

# 原発性肺癌におけるインターロイキン8の発現に関する検討

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/2297/9379">http://hdl.handle.net/2297/9379</a>

## 原発性肺癌におけるインターロイキン8の発現に関する検討

金沢大学医学部医学科第一外科学講座 (主任: 渡辺洋宇教授)

菊 地 勤

原発性肺癌細胞株10(腺癌3, 扁平上皮癌3, 小細胞癌4)株, 原発性非小細胞肺癌89例の腫瘍組織, 担癌正常肺組織, および術前に採取された血漿中におけるインターロイキン-8 (interleukin-8, IL-8) およびIL-8受容体B型 (Interleukin-8 receptorB, IL-8RB) の発現を探り, 臨床病理学的諸因子との相関を検討した。肺癌細胞株におけるIL-8 mRNAの発現は, 逆転写PCR法による半定量的解析により, 腺癌2/3株, 扁平上皮癌3/3株, 小細胞癌2/4株で検出され, 発現量は扁平上皮癌が他の組織型に比べ高い傾向を示した。一方, IL-8RB mRNAの発現は, 腺癌1/3株, 扁平上皮癌3/3株, 小細胞癌4/4株で検出され, 発現量は扁平上皮癌が腺癌より有意に高かった ( $P < 0.05$ )。切除標本におけるIL-8蛋白濃度は, ELISA法による測定で正常肺組織に比し腫瘍組織で有意に高値を示した ( $P < 0.01$ )。腫瘍組織内におけるIL-8の局在は, 免疫組織化学的に, 主として腫瘍細胞の細胞質, 腫瘍組織内のマクロファージに確認できた。腫瘍組織中のIL-8蛋白濃度と, 血漿中IL-8蛋白濃度との間には, 有意な正相関が認められた ( $r = 0.25, P < 0.05$ )。組織型別に見ると, 腫瘍組織中のIL-8蛋白濃度は, 扁平上皮癌が腺癌より, また腫瘍径別では3cm超群が3cm以下群より有意に高く (ともに  $P < 0.05$ )。T因子別にはT1, 2症例に比べT3, 4症例で高い傾向があった。腺癌を対象とした場合, 分化度別には高分化に比し低分化で有意に高値を示した ( $P < 0.01$ )。腫瘍内脈管密度と腫瘍組織中のIL-8蛋白濃度との間で相関は認められず, IL-8の原発性非小細胞肺癌における血管新生因子としての意義は確認できなかった。また, 腫瘍の進展に関与するといわれる自己分泌型運動因子受容体 (autocrine motility factor receptor, AMFR) についても, 腫瘍組織中のIL-8蛋白濃度とAMFR発現の有無との間に相関は確認できなかった。以上の結果より原発性肺癌におけるIL-8の発現は, 扁平上皮癌が他の組織型に比し高く, 腫瘍組織で担癌正常肺組織に比し発現が亢進していることが判明した。腺癌においては, 腫瘍の脱分化および進展にIL-8が関与している可能性が示唆された。

**Key words** interleukin-8, interleukin-8 receptor, lung cancer

### 緒 言

抗腫瘍効果を発揮するサイトカインは, インターロイキン8 (interleukin-8, IL-8), 腫瘍壊死因子 (tumor necrotic factor, TNF)- $\alpha$ ,  $\beta$ , インターフェロン (interferon, IFN)- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , インターロイキン1 (interleukin-1, IL-1) などが報告されている<sup>1)</sup>。IL-8は, IL-1, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , リポポリサッカライド (lipopolysaccharide) 等の炎症起因为物質を中心に種々の産生刺激物質の刺激を受け, 好中球, 好酸球, T細胞, 線維芽細胞, 血管内皮細胞, 滑膜細胞, 軟骨細胞, ケラチノサイトなどで産生される<sup>2)</sup>。その標的細胞としては, 好中球, T細胞, 好塩基球, 単球, ケラチノサイトが知られ, 好中球に対しては, 細胞内酵素の放出, 好中球活性化能を有し, さらに好中球の血管内皮細胞への付着も制御するとされている<sup>2)</sup>。さらに, 腫瘍細胞からの産生も確認され, 腫瘍の進展に関与する可能性が指摘されている<sup>3)~8)</sup>。IL-8の腫瘍進展への関与として以下の二つの可能性が考慮される。一つは好中球などを介し間接的に作用し, 腫瘍の増殖を抑制する場合である<sup>9)~11)</sup>。もう一つは, 腫瘍血管新生

を刺激することで腫瘍の増殖・進展を促進する場合である。実際, IL-8の血管新生刺激因子としての機能が報告されている<sup>12)13)</sup>。肺癌におけるIL-8の発現意義は未だ不明確であり, 本研究は, 原発性非小細胞性肺癌症例におけるその発現を評価し, その臨床病理学所見との相関を探った。

### 対象および方法

#### 1. 対 象

1. 肺癌培養細胞株  
ヒト肺癌由来の細胞株として, 腺癌細胞株3種 (PC-3, PC-8, PC-14), 扁平上皮癌細胞株3種 (PC-10, QG-56, QG-95), 小細胞癌細胞株4種 (PC-6, QG-90, NCIH-69, NCIH-82) 計10種類の肺癌細胞株を用いた。

#### 2. 臨床検体

1996年10月から1998年4月までに, 金沢大学医学部第一外科で切除された原発性非小細胞肺癌症例のうち無作為に選択した89症例の腫瘍および担癌正常肺組織の新鮮凍結標本, 術前採取された血漿, およびホルマリン固定パラフィン包埋標本を

平成10年10月8日受付, 平成10年11月26日受理

Abbreviations : AMF, autocrine motility factor; AMFR, autocrine motility factor receptor; BSA, bovine serum albumin; FGF, fibroblast growth factor; IFN, interferon; IL-1, interleukin-1; IL-8, interleukin-8; IL-8RB, interleukin-8 receptorB; PBS, phosphate buffered saline; RT-PCR, reverse transcription-PCR; TNF, tumor necrotic factor; VEGF, vascular endothelial growth factor

用いた。臨床病理学的因子は、金沢大学医学部付属病院中央検査部からの病理報告書をもとに肺癌取り扱い規約<sup>10)</sup>に基づいた。年齢は25～89(平均66.1)歳、性別は男性63例、女性26例であった。組織型別には、腺癌57例、扁平上皮癌23例、大細胞癌5例、腺扁平上皮癌4例であり、病期はⅠ期42例、Ⅱ期11例、Ⅲ期34例、Ⅳ期2例であった。

Ⅱ. ELISAによるIL-8蛋白の測定

1. 末梢血のIL-8蛋白測定

各患者から術前にヘパリン含血5mlを採取し、200×g、5分間遠心分離し、血漿を分離した。IL-8蛋白の測定は、ヒトIL-8 ELISAキット(東レ、東京)を用いた。予め抗ヒトIL-8ポリクローナル抗体のコティングされたマイクロプレートの各ウェルに400μlの洗浄液を満たし、アスピレーター(マイクロプレート・ウォッシャー、フナコシ、東京)を用いて吸引し洗浄した後、各ウェルに緩衝液100μlを入れた。測定サンプルまたはヒトIL-8標準液(0～600pg/ml)50μlを各ウェルに加え、マイクロプレート振盪機を用いて室温で1時間反応させた。3回洗浄後、ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIL-8モノクローナル抗体100μlを入れ、室温で30分間振盪反応を行った。反応後、3回洗浄し、発色液100μlを入れ、室温にて30分間振盪反応を行ない、1N硫酸100μlを加え反応を停止した。モデル550マイクロプレートリーダー(日本バイオ・ラッドラボラトリーズ、東京)にて450nm(対称波長595nm)の吸光度を測定し、標準曲線をもとにサンプル中のIL-8蛋白濃度を算出した。

2. 腫瘍および正常肺のIL-8蛋白測定

組織材料の採取にあたっては、血球成分などの正常細胞混入をできる限り少なくするために、腫瘍塊及び正常肺をリン酸緩衝食塩水(phosphate buffered saline, PBS)(日水製薬、東京)で十分に洗浄し、採取組織周囲に付着する結合織を取り除いた後、腫瘍細胞の実質部分、または肺組織のみを確実に取り出した。組織材料を眼科用鉗でペースト状に細切採取し、組織材料50μgあたり、PBS 2mlを加え、ホモジナイザースタンダード型ドライブユニット(Polytron, Lucerne, Switzerland)で、ジェネレーターシャフト7mmを使用し、十分に懸濁した。その後、1000×g、15分遠心分離し、上清を抽出した。それぞれの上清を、上記ヒトIL-8 ELISAキットを用いてサンプル中のIL-8蛋白濃度を算出した。

Ⅲ. 逆転写PCR反応(reverse transcription-PCR, RT-PCR)

1. RNA抽出

約5mm角の組織片をマイクロームにて、厚さ16μmで約50枚薄切後、アイソジェン(ニッポンジーン、富山)1ml加え、ボルテックスミキサーにて攪拌した後に5分間室温に静置した。クロロホルム(和光純薬)を0.2ml入れ、15秒間激しく攪拌し、2～3分間室温に静置後、4℃、12000×g、15分間遠心し、水相のみを抽出した。2-プロパノール(和光純薬)を0.5ml注入し、5分間室温に静置後、4℃、12000×g、10分間遠心した。上清を捨てた後、75%エタノール(和光純薬、東京)1mlを入れ、ボルテックスミキサーで攪拌し、4℃、7500×g、5分間遠心後、

Table 1. IL-8, IL-8R type B, β<sub>2</sub> microglobulin gene primers used in this study

Primer	Length (base pairs)	Sequence
IL-8		
Sense	21	5'-ATGACTTCCAAGCTGGCCGTG-3'
Antisense	33	5'-TTATGAATTCAGCCCTCTTCAAAAACCTTCTC-3'
IL-8RB		
Sense	22	5'-ATGCTGGTCATCTTATACAGCA-3'
Antisense	13	5'-GGTGTGCGTGTGA-3'
β <sub>2</sub> microglobulin		
Sense	19	5'-ACCCCCACTGAAAAAGATG-3'
Antisense	20	5'-ATCTTCAAACCTCCATGATG-3'

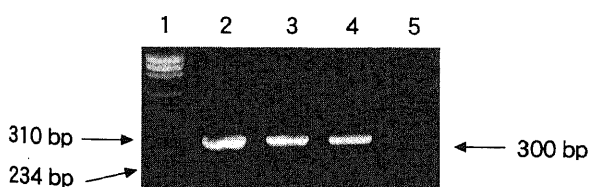


Fig. 1. RT-PCR analysis for IL-8 in cultured human primary lung cancer cell lines. Lane 1, Marker 4 (φX174/HaeIII digest.); Lanes 2, QG90; Lanes 3, QG95; Lanes 4, PC8; Lanes 5, PC10. bp, base pair.

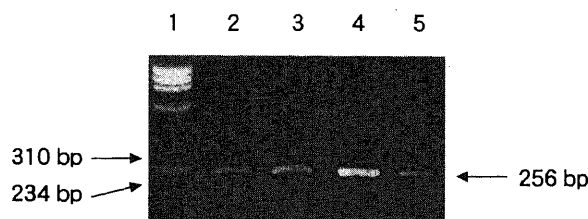


Fig. 2. RT-PCR analysis for IL-8RB in cultured human primary lung cancer cell lines. Lane 1, Marker 4 (φX174/HaeIII digest.); Lanes 2, QG90; Lanes 3, QG95; Lanes 4, PC8; Lanes 5, PC10. bp, base pair.

上清除去し、約7分間真空乾燥した。100 $\mu$ lの滅菌蒸留水にて沈澱を溶解し、200 $\mu$ g/mlのRNA濃度にサンプルを調整した。

## 2. cDNA合成

上記のRNAサンプル5 $\mu$ l (1 $\mu$ g) に、オリゴdT (100 $\mu$ g/ml)

(Gibco BRL, Maryland, USA) を2.5 $\mu$ l入れ、68 $^{\circ}$ C 15分間変性させた後氷冷し、10 $\times$ 逆転写反応緩衝液 (50mM トリス-塩酸 pH8.3, 40mM 塩化カリウム, 8mM 塩化マグネシウム) 2 $\mu$ l, 1% 仔牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (宝酒造, 大

Table 2. Correlations between clinicopathological findings and expression of IL-8 protein in 89 primary non-small cell lung cancer patients

Clinicopathological findings	Number of cases	IL-8 concentration (pg/ml)		
		Tumor	Normal lung	Plasma
Total	89	65.40 $\pm$ 12.88	5.04 $\pm$ 0.62	24.75 $\pm$ 4.48
Sex				
Male	63	85.45 $\pm$ 17.48	5.26 $\pm$ 0.63	25.90 $\pm$ 5.79
Female	26	16.81 $\pm$ 5.36	4.49 $\pm$ 1.48	21.30 $\pm$ 4.49
Histology				
Adenoca.	57	39.82 $\pm$ 9.42	4.53 $\pm$ 0.78	20.39 $\pm$ 2.88
Epidermoid ca.	23	112.64 $\pm$ 39.45	4.79 $\pm$ 1.04	25.26 $\pm$ 5.13
Adenosquamous ca.	4	76.43 $\pm$ 40.76	7.35 $\pm$ 3.36	14.71 $\pm$ 10.76
Large cell ca.	5	130.86 $\pm$ 69.62	10.15 $\pm$ 3.17	71.70 $\pm$ 60.19
Adenoca differentiation				
Well	30	21.43 $\pm$ 6.11	5.21 $\pm$ 1.41	22.83 $\pm$ 4.41
Moderately	14	49.53 $\pm$ 21.12	3.27 $\pm$ 0.63	20.62 $\pm$ 5.34
Poorly	13	71.82 $\pm$ 30.49	4.28 $\pm$ 0.93	15.04 $\pm$ 5.41
Epidermoid ca differentiation				
Well	6	81.66 $\pm$ 40.39	9.55 $\pm$ 2.89	22.63 $\pm$ 9.83
Moderately	11	142.07 $\pm$ 79.30	3.10 $\pm$ 0.86	21.36 $\pm$ 5.62
Poorly	6	89.67 $\pm$ 30.81	3.12 $\pm$ 0.92	35.41 $\pm$ 14.39
Stage				
I, II	53	70.86 $\pm$ 19.52	4.54 $\pm$ 0.83	23.78 $\pm$ 3.17
III, IV	36	57.37 $\pm$ 13.94	5.77 $\pm$ 0.92	26.08 $\pm$ 9.79
T factor				
T1, 2	59	64.31 $\pm$ 17.80	4.30 $\pm$ 0.76	21.23 $\pm$ 2.90
T3, 4	30	67.54 $\pm$ 15.70	6.49 $\pm$ 1.04	30.46 $\pm$ 10.78
N factor				
N0	56	66.40 $\pm$ 18.56	4.99 $\pm$ 0.84	25.25 $\pm$ 3.11
N1<	33	63.70 $\pm$ 14.99	5.11 $\pm$ 0.90	23.99 $\pm$ 10.40
Tumor size				
3cm $\geq$	48	42.84 $\pm$ 10.61	4.43 $\pm$ 0.86	17.96 $\pm$ 2.96
3cm<	41	91.81 $\pm$ 24.59	5.75 $\pm$ 0.90	31.90 $\pm$ 8.55
Lymphatic vessel invasion				
ly0	47	52.24 $\pm$ 11.06	4.99 $\pm$ 1.04	20.91 $\pm$ 3.43
ly1	42	80.12 $\pm$ 24.30	5.09 $\pm$ 0.63	28.20 $\pm$ 7.94
Venous invasion				
v0	59	76.01 $\pm$ 18.48	5.02 $\pm$ 0.84	28.10 $\pm$ 6.66
v1	30	44.54 $\pm$ 11.26	5.07 $\pm$ 0.82	18.67 $\pm$ 3.42
P factor				
P0	47	77.43 $\pm$ 21.99	4.79 $\pm$ 0.92	19.74 $\pm$ 3.12
P1<	42	51.94 $\pm$ 11.77	5.32 $\pm$ 0.82	30.03 $\pm$ 8.56
D factor				
D0	84	68.23 $\pm$ 13.58	5.07 $\pm$ 0.64	25.18 $\pm$ 4.75
D1<	5	17.80 $\pm$ 6.87	4.44 $\pm$ 2.70	18.66 $\pm$ 9.94
PM factor				
PM0	79	69.72 $\pm$ 14.35	4.79 $\pm$ 0.65	26.32 $\pm$ 5.08
PM1<	10	31.23 $\pm$ 13.57	6.95 $\pm$ 1.93	14.36 $\pm$ 5.16
Necrosis				
Negative	67	36.35 $\pm$ 6.76	4.48 $\pm$ 0.71	21.25 $\pm$ 2.74
Positive	22	153.86 $\pm$ 43.33	6.74 $\pm$ 1.22	33.92 $\pm$ 14.59

Adenoca., adenocarcinoma; Epidermoid ca., epidermoid carcinoma; Adenosquamous ca., adenosquamous carcinoma; Large cell ca., large cell carcinoma.

\* p<0.05, \*\* p<0.01.

津) 0.2 $\mu$ l, 2.5mM デオキシリボヌクレオチド三リン酸 (deoxyribonucleotide triphosphate) (宝酒造) 4 $\mu$ l, 0.1M ジチオスレイトール (dithiothreitol) 1 $\mu$ l, RNA分解酵素阻害因子 (RNasin, Promega, Madison, USA) 0.2 $\mu$ l, 逆転写酵素 (reverse trans criptase, サワデー・テクノロジー, 東京) 0.2 $\mu$ l, 滅菌蒸留水 4.9 $\mu$ l を入れ, 合計 20 $\mu$ l とし, 42 $^{\circ}$ C 60 分間反応させて cDNA の合成を行った後, 95 $^{\circ}$ C 5 分間で反応を停止した.

3. PCR 反応

IL-8, IL-8 受容体 B 型 (IL-8 receptor type B, IL-8RB) および補

正用内部コントロールとして  $\beta_2$  ミクログロブリンの mRNA 発現を検出するため, 上記 cDNA サンプル 2 $\mu$ l に, 滅菌蒸留水 14.5 $\mu$ l, PCR 反応緩衝液 (10mM トリス-塩酸 pH8.3, 50mM 塩化カリウム, 1.5mM 塩化マグネシウム) 2 $\mu$ l, dNTP (10mM) 0.4 $\mu$ l, 表 1 に示す塩基配列のセンスおよびアンチセンスプライマー (サワデー・テクノロジー) (20uM) 各 0.5 $\mu$ l ずつ加え, Taq DNA ポリメラーゼ (サワデー・テクノロジー) 0.1 $\mu$ l を入れ合計 20 $\mu$ l とした. これを最初に 94 $^{\circ}$ C で 3 分間熱変性させた後, 94 $^{\circ}$ C 40 秒間の熱変性, 55 $^{\circ}$ C 1 分間のアニリング, 72 $^{\circ}$ C

Table 3. Correlations between clinicopathological findings and expressions of IL-8R tupe B mRNA in 89 primary non-small cell lung cancer patients

Clinicopathological findings	Number of cases	Relative amount ratio <sup>a)</sup>	
		IL-8RB in tumor	IL-8RB in normal lung
Total	89	0.44 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.03
Sex			
Male	63	0.45 $\pm$ 0.04	0.42 $\pm$ 0.04
Female	26	0.42 $\pm$ 0.06	0.38 $\pm$ 0.05
Histology			
Adenoca.	57	0.44 $\pm$ 0.04	0.39 $\pm$ 0.04
Epidermoid ca.	23	0.44 $\pm$ 0.08	0.46 $\pm$ 0.05
Adenosquamous ca.	4	0.66 $\pm$ 0.14	0.69 $\pm$ 0.08
Large cell ca.	5	0.29 $\pm$ 0.11	0.21 $\pm$ 0.12
Stage			
I, II	53	0.44 $\pm$ 0.04	0.40 $\pm$ 0.04
III, IV	36	0.45 $\pm$ 0.06	0.42 $\pm$ 0.05
T factor			
T1, 2	59	0.44 $\pm$ 0.04	0.40 $\pm$ 0.04
T3, 4	30	0.45 $\pm$ 0.07	0.42 $\pm$ 0.06
N factor			
N0	56	0.44 $\pm$ 0.04	0.41 $\pm$ 0.03
N1<	33	0.45 $\pm$ 0.05	0.28 $\pm$ 0.10
Tumor size			
3cm $\geq$	48	0.39 $\pm$ 0.04	0.42 $\pm$ 0.04
3cm<	41	0.50 $\pm$ 0.06	0.41 $\pm$ 0.05
Lymphatic vessel invasion			
ly0	47	0.46 $\pm$ 0.05	0.41 $\pm$ 0.05
ly1	42	0.42 $\pm$ 0.04	0.41 $\pm$ 0.04
Venous invasion			
v0	59	0.44 $\pm$ 0.05	0.41 $\pm$ 0.04
v1	30	0.45 $\pm$ 0.05	0.41 $\pm$ 0.05
P factor			
P0	47	0.41 $\pm$ 0.04	0.42 $\pm$ 0.04
P1<	42	0.47 $\pm$ 0.05	0.40 $\pm$ 0.05
D factor			
D0	84	0.45 $\pm$ 0.03	0.41 $\pm$ 0.03
D1<	5	0.21 $\pm$ 0.09	0.41 $\pm$ 0.11
PM factor			
PM0	79	0.45 $\pm$ 0.04	0.41 $\pm$ 0.03
PM1<	10	0.37 $\pm$ 0.09	0.39 $\pm$ 0.06
Necrosis			
Negative	67	0.45 $\pm$ 0.04	0.41 $\pm$ 0.03
Positive	22	0.41 $\pm$ 0.06	0.42 $\pm$ 0.07

Adenoca., adenocarcinoma; Epidermoid ca., epidermoid carcinoma; Adenosquamous ca., adenosquamous carcinoma; Large cell ca., large cell carcinoma.

<sup>a)</sup> The relative amount ratio of PCR product of each factor to that of  $\beta_2$  microglobulin was calculated using hemiquantitative RT-PCR method.

\* p<0.05.

40秒間のDNA伸張反応を1サイクルとし、Program Temp Control System PC-800 (アステック, 福岡) によって増幅を行った。最後に72℃5分間のDNA伸張反応を行いPCRを終了した。抽出液に色素緩衝液 (和光純薬) を3 $\mu$ l入れた。また、超純水72mlに、アガロースX (和光純薬) 3.2gを溶かし、この中に1 $\mu$ g/mlのエチジウムブロマイド (和光純薬) 8 $\mu$ l, 10 $\times$ トリス-酢酸-EDTA緩衝液8ml加え、4%アガロースゲルを作成した。このゲルにて電気泳動を行い、紫外線照射にて増幅されたDNA断片を検出した。DNAサイズマーカーは、マーカー4 ( $\phi$ X174/*Hae*III分解物, 和光) を用いた。半定量法には、蛍光イメージアナライザー (モレキュラードイナミクスジャパン株式会社, 東京) を使用し内部コントロールとの比を取り半定量した。

培養細胞についても同様にRNAを抽出後、cDNAを作成し、IL-8およびIL-8RBのmRNAの発現を検討した。

RT-PCR法による増幅条件の決定のため、増幅サイクル数を、陽性コントロールに肺癌細胞株QG-56を用い、IL-8はサイクル数15~35回 (15, 20, 25, 30, 35), IL-8RBはサイクル数25~45回 (25, 30, 35, 40, 45),  $\beta_2$ ミクログロブリンはサイクル数15~45回 (15, 20, 25, 30, 35, 40, 45) 各々行い、RT-PCRの定量域を決定した。その結果サイクル数は、IL-8は25回、IL-8RBは35回、 $\beta_2$ ミクログロブリンは25回と決定した。

#### IV. 免疫組織染色法

ホルマリン固定、パラフィン包埋標本を、4 $\mu$ mの厚さに薄切し、シランコーティングスライド (武藤化学, 東京) に付着させ、100%キシレン (和光純薬) にて10分間、3層の脱パラフィンを行った後、100%エタノール3層、90%エタノール、70%エタノール各1層にそれぞれ20回震盪し親水を行い、流水にて1分間水洗した後PBSに浸した。IL-8検出用切片は、5%尿素中で160W相当、5分間、2回のマイクロウェーブ処理を行い、室温まで約20分間放置し、PBSに浸した。自己分泌型運動因子受容体 (autocrine motility factor receptor, AMFR) 検出用切片は5%尿素中で500W、5分間、3回のマイクロウェーブ処理を行った。フォンビルブラント因子 (von Willebrand Factor) 検出用切片は、0.01Mクエン酸緩衝液pH6.0にて500W、5分間、3回のマイクロウェーブ処理を行った。各々の処理の後、3%

過酸化水素加PBSにて15分間の内因性ペルオキシターゼ阻害を行い、10分間流水にて洗浄した。続いて、ウシ血清アルブミン (ダコ・ジャパン, 京都) を用い、10分間非特異的反応のプロッキングを行った。第一抗体として抗ヒトIL-8抗体 (クローン: G265-5, Pharmingen, 藤沢薬品, 大阪) をPBSにて100倍に希釈し、室温で30分間反応させた。抗AMFRモノクローナル抗体 (米国州立KARAMANOSがん研究所 Avraham Raz博士より供与) は、200倍に希釈し、4℃で一晩反応させた。抗ヒトフォンビルブラント因子・ウサギポリクローナル抗体 (ダコ・ジャパン) は、100倍に希釈し、4℃で一晩反応させた。各々の反応後、PBSにて5分間3回洗浄した後、2次抗体としてビオチン標識抗マウス及び抗ウサギイムノグロブリン・ヤギ抗体 (ダコ・ジャパン) を用い室温にて20分間反応させ、PBSにて5分間3回洗浄した。次に、ペルオキシターゼ標識ストレプトアビシン (ダコ・ジャパン) を、室温にて20分間反応させた後、PBSにて5分間3回洗浄した。次に20mg/100mlの四塩酸3,3-ジアミノベンチジン (3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride) (和光純薬) に0.006%の過酸化水素を加えた発色液に入れ、3~7分間顕微鏡で発色状態を確認しながら反応させ、流水水洗を10分間行い反応を停止した。マイヤー・ヘマトキシリン (武藤化学) にて1分間核染色を行い、流水にて色出しを10分間後、エタノール、キシレンにて脱水、透徹を行い、マリノール (武藤化学) で封入した。

IL-8, AMFRの免疫組織染色での判定は、光学顕微鏡を用い定性的に以下のように分類した。腫瘍細胞がまったく染色されな

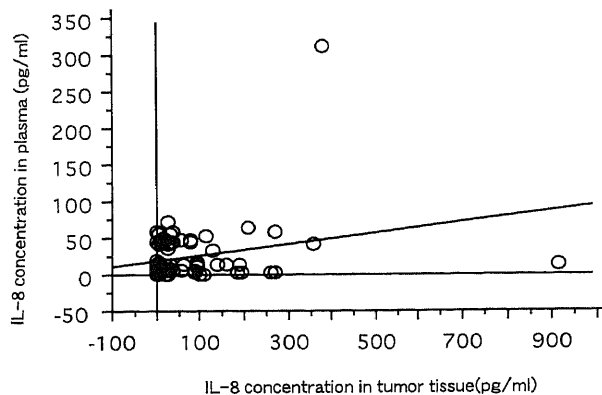


Fig. 3. Correlations between IL-8 contents in tumor tissues and those in corresponding plasma samples in 89 primary non-small cell lung cancer patients ( $Y = 19.35 + 0.07X$ ,  $r = 0.25$ ,  $p < 0.05$ )

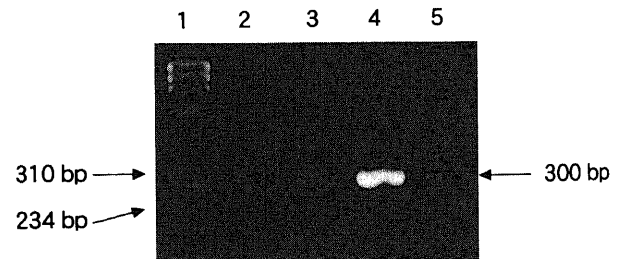


Fig. 4. RT-PCR analysis for IL-8 in human primary non-small cell lung cancers. Lane 1, Marker4 ( $\phi$ X174/*Hae*III digest); Lanes 2 to 5, samples from resected specimens; bp, base pair.

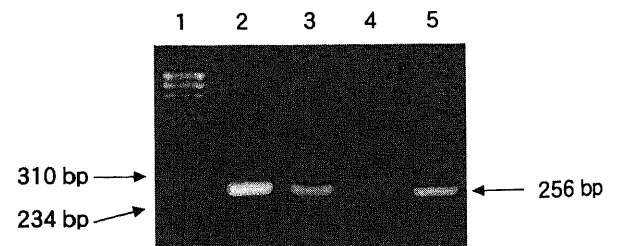


Fig. 5. RT-PCR analysis for IL-8RB in human primary non-small cell lung cancer. Lane 1, Marker4 ( $\phi$ X174/*Hae*III digest); Lanes 2 to 5, samples from resected specimens. bp, base pair.

いもの、および、染色された腫瘍細胞が10%未満のものは陰性とし、腫瘍細胞が10%以上染色された場合を陽性とした。腫瘍内脈管密度の判定はフォンビルブランド因子免疫染色により行った。あらかじめ臨床病理学的背景因子に関する情報を持たな

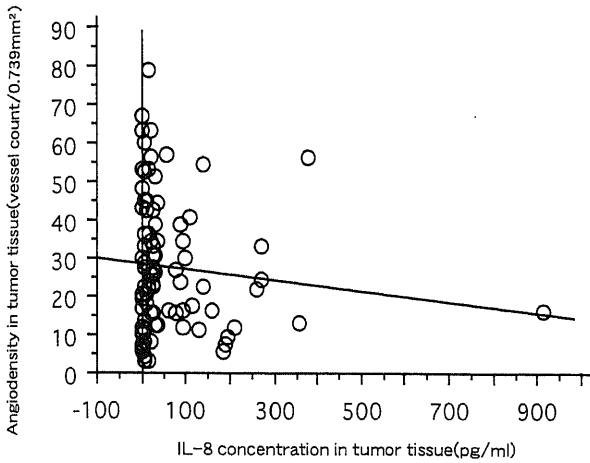


Fig. 6. Correlations between expressions of IL-8 protein and tumor angiogenicity in 89 primary non-small cell lung cancer patients ( $Y = 28.80 - 0.02X$ ,  $r = 0.10$ ,  $p = 0.34$ )

い判定者が、光学顕微鏡下にWeidnerら<sup>19)</sup>の方法に順じて、腫瘍組織中最も血管数の多い3カ所の免疫陽性微小血管数を各々200倍の視野にて算定し、その和の平均値を微小血管密度とした。

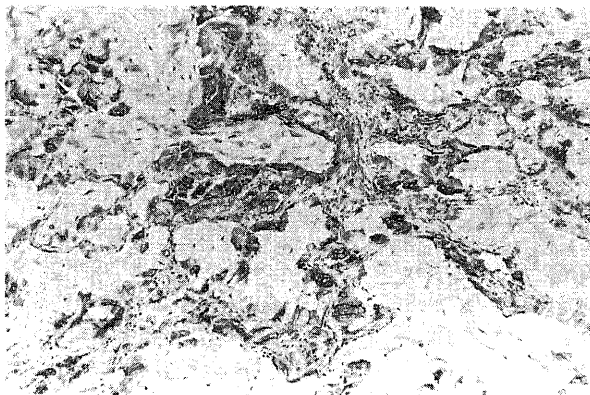
V. 統計学的処理

蛋白の定量とRT-PCR法によるmRNAの測定値は、平均値±標準誤差で示し、有意差検定には、2群の比較にはMann-Whitney検定を、3群以上を比較する場合には、Kruskal-Wallis検定を用いた。離散量に対してはカイ2乗検定を用いた。また、相関性の検討には、回帰関数の検定を用いた。いずれも、危険率(P値)が0.05以下を有意差ありとした。また、相関係数(R値)は、0.2以下は相関関係なし、0.2~0.4は相関関係は弱い、0.4~0.7相関関係あり、0.7以上は強い相関関係ありとした。

成 績

I. 肺癌培養細胞株でのIL-8およびIL-8RB mRNAの発現

IL-8 mRNA発現は、腺癌2/3株、扁平上皮癌3/3株、小細胞癌2/4株で確認でき(図1)、半定量的計測値の平均は、腺癌 $0.59 \pm 0.14$ 、扁平上皮癌 $0.76 \pm 0.25$ 、小細胞癌 $0.20 \pm 0.13$ と、扁平上皮癌で比較的高い傾向を示した。IL-8RB mRNA発現は、腺癌1/3株、扁平上皮癌3/3株、小細胞癌4/4株で確認でき(図2)、測定値の平均は、腺癌 $0.16 \pm 0.16$ 、扁平上皮癌 $0.76 \pm 0.10$ 、小細胞癌 $0.52 \pm 0.23$ で、扁平上皮癌で腺癌より有意に高かった( $P < 0.05$ )。

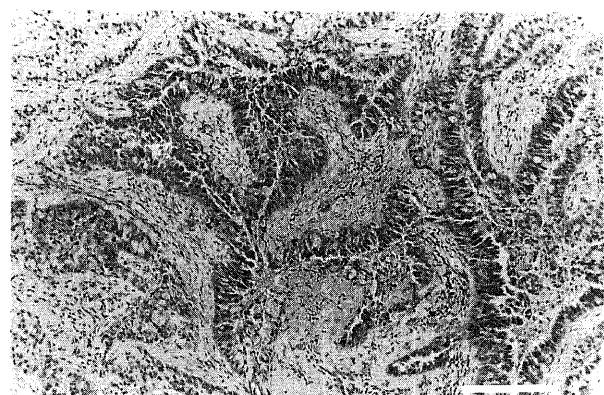


A

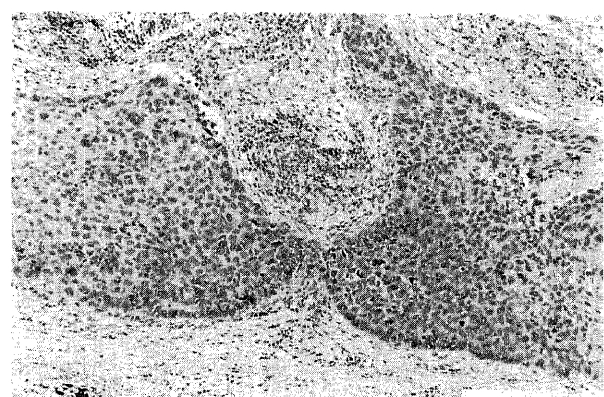


B

Fig. 7. Immunohistochemical staining for IL-8 in adenocarcinoma (A) and epidermoid carcinoma of the lung (B) (magnification  $\times 33$ ) Scale bars,  $200 \mu\text{m}$ .



A



B

Fig. 8. Immunohistochemical staining for AMFR in adenocarcinoma (A) and epidermoid carcinoma of the lung (B) (magnification  $\times 33$ ) Scale bars,  $200 \mu\text{m}$ .

Table 4. Correlations between clinicopathological finding and tumor angiogenesis in 89 primary non-small cell lung cancer patients

Clinicopathological findings	Number of cases	Angiogenesis (vessel count/0.739mm <sup>2</sup> )
Total	89	27.83 ± 1.87
Sex		
Male	63	28.09 ± 2.24
Female	26	27.20 ± 3.46
Histology		
Adenoca.	57	26.48 ± 2.31
Epidermoid ca.	23	30.41 ± 3.84
Adenosquamous ca.	4	19.38 ± 4.67
Large cell ca.	5	38.26 ± 8.83
Adenoca differentiation		
Well	30	21.83 ± 3.22
Moderately	14	30.63 ± 4.16
Poorly	13	32.72 ± 4.74
Epidermoid ca differentiation		
Well	6	32.94 ± 5.62
Moderately	11	30.08 ± 6.85
Poorly	6	28.47 ± 6.56
Stage		
I, II	53	24.53 ± 2.13
III, IV	36	32.70 ± 3.27
T factor		
T1, 2	59	26.52 ± 2.24
T3, 4	30	30.42 ± 3.40
N factor		
N0	56	25.64 ± 2.16
N1<	33	31.56 ± 3.41
Tumor size		
3cm ≥	48	25.17 ± 2.55
3cm <	41	30.96 ± 2.71
Lymphatic vessel invasion		
ly0	47	26.89 ± 2.54
ly1	42	28.89 ± 2.78
Venous invasion		
v0	59	28.18 ± 2.26
v1	30	27.15 ± 3.38
P factor		
P0	47	25.62 ± 2.38
P1<	42	30.31 ± 2.92
D factor		
D0	84	27.77 ± 1.90
D1<	5	28.83 ± 10.43
PM factor		
PM0	79	37.21 ± 1.93
PM1<	10	32.78 ± 6.74
Necrosis		
Negative	67	27.94 ± 2.18
Positive	22	27.52 ± 3.73

Adenoca., adenocarcinoma; Epidermoid ca., epidermoid carcinoma; Adenosquamous ca., adenosquamous carcinoma; Large cell ca., large cell carcinoma.

\* p<0.05.

## II. 肺癌症例での臨床病理所見とIL-8蛋白濃度

全症例での腫瘍内IL-8蛋白濃度の平均は、腫瘍組織65.40 ± 12.88pg/mlに対し、担癌正常肺組織5.04 ± 0.62pg/mlで、腫瘍組織中のIL-8蛋白濃度が有意に高値を示した (P<0.01) (表2)。また扁平上皮癌、腺癌での検討においても腫瘍組織中のIL-8蛋白濃度が正常肺に対して有意に高値を示した (ともにP<0.01)。血漿中のIL-8蛋白の平均濃度は24.75 ± 4.48pg/mlであり、腫瘍組織での蛋白濃度と弱いながらも正の相関を認めた (r = 0.25, P<0.05) (図3)。腫瘍組織におけるIL-8蛋白濃度は、男性で85.45 ± 17.48pg/ml, 女性で16.81 ± 5.36pg/mlと、男性で有意に高値を示した (P<0.01)。組織別では、腺癌39.82 ± 9.42pg/ml, 扁平上皮癌112.64 ± 39.45pg/mlと、扁平上皮癌で腺癌に比して有意に高値を示した (P<0.01)。分化度別でIL-8蛋白濃度を見ると、腺癌では高分化21.43 ± 6.11pg/ml, 中分化49.53 ± 21.12pg/ml, 低分化71.82 ± 30.49pg/mlと、高分化型に比し低分化で有意に高値を示したが (P<0.01)、扁平上皮癌では、分化度別で有意差はなかった。腫瘍最大径別では、3cm以下群42.84 ± 10.61pg/mlに対し、3cm超群91.81 ± 24.59pg/mlと、3cm超群で有意に高値を示した (P<0.05)。腫瘍内壊死所見の有無をみた場合、壊死のない群36.35 ± 6.76pg/mlに対し、壊死のある群が153.86 ± 43.33pg/mlと、壊死のある群が有意に高値を示した (P<0.01)。腺癌においても壊死のない群27.51 ± 6.66pg/mlに対し、壊死のある群が127.78 ± 51.84pg/mlと、壊死のある群が有意に高値を示した (P<0.01)。その他、病期別、T因子別、N因子、ly因子、v因子、P因子、D因子、PM因子については有意差はなかった。

## III. 腫瘍でのIL-8およびIL-8RB mRNAの発現

IL-8 mRNAの発現は (図4)、腫瘍組織で89例中71例 (79.7%) と高頻度に認められ、担癌正常肺においても89例中55例 (61.8%) にみられた。

IL-8RB mRNAの発現は (図5)、腫瘍組織で85/89例 (95.5%)、担癌正常肺組織で84/89例 (94.4%) にみられた。それぞれの半定量的測定値の平均値は、0.44 ± 0.03と0.40 ± 0.03で、腫瘍組織と担癌正常肺組織における発現レベルに有意差はなかった。臨床病理学的因子に付いて検討すると、D因子で、D0群0.45 ± 0.03に対し、D1群が0.21 ± 0.09と、D0群が有意に発現が高かった (表3)

## IV. 腫瘍内脈管密度

腫瘍内脈管密度の平均値は全体として、27.83 ± 1.87であり、組織型別に見ると、腫瘍内脈管密度の平均は、腺癌26.48 ± 2.31, 扁平上皮癌30.41 ± 3.84, 腺扁平上皮癌19.38 ± 4.67, 大細胞癌38.26 ± 8.83であった (表4)。分化度別では、腺癌ではその平均は、高分化21.83 ± 3.22, 中分化30.63 ± 4.16, 低分化32.72 ± 4.74と、高分化に比し中分化および低分化で有意に高値を示したが (P<0.05)、扁平上皮癌では分化度による有意差はなかった。病期別では、I, II期24.53 ± 2.13, III, IV期32.70 ± 3.27と、I, II期に比しIII, IV期に血管数が多い傾向にあった。腫瘍最大径別にみると、3cm以下群25.17 ± 2.55, 3cm超群30.96 ± 2.71と3cm超群に血管数の多い傾向が見られた。腫瘍内脈管密度と腫瘍組織中のIL-8蛋白濃度との間に有意な相関関係は認められなかった (r = 0.07, p = 0.34)。組織型別には、腺癌および扁平上皮癌ともに、両者間の相関はなかった (それぞれr = 0.08, p = 0.60; r = 0.28, p = 0.20) (図6)。



Table 5. Correlations between clinicopathological findings and AMFR expression in 89 primary non-small cell lung cancer patients

Clinicopathological findings	Number of cases	Number (%) of patients with positive AMFR
All	89	38 (38.8)
Adenoca.	57	27 (47.4)
Epidermoid ca.	23	6 (26.1)
Adenosquamous ca.	4	2 (50)
Large cell ca.	5	3 (60)
Adenoca differentiation		
Well	30	15 (50)
Moderately	14	8 (57.1)
Poorly	13	4 (30.8)
Epidermoid ca differentiation		
Well	6	0 (0)
Moderately	11	4 (36.4)
Poorly	6	2 (33.3)

Adenoca., adenocarcinoma; Epidermoid ca., epidermoid carcinoma; Adenosquamous ca., adenosquamous carcinoma; Large cell ca., large cell carcinoma. Well, well differentiated; Moderately, moderately differentiated; Poorly, poorly differentiated.

Table 6. Correlations between IL-8 protein and AMFR expression in 89 primary non-small cell lung cancer patients

Clinicopathological findings	Mean L-8 concentration (pg/ml) in tumors	
	AMFR negative (number)	AMFR positive (number)
Total	61.87 ± 119.41 (51)	70.14 ± 15.16 (38)
Adenoca.	32.42 ± 12.08 (30)	48.04 ± 14.76 (27)
Epidermoid ca.	118.67 ± 52.46 (17)	95.55 ± 35.00 (6)
Adenosquamous ca.	55.52 ± 32.49 (2)	97.35 ± 89.66 (2)
Large cell ca.	27.11 ± 4.43 (2)	200.02 ± 100.86 (3)

Adenoca., adenocarcinoma; Epidermoid ca., epidermoid carcinoma; Adenosquamous ca., adenosquamous carcinoma; Large cell ca., large cell carcinoma.

V. IL-8 と AMFR との免疫組織染色

IL-8 蛋白の染色性は、腫瘍細胞の細胞質に局在がみられ (図7)、分化度別にみた場合、高分化より低分化で強い染まりがみられた。腫瘍組織内での局在性は不均一で、腫瘍組織内のマクロファージに強い染まりが確認された。

AMFR の染色性は、腫瘍細胞の細胞質に局在がみられ、腫瘍組織内の局在性は不均一であり、腫瘍組織内のマクロファージの細胞質にも染色性が確認できた (図8)。

VI. 腫瘍の AMFR 陽性率

AMFR の陽性率は、全体として 42.7% (89 例中 38 例) であり、組織別に見ると、腺癌 47.4% (57 例中 27 例)、扁平上皮癌 26.1% (23 例中 6 例)、腺扁平上皮癌 50% (4 例中 2 例)、大細胞癌 60% (5 例中 3 例) と、腺癌の陽性率が高い傾向にあった (表5)。AMFR 発現別の IL-8 蛋白濃度を比較すると、陽性例 70.1 ± 15.5pg/ml、陰性例 61.9 ± 19.4pg/ml と、IL-8 蛋白濃度と AMFR との間に有意な相関は確認できなかった (表6)。組織別でのそれぞれの IL-8 蛋白濃度の平均は、腺癌で AMFR 陽性例 48.0 ± 14.8pg/ml、陰性例 32.4 ± 12.1pg/ml で両者の間に有意差はなく、扁平上皮癌でも陽性例 95.5 ± 85.7pg/ml、陰性例

118.7 ± 52.5pg/ml と両者の間に有意差はなかった。

考 察

肺癌における IL-8 に関して Yatsunami ら<sup>16)</sup>は、種々の肺癌細胞株の培養上清中に含まれる IL-8 蛋白を ELISA 法で測定した結果、腺癌 7 株中 5 株、扁平上皮癌 4 株中 2 株、大細胞癌 2 株中 1 株で、初代培養気管支上皮あるいは細気管支上皮細胞と同程度の IL-8 産生を認め、小細胞肺癌では 4 株中 1 株にわずかな産生を認めたのみであったと報告している。Mukaida ら<sup>2)</sup>の検討でも小細胞癌における IL-8 の産生の低いことが示されている。石河ら<sup>17)</sup>は、IL-8 の遺伝子発現に関して、癌細胞株 20 株中 16 株、切除癌組織 24 標本中 20 標本で IL-8 mRNA の発現を認めたと報告している。

本研究では、ヒト肺癌培養細胞株 10 株中 7 株で IL-8 mRNA の発現が確認でき、さらに IL-8RB の mRNA は 10 株中 8 株と高率に認められ、特に扁平上皮癌由来の培養細胞では、IL-8 および IL-8RB mRNA の発現はともに 100%、小細胞癌における IL-8 mRNA の発現率は 50% であった。IL-8 および IL-8RB の遺伝子発現は、非小細胞癌、とりわけ扁平上皮癌に高頻度にみられる

可能性が示唆された。

IL-8蛋白の腫瘍に対する作用は、腫瘍増殖を抑制するとの報告と、促進するとの報告に分れ未だ統一の見解が得られない。Wangら<sup>9)</sup>は、IL-8蛋白高産生株に抗IL-8抗体を投与することで、腫瘍増殖が促進され、IL-8蛋白低産生株にIL-8蛋白を投与することで腫瘍増殖が抑制されることを報告した。同様に、松島<sup>10)</sup>広瀬<sup>11)</sup>は、IL-8蛋白遺伝子を導入して癌細胞とベクターのみを導入したコントロール癌細胞を、それぞれ7匹のヌードマウスに移植し、経時的に癌細胞の増加を評価した。その結果IL-8遺伝子を導入した癌細胞を移植した群は、移植7匹中4匹に腫瘍の増殖が観察されたが、残りの3匹では腫瘍の生着が認められず、腫瘍増殖の完全阻害がみられた。最終重量の比較検討でも、コントロール群に比してIL-8遺伝子を導入した腫瘍は86%の増殖阻害が示され有意 ( $P < 0.01$ ) に腫瘍の増殖が抑制されたと報告している。この増殖阻害は、IL-8産生腫瘍細胞の移植腫瘍片のHE染色標本で、コントロールに比し強い好中球の浸潤像が認められるとともに、腫瘍細胞の破壊像も確認されたことから、IL-8蛋白産生による腫瘍増殖抑制効果として報告されている。

一方、これとは逆に、Arenbergら<sup>12)</sup>は、マウスを用いた非小細胞肺癌移植モデルにおいて、抗IL-8抗体が腫瘍の増殖および転移を抑制し、且つ、IL-8の抑制により、非小細胞肺癌の腫瘍の進展が抑制されたことから、IL-8蛋白は腫瘍増殖を促進すると報告した。また、Singhら<sup>13)</sup>は13種類の細胞株を用いた実験でIL-8蛋白の発現および産生と、ヌードマウスに移植した腫瘍の増殖能および転移能とに正の相関が認められたことを報告している。

今回の研究では、腫瘍径が3cmを超える群で3cm以下の群よりIL-8蛋白濃度が有意に高く ( $P < 0.05$ )、T因子別では、T1, 2群に比しT3, 4群でIL-8蛋白の濃度が高い傾向が認められた。また腺癌において、組織学的に高分化型より低分化型群で、IL-8蛋白濃度が有意に高かった ( $P < 0.01$ )。腫瘍増殖に伴う宿主側の反応として炎症細胞浸潤を来し、宿主側要因としてIL-8が上昇した可能性は否定できないが、以上の結果は、癌細胞の多くでのIL-8RBの発現の結果と相まって、少なくとも肺腺癌において癌細胞自身が産生するIL-8が腫瘍の脱分化および増殖を促進する可能性を示唆するものと考えられる。

Folkman<sup>14)</sup>は、癌進展初期に局所の毛細血管増殖がない場合、腫瘍は直径で2-3mmを越えて大きくならず、腫瘍成長に必要な血管供給の増加とともに、腫瘍が増大することを実験的に検証した。悪性腫瘍の増殖進展に重要な因子となる腫瘍血管新生は、血管内皮細胞の遊走、増殖、管腔形成の3段階からなり<sup>15)</sup>、これを促進する血管新生因子として多くの因子が同定されてきた。最も強力な血管内皮増殖作用を有する増殖因子として、血管内皮細胞増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) ファミリーや線維芽細胞増殖因子 (fibroblast growth factor, FGF) ファミリー等が代表的であるが、IL-8も血管新生因子としての活性を有することが明らかにされている。例えば、Wakabayashiら<sup>20)</sup>は、ヒトグリオーマ細胞を用いた検討から腫瘍血管因子機序としてVEGF/FGFを介するものと、IL-8を介するものが独立した機序として両立している可能性を指摘している。IL-8の血管新生作用に関し、Smithら<sup>21)</sup>はヒト肺癌組織抽出液を使用し、IL-8の中和抗体の投与にて生体外で血管内皮の走化活性およびラット角膜での血管新生の低下を確認し、IL-8

がヒト気管支原性肺癌の中の脈管形成の主要な血管因子であると報告している。八並ら<sup>22)23)</sup>は、マウス背部筋膜法を用いて、IL-8高産生株が誘導する血管新生に対する抗IL-8中和抗体の作用を検討したところ、抑制効果が認められ、IL-8産生は血管新生を介して肺癌の進展に影響を与えている可能性があるとして報告している。今回の研究結果からは、病期別でI, II期よりIII, IV期で、また、3cm以下群より3cm超群で腫瘍内脈管密度が高い傾向が認められ、血管新生が肺癌における腫瘍の増殖進展に関与する可能性は示されたが、IL-8蛋白濃度と腫瘍内脈管密度との間に有意な相関関係は見い出せなかった。このことから、肺癌の腫瘍血管新生機序として、IL-8の直接的関与は低く、IL-8が血管新生を介し腫瘍の進展に関する可能性は低いと考えられた。

腫瘍細胞の間質構築への局所的浸潤過程が、転移の初期段階として重要であり、この段階における蛋白分解酵素の分泌や、細胞運動能の増加が転移において重要な役割を果たすと考えられている<sup>24)25)</sup>。AMFは、1986年にLiottaら<sup>26)</sup>によりヒト悪性黒色腫細胞の培養液中から、その産生腫瘍細胞の走化性に対する刺激活性因子として同定された。腫瘍細胞の組織学的形態と肺転移能に関する研究において、扁平な培養細胞を非接着性基質を用いて球状状態にすることにより、固有運動能の増加とともに、可逆的な肺転移能の増加がみられることが転移性腫瘍B16-F1黒色腫で確認された<sup>27)</sup>。球状に培養されたB16-F1黒色腫における糖蛋白には、レクチンの一種落花生凝集素 (peanut agglutinin, PNA) により認識される78kDの糖蛋白 (gp78) の発現が、扁平状態で培養されたものに比べて増強していることが明らかとなった<sup>28)</sup>。抗gp78モノクローナル抗体を用いてgp78を介した運動能がAMFによる運動能と生化学的に類似であり<sup>29)</sup>、抗gp78モノクローナル抗体を使って分離精製されたgp78がB16-F1黒色腫より分離精製されたAMFRであることが確認された<sup>30)</sup>。そのAMFRは細胞表面に存在し、免疫蛍光抗体法から高転移能株では多くの細胞が1か所、まれに2か所の細胞端に偏在しているのに対し、低転移能株においては細胞表面上に散在していることが報告されている<sup>31)</sup>。AMFとの結合により刺激を受けると結合体は細胞内移行を起し、細胞質内では一部ライソゾームに分布することが判明している。AMFRの細胞表面における発現の低下している場合、その内部の移行の動的増加を反映する可能性が指示されており、細胞膜よりのAMFRの内部移行が癌細胞の高転移能に関与している可能性が報告されている<sup>32)</sup>。近年、腫瘍細胞の運動能を阻止するモノクローナル抗体が認識するH抗原の糖鎖の発現が、肺癌患者の予後因子になり得ることが示される一方、この抗体がgp78の糖鎖を認識する可能性も指摘されており<sup>30)</sup>、AMFRの発現は悪性腫瘍の予後因子としての活用の可能性が考慮される<sup>33)34)</sup>。AMFRの原発性肺癌での発現に関する報告はまだなく、今回免疫組織学的に始めてそれを検討し、IL-8蛋白濃度との相関性を追求した。その結果、原発性非小細胞肺癌における、AMFR陽性率は全体として42.7%と比較的高かったもののIL-8蛋白濃度との相関関係は確認できなかった。

以上、原発性肺癌での腫瘍組織におけるIL-8の発現は、担癌正常肺組織に比べ有意に亢進し、臨床病理組織学的所見との対比から、肺腺癌における進展との関与が示唆された。しかし、腫瘍内血管密度や腫瘍細胞の自己分泌型走化性因子受容体の発現とIL-8蛋白濃度との相関は確認できず、その機構に関しては

明確な答えを導くことはできなかった。今後、本研究に供された症例の予後を追求し、その臨床的意義を検討する必要がある。

## 結 論

原発性肺癌細胞株10株、原発性非小細胞肺癌89例の腫瘍組織、担癌正常肺組織、および術前に採取された血漿中におけるIL-8およびIL-8RBの発現を探り、また臨床標本では、病理組織学的因子との相関を検討し以下の結果をえた。

1. 肺癌細胞株におけるIL-8 mRNAの発現率および発現量は、腺癌、扁平上皮癌、小細胞癌のうち、扁平上皮癌が高かった。一方、IL-8RBの発現は、扁平上皮癌および小細胞癌で高かった。

2. 切除標本におけるIL-8蛋白濃度は、ELISA法での解析により正常肺組織に比し腫瘍組織で有意に高値を示し、腫瘍組織内におけるIL-8蛋白濃度と、末梢血中IL-8蛋白濃度との間には、有意な正相関が認められた。

3. 腫瘍組織中のIL-8蛋白濃度は、扁平上皮癌が腺癌より、また腫瘍最大径が3cm超群が3cm以下群より有意に高く、T1, 2症例に比べT3, 4症例で高い傾向があった。分化度別にみたIL-8蛋白濃度の検討では、高分化腺癌に比し、低分化腺癌で有意に高値を示した。

4. 免疫組織化学的にIL-8の染色性は、腫瘍細胞の細胞質と同時に腫瘍組織内のマクロファージにも強く確認できた。

5. 腫瘍内脈管密度と腫瘍組織でのIL-8蛋白濃度との間で相関は認められず、IL-8の原発性非小細胞肺癌における血管新生因子としての意義は確認できなかった。

6. AMFR陽性群と陰性群とで腫瘍組織中IL-8蛋白濃度の平均値に有意な差はなく、IL-8蛋白濃度とAMFRとの間に相関は確認できなかった。

以上の結果より原発性肺癌におけるIL-8の発現は、扁平上皮癌が他の組織型に比し高く、腫瘍組織で担癌正常肺に比し発現が亢進していることが判明した。腺癌においては、腫瘍の脱分化および進展にIL-8が関与している可能性が示唆された。

## 謝 辞

稿を終えるに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師渡辺洋宇教授に深甚なる謝意を捧げます。また、本研究に際し助言ならびに御指導を賜りました太田安彦博士に心から感謝いたします。また免疫組織染色等の技術的な御指導頂きました田中洋子氏、川上和之博士、本研究の遂行に当たり御協力頂きました金沢大学医学部第一外科学講座各位、ならびにAMFRの貴重な抗体を御提供頂きました米岡州立KARAMANOSがん研究所Avraham Raz博士に深謝いたします。

## 文 献

- 1) 越田吉一, 新津洋司郎. 腫瘍免疫を増強するサイトカイン. 臨床免疫 26: 162-170, 1994
- 2) Mukaida N, Harada A, Yasumoto K, Matsushima K. Properties of pro-inflammatory cell type-specific leukocyte chemotactic cytokines, interleukin 8 (IL-8) and monocyte chemotactic and activating factor (MCAF). Microbiol Immunol 36: 773-789, 1992.
- 3) Schadendorf D, Moller A, Algermissen B, Worm M, Sticherling M, Czarnetzki BM. IL-8 produced by human malignant melanoma cells in vitro is an essential autocrine growth factor. J Immunol 151: 2667-2675, 1993

- 4) Sakamoto K, Masuda T, Mita S, Ishiko T, Nakashima Y, Arakawa H, Egami H, Harada S, Matsushima K, Ogawa M. Interleukin-8 is constitutively and commonly produced by various human carcinoma cell lines. Int J Clin Lab Res 22: 216-219, 1992
- 5) Ebina T, Murata K. Antitumor effect of PSK at a distant site: inductions of interleukin-8-like factor and macrophage chemotactic factor in murine tumor. Jpn J Cancer Res 81: 1307-1313, 1990
- 6) Abruzzo LV, Thornton AJ, Liebert M, Grossman HB, Evanoff H, Westwick J, Strieter RM, Kunkel SL. Cytokine-induced gene expression of interleukin-8 in human transitional cell carcinomas and renal cell carcinomas. Am J Pathol 140: 365-373, 1992
- 7) Yasumoto K, Okamoto S, Mukaida N, Murakami S, Mai M, Matsushima K. 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. J Biol Chem 267: 22506-22511, 1992
- 8) Wismer JM, McKenzie RC, Sauder DN. Interleukin-8 immunoreactivity in epidermis of cutaneous T-cell lymphoma patients. Lymphokine Cytokine Res 13: 21-27, 1994
- 9) Wang J, Huang M, Lee Paul, Komanduri K, Sharma S, Chen G, Dubinett SM. Interleukin-8 inhibits non small cell lung cancer proliferation: A possible role for regulation of tumor growth by autocrine and paracrine pathways. Interferon Cytokine Research 16: 53-60, 1996
- 10) 松島綱治. インターロイキン8の性状と炎症疾患, 悪性腫瘍との関わり. 癌と化学療法 21: 2525-2532, 1994
- 11) 広瀬国孝, 松島綱治. ケモカインによる癌治療の試み. 臨床外科 50: 85-90, 1995
- 12) Arenberg DA, Kunkel SL, Polverini PJ, Glass M, Burdick MD, Strieter RM. Inhibition of interleukin-8 reduces tumorigenesis of human non-small cell lung cancer in SCID mice. J Clin Invest 97: 2792-2802, 1996
- 13) 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 54: 3242-3247, 1994
- 14) 日本肺癌学会編. 臨床・病理, 肺癌取り扱い規約. 改定第4版, 24-30頁, 金原出版, 東京, 1995
- 15) Weidner N, Semple JP, Welch W, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. N Engl J Med 324: 1-8, 1991
- 16) Yatsunami J, Tsuruta N, Ogata K, Wakamatsu K, Takayama K, Kawasaki M, Nakanishi Y, Hara N, Hayashi S. Interleukin-8 participates in angiogenesis in non-Small cell, but non Small cell carcinoma of the lung. Cancer Lett 120: 101-108, 1997
- 17) 石河隆敏, 箕田誠司, 蒲原英伸, 酒本喜興志, 小川道雄. 腫瘍組織におけるIL-8の構成的発現と免疫療法への応用. 日消外会誌 28: 533, 1995
- 18) Folkman J. Tumor angiogenesis. Adv Cancer Res 43: 175-203, 1985
- 19) Blood CH, Zetter BR. Tumor interactions with the

- vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* 1032: 89-118, 1990
- 20) Wakabayashi Y, Shono T, Isono M, Hori S, Matsushima K, Ono M, Kuwano M. Dual pathways of tubular morphogenesis of vascular endothelial cells by human glioma cells: vascular endothelial growth factor/basic fibroblast growth factor and interleukin-8. *Jpn J Cancer Res* 86: 1189-1197, 1995
- 21) Smith DR, Polverini PJ, Kunkel SL, Orringer MB, Whyte RI, Burdick MD, Wilke CA, Strieter RM. Inhibition of interleukin 8 attenuates angiogenesis in bronchogenic carcinoma. *J Exp Med* 179: 1409-1415, 1994
- 22) 八並 淳, 原 信之. IL-8と血管新生. *Surgery Frontier* 4: 392-396, 1997
- 23) 八並 淳, 高山浩一, 中西洋一, 緒方賢一, 川崎雅之, 斐新海, 白鳳, 落合早苗, 若松謙太郎, 犬塚 悟, 橋本修一, 原 信之. 肺癌細胞株および肺癌組織でinterleukin-8の産生とその意義の検討. *肺癌* 35: 549, 1995
- 24) Nicolson GL. Organ specificity of tumor metastasis: role of preferential adhesion, invasion and growth of malignant cells at specific secondary sites. *Cancer Metastasis Rev* 7: 143-188, 1988
- 25) Fidler IJ, Hart IR. Biological diversity in metastatic neoplasms: origins and implications. *Science* 217: 998-1003, 1982
- 26) Liotta LA, Mandler R, Murano G, Katz DA, Gordon RK, Chiang PK, Schiffmann E. Tumor cell autocrine motility factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 3302-3306, 1986
- 27) Raz A, Ben-Ze'ev A. Modulation of the metastatic capability in B16 melanoma by cell shape. *Science* 221: 1307-1310, 1983
- 28) Nabi IR, Raz A. Cell shape modulation alters glycosylation of a metastatic melanoma cell-surface antigen. *Int J Cancer* 40: 396-402, 1987
- 29) Nabi IR, Watanabe H, Raz A. Identification of B16-F1 melanoma autocrine motility-like factor receptor. *Cancer Res* 50: 409-414, 1990
- 30) Silletti S, Watanabe H, Hogan V, Nabi IR, Raz A. Purification of B16-F1 melanoma autocrine motility factor and its receptor. *Cancer Res* 51: 3507-3511, 1991
- 31) 渡辺秀臣, 千木良正機, Avraham Raz. 転移能における自己分泌型運動因子受容体の役割. *癌と化学療法* 20: 405-409, 1993
- 32) 渡辺秀臣, 自己分泌型運動因子受容体としてのgp78. *日整会誌* 70: 1171, 1996
- 33) Miyake M, Taki T, Hitomi S, Hakomori S. Correlation of expression of H/Le(y)/Le(b) antigens with survival in patients with carcinoma of the lung. *N Engl J Med* 327: 14-18, 1992
- 34) Miyake M, Hakomori SI. A specific cell surface glycoconjugate controlling cell motility: evidence by functional monoclonal antibodies that inhibit cell motility and tumor cell metastasis. *Biochemistry* 30: 3328-3334, 1991

**Expression of Interleukin-8 in Primary Lung Cancers** Tsutomu Kikuchi, Department of Surgery ( I ), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 - J. Juzen Med Soc., 107, 434 - 445 (1998)

**Key words** interleukin-8, interleukin-8 receptor, lung cancer

#### Abstract

The expression of interleukin-8 (IL-8) and IL-8 receptor type B (IL-8 RB) was investigated in neoplastic tissue, cancer-bearing normal lung tissue, and plasma samples taken before surgery from a random selection of 89 patients with primary non-small cell lung carcinomas, as well as in 10 types of primary pulmonary carcinoma cell lines (3 adenocarcinomas, 3 squamous cell carcinomas, and 4 small cell carcinomas). This study also analyzed the correlation between their expression and the clinicopathological factors of the patient. Comparing different histological subtypes, the frequencies of the cell lines expressing IL-8 mRNA, as determined by reverse transcription-PCR, were 2/3 cases for adenocarcinoma, 3/3 cases for squamous cell carcinoma, and 2/4 cases for small cell carcinoma, suggesting a higher expression rate in squamous cell carcinoma compared to the other histological subtypes. On the other hand, the expression rate of IL-8RB in the cell lines were 1/3 cases for adenocarcinoma, 3/3 cases for squamous cell carcinoma, and 4/4 cases for small cell carcinoma, suggesting a similarly higher expression rate for the squamous cell carcinoma and small cell carcinoma ( $P < 0.05$ ). The concentration of IL-8 protein in the resected tumor specimens was measured by ELISA. The result showed significantly higher levels of IL-8 protein in the neoplastic tissue than in the normal lung tissue ( $P < 0.01$ ). In the neoplastic tissue, the localization of IL-8 was immunohistochemically confirmed to be mainly in the cytoplasm of the tumor cells and in the macrophages within the tumor tissue. There was a significant positive correlation between the IL-8 protein concentration in the neoplastic tissue and that in the peripheral blood samples ( $r=0.25$ ,  $P < 0.05$ ). The IL-8 protein concentration in the neoplastic tissue was significantly higher for squamous cell carcinoma than for adenocarcinoma, and in tumors larger than 3 cm in diameter than in those smaller than 3 cm (both  $P < 0.05$ ). It tended to be higher in patients with T3 and T4 tumors than in those with T1 and T2 tumors. In the patients with adenocarcinoma, the IL-8 protein concentration was significantly higher in poorly differentiated neoplastic tissue than in well differentiated tissue. The correlation between the IL-8 protein concentration in the tumor tissue and the microvessel density in the tumor was not significant. Accordingly, the significance of IL-8 as an angiogenic factor for the primary non-small cell lung carcinoma could not be ascertained. Looking at the autocrine motility factor receptor (AMFR), no significant difference in the mean IL-8 concentration was recognized between the AMFR-positive and-negative tumors. Although the role of IL-8 in tumor progression needs to be further studied, the present study revealed that IL-8 expression is closely associated with the phenotype expression of the primary lung cancer.