

論 文 要 旨

Interleukin-8 in human hepatocellular carcinoma correlates with cancer cell invasion of vessels but not with tumor angiogenesis.

(肝細胞癌においてインターロイキン8は血管新生よりも血管浸潤に関連している)

久保 文武

【はじめに】

肝細胞癌（以下HCC）は、血流豊富な腫瘍で、血管新生はその発育、進展に密接に関わっていると考えられる。代表的なケモカインであるInterleukin-8（以下IL-8）は、強力な白血球遊走因子であると同時に、血管新生因子として知られ、胃癌、肺癌、前立腺癌においては腫瘍因子や、治療成績との有意な関連性を報告されているが、HCCとの関連性は明らかにされていない。また、HCCは患者因子、腫瘍因子に応じて、肝切除、焼灼療法、経動脈的治療など多彩な治療法が選択されているが、5年生存率はStage I/IIの症例でも60%程度に過ぎず、HCCの腫瘍進展の特徴を解明することは治療成績の向上にも寄与すると考えられる。今回臨床検体を用いて、IL-8の発現を測定し、臨床病理学的意義を検討し、かつ培養肝癌細胞に対するIL-8の細胞増殖能・運動能に対する影響を検討した。

【対象と方法】

1995年から1998年までの間に鹿児島大学医学部第一外科にて切除され、速やかに組織が液体窒素にて凍結保存されたHCC切除症例45例を対象とした。IL-8mRNAの発現の検索にはRT-PCR法を用い、内部コントロールとして β -アクチンを用いた。血管新生指標としては、抗CD34マウスモノクローナル抗体を用いた免疫組織学的染色を行い、血管数を測定し、腫瘍内血管密度（micro vessel density, 以下MVD）として数量化した。MVDによって、hypervascular groupと、hypovascular groupの2群を設定し、IL-8mRNA発現とMVD、臨床病理学的因子との関連性を検討した。また、in vitro実験系において、培養肝癌細胞(HepG2)に対するIL-8の効果を判定するために、蛍光標識を用いたproliferation assay, migration assay, fluorometric invasion assayを行った。

【結果】

- 1) HCC45例中IL-8発現は、35例（77%）で陽性、10例（23%）で陰性であった。
- 2) 陽性群と陰性群の間で、多くの臨床病理学的因子（年齢、性別、肝炎ウイルス、肝障害度、腫瘍径、腫瘍数、肉眼形態、分化度、被膜形成、被膜浸潤、再発頻度および5年生存率）については有意差を認めなかった。しかし、IL-8陽性群では、有意に組織学的脈管浸襲陽性例が多く、さらに、Stage I, II症例よりもStage III, IV症例に多く認められた。MVDと臨床病理学的因子との関連は認めなかった。

- 3) IL-8陽性群においてMVDが高いという結果は得られず、血管新生との明らかな関連性は見出せなかった。
- 4) in vitro実験系では、IL-8添加はHepG2細胞の増殖能には有意な影響を与えないものの、その遊走能・浸潤能を有意に亢進させた。また、その遊走能、浸潤能は中和抗体にて有意に抑制された。

【考察】

臨床検体を用いたIL-8の発現の検討は少なく、秋葉らはその発現は100%（23例中23例）に認めたと報告している。また、井口らは62%（13例中8例）に発現を認めたと報告し、さらに2cm未満の小肝癌では50%（5/10）に、2cm以上の肝癌には100%（3/3）に発現を認めたと報告している。今回われわれが行った、臨床検体を用いたHCCにおけるIL-8の発現の検討においては、その発現は45例中35例、77%に認められた。IL-8陽性例と、IL-8陰性例でその臨床病理学的因子を比較したところ、陽性群は、陰性群に比べ有意に血管浸潤（門脈浸潤および静脈浸潤）の頻度が高く、またStageIII/IV（肝癌取り扱い規約における）の頻度が高くなっていった。秋葉らは、癌部と非癌部のIL-8の発現レベルを比べ、癌部の発現が高い群において、門脈浸潤、静脈浸潤の頻度が有意に高いとしており、今回のわれわれの結果と同様、IL-8の発現と血管浸潤との間の有意な関係を示唆している。その一方で、今回、IL-8の発現とMVDとの間には有意な関係は見出せなかったが、臨床的にはVEGFや、bFGFなど、他の強力な血管新生因子の影響が非常に大きいと推測される。

また、IL-8はKochらにより初めて、血管新生因子として報告されて以来、血管内皮細胞に対する、遊走因子（Koch, Rosalba Salcedo）、増殖因子（Akiba）としての報告が散見される。秋葉らは、HCCセルラインならびにHUVEC（ヒト臍静脈内皮細胞）に対するIL-8の影響を検討した結果、IL-8はHCCセルラインの増殖を亢進しないが、血管内皮細胞の増殖を亢進することを報告し、血管新生因子としてのIL-8の重要性を報告している。また、元来白血球の遊走因子として見出されたIL-8が、白血球だけでなく癌細胞に対しても遊走因子として働くことは十分予測される。

今回われわれは、IL-8の、癌細胞の増殖能、遊走能、浸潤能に対する影響を、HepG2を用いて検討した。その結果、IL-8はHepG2の増殖能には影響しない濃度で、その遊走能、浸潤能を明らかに亢進することが示唆された。HepG2自体がIL-8の分泌能を有していることからauto-paracrine mannerによりその遊走、浸潤を惹起していると考えられる。このことはIL-8を発現している肝細胞癌例に有意に血管浸襲例が多いという臨床病理学的な検討の結果とも一致する。また、その遊走能は抗IL-8抗体で有意に抑制され、抗IL-8療法は肝細胞癌の腫瘍進展抑制に有用な一つの手段になる可能性が示唆された。

【結語】

HCCの進展にしたがってIL-8の発現頻度は高くなり、その発現は腫瘍進展に付随する血管新生よりも、むしろ脈管浸潤に代表されるような腫瘍細胞浸潤能などの悪性所見に関与する。この作用は、中和抗体を用いて抑制され得ることから、HCC進展に対する抗IL-8療法の可能性が示唆された。

論文審査の要旨

報告番号	医研 第 601 号	氏名	久保文武
審査委員	主査	小澤政之	
	副査	丸山征郎	坪内博仁

Interleukin 8 in human hepatocellular carcinoma correlates with cancer cell invasion of vessels but not with tumor angiogenesis

(肝細胞癌においてインターロイキン8は血管新生よりも血管浸潤に関連している)

血管新生は腫瘍進展に必須な要素の一つで、多くの腫瘍について血管新生因子についての報告がなされてきた。肝細胞癌(以下HCC)は血流豊富な腫瘍で、血管新生はその発育、進展に密接に関わっていると考えられる。代表的なケモカインであるInterleukin-8(以下IL-8)は、強力な白血球遊走因子であると同時に、血管新生因子として知られ、胃癌、肺癌、前立腺癌においては腫瘍因子や、治療成績との有意な関連性を報告されているが、HCCとの関連性は明らかでなく、その臨床的意義については一定の見解を得ていない。そこで学位申請者らは、HCCの臨床検体を用いてIL-8の発現を測定し、その発現と臨床病理学的因子との関連を比較検討するとともに肝細胞癌細胞に対するIL-8の作用を*in vitro*で検討した。HCC切除症例45例を対象とし、IL-8mRNAの発現をRT-PCR法により測定した。血管新生の指標としては、抗CD34マウスモノクローナル抗体を用いた免疫組織学的染色を行い、腫瘍内血管数を測定し、腫瘍内血管密度(micro vessel density, 以下MVD)として数量化した。また、培養肝癌細胞(HepG2)に対するIL-8の効果を判定するために、蛍光標識を用いたproliferation assay, migration assay, fluorometric invasion assayを行った。

その結果、本研究で以下の知見が明らかにされた。

- 1) IL-8発現は、HCC45例中35例(77%)で陽性、10例(23%)で陰性であった。
- 2) 陽性群と陰性群の間で、多くの臨床病理学的因子(年齢、性別、肝炎ウイルス、肝機能、肝障害度、腫瘍径、腫瘍数、肉眼形態、分化度、被膜形成、被膜浸潤、再発頻度および5年生存率)については有意差を認めなかった。しかし、IL-8陽性群では、有意に組織学的脈管浸襲陽性例が多く、さらに、Stage I, II症例よりもStage III, IV症例が多く認められた。MVDと臨床病理学的因子との関連は認めなかった。
- 3) IL-8陽性発現の有無とMVDの間には有意な関係は認められなかった。
- 4) HepG2細胞の増殖能に対しては、IL-8は有意な影響を与えなかった。
- 5) 一方、IL-8はHepG2の遊走能・浸潤能を有意に亢進させ、またその遊走能は中和抗体にて有意に抑制された。

HCCにおけるIL-8の発現は高頻度に観察され、病期(Stage)進行にしたがってIL-8の発現頻度は高くなっていった。その発現は腫瘍進展に付随する血管新生よりも、むしろ脈管浸潤に代表されるような腫瘍細胞浸潤能などの悪性所見に関与していた。この作用は中和抗体を用いて抑制されることから、HCC進展に対する抗IL-8療法の有用性が示唆された。また、本研究でIL-8は癌細胞の遊走、浸潤を促進する因子であることは示されたが、その一方でIL-8は強力な好中球遊走刺激能をもつ非常に多機能な炎症性サイトカインであり、炎症と癌浸潤を繋ぐ一つの重要な因子と考えられ、今後抗炎症、抗腫瘍進展治療の追求が必要な分野である。

本研究は、肝細胞癌におけるIL-8の発現と臨床病理学的因子の関連を検討したものであり、その結果IL-8の発現は、血管新生でなく脈管浸潤、Stageに関係することが示され、またIL-8が癌細胞自身の遊走能、浸潤能を促進すること、さらにその働きは中和抗体で抑制されることを示した点で非常に興味深い。よって本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	医研 第 601 号	氏名	久保文武
審査委員	主査	小澤政之	
	副査	丸山征郎	坪内博仁

主査および副査の3名は、平成17年8月17日、学位請求者 久保文武 に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下の様な質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

- ① IL-8が、autocrine mannerまたはparacrine mannerで、作用を発揮しているが、IL-8のreceptorの発現はどうなっているのか？
→肝細胞癌にはIL-8のレセプターであるCXCR1, CXCR2ともに発現するとされており、特にCXCR2の発現が強いと報告されている。
- ② 白血球の癌局所への遊走、浸潤は見られたか？
→肝細胞癌は程度の差はあるが慢性肝炎、肝硬変を背景にしており、白血球浸潤はほぼ見られたが、特にIL-8陽性群と、陰性群との間にその差があるという所見は確認していない。
- ③ 免疫組織学的に検討された新生血管の成熟度についてはどのように解釈しているか？
→非癌部正常肝類洞上皮はCD34陰性であり、今回検討したCD34陽性の血洞（腫瘍内の類洞構造をさす）上皮は、肝内組織としては異常血管であり、未熟な血管であると考えている。
- ④ HepG2の増殖試験において、exogenous IL-8はHepG2の増殖能に関係していないとしているが、endogenous IL-8で、すでに十分な増殖刺激を受けているためとは考えられないか？
→IL-8を加えていない状態での増殖も認められており、その可能性も考慮すべきであるが、その一方で抗IL-8処理により抑制を受けていない結果も合わせると、やはり増殖への影響は小さいものとする。
- ⑤ 肝細胞癌と最も関係のあるMMPとして、MMP-2, -7, -9を検討されているが、その他のMMPsについての検討はされていないのか？
→MMP-1から9を検討したが、他のMMPでは明らかな発現は認めず、MMP-7のみが強く発現していた。
- ⑥ IL-8の発現を、mRNAレベルで確認しているが、タンパクレベルではどうであったか？
→臨床例では免疫組織学的に、HepG2ではwestern blotting法でIL-8の発現を確認している。臨床例では腫瘍中心部よりも腫瘍辺縁先進部で強く発現する傾向を認めた。
- ⑦ 通常IL-8が定量される際には一般にpgというオーダーが用いられることが多い。今回HepG2を用いたassayでのIL-8の濃度単位がngである。この単位の差をどう解釈しているのか？
→局所組織中のサイトカインなどの濃度は、末梢血中の10から100倍のオーダーにのぼることが報告されており、矛盾はないものと判断している。
- ⑧ 定量的RT-PCRはおこなっていないのか？
→今検討では定性のみ行ったが、定量的RT-PCRを行うことで、その他の臨床病理学的因子との関係も見出せる可能性がある。今後の検討課題である。
- ⑨ 肝硬変組織では、IL-8の発現はどうなっているのか？
→慢性肝炎、肝硬変組織でもIL-8は発現するが、その発現は癌部に比べると弱い傾向がある。
- ⑩ 癌の浸潤の面から見たIL-8の役割をどう考えているのか？
→今回の検討で、IL-8は癌細胞の遊走、浸潤を促進する因子であることは示されたが、その一方でIL-8は強力な好中球遊走刺激能をもつ非常に多機能な炎症性サイトカインであり、炎症と癌浸潤を繋ぐ一つの因子であると考えている。

- ⑪ 今後の臨床的展望はどう考えているか？
→臨床的には、外科侵襲に引き続いて癌の急速進展をきたすことがしばしば経験される。そのような現象に対する抗炎症、抗サイトカイン療法の一つとなる可能性があると考えている。
- ⑫ HepG2以外の細胞ではどうであったか？
→今検討ではその他の細胞株での検討は行っていない。文献的には悪性黒色腫、乳癌、扁平上皮癌、前立腺癌由来の細胞で類似した結果が得られている。
- ⑬ Migration assayの結果からIL-8以外のファクターが関与している可能性は？
→抗IL-8処理によっても、遊走能は完全に抑制されていないことから、その他のファクターが関与している可能性も考えられる。
- ⑭ IL-8による細胞の形態学的変化は見られたか？
→今回は蛍光学的検討のみ行い、形態学的変化については観察を行っていない。
- ⑮ カルセインAMの蛍光標識の原理はどうなっているのか？
→カルセインAM自体は蛍光を示さないが、細胞膜透過性をもち、細胞内に移行し細胞内のエステラーゼによる加水分解を受けAM基が外れ、カルセインが蛍光発色する。カルセインは膜不透過性で発色後細胞外に漏出することが少ない。
- ⑯ カルセインAMはどんな細胞内でも分解されるのか？
→基本的には生細胞であれば細胞内へ移行し加水分解を受ける。死細胞では細胞内移行も少なく、分解もされないため蛍光発色しない。
- ⑰ IL-8刺激によるMMPsの発現はどのような流れで説明できるのか。また、MMP-2や-9との相違は何か？
→MMPsの制御にはets転写因子ファミリーであるets1やets2が関与するとされているが、それらの上流にIL-8からの直接的な関与は現在明らかでなく、また、MMP-7とMMP-2や-9との相違についても示されていない。今後の検討課題である。

以上の結果から、3名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者としての学力と識見を具備しているものと判断し、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。