している。4. 刺激されていないリンパ管内皮と BV9 の接着は

Ca²⁺・Mg²⁺非依存性であり、ヒアルロン酸を認識する分子を介している可能性がある。

5. 癌患者においては末梢血・腫瘍所属リンパ節共に Th1 細胞は減少しており、リンパ節では殊に顕著である。6. 一方、Th2 細胞の増加は生じておらず、転移があるリンパ節ではむしろ減少している。