

平成22年 4月23日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008-2009
 課題番号：20790794
 研究課題名 (和文) Toll 様受容体のシグナル伝達阻害による新規メラノーマ分子標的治療の開発
 研究課題名 (英文) TLR4 and its signaling pathways on melanoma cells may be a potential direct target for immuno- and molecular therapy in melanoma patients.
 研究代表者
 後藤 康文 (GOTO YASUFUMI)
 信州大学・医学部附属病院・助教 (特定雇用)
 研究者番号：60467181

研究成果の概要 (和文)：メラノーマの増殖において、TLR4 やそのアダプター分子である MyD88 を刺激することによりメラノーマ細胞の増殖や migration 能が刺激されることが分かった。TLR4 や MyD88 は免疫療法や分子標的療法の有用な標的になりうる可能性があると考えられた。

研究成果の概要 (英文)：TLR activation of tumor cells is suggested to be a factor promoting tumor progression in melanoma. TLR4 and its signaling pathways on melanoma cells may be a potential direct target for molecular therapy in melanoma patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚腫瘍学

1. 研究開始当初の背景

Toll-like receptors (TLRs)は自然免疫にお

ける病原体の認識に必須の受容体である。

TLR は pathogen-associated molecular

patterns (PAMPs)を認識し自然免疫を活性化するだけでなく、樹状細胞を始めとする抗原提示細胞の活性化を介して獲得免疫も誘導し、免疫応答全体において重要な役割を果たしている。TLRsは感染防御免疫において重要な役割を果たしているのみならず、古くから癌に対する免疫アジュバントとして臨床応用されていたBCG-CWSやOK-432などもTLRsの刺激を介して作用していることが明らかになった。

これまで癌免疫において注目されてきたTLRsの役割は、感染防御と同様に免疫細胞に発現するTLRsが中心であり、癌細胞自身におけるTLRsについてはほとんど注目されなかった。近年わずかながら癌細胞自身がTLRsを発現することが報告された(Kelly MGら:Cancer Res 2006、Molteni Mら:Cancer Lett. 2006)が、未だにその機能については明らかではない。以前、我々はメラノーマ細胞におけるTLRsの発現とその機能を検討し、メラノーマにおいて発現の高いTLRsはTLR2、TLR3、TLR4であること、メラノーマに発現しているTLR2、TLR3、TLR4はそれぞれのリガンドと結合することによって活性化し、NF κ BやIRFを介して様々なサイトカインやインターフェロンがメラノーマ細胞から分泌されること、TLR2、TLR3、TLR4をそれぞれのリガンドで刺激することによってメラノーマ細胞自身のmigration能が亢進することを明らかにした。

2. 研究の目的

以上の背景を踏まえ、我々は以下の作業仮説を考え、それを証明することを目標とした。<我々の仮説> メラノーマの微小環境において壊死やアポトーシスをおこしたメラノーマ細胞やメラノーマの組織に浸潤している免疫細胞から mRNA などが遊離し、その mRNA が内因性リガンドとしてメラノーマ細胞に発現する TLRs を刺激し、メラノーマ細

胞から炎症誘発性サイトカインやインターフェロンを分泌させる。これらの炎症誘発性サイトカインやインターフェロンはメラノーマ組織の微小環境を慢性炎症の状態に導き、慢性炎症の状態はメラノーマ細胞を増殖方向へ刺激する。さらに、内因性リガンドがTLRsを刺激することによって、直接メラノーマ細胞のmigration能は亢進する(下図参照)。すなわち、メラノーマの微小環境においてメラノーマ細胞に発現する TLRs が、メラノーマ細胞自身や腫瘍に浸潤した免疫細胞から遊離した mRNA を内因性リガンドとして刺激され、メラノーマ細胞を増殖の方向へ導く。

3. 研究の方法

(1) TLR2、TLR3、TLR4の特異抗体を用いて、*in vivo*のヒトメラノーマ細胞におけるTLR2、TLR3、TLR4の発現を免疫組織化学的に確認する。

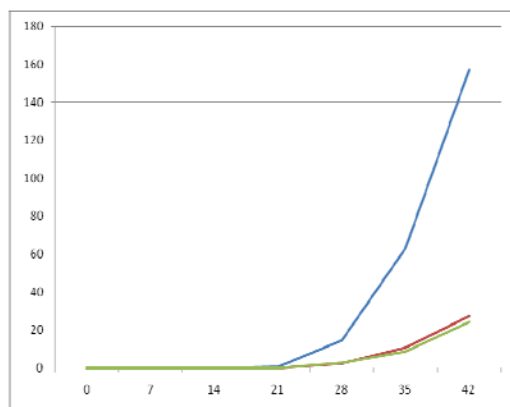
(2) TLR2、TLR3、TLR4やTLRsのアダプター分子であるMyD88のsiRNAを作成し、ヒトメラノーマ細胞においてRNA干渉を行い、メラノーマ細胞の増殖能、migration能、浸潤能などに対する影響を見る。

(3) 抗TLR2、TLR3、TLR4抗体を用いてメラノーマ細胞に発現するTLR2、TLR3、TLR4をブロックする中和実験を行い、メラノーマ細胞の増殖能、migration能、浸潤能などに対する影響を見る。4) TLR2、TLR3、TLR4、MyD88のsiRNAを導入したマウスメラノーマ細胞B16をC57-BL6マウスに皮下注射し、コントロールと比較することによって、TLRsからのシグナルがメラノーマの増殖に与える影響を*in vivo*において明らかにする。同様に、抗TLR2、TLR4抗体を用いてTLRsをブロックする中和実験によって、抗TLR2、TLR4抗体によるメラノーマに対する治療効果を判定する。5) 免疫不全マウスであるNOD-scidマウスを用いて、ヒトメラノーマ細胞に対す

る TLR2、TLR3、TLR4、MyD88 の siRNA や抗 TLR2、TLR3、TLR4 抗体の治療効果を検討する。

4. 研究成果

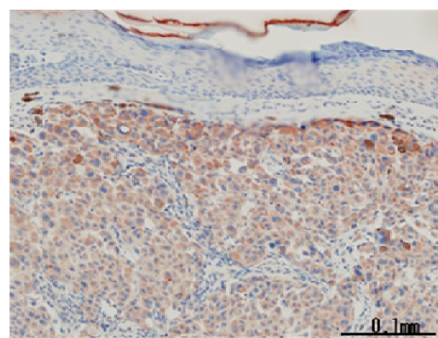
今回我々は、メラノーマ細胞株を用いて行った TLR4、MyD88 の RNA 干渉実験を行い、TLR4、MyD88 の発現を抑制することにより、メラノーマ細胞株の増殖や migration 能は抑制されることが分かった。また、SCID マウスに、RNA 干渉実験で TLR4、MyD88 の発現を抑制したメラノーマ細胞株を移植したところ、コントロールの細胞に比べて TLR4、MyD88 の発現を抑制したメラノーマ細胞株では細胞の増殖が抑制された（下図参照）。



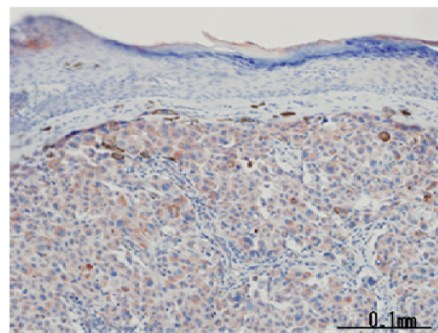
tumor weight
 $L \times W^2 / 2$ (g)

- control siRNA (n=17)
- TLR4 siRNA2 (n=14)
- MyD88 siRNA2 (n=16)

さらに、メラノーマの組織における TLR4 の発現を免疫組織化学的に検討したところ、原発メラノーマ組織 29 例中 26 例(90%)と転移メラノーマ組織 28 例中 26 例(89%)と高率に発現していることが分かった（右図参照）。



anti-MyD88 Ab



anti-TLR4 Ab

以上のような結果から、メラノーマの増殖において、TLR 4 やそのアダプター分子である MyD88 を刺激することによりメラノーマ細胞の増殖や migration 能が刺激されることが分かった。TLR4 や MyD88 は免疫療法や分子標的療法の有用な標的になりうる可能性があると考えられた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 2 件）

①Cancer Cells Expressing Toll-like Receptors and the Tumor Microenvironment. Sato Y, Goto Y, et al. Cancer Microenviron. 2009 Sep;2 Suppl 1:205-14. 査読あり

②Goto Y, Arigami T, Kitago M, et al. Activation of toll-like receptors 2, 3, and 4 on human melanoma cells induces inflammatory factors. Mol Cancer Ther. 2008 Nov;7(11):3642-53. 査読あり

〔学会発表〕（計 5件）

- ① 2009.12 第34回日本研究皮膚科学会総会，福岡
- ② 2009.5 7th World Congress on Melanom, ウィーン
- ③ 2009.4 第108回皮膚科学会総会，福岡
- ④ 2008.10 第67回日本癌学会総会，名古屋
- ⑤ 2008.2 東京皮膚フォーラム，東京

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.shinshu-u.ac.jp/faculty/medicine/chair/i-hifu/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

後藤 康文 (GOTO YASUFUMI)

信州大学・医学部附属病院・助教（特定雇用）

研究者番号：60467181