

## 論文の内容の要旨

氏名：西 尾 幸 奈

博士の専攻分野の名称：博士（歯学）

論文題名：単球由来細胞株 THP-1 の IL-8 分泌における癌細胞由来 IL-8 の役割

口腔扁平上皮癌 (OSCC) は頭頸部の悪性腫瘍の中で発生率が最も高く、世界 6 大主要癌の一つである。OSCC では NF- $\kappa$ B や AP-1 など転写因子が恒常的に活性化され、前癌病変、初期癌、浸潤癌と病変の進行に伴ってこれらが増強することが知られており、病変の悪性化ときわめて密接な関係があることが示されている。これら転写因子の異常な活性は、様々なサイトカインやケモカインの自発的な分泌を引き起こし、癌細胞の増殖と進展にとって有利に働くことが証明されている。中でも IL-8 はその血管新生活性によって OSCC の成長を促進することが知られており OSCC を含む様々なタイプの癌細胞から産生されている。IL-8 の作用は、特異的受容体である CXCR1 および CXCR2 と高い親和性で結合することによって発揮される。

腫瘍細胞と腫瘍内微小環境の複雑な相互作用は癌の増殖と進展に極めて重要な役割を担っている。腫瘍内微小環境は、活性内皮細胞、腫瘍関連マクロファージ (tumor-associated macrophages: TAMs)、骨髄由来細胞を含む種々の間質細胞からなる。このうち TAMs には M1 および M2 タイプがあり、それぞれ癌の抑制と増殖促進という正反対の作用を有するとされている。TAMs における IL-8 受容体の発現はすでに報告されているが、癌細胞が分泌する IL-8 の TAMs に対する影響については知られていない。

本研究では、単球由来細胞株である THP-1 の血管新生活性に対する、OSCC 由来 IL-8 の効果について検討した。ヒト肉肉扁平上皮癌由来細胞株である Ca9-22 の培養上清 (Ca-sup) を THP-1 に添加し、20 時間後に THP-1 の培養上清中に含まれる IL-8 の濃度を ELISA で定量した。その結果 Ca-sup 中の IL-8 濃度が 39 pg/ml であったのに対して、Ca-sup によって刺激した THP1 では 1.9 ng/ml と有意に IL-8 分泌を増加させることを確認した。免疫沈降によって Ca-sup 中の IL-8 を除去した後に THP-1 に作用させると IL-8 分泌が著しく減少したことから、この反応が Ca-sup 中の IL-8 によるものであることが証明された。また、real-time PCR で THP-1 における IL-8 の mRNA 発現が、Ca-sup によって経時的に増加し、6 時間後にピークを迎えることから、IL-8 の分泌促進は転写レベルで起こることを確認した。さらに、血管新生に関与する因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) および basic fibroblast growth factor (b-FGF) の発現についても検索したところ、Ca-sup 添加後 3 時間に VEGF および b-FGF はコントロールと比較して、それぞれ 6.35 倍および 3.5 倍の遺伝子発現の上昇を認めた。これらの結果から、OSCC 由来 IL-8 によって THP-1 の血管新生活性が亢進することが確認できた。

さらに、IL-8 によって活性化された THP-1 は表現型を M2 タイプへと分化し、血管形成能を高め、癌の増殖促進に関与するという仮説のもと、THP-1 に recombinant IL-8 を添加し 3 時間後、M1 および M2 のマーカーである CD86 および CD163 primer を用いて real-time PCR を行いその表現型を調べた。その結果コントロールと比較し、CD86 の mRNA 発現が有意に増加し、CD163 の発現には顕著な変化が認められなかった。これにより、IL-8 によって活性化された THP-1 は癌の増殖に抑制的に働く M1 タイプへと分化するという予測と反する結果を得た。今回の結果から、M1, M2 には複数のマーカーが存在するため、CD86, CD163 のみで TAMs の分化を確定することは出来ないと考えられた。

OSCC における IL-8 の発現増強に、NF- $\kappa$ B は極めて重要であることが数多く報告されている。そこで、NF- $\kappa$ B 結合部位を含む IL-8 遺伝子の 5'-非翻訳領域を PCR にて増幅し、この領域を pGL4-basic vector の Bam HI 及び Hind III 領域へサブクローニングし reporter plasmid を構築した (wt)。この plasmid を鋳型として NF- $\kappa$ B 結合部位を欠失させた変異体 ( $\Delta\kappa$ B) を構築し Luciferase assay を行った。その結果、Luciferase 活性の Ca-sup 添加による増加は確認されなかった。さらに NF- $\kappa$ B 特異的阻害剤 (TPCK) による pre-incubation が IL-8 産生に全く影響しなかったことから、この反応における転写因子 NF- $\kappa$ B の関与はないものと結論づけた。

Ca-sup 由来の IL-8 によって誘導される THP-1 での IL-8 分泌におけるシグナル伝達経路を明らかにするため、THP-1 を MEK 特異的阻害剤 (U0126) および JNK 阻害剤 (SP600125) で pre-incubation 後、Ca-sup を添加し、培養上清中の IL-8 濃度を ELISA で定量した。その結果 THP-1 の IL-8 分泌は MEK 阻害剤の濃度依存的に低下した。一方、JNK 阻害剤で処理した際には IL-8 の発現に有意な変化は認められなかった。このことから Ca-sup 由来の IL-8 によって誘導される THP-1 における IL-8 分泌には MEK が関与する可能性が示唆された。そこで、Ca-sup 添加 0,1,2,3 時間後の THP-1 における ERK のリン酸化を Western blotting で確認した。その結果、Total ERK1/2 の発現量に変化が認められないのに対し、ERK1/2 のリン酸化は経時的に増加することが分かった。

悪性黒色腫や子宮頸癌では、血管形成における癌細胞とマクロファージの相互作用の重要性がすでに報告されている。しかし、腫瘍由来の IL-8 によってマクロファージの産生する IL-8 が増加することを示した報告はない。本研究では、Ca9-22 による自発的 IL-8 産生を示し、さらに分泌された IL-8 が THP-1 に対して IL-8 分泌を促進することを明らかにした。IL-8 遺伝子発現誘導は様々なシグナル伝達経路によってコントロールされている。本研究において THP-1 における IL-8 産生の増強には、転写因子 NF- $\kappa$ B を介する一般的な経路とは異なり、MAPK を介したシグナル伝達が重要な役割を果たしていることが明らかとなり、THP-1 における IL-8 誘導のメカニズムは OSCC におけるそれとはまったく異なると推測した。

本研究の結果、腫瘍細胞が自ら産生する IL-8 を腫瘍間質に浸潤するマクロファージに作用させ、血管形成能を高めることによって自身の増殖と進展に有利な微小環境を作り出すことが示唆された。