

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

日本大学大学院歯学研究科歯学専攻

西尾 幸奈

(指導：清水 典佳 教授, 浅野 正岳 教授)

目 次

| | |
|---------|--------|
| 概 要 | ………… 2 |
| 緒 言 | ………… 5 |
| 材料および方法 | ………… 6 |
| 成 績 | ………… 9 |
| 考 察 | …………11 |
| 結 論 | …………13 |
| 謝 辞 | …………14 |
| 文 献 | …………15 |
| 基幹論文 | …………18 |

Nishio *et al.* Tumor Biology, 2015 (in press)

概 要

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 大主要癌のうちの一つである。OSCC では NF- κ 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。ヒト歯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- κ 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- κ 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- κ B 結合部位を欠失させた変異体 (Δ κ 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- κ 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- κ 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- κ 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。

なお、本論文は、*Tumor Biology* に掲載予定の基幹論文に THP-1 の表現型に関する遺伝子発現解析を新たな実験データとして加えることによって総括したものである。

緒 言

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 大主要癌のうちの一つ¹⁾である。OSCC においては nuclear factor-kappa B (NF- κ B) をはじめとする多くの転写因子の無秩序な活性亢進によって、interleukin-8 (IL-8) をはじめとして、癌細胞の増殖にとって有利な種々のサイトカインやケモカインが自発的に産生されていることが知られている¹⁾。NF- κ B 活性は前癌病変から浸潤癌になるにつれ徐々に増加することが知られており、発癌過程における重要性が指摘されている²⁻⁵⁾。IL-8 は CXC ケモカインファミリーに属し⁶⁾、血管新生を誘導する⁷⁾。OSCC における IL-8 受容体 CXC motif receptor (CXCR) 1 および CXCR2 の発現については多くの報告があり、IL-8 の受容体への結合は、OSCC 細胞の増殖、遊走、および浸潤を引き起こす⁸⁾とされている。

腫瘍細胞と腫瘍内微小環境の複雑な相互作用は癌の進展と増殖に極めて重要な役割を担っている⁹⁾。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¹⁰⁾。これらのうち、TAMs は M1 および M2 タイプに分類され、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¹⁰⁻¹²⁾。TAMs においても IL-8 受容体が発現しているとする報告は散見される^{13, 14)}が、癌細胞の産生する IL-8 に対する反応性についてはよく知られていない。

そこで本研究では、OSCC に由来する IL-8 が TAMs の血管新生活性にどのような影響を与えるかという点について検討することとした。

材料および方法

1. 細胞培養

THP-1 および Ca9-22 (oral squamous cell carcinoma derived cell line: OSCC) は RPMI1640 培地 (GIBCO) に 10% fetal calf serum (FCS) (Nichirei) および 50 units/ml ペニシリン, 50 $\mu\text{g/ml}$ ストレプトマイシンを添加し (10% FCS-RPMI1640), 37°C, 5% CO₂ 存在下で培養した。

2. 細胞への刺激

Ca9-22 細胞を 6 穴プレート (Iwaki) に 1×10^6 個/well の密度で播種し, 18 時間培養した。その後, 前述の培地で細胞を洗浄し 3,6,9,12 および 24 時間培養した。各時間の培養上清を回収し IL-8 の濃度を酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) にて定量した。6 時間培養後の上清を Ca9-22 culture supernatant (Ca-sup) とした。

THP-1 細胞を 2×10^6 個/ml に調整し 48 穴プレート (Iwaki) に 5×10^5 個/well の密度で播種した。その後 Ca-sup 25 μl を THP-1 に添加しさらに 20 時間培養した。

3. IL-8 の測定

Ca-sup と THP-1 の培養上清中に含まれる IL-8 のタンパク濃度は, 培養上清を遠心分離後, DuoSet ELISA Development System (R&D Systems) で定量した。吸光度の測定は Model 3550 Microplate Reader (Bio Rad) を用いた。

4. Ca-sup 中の IL-8 の免疫沈降法による除去

Ca-sup 300 μl に 400 ng の抗 IL-8 抗体 (R&D Systems) を添加し 4°C, 18 時間 rotation した。コントロールとして IL-8 抗体非添加のものを作成した。その後 10 μl の protein G-sepharose (GE Healthcare) を加えさらに 2 時間 rotation した。最後に 4°C で 1 分間遠心分離し, 上清のみ新しいチューブに回収し, これを IL-8(-),(+)sup とした。上清中の IL-8 濃度は ELISA で定量した。さらに作成したサンプルを前述のように THP-1 に添加した。

5. RNA の抽出と real-time PCR

回収した細胞からの Total RNA の抽出には RNeasy mini kit (QIAGEN) を用いた。RNA の定量は、分光光度計 Nano Drop ND1000 Spectrophotometer (Nano Drop Technologies) を用いて波長 260 nm および 280 nm で吸光度を測定し、RNA の濃度および純度を確認した。抽出した RNA から Superscript III reverse transcriptase (Invitrogen) を用いて cDNA を合成した。real-time PCR には SYBR green (TaKaRa) および Light Cycler nano (Roche) を用いた。なお、本研究で用いた primer 配列を第 1 表に示す。

6. Luciferase assay 用 vector の構築

ヒト大腸癌由来培養細胞株である HT-29 から得られた genomic DNA を用いて、ヒト IL-8 遺伝子の 5'-非翻訳領域 (-133~-1) を PCR にて増幅した。この領域を pGL4-basic vector (Promega) の BamHI および Hind III 領域へ subcloning し、Luciferase reporter plasmid を構築した。この plasmid を wild type (wt) とした。さらに、wt を鋳型として NF- κ B の結合部位を欠失させた変異体 ($\Delta\kappa$ B) を QuikChange Site Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) によって構築した。

7. Luciferase assay

THP-1 への Luciferase reporter plasmid の transfection は Lipofectamine plus Reagent (Life Technologies) を用いて行った。すなわち、THP-1 を OPTI-MEM (Life Technologies) によって 2 回洗浄後、Lipofectamine (1 μ l/well) と plus Reagent (1 μ l/well) (Life Technologies) を用いて、500 ng の reporter plasmid (wt または $\Delta\kappa$ B) を transfection した。3 時間後、細胞を 10% FCS-RPMI1640 で洗浄し、さらに 3 時間培養した。その後新しい培養液を用いて細胞の濃度を 2×10^6 個/ml に調整し 48 穴プレートに 5×10^5 個/well の密度で播種した。Ca-sup (25 μ l) の存在下および非存在下にて 3 時間培養し、培養後の細胞を PBS で洗浄した。細胞を 1x passive lysis buffer (Promega) (65 μ l) を用いて回収し Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) および Lumat LB9507 luminometer (Berthold) を用いて測定した。transfection 効率は pRL/CMV vector (Promega) を co-transfection して renilla luciferase 活性を測定することによって標準化した。

8. Inhibitor assay

THP-1 を各種濃度の NF- κ B 特異的阻害剤 L-1-4'-tosylamino-phenylethyl-chloro-

methyl ketone (TPCK) (Sigma-Aldrich) , mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase (MEK) 阻害剤 (U0126) (promega) , c-Jun N-terminal kinase (JNK) 阻害剤 (SP600125) (promega) 存在下で1時間pre-incubationした。培養後、細胞を洗浄しCa-supを添加し、さらに20時間培養した。培養後、上清を回収し、IL-8濃度をELISAで定量した。

9. Western blotting

THP-1 を Ca-sup 存在下で 0,1,2,3 時間培養した後、PBS で 2 回洗浄した。100 μ l の細胞溶解液 (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl and 0.5% Triton X-100) に懸濁しサンプルとした。タンパク濃度を BioRad protein assay kit (BioRad) によって測定した後、100 μ g を 10% SDS-PAGE によって展開した。Western blotting は通法に従って行った¹⁵⁾。一次抗体として200倍希釈のウサギ抗ヒト total extracellular signal-regulated kinase (ERK) 1/2 抗体 (Santa Cruz) , 200 倍希釈のマウス抗ヒト phosphorylated ERK1/2 抗体 (Santa Cruz) , 10,000 倍希釈のウサギ抗ヒト GAPDH 抗体 (Santa Cruz) を用いた。さらに、二次抗体としては 10,000 倍希釈のヤギ抗マウス IgG 抗体 (Jackson Immuno Research) および 10,000 倍希釈のヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Jackson Immuno Research) を用いた。抗体の希釈は全て 1% BSA-PBST (0.1% tween-20/PBS) を用いた。バンドは Clarity Western ECL Substrate (BioRad) (1 ml) をメンブレンに滴下して検出後、ChemiDoc XRS (BioRad) および Quantity one Version 4.5 (BioRad) を用いて解析を行った。

10. 統計処理

データは平均値と標準偏差で示した。One-way ANOVAおよびStudent's *t* -test によって有意差検定を行った。なお、有意水準は5% 以下とした。全てのデータは SPSS software version 22 (IBM) で解析した。

成 績

1. Ca9-22 からの IL-8 分泌

Ca9-22 の培養上清中に含まれる IL-8 の蓄積量は経時的に増加することが確認できた。IL-8 の分泌は培養後 6 時間 (39 pg/ml) で検出可能となり、24 時間後には 125 pg/ml に達した (第 1 図)。6 時間培養後の上清を Ca-sup として以後の実験に用いた。

2. Ca-sup による THP-1 の IL-8 分泌誘導

Ca-sup の存在および非存在下で THP-1 を刺激すると、Ca-sup 存在下では IL-8 濃度は 1.9 ng/ml まで上昇した (第 2 図 A)。このことが Ca-sup 中の IL-8 によるものである可能性を確認するため、Ca-sup 中の IL-8 を免疫沈降法によって除去した。除去後の IL-8 濃度はコントロール (180 pg/ml) と比較して 2.4 pg/ml と有意に減少した (第 2 図 B)。

さらに、IL-8(+)^{sup} および IL-8(-)^{sup} によって THP-1 を刺激すると、IL-8(+)^{sup} では 2.2 ng/ml であったのに対し、IL-8(-)^{sup} では 0.1 ng/ml と顕著に低下した (第 2 図 C)。

3. IL-8, vascular endothelial growth factor (VEGF) および basic fibroblast growth factor (b-FGF) 分泌の転写レベルでの誘導

IL-8 分泌の誘導が転写レベルでの調節である可能性について real-time PCR を用いて IL-8 の mRNA 発現の変化について検討した。その結果、Ca-sup 刺激によって IL-8 mRNA 発現が経時的に増加することを確認した (第 3 図 A)。発現のピークは 6 時間後に 450 倍に達し、24 時間後にはベースラインまで減少した (第 3 図 A)。さらに、血管新生関連遺伝子である VEGF および b-FGF の発現についても検討した。その結果 VEGF および b-FGF はいずれも、刺激 3 時間後にそれぞれ 6.35 倍および 3.5 倍の遺伝子発現の上昇を認めた (第 3 図 B,C)。

4. THP-1 の表現型の変化

IL-8 刺激後の THP-1 の表現型の変化について、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 によって検索した。その結

果 IL-8 刺激後は、CD86 の mRNA 発現が有意に増加した（第 4 図）のに対し、CD163 の発現増強は認められたものの、有意差は認められなかった（データは示していない）。

5. NF- κ B 非依存的 IL-8 の分泌誘導

IL-8 分泌誘導における NF- κ B の役割を調べるため、NF- κ B の特異的阻害剤である TPCK を用いて検討した。その結果、TPCK は THP-1 における IL-8 誘導に影響しないことが確認された（第 5 図 A）。

次に Luciferase assay によって NF- κ B の関与について検討した。実験に用いた reporter plasmid の構造を第 5 図 B に示す¹⁶⁾。wt を用いた Luciferase assay によって、Ca-sup によって Luciferase 活性の増加がみられないことが明らかとなった。 $\Delta\kappa$ B mutant では全体的な Luciferase 活性の低下が見られたものの、Ca-sup による増強は全く観察されなかった（第 5 図 C）。

6. MEK 依存的 IL-8 分泌誘導

次に、MEK 阻害剤を用いて IL-8 分泌の変化について検討した。その結果、IL-8 分泌は MEK 阻害剤の濃度依存的に著しく低下した（第 6 図 A）。一方、JNK 阻害剤は、IL-8 分泌をわずかに減少した（第 6 図 B）。

Ca-sup 存在下および非存在下に 0,1,2,3 時間 THP-1 を培養し ERK のリン酸化を Western blotting で確認した。Total ERK1/2 の発現量には変化が認められないのに対し、リン酸化 ERK1/2 は刺激 3 時間で有意に増強された（第 6 図 C）。

考 察

OSCCにおけるNF- κ BやAP-1など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産生を誘導し¹⁾、癌細胞自身の増殖と進展に有利に働くと考えられている。癌細胞の増殖のためには低酸素状態において血管を新生することが重要であるが、こうした作用を有するものとしてIL-8やVEGF, b-FGFなどが知られている。IL-8は様々な癌細胞から分泌され、既存の血管の分枝を誘導することで血管新生を促進する¹⁷⁾。一方、腫瘍間質に浸潤するマクロファージはTAMsとよばれ癌の進展にとって全く逆の働きをするM1, M2などの表現型があることが報告されている¹⁰⁻¹²⁾。本研究では、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、癌の増殖促進に関与するという仮説のもと、real-time PCRでその表現型を検討した。その結果予想に反し、M1タイプへ分化誘導される傾向が示唆され、IL-8産生とTAMsの表現型は必ずしも一致しなかった。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。

血管新生における癌細胞とマクロファージの相互作用の重要性は、悪性黒色腫や子宮頸癌でもすでに報告^{18, 19)}されているが、腫瘍細胞由来のIL-8のTAMsに対する効果についての報告はない。本研究では、Ca9-22による自発的IL-8産生の意義に着目し、分泌されたIL-8が単球由来細胞株であるTHP-1のIL-8分泌を促進することを明らかにした。IL-8の受容体であるCXCR1とCXCR2は7回膜貫通型Gタンパク共役受容体に属し^{20, 21)}、マクロファージにおける両分子の発現については多くの報告がある^{13, 14)}。OSCCにおけるIL-8誘導には、転写因子であるNF- κ Bが重要であるとの報告²²⁾に基づき、THP-1においてもNF- κ Bの特異的阻害剤であるTPCKの効果について検討したが、IL-8の分泌には全く影響を及ぼさなかった。このことは、Luciferase assayでも確認され、THP-1とOSCCにおけるIL-8発現誘導メカニズムは全く異なることが示唆された。しかし、real-time PCRによる検索ではIL-8誘導が転写レベルで調節されていることが示され、血管新生関連遺伝子であるVEGFおよびb-FGFの誘導も確認した。

今回用いたIL-8の5'-非翻訳領域(-133~-1)は遺伝子の発現に十分な領域である¹⁶⁾とされているが、本研究の結果、より上流域の関与についても検討する必要があると考えられた。IL-8遺伝子の誘導は多様なシグナル伝達経路によっ

て調節されている¹⁶⁾。本研究において ERK1/2 阻害剤での前処理は IL-8 分泌を有意に抑制したのに加え、Ca-sup 刺激は、明らかな ERK1/2 のリン酸化を誘導した。このことは、MAPK 経路が THP-1 における IL-8 産生誘導に重要な役割を果たしていることを示唆した。Ca-sup による IL-8 誘導のシグナル伝達経路については、さらなる検討が必要であると考えられた。

OSCC における IL-8 受容体の発現はすでに確認されており⁸⁾、IL-8 がオートクライン作用によって癌細胞の遊走や浸潤を促進するとされている^{23, 24)}。さらに、扁平上皮癌患者血清中の IL-8 濃度は上昇していることが知られており²⁵⁾、癌細胞由来の IL-8 は腫瘍間質での TAMs の浸潤に寄与していると考えられ²⁶⁾、IL-8 産生量と癌活性には関連があることを示唆している。本研究において、癌細胞由来の IL-8 がマクロファージの血管新生能を高める可能性が考えられた。IL-8 を介した両細胞の相互作用は、癌の増殖と進展における新たなメカニズムの発見という点で極めて重要と考えられた。

結 論

本研究では OSCC 由来の IL-8 がマクロファージの IL-8 分泌に与える影響およびそのシグナル伝達経路について検討を行った。

その結果以下の結論を得た。

1. OSCC 由来の IL-8 は THP-1 における IL-8 分泌を顕著に増強した。
2. THP-1 における IL-8 誘導は転写レベルで調節されていた。
3. 他の血管新生因子である VEGF および b-FGF についても Ca-sup によって発現が増強された。
4. THP-1 における IL-8 分泌誘導には MAPK 経路が重要な役割を果たしていると考えられた。

以上のことから、OSCC 由来の IL-8 は MAPK 経路を介して腫瘍内微小環境のマクロファージの血管新生活性を高めると考えられた。

謝 辞

稿を終えるにあたり，格別なるご指導を賜りました日本大学歯学部歯科矯正学講座の清水典佳教授に心より感謝申し上げます。

本研究をご指導およびご校閲賜りました日本大学歯学部病理学講座の浅野正岳教授に謹んで深く感謝申し上げます。

最後に本研究にご協力を頂いた日本大学歯学部歯科矯正学講座また日本大学歯学部病理学講座の皆様には感謝いたします。

本研究の一部は，平成 26 年度大学院歯学研究費（学生研究費）の助成によって行われた。

文 献

- 1) Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS. Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2009; 45: 324-334.
- 2) Ondrey FG, Dong G, Sunwoo J, Chen Z, Wolf JS, Crowl-Bancroft CV, Mukaida N, Van Waes C. Constitutive activation of transcription factors NF- κ B, AP-1, and NF-IL6 in human head and neck squamous cell carcinoma cell lines that express pro-inflammatory and pro-angiogenic cytokines. *Mol Carcinog.* 1999; 26: 119-129.
- 3) Bindhu OS, Ramadas K, Sebastian P, Pillai MR. High expression levels of nuclear factor kappa B and gelatinases in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck.* 2006; 28: 916-925.
- 4) Sawhney M, Rohatgi N, Kaur J, Shishodia S, Sethi G, Gupta SD, Deo SV, Shukla NK, Aggarwal BB, Ralhan R. Expression of NF- κ B parallels COX-2 expression in oral precancer and cancer: association with smokeless tobacco. *Int J Cancer.* 2007; 120: 2545-2556.
- 5) Mishra A, Bharti AC, Varghese P, Saluja D, Das BC. Differential expression and activation of NF- κ B family proteins during oral carcinogenesis: Role of high risk human papillomavirus infection. *Int J Cancer.* 2006; 119: 2840-2850.
- 6) Balkwill FR. The chemokine system and cancer. *J Pathol.* 2012; 226: 148-157.
- 7) Richmond A. NF- κ B, chemokine gene transcription and tumour growth. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2: 664-674.
- 8) Watanabe H, Iwase M, Ohashi M, Nagumo M. Role of interleukin-8 secreted from human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Oral Oncol.* 2002; 38: 670-679.
- 9) Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010; 141: 52-67.
- 10) Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A. Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends Immunol.* 2002; 23: 549-555.
- 11) Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell.* 2010; 141: 39-51.

- 12) Mori K, Haraguchi S, Hiromi M, Shimada J, Ohmori Y. Tumor-associated macrophages in oral premalignant lesions coexpress CD163 and STAT1 in a Th1-dominated microenvironment. *BMC cancer*. 2015; 15: 573.
- 13) Waugh DJ, Wilson C. The interleukin-8 pathway in cancer. *Clin Cancer Res*. 2008; 14: 6735-6741.
- 14) Zimmermann HW, Seidler S, Gassler N, Nattermann J, Luedde T, Trautwein C, Tacke F. Interleukin-8 is activated in patients with chronic liver diseases and associated with hepatic macrophage accumulation in human liver fibrosis. *PLoS One*. 2011; 6: e21381.
- 15) Omagari D, Mikami Y, Suguro H, Sunagawa K, Asano M, Sanuki E, Moro I, Komiyama K. Poly I:C-induced expression of intercellular adhesion molecule-1 in intestinal epithelial cells. *Clin Exp Immunol*. 2009; 156: 294-302.
- 16) Hoffmann E, Dittrich-Breiholz O, Holtmann H, Kracht M. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol*. 2002; 72: 847-855.
- 17) Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 727-739.
- 18) Torisu H, Ono M, Kiryu H, Furue M, Ohmoto Y, Nakayama J, Nishioka Y, Sone S, Kuwano M. Macrophage infiltration correlates with tumor stage and angiogenesis in human malignant melanoma: possible involvement of TNF α and IL-1 α . *Int J Cancer* 2000; 85: 182-188.
- 19) Schoppmann SF, Birner P, Stockl J, Kalt R, Ullrich R, Caucig C, Kriehuber E, Nagy K, Alitalo K, Kerjachiki D. Tumor-associated macrophages express lymphatic endothelial growth factors and are related to peritumoral lymphangiogenesis. *Am J Pathol*. 2002; 161: 947-956.
- 20) Oppenheim JJ, Zachariae CO, Mukaida N, Matsushima K. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Annu Rev Immunol*. 1991; 9: 617-648.
- 21) Campbell LM, Maxwell PJ, Waugh DJ. Rationale and means to target pro-inflammatory interleukin-8 (CXCL8) signaling in cancer. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2013; 6: 929-959.
- 22) Shionome T, Endo S, Omagari D, Asano M, Toyoma H, Ishigami T, Komiyama K. Nickel ion inhibits nuclear factor-kappa B activity in human oral squamous cell

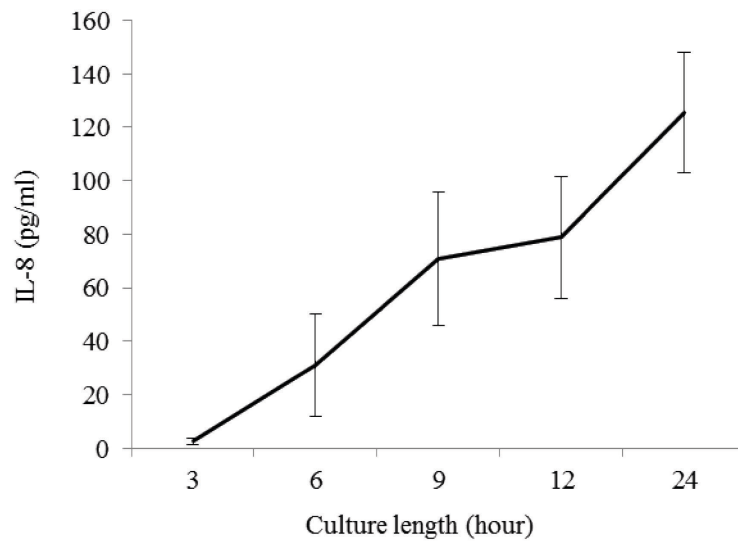
- carcinoma. PLoS ONE. 2013; 8: e68257.
- 23) Singh RK, Gutman M, Radinsky R, Bucana CD, Fidler IJ. Expression of interleukin 8 correlates with the metastatic potential of human melanoma cells in nude mice. *Cancer Res.* 1994; 54: 3242-3247.
 - 24) Kitadai Y, Haruma K, Sumii K, Yamamoto S, Ue T, Yokozaki H, Yasui W, Ohmoto Y, Kajiyama G, Fidler IJ, Tahara E. Expression of interleukin-8 correlates with vascularity in human gastric carcinomas. *Am J Pathol.* 1998; 152: 93-100.
 - 25) Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, Enamorado I, Yeh NT, Kroog GS, Rudy S, McCullagh L, Mousa S, Quezado M, Herscher LL, Van Waes C. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 1999; 5: 1369-1379.
 - 26) Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001; 357: 539-545.

基幹論文

Yukina Nishio, Takahiro Gojoubori, Yasuhide Kaneko, Noriyoshi Shimizu, Masatake Asano. Cancer cell-derived IL-8 induces monocytic THP1 cells to secrete IL-8 via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Tumor Biology*, 2015 (in press)

第1表 用いたプライマーの塩基配列

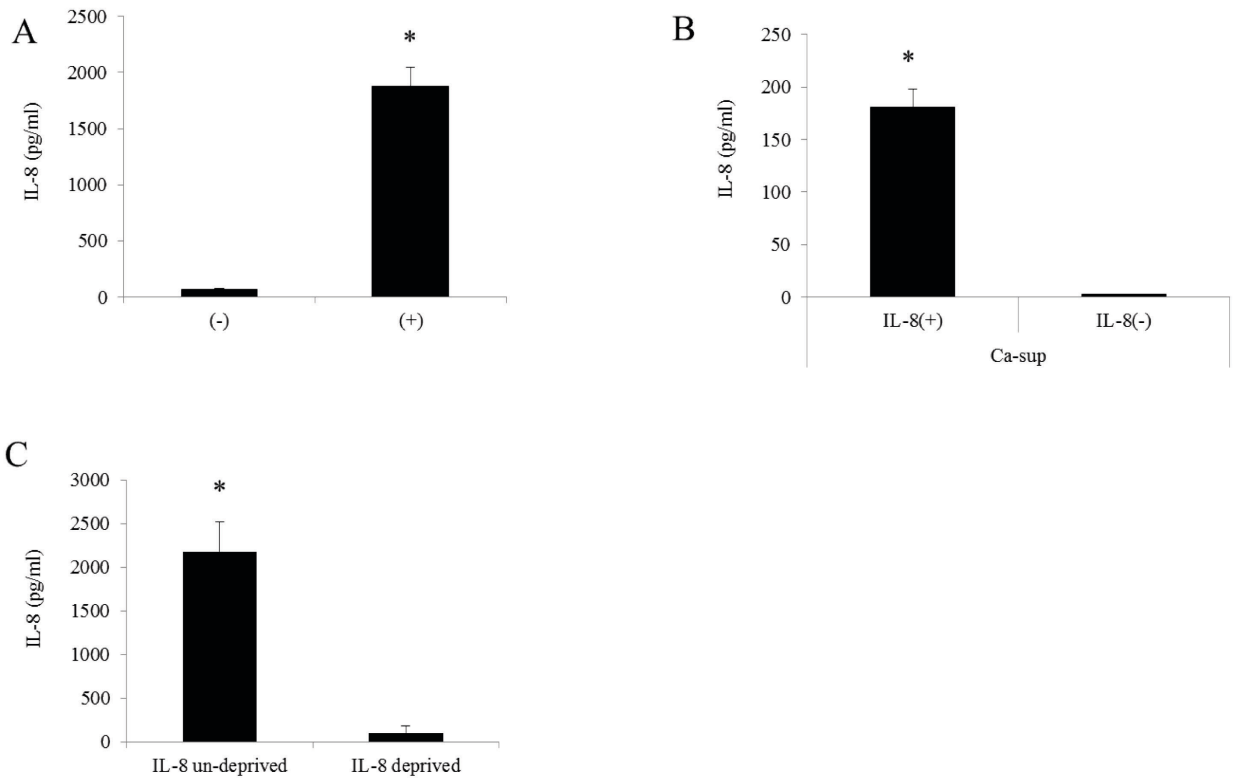
| gene name | Forward primer | Reverse primer | Genbank acc. No. |
|----------------|-------------------------------|----------------------------------|------------------|
| β -actin | 5'-GGAGCAAGTATCTTGAATCTTC-3 | 5'-CCTTCCTGCGCATGGAGTCCTG-3' | NM_007393 |
| IL-8 | 5'-GTGCAGAGGGTTGTGGAGAAGTTT-3 | 5'-ACCAGGAATCTTGTATTGCACTCTGG-3' | NM_000584 |
| VEGF | 5'-ATGTGTGCCGTCTACAGATGT-3' | 5'-GGAAGTGTGATTGGCAAAACTG-3' | NM_005429 |
| b-FGF | 5'-AGTGTGTGCTAACCGTTACCT-3' | 5'-ACTGCCCCAGTTCGTTTCAGTG-3' | NM_002006 |
| CD86 | 5'-CTGCTCATCTATACACGGTTAC-3' | 5'-GGAAAACGTCGTACAGTTCTGTG-3' | NM_175862 |
| CD163 | 5'-GCTGTGGTAACTTGCAATCCTG-3' | 5'-GCAGTAGTGTCCACCCATCA-3' | NM_001297650 |



第1図 Ca9-22からのIL-8分泌

Ca9-22を6穴プレートに播種 (1×10^6 個/well) し、18時間培養した。培養液を新しいものに換えさらに3, 6, 9, 12, 24時間培養した。培養上清を回収しIL-8濃度をELISAで定量した。

データは4回の異なる実験の平均を示す。図中のバーは標準偏差を示す。



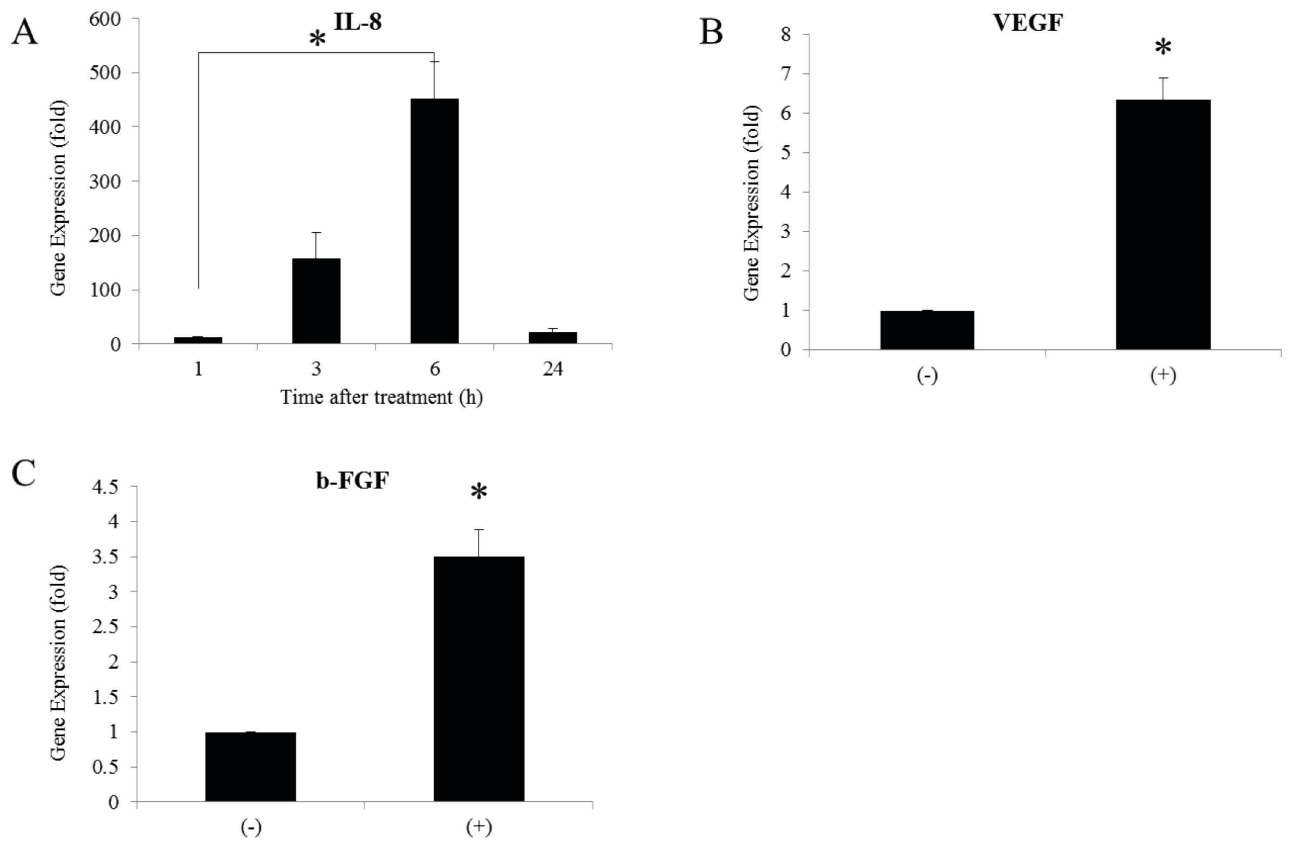
第2図 Ca-supによるTHP-1のIL-8分泌誘導

A: Ca-sup 存在下(+) および非存在下(-) でTHP-1を20時間培養した。培養上清中のIL-8濃度をELISAで定量した。

B: Ca-sup中のIL-8を免疫沈降によって除去した。除去後のCa-sup中のIL-8濃度を示す。

C: THP-1をIL-8(+)supおよびIL-8(-)supによって刺激した。

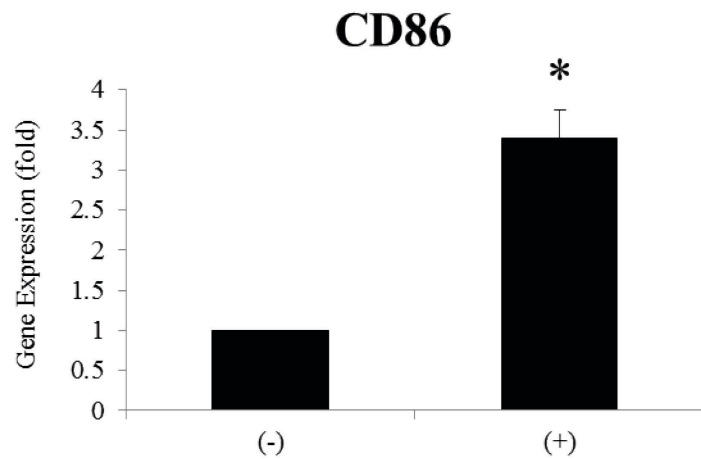
データは4つの異なる実験の平均を示す。図中のバーは標準偏差を示す。 $*p < 0.05$



第3図 IL-8, VEGF および b-FGF 分泌の転写レベルでの誘導

Real-time PCR で IL-8(A), VEGF(B), b-FGF(C) の mRNA 発現の変化を検討した。THP-1 を Ca-sup で 1, 3, 6, 24 時間 (IL-8) あるいは 3 時間 (VEGF および b-FGF) 刺激後のデータを示す。グラフは未刺激の THP-1 における IL-8 mRNA 発現を 1 とした。

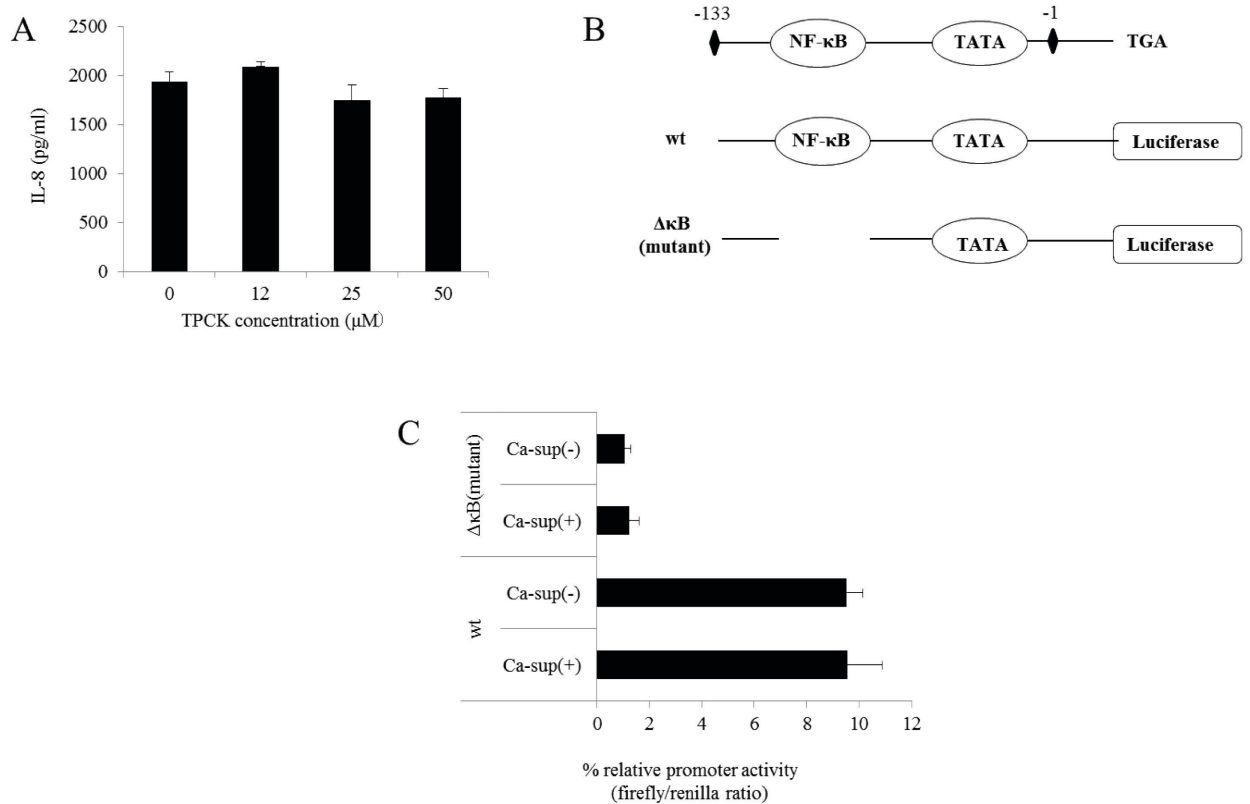
データは異なる 3 回の実験の平均を示す。図中のバーは標準偏差を示す。* $p < 0.05$



第4図 THP-1 の表現型の変化

THP-1 へ recombinant IL-8 (1 ng/ml) を添加し, 3 時間培養した。M1 および M2 タイプのマーカーである CD86 および CD163 primer を用いて real-time PCR を行った。CD86 の結果をグラフに示す。グラフは recombinant IL-8 非存在下に THP-1 を 3 時間培養した際の遺伝子発現を 1 とした。

データは異なる 3 回の実験の平均を示す。図中のバーは標準偏差を示す。* $p < 0.05$



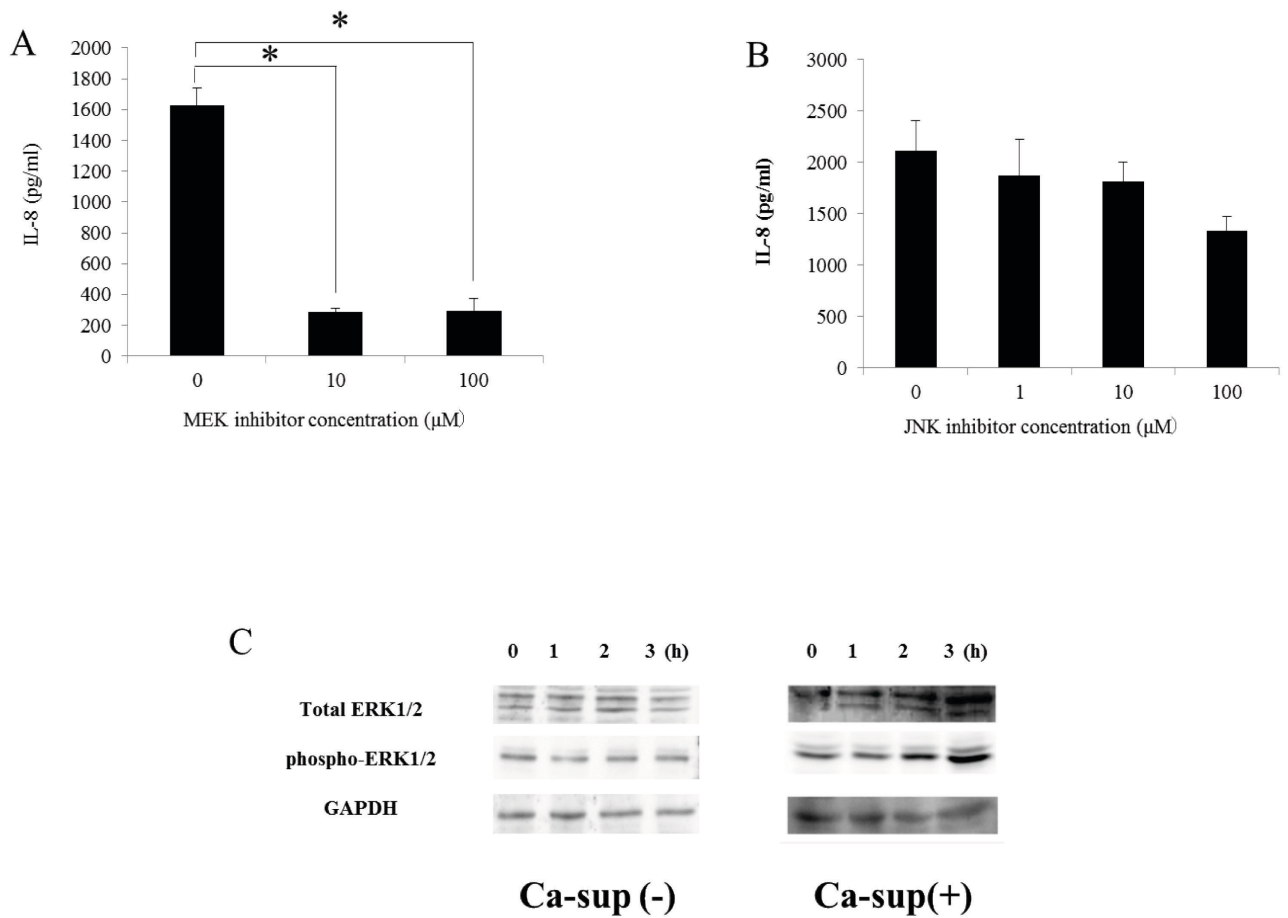
第 5 図 NF- κ B 非依存的 IL-8 の分泌誘導

A: THP-1 を 0, 12.5, 25 および 50 μM の TPCK で 1 時間 pre-incubation した。Ca-sup で 20 時間刺激後の培養上清を回収し、IL-8 濃度を ELISA で定量した。

B: ヒト IL-8 遺伝子の 5'-非翻訳領域 (-133~-1) の構造を図に示す。この領域には NF- κ B 結合領域が 1 箇所含まれる。これを pGL4-basic vector に subcloning したものを wt とした。NF- κ B 結合領域を QuikChange 法によって欠失させたものを $\Delta\kappa\text{B}$ とした。

C: それぞれの reporter plasmid を THP-1 に transfection した。Transfection 後、THP-1 を Ca-sup 存在下(+) および非存在下(-) で 3 時間培養した。その後 Luciferase 活性を測定した。

データは異なる 3 回の実験の平均を示す。図中のバーは標準偏差を示す。



第6図 MEK 依存的 IL-8 分泌誘導

THP-1 を MEK 阻害剤 (0,10,100 μM) (A) および JNK 阻害剤 (0,1,10,100 μM) (B) で 1 時間 pre-incubation した。Ca-sup で 20 時間刺激後の培養上清を回収し、IL-8 濃度を ELISA で定量した。

データは異なる 3 回の実験の平均を示す。図中のバーは標準偏差を示す。* $p < 0.05$
 C: Ca-sup 存在下(右図)および非存在下(左図)に THP-1 を 1,2 および 3 時間培養した。培養後、タンパク量 100 μg の細胞溶解液を用いて Western blot を行った。一次抗体として抗 ERK1/2 抗体 (×200), 抗リン酸化 ERK1/2 抗体 (×200), 抗 GAPDH 抗体 (×10,000) を用いた。