

# Tumor Necrosis Factor $\alpha$ and Interferon $\gamma$ Synergistically Induce Interleukin 8 Production in a Human Gastric Cancer Cell Line through Acting Concurrently on AP-1 and NF-kB-like Binding Sites of the Interleukin 8 Gene

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8425">http://hdl.handle.net/2297/8425</a>

## Tumor necrosis factor $\alpha$ と Interferon $\gamma$ による ヒト胃癌細胞株における相乗的インターロイキン8 産生誘導機序の分子生物学的解析

金沢大学がん研究所外科部 (主任: 磨伊正義教授)

安 本 和 生

(平成5年1月20日受付)

インターロイキン8 (interleukin-8, IL-8) は, 好中球に対して走化性・活性化作用を示すほかに, 好塩基球やTリンパ球に対しても走化作用を有するサイトカインである。IL-8 は, 炎症性サイトカインであるインターロイキン1 (interleukin-1, IL-1), 腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) などの刺激により, 単球/組織マクロファージ・皮膚線維芽細胞・血管内皮細胞・ケラチノサイト・メザンギウム細胞など様々な細胞から産生されることが知られている。本研究では, IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , TNF $\alpha$ +インターフェロンガンマ (interferon gamma, IFN $\gamma$ ) の刺激により, ヒト胃癌細胞株が IL-8 産生誘導能を有するか否かについて検討した。今回用いたヒト胃癌細胞株9株中8株の細胞培養上清中に, 刺激後 IL-8 蛋白の産生誘導がみられることが酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) により確認された。さらに MKN45, KATOIII をはじめ数株で, TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  により IL-8 蛋白の相乗的産生誘導が観察された。そこで MKN45 株を用いて TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による IL-8 遺伝子の相乗的発現調節機序について検討した。IL-8 mRNA の発現について検討したところ, IL-8 mRNA の相乗的発現が観察され, しかも蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキサミドによってもこの相乗的発現は阻害されなかった。さらに, Scatchard 解析から IFN $\gamma$  は MKN45 株の細胞膜上の TNF 受容体の数や親和性に变化を与えないことが判明し, これらの事実から IL-8 遺伝子の相乗的発現誘導がレセプターの変化を介さない受容体以降の細胞内シグナル伝達系の活性化に基づいていることが判明した。さらに, ヒト IL-8 遺伝子発現に関する転写調節領域を含む DNA フラグメントを挿入したクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyl transferase, CAT) 発現プラスミドを MKN45 に遺伝子導入し, 細胞刺激後の CAT 活性を測定したところ TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  により CAT 活性の相乗的誘導が観察された。また, ヒト IL-8 遺伝子上の転写調節領域の突然変異体を用いた CAT アッセイの結果から, ヒト IL-8 遺伝子上の AP-1 および NF- $\kappa$ B 様蛋白認識配列が TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による IL-8 遺伝子の相乗的発現に関与していることが判明した。さらに, ゲルシフトアッセイにより TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  がこれら蛋白認識配列に結合する AP-1 および NF- $\kappa$ B 様蛋白を相乗的に誘導することが判明した。以上から, ヒト胃癌細胞株である MKN45 における TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による相乗的 IL-8 産生誘導は, TNF 受容体の数や親和性の变化を介さない, 転写因子の相乗的活性化に起因するものであることが判明した。

**Key words** インターロイキン8, 胃癌, TNF $\alpha$  と IFN $\gamma$  による相乗効果

従来より, 腫瘍組織内およびその周囲に白血球の存在が指摘されてきたが, この腫瘍浸潤性白血球の臨床学的意義については議論の多いところである<sup>1,2)</sup>。この腫瘍局所に浸潤したTリンパ球の集積密度と患者の予後が相関することから<sup>3)-5)</sup>、近年この腫瘍浸潤リンパ球 (tumor infiltrating lymphocytes, TIL) を試験管内で増量, 活性化させ, 担癌患者に投与する養子免疫療法が試みられている<sup>6)-8)</sup>。一方, 腫瘍拒絶に関与するエフェクター細胞の同定とその腫瘍浸潤機序についての解析から, 免疫ラットへの同系腫瘍移植後の経時的観察では移植後数時間で好中球・単球を主体とする急性炎症が誘発し, 4日目頃には CD4<sup>+</sup> Tリンパ球が, 6日目頃には CD8<sup>+</sup> Tリンパ球が主体となる。このひきつづくリンパ球浸潤には腫瘍局所の好中球が産生する

Tリンパ球遊走因子が関与していることが示唆されている<sup>9,10)</sup>。さらに, ラット同系腫瘍を用いた腫瘍拒絶反応においても, 好中球が反応初期ばかりかエフェクター相においても重要な役割を果たしていることが示唆された<sup>11,12)</sup>。したがって, 抗腫瘍免疫療法を考えるうえで腫瘍局所への白血球浸潤機構を解明することは重要な課題であると思われる。IL-8 は, 好中球・Tリンパ球に対して走化活性を有するサイトカインであり<sup>13,14)</sup>、単球・組織マクロファージ・皮膚線維芽細胞・血管内皮細胞・ケラチノサイト・メザンギウム細胞およびいくつかのヒト腫瘍細胞株など様々なタイプの細胞から産生されることが知られている<sup>13,15)</sup>。しかし, IL-8 は, これら細胞より恒常的には産生されておらず, マイトゲン・レクチン・IL-1・TNF・尿酸結晶・ウイ

Abbreviations: bp, base pair; BSA, bovine serum albumin; CAT, chloramphenicol acetyl transferase; C/EBP, CCAAT/enhancer binding protein; DTT, dithiothreitol; EDTA, ethylenediamine-tetra-acetic acid 2Na; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; FBS, fetal bovine serum; IL, interleukin; IFN, interferon;

ルスをはじめとする種々の刺激により産生が誘導されることが指摘されている<sup>13)</sup>。本研究では、腫瘍部への白血球浸潤機構を解明する第一段階として、感染・サイトカイン治療・免疫補助療法などにより胃癌細胞自らが IL-8 を産生する可能性について検討するために、サイトカイン刺激 (IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ ) によるヒト胃癌細胞株における IL-8 蛋白の産生誘導の有無を試験管内において検討した。今回検討したほとんどの胃癌細胞株が IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  により IL-8 蛋白を産生誘導することが判明した。なかでも数株で TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  により IL-8 蛋白の相乗的産生誘導を認めため、同刺激による転写レベルにおける IL-8 遺伝子の相乗的発現調節機構についても分子生物学的な解析を行った。

### 対象および方法

#### I. 培養細胞株

対象は、ヒト胃癌細胞株 9 株 MKN45<sup>19)</sup>, KATOIII<sup>17)</sup>, NAKAJIMA<sup>18)</sup>, NTAS<sup>19)</sup>, ISLS<sup>20)</sup>, KKLS<sup>21)</sup>, NKPS (金沢大学がん研究所外科, 沢口博士より供与), MATSUURA, HAMADA (高知医科大学, 藤本博士より供与) を 5% 非動化牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Hyclone laboratory, Logan, UT, USA), ペニシリン 100 $\mu$ g/ml, カナマイシン 100 $\mu$ g/ml およびグルタミン 2mM/ml を加えた RPMI 1640 培養液 (日本製薬, 東京) にて 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 下で培養した。MKN45 は肝転移巣よりえられた低分化型腺癌, KATOIII, NTAS は、印環細胞癌, NKPS, NAKAJIMA は、癌性胸膜炎患者の胸水よりえられた低分化型腺癌, KKLS は転移リンパ節巣よりえられた未分化癌, ISLS は、転移リンパ節巣よりえられた中分化型腺癌である。

#### II. RNA の調整およびノーザンブロッティング

全 RNA はグアニジンチオシアネート法により抽出した。全 RNA 各 10 $\mu$ g/ml をホルムアルデヒド 6.5% 加 1% アガロースゲル上で 100V, 3 時間電気泳動後、ニトロセルロースメンブレン (cellulosenitrate, Schleicher & Schuell, Dassel, Germany) にトランスファーした。プローブとして用いた IL-8cDNA およびヒト  $\beta$  アクチンは、<sup>32</sup>P-dCTP をマルチプライム法 (multiprime DNA labeling kit, Amersham, Buckinghamshire, England) で標識した。メンブレンフィルターのハイブリダイゼーションは 42 $^{\circ}$ C で行い、ハイブリダイゼーション液は、5 $\times$  Denhart 液, 50% ホルムアミド, 0.1% Sodium laurylsulfate (SDS), 5 $\times$  SSPE (1 $\times$  SSPE は、0.18M NaCl, 10mM リン酸ナトリウム, pH 7.0, 0.1mM ethylene diamine tetraacetic acid 2Na (EDTA) disodium salt よりなる) の組成からなるものを用いた。16~20 時間ハイブリダイズした後、0.1% SSPE, 0.1% SDS で洗浄し、-80 $^{\circ}$ C でオートラジオグラフィードした。

#### III. ELISA 法<sup>22)</sup>

0.05M 炭酸緩衝液 (pH 9.5) にて 0.5 $\mu$ g/ml に希釈した抗 IL-8 モノクローナル抗体 (WS-4) を 96 穴マルクロータイタープレート (Nunc, Copenhagen, Denmark) に 1 ウェルあたり 100 $\mu$ l づつ注入し、4 $^{\circ}$ C, 一晩インキュベートし固相化後、洗浄液 (0.05% Tween20 加 0.1M リン酸緩衝塩化ナトリウム

(phosphate buffered saline, PBS) (pH 7.4) にて洗浄した後、1% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (和光, 大阪) 加 PBS を 150 $\mu$ l 注入し、37 $^{\circ}$ C, 1 時間反応させブロッキングを行なった。洗浄操作の後、サンプルを加え、一晩 4 $^{\circ}$ C でインキュベートした。洗浄後、2 次抗体として 3% ポリエチレングリコール (和光純薬, 大阪) にて 1 $\mu$ g/ml に希釈した抗ヒト IL-8 ウサギポリクローナル抗体を注入し、2 時間、37 $^{\circ}$ C で反応させた。次にアルカリフォスファターゼ標識した抗ウサギ抗体 (Code 6500, Tago, Inc., Burlingame, CA, USA) を 0.5% 加 PBS にて 1:10000 に希釈し、再度 37 $^{\circ}$ C, 2 時間反応させた。最後に、0.5mM 塩化マグネシウム加 1M ジェタノールアミン (pH 9.8) を 1mg/ml に調整した p-ニトロフェニールリン酸を発色基質として各ウェルに加え、室温にて 30 分反応させた。1N の NaOH にて反応を終了させ、マイクロプレートリーダー (MPR-A4i, 東ソー, 東京) を用いて 405nm における吸光度を測定した。

#### IV. プラスミド

第一エクソン開始部位から 5' 上流域にかけての -1481~+44bp の長さを持つ IL-8 遺伝子上の EcoRI-Hind III フラグメントを PUC19 にサブクローンし、適当な制限酵素で処理後、さらにクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (chloramphenicol acetyl transeferase, CAT) 遺伝子の翻訳開始部位の上流にポリリンカー部位を有する PUX-CAT にサブクローンしてえられた<sup>23)</sup>。

#### V. 遺伝子導入と CAT アッセイ

Tris-HCl 緩衝塩化ナトリウム (Tris-buffered saline, TBS) 1ml とプラスミド 5 $\mu$ g と diethyl aminoethyl-dextran (DEAE デキストラン) の混合液を、TBS にて 2 $\times$ 10<sup>6</sup> 個/ml の濃度に調整後遠心した MKN45 細胞のペレットに加えた。30 分室温でインキュベートしたのち、そのペレットを無血清の RPMI1640 培地に懸濁し、プレートに移し、37 $^{\circ}$ C, 24 時間培養した。培養後各サイトカインで刺激し、さらに 24 時間培養したのち、PBS にて洗浄し、細胞を回収した。超音波ホモジナイザーで細胞を破壊し、遠心後の上清を CAT 活性の測定に用いた。CAT 活性はえられた上清の 50 $\mu$ g を用いて、Gorman らの方法<sup>24)</sup>に従い測定した。シリカゲル薄層クロマトグラフィーで展開後、イメージアナライザーにてアセチル化されたクロラムフェニコールの比率を定量した。

#### VI. DNA フラグメントの調整

以下の DNA フラグメントを調整し、ゲルシフトアッセイに用いた。IL-8 遺伝子上の -83~-69bp の塩基配列 CGTGG-AATTCCT; IL-8 遺伝子上の -133~-166bp の塩基配列, GGAATTCCT; IL-8 遺伝子上の NF-kB 様蛋白認識配列<sup>25)</sup>; 3 $\times$  (GGAATTCCT); イムノグロブリン遺伝子上の NF-kB 結合配列<sup>26)</sup>; 3 $\times$  (GGGACTTCC); IL-8 遺伝子の NF-kB 様蛋白認識配列における突然変異体, 3 $\times$  (TAACTTCCT); AP-1 認識配列<sup>27)</sup>, TGA CTCA; AP-1 認識配列の突然変異体, 3 $\times$  (TATCTCA)

#### VII. ゲルシフトアッセイ

MKN45 細胞を各サイトカインにて 3 時間刺激後、Dignam

MHC, major histocompatibility complex; PBS, phosphate buffered saline; PMA, phorbol myristate 13-acetate; SDS, sodium laurylsulfate; TPA, 12-0-tetra-decanoyl-phorbol-13-acetate; TBS, tris-buffered saline; TNF, tumor necrosis factor; TRE, TPA responsive element

らの方法<sup>28)</sup>に従い核抽出液を調整した。各反応に核抽出液 4 $\mu$ g を用い、DNA 結合緩衝液 (20mM HEPES 緩衝液 pH 7.9, 75mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA, 1mM dithiothreitol (DTT), 10% glycerol, 2% polyvinyl alcohol, poly (dI-dC)·poly (dI-dC) 3 $\mu$ g) と氷上で10分間反応させたのち、IL-8 遺伝子上の -133~-116を末端標識したプローブとさらに30分間室温で反応させた。同様に-83~-69を標識し、DNA 結合緩衝液 (20mM HEPES 緩衝液 pH 7.9, 40mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2mM EDTA, 1mM DTT, 10% glycerol, 2% polyvinyl alcohol, poly (dI-dC)·poly (dI-dC) 3 $\mu$ g) と反応させた。反応後 4%ポリアクリルアミドゲルにて電気泳動後、オートラジオグラフィーした。

Ⅶ. TNF $\alpha$  受容体結合アッセイ

6穴細胞培養プレート (NUNC, Nunc, Denmark) に MKN45 細胞を培養後、IFN $\gamma$  (1000U/ml) で1時間刺激した。その後、培養上清を除去し過剰量の未標識 TNF $\alpha$  の存在下および非存在下にて <sup>125</sup>I 標識 TNF $\alpha$  (49.4 $\mu$ Ci/ $\mu$ g, 1Ci=37GBq, Amersham, code IM 206) を含む 1% BSA, 0.02% NaN<sub>3</sub> 加 RPMI 1640培地 1ml と2時間37℃にて反応させた。1% BSA, 0.02% NaN<sub>3</sub> 加 RPMI 1640液にて洗浄後、0.1% Triton X-100 を含む PBS 緩衝液 3ml を加え細胞を破壊溶解し、 $\gamma$  カウンターにて放射活性を測定し得られた結果を Scatchard 解析した。

成 績

1. ヒト胃癌細胞株からの IL-8 産生誘導

ヒト胃癌細胞株 9 株を対象に、IL-1 $\alpha$  (100U/ml), TNF $\alpha$  (100U/ml), IFN $\gamma$  (1000U/ml), TNF $\alpha$  (100U/ml)+IFN $\gamma$  (1000U/ml) の各刺激後48時間培養後の細胞培養上清中の IL-8 蛋白産生量を ELISA を用いて測定した。図1に示すように、無刺激および IFN $\gamma$  単独刺激ではほとんど IL-8 蛋白の産生誘導はみられなかったが、IL-1 $\alpha$ , TNF $\alpha$ , TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  の刺激により 9 株中 8 株に 1~14ng/ml の範囲で IL-8 蛋白の産生誘導

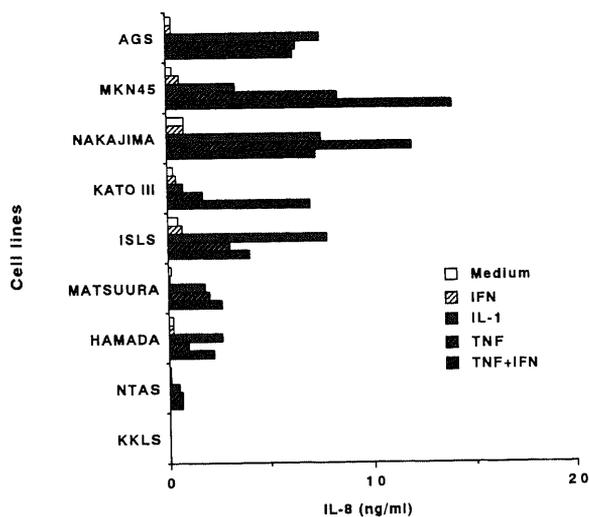


Fig. 1. Levels of IL 8 in culture supernatants from gastric cancer cell line cells stimulated with either IFN $\gamma$  (1000 U/ml), IL-1 $\alpha$  (100 U/ml), TNF $\alpha$  (100 U/ml) or TNF $\alpha$  (100 U/ml) plus IFN $\gamma$  (1000 U/ml) for 48 h. The IL 8 content was measured by ELISA. These data are representative of three independent experiments performed in duplicate.

が観察された。また、TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  刺激による相乗的 IL-8 産生誘導が MKN45, KATO III, MATSUURA, HAMADA の 4 株に観察された。そこでこれら 4 株中もっとも産生量の多かった MKN45 株を用いて IL-8 の相乗的産生誘導機序を分子生物学的に解析した。

図 2 a, b に示すように MKN45 株における IL-8 蛋白の相乗的産生誘導は、IFN $\gamma$  (1000U/ml) の時に TNF $\alpha$  1U 以上で、また TNF $\alpha$  (100U/ml) で一定の時、IFN $\gamma$  10U/ml 以上で観察された。また、TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  刺激 3 時間後より MKN45 細胞培養液中に生物学的に有意な IL-8 蛋白量が産生され、以後 24 時間まで産生量は徐々に増加した。

Ⅱ. MKN45 株細胞培養液中の生物活性を有する IL-8 の同定

各刺激後の MKN45 株細胞培養液をヘパリンカラムをもちいて部分精製し、これらの好中球遊走活性について調べた<sup>29)</sup>。図 3 に示すように IFN $\gamma$  単独では遊走活性は認められなかったが、TNF $\alpha$  の刺激により活性が誘導され、TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  では相乗的に活性は増加した。さらに、これらの好中球遊走活性は IL-8 のモノクローナル抗体 (WS-4) の投与によりほぼ完全に抑

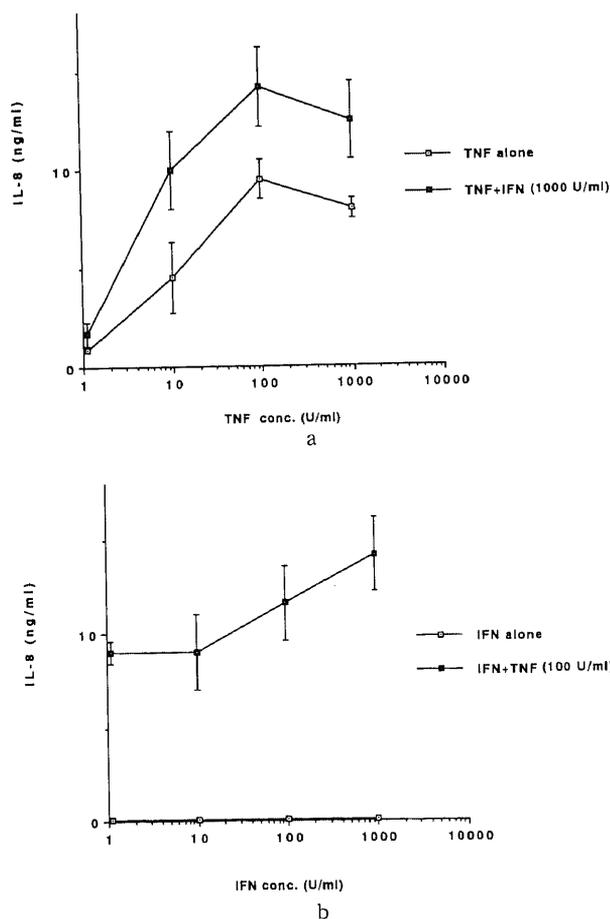


Fig. 2. Synergistic induction of IL 8 production in MKN 45 stimulated with either TNF $\alpha$  (1-1000 U/ml) and IFN $\gamma$  (1000 U/ml) (a) or TNF $\alpha$  (100 U/ml) and IFN $\gamma$  (1-1000 U/ml) (b). Cells were cultured for 48 h and IL 8 content in the culture media was measured by ELISA. These results are representative of three independent experiments performed in duplicate. Data are expressed as mean  $\pm$  SE.

制され、コントロール抗体 (3ZD) の添加では抑制されないことから、MKN45 株より産生誘導された IL-8 蛋白は生物活性を有することが判明し、さらに TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による相乗的 IL-8 産生誘導は生物活性のレベルにおいても確認された。

Ⅲ. MKN45 株における TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による IL-8mRNA の相乗的発現誘導

TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による相乗的 IL-8 産生誘導が IL-8mRNA 発現の増強を伴っているかどうかを検討するために、各刺激後の RNA を調整しノーザンブロッティングを行なった。図 4 に示すように、IFN $\gamma$  単独では IL-8mRNA の発現は誘導されなかつ

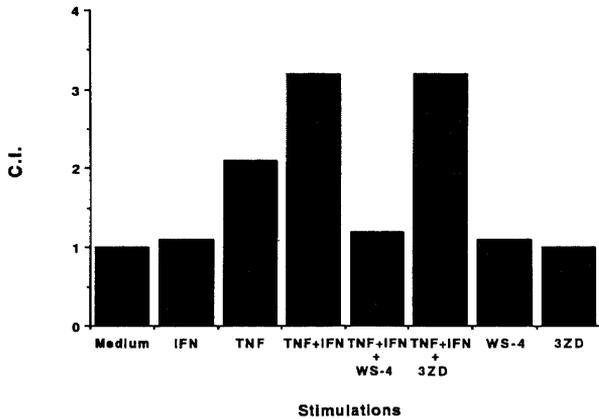


Fig. 3. Neutrophil chemotactic activity in the culture supernatants from MKN 45 stimulated with either IFN $\gamma$  (1000 U/ml), TNF $\alpha$  (100 U/ml) or TNF $\alpha$  (100 U/ml) plus IFN $\gamma$  (1000 U/ml) for 48 h and separated by a heparin-agarose column. Supernatants of MKN 45 stimulated with TNF $\alpha$  plus IFN $\gamma$  were evaluated for chemotaxis in the presence of anti-IL-8 monoclonal antibody (WS-4, 10  $\mu$ g/ml) and control antibody (3ZD, 10  $\mu$ g/ml). The chemotactic index (C. I.) expresses neutrophil chemotactic activity in the culture media of stimulated MKN 45 cells relative to the neutrophil chemotactic activity in media of unstimulated MKN 45 cells. These results are representative of three independent experiments.

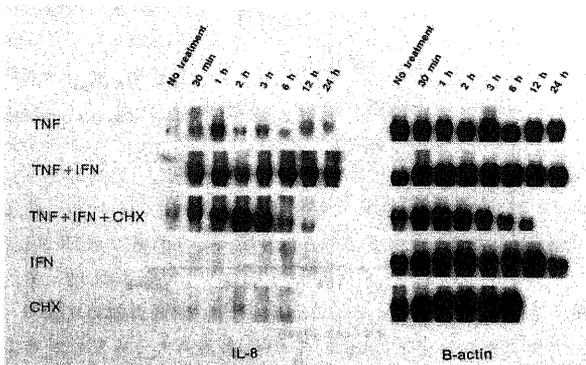


Fig. 4. Time course of the induction of IL 8 mRNA in MKN 45 cells analyzed by Northern blotting analysis. MKN 45 cells were stimulated with either IFN $\gamma$  (1000 U/ml), TNF $\alpha$  (100 U/ml), cycloheximide alone (10  $\mu$ g/ml), TNF $\alpha$  (100 U/mg) plus IFN $\gamma$  (1000 U/ml) or TNF $\alpha$  (100 U/ml) plus IFN $\gamma$  (1000 U/ml) plus cycloheximide (10  $\mu$ g/ml). These results are representative of three independent experiments.

たが、TNF $\alpha$  により IL-8mRNA の発現は観察され、発現は刺激後30分以前より起こり1時間でピークに達した。著者らは、TNF $\alpha$  は 0.1U/ml 以上で IL-8mRNA の発現は観察され、100U/ml で発現はピークになることも既に確認している。TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  により mRNA の発現は TNF $\alpha$  単独に比して 2~3 倍増強し、24時間まで観察された。TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による相乗的 IL-8 産生誘導は、IL-8mRNA の相乗的発現増強を伴うことが判明した。しかも、この相乗的な mRNA の発現が蛋白合成阻害剤であるサイクロヘキサミド (10 $\mu$ g/ml) の投与によっても阻害されないことから TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による相乗的 IL-8 産生誘導には新たな蛋白合成を必要としないことが判明した。

Ⅳ. IFN $\gamma$  による MKN45 細胞膜上の TNF $\alpha$  受容体への影響

TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による相乗効果が IFN $\gamma$  による TNF $\alpha$  受容体の発現増強に起因するか否かを検討するために受容体結合アッセイを行なった。IFN $\gamma$  添加による MKN45 細胞膜上の TNF 受容体への<sup>125</sup>I 標識 TNF $\alpha$  の結合は IFN $\gamma$  非添加時に比べ少なくとも 6 時間の反応では変化がみられないこと、図 4 に示したように TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による IL-8mRNA の相乗的発現が刺激後 1 時間以内から観察されていたので、IFN $\gamma$  処理後の培養時間を 1 時間とした。図 5 の Scatchard プロットが示すように、IFN $\gamma$  処理群および未処理群の間で差はみられず、ともに Kd 値 97pM で、細胞あたりの受容体数は 7000 個であった。これらの結果より、IFN $\gamma$  は MKN45 細胞上の TNF $\alpha$  受容体の数や親和性に変化を与えないことが判明した。すなわち、このヒト胃癌細胞株 MKN45 株における TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による相乗的 IL-8 産生誘導には IFN $\gamma$  による TNF $\alpha$  受容体の発現増強は関与しないことが判明した。

Ⅴ. TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による IL-8 遺伝子の相乗的発現に関与する転写調節領域の同定

TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による IL-8 遺伝子の相乗的発現に関与する 5' 上流域の転写調節領域を決定するために、IL-8 遺伝子上の 5' 上流域の欠失変異体や点突然変異体の DNA フラグメント

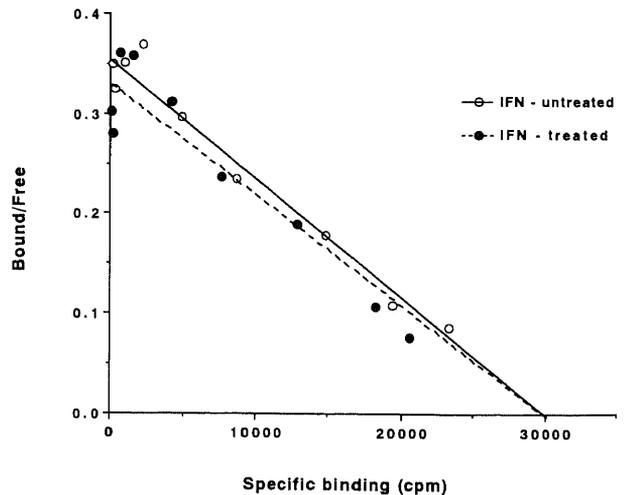


Fig. 5. Scatchard analysis of TNF receptors on untreated (open circles) and IFN $\gamma$ -treated (closed circles) MKN45 cells. Both untreated and IFN $\gamma$ -treated cells were estimated to possess 7,000 receptors per cell with a Kd of 97 pM. These representative data are from one of two independent experiments.

を組み込んだ CAT 発現プラスミドを MKN45 細胞に遺伝子導入し、細胞刺激後の CAT 活性を測定した。5' 上流 -1481bp までの検討において、-161CAT、-133CAT が TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  によりもっとも高い CAT 活性を誘導した。-1481~-161bp の間に抑制性の遺伝子発現調節領域が存在する可能性があるのかもしれない。図 6 に示すように、-133CAT と -120CAT の間で急激に CAT 活性が低下したことから、おそらく -126~-120bp に存在する AP-1 認識配列が TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による IL-8 遺伝子の活性化に重要であることが示唆された。さらに、-94CAT ではわずかに CAT 活性の誘導がみられるのに対し、-85CAT においては完全に活性が消失することから、ヒト線維肉腫細胞株において IL-8 の遺伝子発現上重要とされている、おそらく -94~-81bp に存在する CCAAT 転写調節領域結合蛋白 (CCAAT/enhancer binding protein, C/EBP) 様蛋白認識配列も重要であると考えられた。また、同細胞株において -80~-71bp に存在する NF-kB 様蛋白認識配列も IL-1/TNF/phorbol myristate 13-acetate (PMA) 反応調節領域として C/EBP 配列とともに IL-8 遺伝子発現に

重要であることが同定されており、これら 3 領域の核蛋白認識配列が TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による IL-8 遺伝子の相乗的発現にいかに関与するのかを検討するために各核蛋白が結合能を失う点突然変異体を作成し、細胞刺激後の CAT 活性を測定した。AP-1 および NF-kB 様認識配列における点突然変異体は TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  により誘導された CAT 活性を著明に減少させたが、C/EBP 様認識配列における点突然変異体は活性に影響を与えなかった。これらの結果から、AP-1 および NF-kB 様蛋白認識配列が TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による IL-8 遺伝子の相乗的発現に主に関与することが示唆された。

VI. 転写調節領域に特異的に結合する核蛋白

IL-8 遺伝子の相乗的発現に関与し、これら転写調節領域に特異的に結合する核蛋白を明らかにするために、ゲルシフトアッセイを行なった。まず、ヒト IL-8 遺伝子の 5' 上流領域の NF-kB 様蛋白認識配列が存在する -83~-69 を <sup>32</sup>P で末端標識し DNA プローブとし、3 時間刺激後の核抽出液と反応させた。図 7 a に示すように無刺激および IFN $\gamma$  単独ではバンド II にわずかな複合体の形成をみとめたが、TNF $\alpha$  により新たなバ

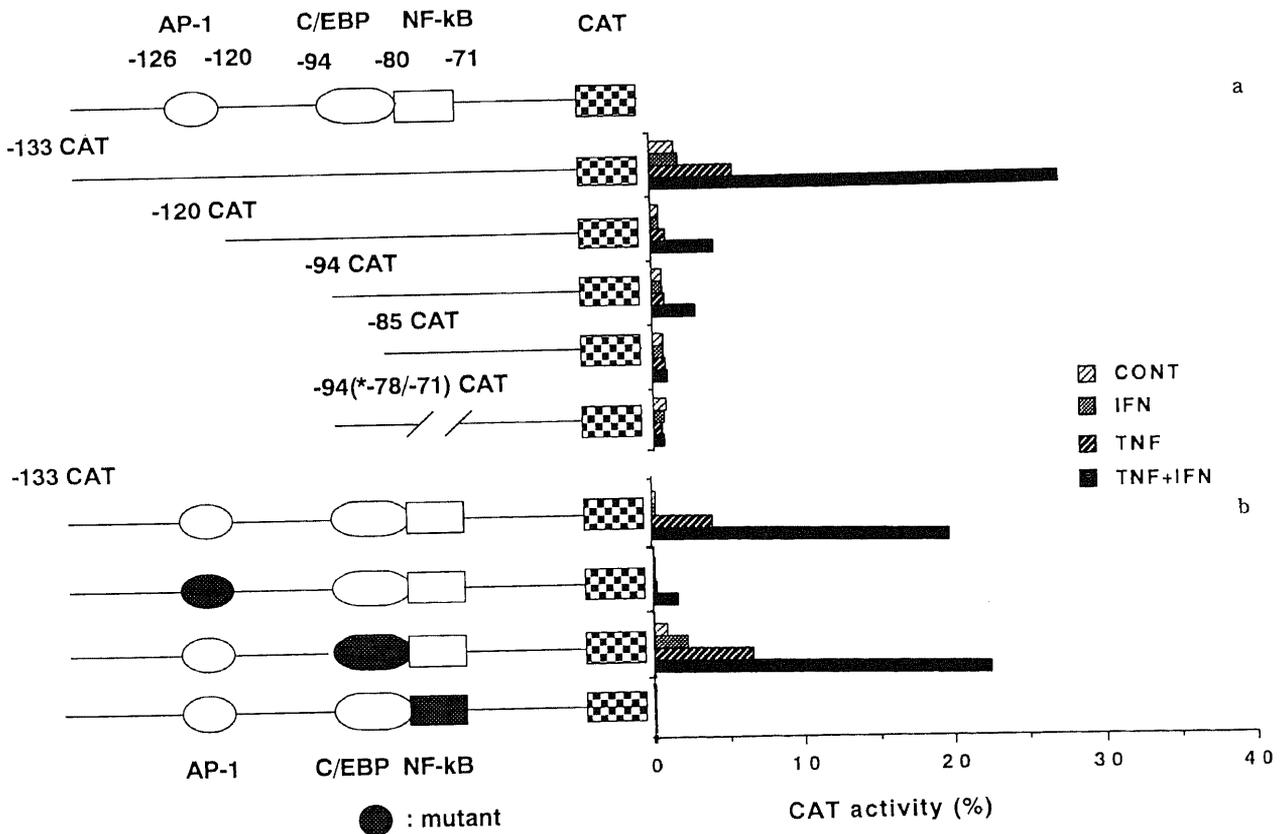


Fig. 6. Determination of enhancer activity using chimeric CAT genes. a, Identification of TNF $\alpha$ /IFN $\gamma$  response elements in the IL 8 gene. Deletion mutants of the 5'-flanking region of the IL 8 gene were inserted into CAT vectors. The chimeric CAT genes were transiently transfected into MKN 45 cells followed by stimulation with either IFN $\gamma$  (1000 U/ml), TNF $\alpha$  (100 U/ml) or TNF $\alpha$  (100 U/ml) plus IFN $\gamma$  (1000 U/ml) for 24 h prior to harvesting the cells for CAT assay. b, The role of the nuclear factor binding sites in conferring the synergistic responsiveness to TNF $\alpha$  plus IFN $\gamma$  stimulation. Several mutant DNAs were synthesized as follows: AP-1 mutant; point mutation in AP-1 binding element from the IL 8 gene (-126 to -120 bp) replacing TGACTCA with TatCTCA, NF-kB mutant; point mutation in NF-kB like factor binding element (-80 to -71 bp) replacing GGAATTCCT with taAcTTTCCT, C/EBP mutant; point mutation in C/EBP like factor binding element (-94 to -81 bp) replacing CAGTTGCAAATCGT with agcTTGCAAATCGT. CAT reporter genes with these synthesized DNAs inserted were transfected into MKN 45 cells and CAT activity was measured using 50  $\mu$ g of cell extract by the method described by Gorman<sup>20</sup>. After thin-layer chromatography, radioactivity was determined by bioimaging analyzer. These results are representative of three independent experiments.

ンド I の形成とバンド II に 2.6 倍の増強が観察された。さらに、 $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\gamma$  でバンド II は変化しないものの、バンド I は  $\text{TNF}\alpha$  刺激に比して 1.7 倍の増強を認めた。これら複合体 I、II は、ヒト IL-8 遺伝子上の NF- $\kappa$ B 様蛋白認識配列や免疫グロブリン  $\kappa$  鎖遺伝子転写因子 (NF- $\kappa$ B) 認識配列のオリゴマーをもちいた競合阻害反応では複合体の形成が完全に阻害されるのに対して、ヒト IL-8 遺伝子上の NF- $\kappa$ B 様蛋白認識配列の突然変異体との反応では阻害されないことから、これら複合体 I、II を形成する核蛋白は NF- $\kappa$ B 様蛋白であると考えられた。また、同様に AP-1 認識配列が存在する -133~-116 を  $^{32}\text{P}$  で末端標識し、DNA プロブとして、ゲルシフトアッセイを行った (図 7 b)。 $\text{IFN}\gamma$  および  $\text{TNF}\alpha$  単独ではバンド III に示す複合体の増強はみられなかったが、 $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\gamma$  により約 2.5 倍の複合体の増強が観察された。この複合体 III は、AP-1 認識配列 (12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) response element, TRE) との競合阻害反応では複合体の形成が完全に阻害されるのに対して、突然変異体との反応では阻害されないことから複合体 III を形成する核蛋白は AP-1 であると考えられた。これらゲルシフトアッセイの結果から、 $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\gamma$  により AP-1 および NF- $\kappa$ B 様核蛋白はそれぞれ相乗的に誘導され、それぞれの転写調節領域に結合し IL-8 遺伝子の相乗的発現をもたらすことが判明した。

## 考 察

### 1. ヒト胃癌細胞からの IL-8 産生誘導の意義

近年の免疫病理組織学的研究により、腫瘍浸潤白血球は T リンパ球が主である、その集積の密度と患者の予後が相関することが胃癌<sup>30)31)</sup>・乳癌<sup>32)33)</sup>・肺癌<sup>32)</sup>・悪性黒色腫<sup>34)</sup>をはじめいくつかの腫瘍において観察されている。しかしながら、腫瘍局所へのリンパ球浸潤機序はまだまだ十分解明されたとはいえない。一方、最近腫瘍局所への好中球の浸潤が、IL-1, PSK, OK-432 をはじめとするサイトカイン・免疫補助療法によってひきおこる抗腫瘍免疫カスケードの引き金となりうること<sup>35)36)</sup>、さらに特異的腫瘍拒絶反応の初期と効果期の両期にわたり好中球が重要な役割を果たすことが示唆されている<sup>11)12)</sup>。

本研究において、ヒト胃癌細胞が試験管内で IL-1 $\alpha$ ,  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\gamma$  の刺激により IL-8 を産生誘導することが判明し、また数株で  $\text{TNF}\alpha + \text{IFN}\gamma$  により相乗的に IL-8 が産生誘導された。IL-8 は、好中球・T リンパ球に走化活性を有するサイトカインである<sup>13)14)</sup>。感染、サイトカイン療法や免疫補助療法によってひきおこる局所あるいは全身の炎症期に、胃癌細胞から産生誘導される IL-8 が腫瘍局所に浸潤する白血球誘導に関与し、ひいては抗腫瘍免疫反応を開始し、腫瘍の増殖や転移をコントロールしている可能性が示唆された。

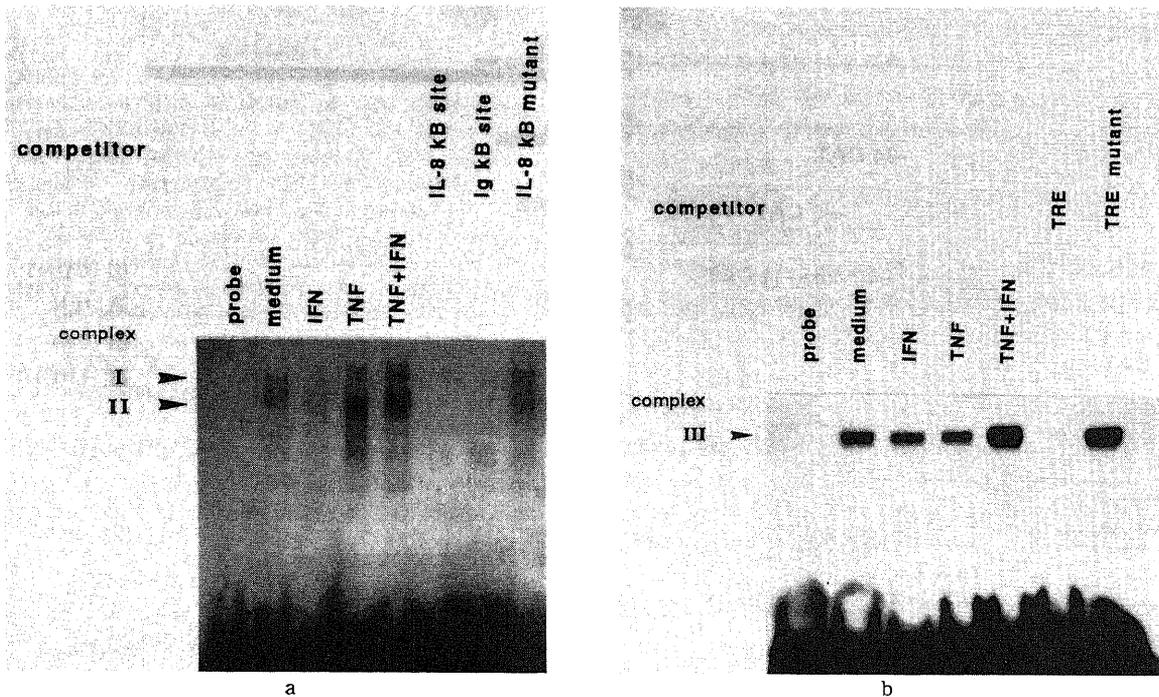


Fig. 7. Gel retardation assay. a, Characterization of nuclear factors binding to the region at -83 to -69 bp in the IL 8 gene.  $^{32}\text{P}$ -labeled DNA fragment (-83/-69 bp) (100  $\mu\text{g}$ , radioactivity  $3 \times 10^4$  cpm) was mixed with 4  $\mu\text{g}$  of nuclear protein extracts from MKN 45 cells stimulated with medium alone (lane 2),  $\text{IFN}\gamma$  (1000 U/ml, lane 3),  $\text{TNF}\alpha$  (100 U/ml, lane 4), and  $\text{TNF}\alpha$  (100 U/ml) plus  $\text{IFN}\gamma$  (1000 U/ml) (lane 5-8) in 20  $\mu\text{l}$  of binding reaction buffer in the presence or the absence of unlabeled DNA fragment. Specific protein/DNA complexes (bands, I and II) are indicated by arrows. b, Characterization of a nuclear factor binding to the region at -130 to -116 bp in the IL 8 gene.  $^{32}\text{P}$ -labeled DNA fragment (-130 to -116 bp) (100  $\mu\text{g}$ ) was mixed with 4  $\mu\text{g}$  of nuclear proteins extracted from MKN 45 cells stimulated with medium alone (lane 2),  $\text{IFN}\gamma$  (1000 U/ml, lane 3),  $\text{TNF}\alpha$  (100 U/ml, lane 4), and  $\text{TNF}\alpha$  plus  $\text{IFN}\gamma$  (lane 5-7) in 20  $\mu\text{l}$  of binding reaction buffer in the presence or the absence of unlabeled DNA fragment. Lane 1: the labeled DNA fragment alone. One DNA/protein complex (designated III) is indicated by the arrow. The mixtures with or without competitors were incubated for 10 min on ice prior to the addition of probes. After a further 30 min of incubation at room temperature, the samples were electrophoresed on a 4% polyacrylamide gel. Gels were dried and autoradiographed, and the retarded DNA/protein complexes were quantitated by a bioimaging analyzer. These results are representative or three independent experiments.

## II. TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$ による IL-8 遺伝子の相乗的活性化機序

従来より、TNF による殺細胞効果をはじめ IFN $\gamma$  による TNF 作用の相乗的増強が様々な生体反応において観察されてきたが<sup>37,38)</sup>、TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による相乗的活性化機序はいずれの実験システムにおいても解明されていない。TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による殺細胞効果の検討で、IFN $\gamma$  による TNF レセプターの発現増強が関与するとの報告もあるが<sup>39,40)</sup>、必ずしもすべての細胞が当てはまるわけではない<sup>41)</sup>。最近、Pober ら<sup>42)</sup>は血管内皮細胞上の主要組織適合遺伝子複合体 (major histocompatibility complex, MHC) クラス I 発現における TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による相乗的発現増強効果について報告し、このなかで TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による相乗効果は IFN $\gamma$  による TNF 受容体の数や親和性の変化に起因するものではなく、MHC クラス I 遺伝子発現における転写の活性化に起因することを明らかにした。今回の検討からも、IFN $\gamma$  は、MKN45 細胞上の TNF 受容体の数や親和性に变化を与えず、TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による IL-8 の相乗的産生誘導が遺伝子の翻訳以前の段階で行なわれていることが明らかとなった。また著者は、mRNA の安定性についても検討を行なったが、IFN $\gamma$  処理および非処理群の間で両者間に差はみられなかった。さらに、サイクロヘキサミドの処理によっても IL-8 mRNA の相乗的発現が阻害されないことから、少なくとも TNF 受容体の新たな合成などの新たな蛋白合成は関与しないと考えられた。

本研究により、胃癌細胞株である MKN45 細胞における TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による IL-8 遺伝子の相乗的活性化に關与する転写調節領域を同定した。先に、ヒト繊維肉腫細胞株、8387細胞においては IL-8 遺伝子の 5' 上流域-94~-71bp (C/EBP および NF-kB 様核蛋白認識配列が存在) が、IL-1 $\alpha$ 、TNF $\alpha$ 、PMA および B型肝炎ウイルス-X による IL-8 遺伝子の転写活性化の際に最小の転写調節領域として同定されていたが<sup>23,43)</sup>、MKN45 細胞では-126~-120bp に存在する AP-1 と NF-kB 様認識配列が TNF $\alpha$  単独刺激同様 TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による相乗的活性化の際にも関与していることが判明した。さらに、今回は示さなかったが、MKN45 細胞においては、IL-1 $\alpha$  や TPA も TNF $\alpha$  と同一の転写調節領域を活性化し IL-8 遺伝子を発現するが、IL-1 $\alpha$ +IFN $\gamma$ 、TPA+IFN $\gamma$  は TNF $\alpha$  にみられたような相乗効果は示さないことを観察しており、IFN $\gamma$  は TNF $\alpha$  のシグナル伝達系を選択的に増幅することが示唆された。一方、ヒト繊維肉腫細胞株、8387細胞において IL-8 遺伝子の転写活性化に必須とされる C/EBP 様認識配列は、MKN45 細胞では欠失変異体や点突然変異体を用いた CAT アッセイの検討からそれほど重要ではないことが判明し、さらに、ゲルソフトアッセイにおいてもこの領域に結合する蛋白は同定されなかった。

IL-1 $\alpha$  や TNF $\alpha$  反応性 IL-8 遺伝子転写調節領域においては、今回検討したヒト胃癌細胞をはじめ肝癌細胞、気管支上皮細胞<sup>44)</sup> などの上皮系由来の細胞では、IL-1 $\alpha$  や TNF $\alpha$  反応性 IL-8 遺伝子転写調節領域は AP-1 と NF-kB 様認識配列が関与するのに対してヒト繊維肉腫細胞・星状細胞腫・神経膠芽細胞腫などでは-94~-71bp に存在する C/EBP および NF-kB 様核蛋白認識配列が関与することから、IL-8 遺伝子転写調節領域はこれら細胞系間で異なり、それら領域に結合する転写因子もまた各細胞系間で異なる可能性が示唆された。細胞系におけるこのような相違は細胞膜上に存在する受容体の数やタイプの違

いに起因するのかもしれない。IL-1 $\alpha$  や TNF $\alpha$  にそれぞれ 2 つのタイプの受容体の存在が報告されており<sup>45,46)</sup>、これらの受容体の細胞膜上の分布の差異も当然考えられる。したがって、これらサイトカインは各細胞系でタイプの異なる受容体に結合し、異なる細胞内シグナル伝達系を活性化し、異なる転写因子を活性化するのかもしれない。一方、転写因子が各細胞系間で異なることはよく知られていることである。たとえ受容体以降同一のシグナル伝達系を活性化したとしても、異なる転写因子が活性化される可能性も考えられる。IL-8 遺伝子発現の転写活性化に關与する転写因子がいかに調節・制御されているのかを明らかにすることは細胞系で異なる転写調節機序の解明につながるものと思われる。

興味深いことに、ゲルソフトアッセイによる解析から、IL-8 遺伝子の転写活性化因子である AP-1 および NF-kB 様核蛋白の両核蛋白は、IL-8 遺伝子の相乗的発現時に相乗的に誘導されることが観察された。以上の結果より、ヒト胃癌細胞 MKN45 細胞における TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による相乗的 IL-8 産生誘導は、IFN $\gamma$  による TNF $\alpha$  受容体の発現増強を介さない、受容体以降のレベルでの IFN $\gamma$  による TNF $\alpha$  細胞内シグナル伝達系の選択的増幅活性化に起因する転写因子の相乗的活性化誘導を通じて、IL-8 遺伝子の相乗的発現がもたらされるものと結論された。

## 結 論

サイトカイン刺激によるヒト胃癌細胞における IL-8 産生誘導能を試験管内にて検討するとともに TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による相乗的 IL-8 産生誘導機序の分子生物学的解析により以下の結果を得た。

1. 今回検討したヒト胃癌細胞株 9 株中 8 株に IL-1 $\alpha$ 、TNF $\alpha$ 、TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  により IL-8 蛋白の産生誘導が観察され、このうち MKN45、KATOIII をはじめ 4 株は TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  により相乗的に IL-8 蛋白を産生誘導した。また、これら誘導された IL-8 蛋白は生物活性を持つことが判明し、TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  により相乗的な生物活性の増強が観察された。感染・サイトカイン治療・免疫補助療法などにより胃癌細胞自らが IL-8 を産生誘導し、主要局所への白血球浸潤の第一段階となる可能性を示唆した。

2. Scatchard 解析から IFN $\gamma$  はヒト胃癌細胞株 MKN45 細胞膜上の TNF $\alpha$  受容体の数や親和性に变化を与えないことが判明し、さらに、mRNA の安定性の検討からも IFN $\gamma$  による IL-8 mRNA の安定化は TNF $\alpha$ +IFN $\gamma$  による mRNA の相乗的発現に關与しないことが明らかとなった。

3. IL-8 遺伝子上の AP-1 と NF-kB 様核蛋白認識配列が IL-8 遺伝子の相乗的活性化に相互に關与するとともに、これら転写調節領域に結合する転写因子 (AP-1 と NF-kB 様核蛋白) も相乗的に誘導活性化されることが判明した。

## 謝 辞

稿を終るにあたり、御指導と御校閲を賜りました恩師磨伊正義教授に深甚なる謝意を表します。また、終始直接の御指導・御助言を賜りました金沢大学がん研究所薬理部松島綱治教授に心より謝意を表します。また多大なる御協力を頂きました金沢大学がん研究所生物物理部村上清史助教授、薬理部田直史助教授をはじめ薬理部教室員の皆様方に深謝致します。なお、本論文の一部は、第51回日本癌学会総会 (1992年大阪)、第22回日本免疫学会総会 (1992年名古屋) において発表した。

## 文 献

- 1) Underwood, J. C.: Lymphoreticular infiltration in human tumours: prognostic and biological implications. *Br. J. Cancer*, **30**, 538-548 (1974).
- 2) Ioachim, H. L.: The stromal reaction of tumors: an expression of immune surveillance. *J. Natl. Cancer Inst.*, **57**, 465-475 (1976).
- 3) Kikuchi, K., Ishii, Y., Ueno, H. & Koshiba, H.: Cell mediated immunity involved in autochthonous tumor rejection in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **276**, 188-206 (1976).
- 4) Ibayashi, Y., Uede, T., Uede, T. & Kikuchi, K.: Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors: differential cytotoxicity of mononuclear cells from tumors of immune and non-immune rats. *J. Immunol.*, **134**, 648-653 (1985).
- 5) Uede, T., Kohda, H., Ibayashi, Y., Osawa, H., Diamantstein, T. & Kikuchi, K.: Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors: differential cytotoxicity of mononuclear cells from tumors of immune and non-immune rats. *J. Immunol.*, **135**, 3243-3251 (1985).
- 6) Rosenberg, S. A.: The development of new immunotherapies for the treatment of cancer using interleukin-2. *Ann. Surg.*, **208**, 121-135 (1988).
- 7) Rosenberg, S. A., Packard, B. S., Aebersold, P. M., Solomon, D., Topalian, S. L., Toy, S. T., Simon, P., Lotze, M. T., Yang, J. C., Seipp, C. A., Simpson, C., Carter, C., Bock, S., Schwartzentruber, D., Wei, J. P. & White, D. E.: Use of tumor infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. *N. Engl. J. Med.*, **319**, 1676-1680 (1988).
- 8) Kradin, R. L., Kurnick, J. T., Lazarus, D. S., Preffer, F. I., Dubinnet, S. M., Pinto, C. E., Gifford, J., Davidson, E., Grove, B., Callahan, R. J. & Strauss, H. W.: Tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in treatment of advanced cancer. *Lancet*, **1**, 577-580 (1989).
- 9) Yamaki, T., Uede, T., Shijubo, N. & Kikuchi, K.: Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors: III. soluble factors involved in the regulation of T lymphocyte infiltration into tumors. *J. Immunol.*, **140**, 4388-4396 (1988).
- 10) Shijubo, N., Uede, T. & Kikuchi, K.: Functional analysis of mononuclear cells infiltrating into tumors: V. a soluble factor involved in the regulation of cytotoxic/suppressor T cell infiltration into tumors. *J. Immunol.*, **142**, 2961-2967 (1989).
- 11) Midorikawa, Y., Yamashita, T. & Sendo, F.: Modulation of the immune response to transplanted tumors in rats by selective depletion of neutrophils in vivo using a monoclonal antibody: abrogation of specific transplantation resistance to chemical carcinogen-induced syngeneic tumors by selective depletion of neutrophils in vivo. *Cancer Res.*, **50**, 6243-6247 (1990).
- 12) Kudo, C., Araki, A., Matsushima, K. & Sendo, F.: Inhibition of IL-8-induced W3/25<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>) T lymphocyte recruitment into subcutaneous tissues of rats by selective depletion of in vivo neutrophils with a monoclonal antibody. *J. Immunol.*, **147**, 2196-2201 (1991).
- 13) Matsushima, K., Baldwin, E. T. & Mukaida, N.: Interleukin-8 and MCAF: novel leukocyte recruitment and activating cytokines. *Chemical Immunol.*, **51**, 236-265 (1992).
- 14) Larsen, C. G., Anderson, A. O., Appella, E., Oppenheim, J. J. & Matsushima, K.: Neutrophils activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes. *Science*, **243**, 1464-1466 (1989).
- 15) Zachariae, C. O. C., Pedersen, K. T. & Matsushima, K.: Expression and secretion of leukocyte chemotactic cytokines by normal human melanocytes and melanoma cells. *J. Invest. Dermatol.*, **97**, 593-599 (1991).
- 16) Hojo, H.: Establishment of cultured cell lines of stomach cancer origin and their morphological characteristics. *Niigata Med. J.*, **91**, 737-751 (1977).
- 17) Sekiguchi, M., Sakakibara, K. & Fujii, G.: Establishment of cultured cell lines derived from a human gastric carcinoma. *Jpn. J. Exp. Med.*, **48**, 61-68 (1978).
- 18) Yanoma, S. & Tsukuda, M.: Establishment and characterization of cultured cell lines derived from a CA19-9-producing human gastric cancer. *Human Cell*, **2**, (3, Suppl.), 93 (1989).
- 19) Sawaguchi, S., Asai, T., Dong, X-S., Tanaka, A., Itoh, T., Deguchi, Y., Ooi, A., Ogino, T. & Mai, M.: Establishment and characterization of a human carcinoma cell line of the stomach (NTAS). *Human Cell*, **2**, (3, Suppl.), 87 (1989).
- 20) Sawaguchi, K., Tanaka, A., Asai, T., Hung, C. D. & Mai, M.: Establishment and characterization of a human carcinoma cell line of the stomach (ISLS). *Human Cell*, **4**, (3, Suppl.), 50 (1991).
- 21) Huang, C. D., Sawaguchi, K., Tanaka, A., Asai, T. & Mai, M.: Establishment and characterization of human undifferentiated carcinoma cell line of the stomach. *Human Cell*, **4**, (3, Suppl.), 51 (1991).
- 22) Ko, Y-C., Mukaida, N., Panyutich, A., Voitenok, N. N., Matsushima, K., Kawai, T. & Kasahara, T.: A sensitive enzyme-linked immunosorbent assay for human interleukin 8. *J. Immunol. Methods*, **149**, 227-235 (1992).
- 23) Mukaida, N., Mahe, Y. & Matsushima, K.: Cooperative interaction of nuclear factor-kB and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J. Biol. Chem.*, **265**, 21128-21133 (1990).
- 24) Gorman, C. M., Moffat, L. F. & Howard, B. H.: Recombinant genomes which express chloramphenicol acetyltransferase in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.*, **2**, 1044-1051 (1982).
- 25) Mukaida, N., Masahiro, S. & Matsushima, K.: Genome structure of the human monocyte-derived neutrophil

- chemotactic factor IL-8. *J. Immunol.*, **143**, 1366-1371 (1989).
- 26) Sen, R. & Baltimore, D.: Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell*, **46**, 705-716 (1986).
- 27) Angel, P., Imagawa, M., Chiu, R., Stein, B., Imbra, R. J., Rahmsdorf, H. J., Jonat, C., Herrlich, P. & Karin, M.: Phorbol ester-inducible genes contain a common cis element recognized by a TPA-modulated trans-acting factor. *Cell*, **49**, 729-739 (1987).
- 28) Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. & Roeder, R. G.: Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucl. Acids Res.*, **11**, 1475-1489 (1983).
- 29) Larsen, C. G., Anderson, A. O., Oppenheim, J. J. & Matsushima, K.: Production of interleukin-8 human dermal fibroblasts and keratinocytes in response to interleukin-1 or tumour necrosis factor. *Immunology*, **68**, 31-36 (1989).
- 30) Watanabe, H., Enjoji, M. & Imai, T.: Gastric carcinoma with lymphoid stroma. Its morphologic characteristics and prognostic correlations. *Cancer*, **38**, 232-243 (1976).
- 31) Minamoto, T., Mai, M., Watanabe, K., Ooi, A., Kitamura, T., Takahashi, Y., Ueda, H., Ogino, T. & Nakanishi, I.: Medullary carcinoma with lymphocytic infiltration of the stomach. *Cancer*, **66**, 945-952 (1990).
- 32) Vose, B. M. & Moore, M.: Suppressor cell activity of lymphocyte infiltrating human lung and breast tumors. *Int. J. Cancer*, **24**, 579-585 (1979).
- 33) Shimokawara, I., Imamura, M., Yamanaka, N., Ishii, Y. & Kikuchi, K.: Identification of lymphocyte subpopulations in human breast cancer tissue and its significance: An immunoperoxidase study with anti-human T- and B-cell sera. *Cancer*, **49**, 1456-1464 (1982).
- 34) Ito, K., Tilden, A. B. & Balch, C. M.: Interleukin 2 activation of cytotoxic T-lymphocytes infiltrating into human metastatic cancer. *Cancer Res.*, **46**, 3011-3017 (1986).
- 35) Ebina, T. & Murata, K.: Antitumor effect of PSK at a distant site: Induction of interleukin-8-like factor and macrophage chemotactic factor in murine tumor. *Jpn. J. Cancer Res.*, **81**, 1307-1313 (1990).
- 36) Ebina, T. & Murata, K.: Antitumor effector mechanism of interleukin-1 $\beta$  at a distant site in the double grafted tumor system. *Jpn. J. Cancer Res.*, **82**, 1292-1298 (1991).
- 37) Williamson, B. D., Carswell, E. A., Rubin, B. Y., Prendergast, J. S. & Old, L. J.: Human tumor necrosis factor produced by human B cell lines: synergistic cytotoxic interaction with human interferon. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 5397-5401 (1983).
- 38) Lee, S. H., Aggarwal, B. B., Rinderknecht, E., Assisi, F. & Chiu, H.: The synergistic anti-proliferative effect of g-interferon and human lymphotoxin. *J. Immunol.*, **133**, 1083-1086 (1984).
- 39) Aggarwal, B. B., Eessalu, T. E. & Hass, P. E.: Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by g-interferon. *Nature*, **318**, 665-667 (1985).
- 40) Tsujimoto, M., Yip, Y. K. & Vilcek, J.: Interferon-g enhances expression of cellular receptors for tumor necrosis factor. *J. Immunol.*, **136**, 2441-2444 (1986).
- 41) Ruggiero, V., Tavernier, J., Fiers, W. & Baglioni, C.: Induction of the synthesis of tumor necrosis factor receptors by interferon-g. *J. Immunol.*, **136**, 2445-2450 (1986).
- 42) Johnson, D. R. & Pober, J. S.: Tumor necrosis factor and immune interferon synergistically increase transcription of HLA class I heavy- and light-chain genes in vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5183-5187 (1990).
- 43) Mahe, Y., Mukaida, N., Kuno, N., Akiyama, M., Ikeda, N., Matsushima, K. & Murakami, S.: Hepatitis B virus X protein transactivates human interleukin-8 gene through acting nuclear factor kB and CCAAT/enhancer-binding protein-like-elements. *J. Biol. Chem.*, **266**, 13759-13763 (1991).
- 44) Nakamura, H., Yoshimura, K., Jaffe, H. A. & Crystal, R. G.: Interleukin-8 gene expression in human bronchial epithelial cells. *J. Biol. Chem.*, **266**, 19611-19617 (1991).
- 45) Tartaglia, L. A. & Goeddel, D. V.: Two TNF receptors. *Immunol. Today*, **13**, 151-156 (1992).
- 46) McMahan, C. J., Slack, J. L., Mosley, B., Cosman, D., Lupton, S. D., Brunton, L. L., Grubin, C. E., Wignall, J. M., Jenkins, N. A., Brannan, C. I., Copeland, N. G., Huebner, K., Croce, C. M., Cannizzarro, L. A., Benjamin, D., Dower, S. K., Spriggs, M. K. & Sims, J. E.: A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types. *EMBO J.*, **10**, 2821-2832 (1991).

**Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  and Interferon  $\gamma$  Synergistically Induce Interleukin 8 Production in a Human Gastric Cancer Cell Line through Acting Concurrently on AP-1 and NF-kB-like Binding Sites of the Interleukin 8 Gene**  
Kazuo Yasumoto, Department of Surgery, Cancer Research Institute, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920—J. Juzen Med Soc., 102, 133—142 (1993)

**Key words** interleukin 8, gastric cancer, synergy between TNF  $\alpha$  and IFN $\gamma$

#### Abstract

Interleukin 8 (IL 8) is a novel cytokine which possesses neutrophil chemotactic and activating activities in addition to chemotactic activity for basophils and T lymphocytes. It has been shown that IL 8 is produced by a variety of human somatic cells including monocytes/macrophages, dermal fibroblasts, vascular endothelial cells, keratinocytes, mesangial cells and several types of tumor cell lines. We have examined here whether or not human gastric cancer cell lines produce IL 8 in vitro. The production of IL 8 protein was detected by enzyme-linked immunosorbent assay in the culture supernatants derived from eight of nine human gastric cancer cell lines stimulated with either interleukin 1  $\alpha$  (IL-1  $\alpha$ ), tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ), or TNF  $\alpha$  plus interferon  $\gamma$  (IFN  $\gamma$ ). In some of the gastric cancer cell lines such as MKN 45 and KATOIII, TNF  $\alpha$  IFN $\gamma$  synergistically induced the production of IL 8. In MKN 45 cells, synergistic increase of the steady state level of IL 8 mRNA by TNF  $\alpha$  plus IFN  $\gamma$  was not inhibited by cycloheximide treatment. Scatchard analysis revealed that IFN  $\gamma$  changed neither the number nor the affinity constant of TNF  $\alpha$  binding sites on a gastric cancer cell line, suggesting that the synergism was a post-receptor event. Furthermore, synergistic induction of chloramphenicol acetyltransferase activity (CAT) by TNF  $\alpha$  plus IFN  $\gamma$  was observed in MKN 45 that were transiently transfected with chimeric CAT reporter genes driven by the transcriptional regulatory region of human IL 8 gene. Through the mutation of the regulatory region of the IL 8 gene, both AP-1 and NF-kB-like factor binding elements were presumed to be involved in conferring the responsiveness to TNF  $\alpha$  plus IFN  $\gamma$ . Moreover, gel retardation analyses revealed that TNF  $\alpha$  and IFN  $\gamma$  synergistically induced the binding of NF-kB-like as well as AP-1-like proteins bound to these sites. These results indicated that IFN  $\gamma$  synergistically enhanced TNF  $\alpha$ -induced IL 8 production in a human gastric cancer cell line through synergistic activation of transcription factors without up-regulating TNF  $\alpha$  receptor.