

## 審査の結果の要旨

氏名 中山 洋

本研究は癌のリンパ節転移のメカニズムを解明するため、癌細胞のリンパ節着床機構、及び癌細胞に対する免疫寛容として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、前者においてはラットの胸管由来のリンパ管内皮細胞と癌細胞との動的条件下での接着実験を行ない、また、後者においてはヒトの腫瘍所属リンパ節リンパ球のサイトカイン産生能をフローサイトメトリーで解析し、下記の結果を得ている。

1. ラットの胸管内腔から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。フローの条件下でラット胃癌細胞 BV9 の接着を観察したところ、多数の細胞の接着が観察され、これは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。従ってリンパ管内皮細胞への癌細胞の接着現象が存在することが明らかとなり、癌細胞のリンパ節転移メカニズムにおいて、癌細胞のリンパ管内皮細胞への接着が一つのステップとして存在しうることが示された。
2. リンパ管内皮細胞を IL1- $\beta$  10 ng/ml、TNF- $\alpha$  500 ng/ml、IFN- $\gamma$  150 u/ml もしくは IL4 500 ng/ml で 24 時間刺激したところ、前 2 者では接着は有意に増加した。このことから、一部の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された。
3. フロー液から Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>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- $\beta$  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。また、BV9 を抗インテグリン  $\alpha_2$  抗体で処理したところ、IL1- $\beta$  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。従って、この接着の増加は Ca<sup>2+</sup>、Mg<sup>2+</sup>依存性であり、インテグ

リン $\alpha_2$ を介していることが示された。

4. 一方、非刺激内皮について、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みられた。従って、この接着は  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  非依存性であり、一部にヒアルロン酸を認識する分子が関与していることが示唆された。
5. 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、患者群は末梢血及び切除標本のリンパ節から、健常群では末梢血からリンパ球を分離した。PMA と ionomycin でリンパ球を刺激した後、細胞膜の透過を行ない、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- $\gamma$ , 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。その結果、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- $\gamma$  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ず、転移のあるリンパ節ではむしろ低下していた。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おり、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充分に出来ず、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示唆された。

以上、本論文はラット胸管由来のリンパ管内皮と胃癌細胞 BV9 の動的条件下での接着実験系において、癌細胞とリンパ管内皮の接着現象を初めて明らかにし、その分子機構の一部を明らかにした。また、癌患者の免疫応答において Th1 細胞の減少が、Th2 優位の一因となっていることを明らかにした。本研究は、未知の部分の多い癌のリンパ節転移機構の解明において重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。