

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 27 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009 ～ 2011

課題番号：21592199

研究課題名（和文） 頭頸部癌における TLR の発現と生物学的意義の解明

研究課題名（英文） The expressions and significance of TLRs in head and neck cancer

研究代表者

能美 希（NOMI NOZOMI）

大分大学・医学部・助教

研究者番号：40468020

研究成果の概要（和文）：Toll-like receptor (TLR)は自然免疫における重要なセンサーであり、種々の細胞に発現し免疫応答を誘導することが知られている。近年、癌細胞においても TLR が発現していることが明らかとなってきたが、頭頸部癌での TLR の発現およびその生物学的な役割についてはいまだ不明な点も多い。我々は頭頸部癌において TLR の発現について検討した。8 種類の異なる頭頸部扁平上皮癌細胞株を用いて、*in vitro* で mRNA および蛋白レベルで TLR の発現についての検討を行った。また、TLR2 のリガンドである Pam3CSK4、TLR3 のリガンドである polyinosine-polycytidylic acid (poly I:C) で細胞株を刺激しその変化について検討した。その結果、頭頸部癌において TLR は発現しており、なかでも TLR2 および TLR3 は強発現する傾向にあった。また、頭頸部癌において TLR2 を介する刺激を加えると細胞増殖が、TLR3 を介する刺激を加えると細胞のアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。さらに、TLR2 を介する刺激は細胞増殖以外にも浸潤能増加にも関与が示唆された。これらの研究成果より、TLR2 については頭頸部癌の増殖や浸潤に関わる因子として、TLR3 については頭頸部癌のアポトーシスを誘導する因子として、いずれも臨床に直結する治療標的として応用が期待される。

研究成果の概要（英文）：The innate immune system builds up the host defense against a huge diversity of pathogens like viruses, bacteria and fungi. Toll-like receptors (TLRs) are one of the pattern recognition receptors (PRRs), which trigger the initiation of various defense mechanisms. The expression of TLRs represents an important link between innate and adaptive immune responses. Recently, the expression of TLRs in several cancer cells has been reported, however, the exact roles of TLRs in cancers are still unclear. In this study, we investigated the expressions of TLRs and its signaling in human head and neck squamous cell carcinomas (HNSCCs). The expressions of TLRs in 8 HNSCC cell lines were examined. Cells were incubated with Pam3CSK4 and polyI:C, and viability of cells was tested with MTT assay. TLR2 and TLR3 were widely expressed in human HNSCCs. Interestingly, the stimulation of TLR2 by Pam3cysSK4 induced cell proliferation, in a contrasting situation, the stimulation of TLR3 by poly I:C induced the apoptosis in cancer cells, both in dose-dependent manner. We also revealed that the stimulation of TLR2 might induce cell migration. In the present study, we demonstrated the proliferative activity of TLR2 and the proapoptotic activity of TLR3 expressed by HNSCCs. These results suggested that TLR2 and TLR3 could be the new target for therapy in HNSCCs.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
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：外科系臨床医学・耳鼻咽喉科

キーワード：頭頸部癌・腫瘍免疫・TLR

1. 研究開始当初の背景

哺乳類の免疫機構は自然免疫と獲得免疫に大別されるが、Toll-like receptor(TLR)は自然免疫を担う重要なセンサーのひとつとして近年注目されている。TLRはショウジョウバエの生存に必須なToll受容体に類似したファミリーとして発見され、ヒトでは10種類が同定されており、免疫担当細胞や上皮細胞などに存在している。TLRの各メンバーがウイルスや細菌などの病原微生物の構成成分をそれぞれ特異的に認識し、非自己の認識を司っている。また、TLRを介した自然免疫系の活性化は獲得免疫系の活性化への重要な橋渡しを行い、獲得免疫系の制御を行うため、免疫応答の最初のトリガーとしても重要な役割を担っていることが明らかとなってきた。一方、最近の研究でTLRは各種癌細胞においても発現することがわかってきた。これまで、TLRは生体防御にきわめて重要な役割を担っていると考えられてきたが、生体を侵略する癌細胞自体がTLRを発現するという相反する現象が明らかとなり、その生物学的意義については非常に興味深い。これまでに悪性疾患においては、マウスの肺癌や血液疾患モデルを用いた研究で、TLRを介する経路で宿主のCTLや樹状細胞など自然免疫系が内因性に活性化され、抗腫瘍効果を示すといった報告は散見されるが、現在のところ癌細胞自体におけるTLRの発現の生物学的意義についてはほとんど明らかとなっていない。さらに、頭頸部癌におけるTLRの発現とその役割については未解明である。

2. 研究の目的

TLRは免疫担当細胞を活性化し、様々な免疫応答を惹起することは知られている。また、その発現は生体内の部位により異なっていることも知られている。本研究ではまず頭頸部癌におけるTLRの発現をmRNAレベルおよび蛋白レベルで明らかにする。次に、頭頸

部癌において強発現のみられるTLRメンバーについてそれぞれのリガンドで刺激して癌細胞の変化を検討する。すでに、TLR3を介するアポトーシスはいくつかの領域の癌において示唆されているが、その機序についてはほとんど明らかとなっていない。本研究では、頭頸部癌細胞株をTLR3のリガンドを用いて刺激してその変化を検討し、頭頸部癌におけるTLR3の役割を検討する。またTLR2のリガンドによる細胞の刺激による変化に関する報告は現在のところほとんどない。同様にTLR2のリガンドで癌細胞を刺激した際の癌細胞の変化を見る。

3. 研究の方法

①頭頸部癌細胞株におけるTLRの発現

頭頸部癌でのTLRの発現を検討する。頭頸部癌細胞株を用いてmRNAおよび蛋白を抽出し、RT-PCR法、定量的RT-PCR法およびWestern blot法でTLRの発現について明らかにする。また、TLRを蛍光標識させ、Flow cytometryによりその発現を解析する。

②細胞株のリガンド刺激

TLRのリガンドを用いて細胞株を刺激し、細胞の変化を観察する。細胞刺激にはTLR2に関しては精製リガンドであるPam3CSK4を、TLR3に関しては精製リガンドであるpoly I:Cを用いる。反応時間は12~72時間とする。反応を見ながら添加するリガンドの量を適宜増減して同様に観察を行う。この結果、頭頸部癌細胞株においてリガンドによる刺激を加えた際に、癌細胞の増殖あるいはアポトーシスが誘導されるかどうか明らかにする。また、これらの細胞の変化がそれぞれTLRの発現と関連するかを検討する。さらに、経時的に観察を行い、細胞数の変化が、時間依存的に、あるいはリガンドの容量依存的に誘導されるかについても検討する。細胞の形態学的な変化についても観察を行うと同時にMTT assayならびにannexin V, PIを指

標とした Flow cytometry を行い、癌細胞の増殖およびアポトーシスの検討を行う。

③TLR3 を介する癌細胞のアポトーシスの機序の解明

細胞株に poly I:C を添加・刺激し、12～72 時間後に細胞より mRNA およびタンパクを得る。survivin の発現の変化をリガンドによる刺激の前後で検討する。リガンドの添加量は適宜増減して、異なる容量での変化も検討する。

④TLR2 を介する浸潤能変化

細胞株に Pam3CSK4 を添加・刺激し、浸潤能増殖への関与についても検討する。共焦点レーザー顕微鏡にてリガンド刺激後の細胞の形態を観察する。また TLR2 siRNA を細胞株に導入し、浸潤能に変化が見られるか検討する。

4. 研究成果

①頭頸部癌細胞株における TLR の発現

RT-PCR, real-time RT-PCR, Western blot 法, Flow cytometry で検討した結果、頭頸部扁平上皮癌細胞株では、細胞株で程度の差はあるものの TLR2 および TLR3 の発現が強い傾向にあった。TLR4 および TLR9 についてはほとんど発現がみられなかった。また、Flow cytometry では TLR2 は細胞膜上、TLR3 は細胞内に発現していることが明らかとなった。

②細胞株のリガンド刺激

TLR3 については TLR3 の強発現株である SAS(舌扁平上皮癌)、中等度発現株である HO-1-u-1(口腔底扁平上皮癌)、低発現株である SCC25(舌扁平上皮癌)を用いて実験を行った。TLR3 のリガンドである poly I:C を培養上清中に 0, 10, 100 μ g/ml 添加し、12, 24, 36, 48 時間後にその変化を顕微鏡下に行った。その結果、リガンド刺激後には細胞数の減少がみられた。また、その現象は Flow cytometry にてアポトーシスであることが明らかとなった。さらに MTT assay の結果、癌細胞のアポトーシスは、時間依存的に、あるいはリガンドの用量依存的に誘導されていたが、もっともアポトーシスの変化が見られたのはリガンド刺激後 24 時間であった。この結果、TLR3 の刺激を介して頭頸部癌のアポトーシスが誘導されることが示唆された。

次に TLR2 についての検討を行った。TLR2 の高発現株である SAS(舌扁平上皮癌)、HSC-3(舌扁平上皮癌)、低発現株である HEP2(喉頭扁平上皮癌)、HO-1-u-1(口腔底扁平上皮癌)を用いて実験を行った。TLR2 のリガンドである Pam3CSK4 を培養上清中に 0, 1, 10 μ g/ml 添加し、TLR3 と同様に 12, 24, 36, 48 時間後にその変化を顕微鏡下および MTT assay にて検討した。興味深いことに、

TLR2 を発現する細胞株では TLR2 の発現の程度によって、また Pam3CSK4 の濃度依存性に細胞増殖が誘導された。また、この細胞増殖はリガンド刺激 12 時間後にピークがみられた。TLR2 siRNA を導入し同様に刺激すると、TLR2 強発現株ではリガンド刺激後も有意に細胞増殖の抑制がみられた。この結果、TLR2 の刺激を行った際には TLR3 刺激時とは反して、細胞増殖が誘導されることが明らかとなった。

③TLR3 を介する癌細胞のアポトーシスの機序の解明

細胞株を poly I:C で刺激し、アポトーシス抑制タンパクである survivin の発現の変化をリガンドによる刺激の前後で比較検討した。その結果、リガンド容量および TLR3 の発現の強さに依存して survivin の発現抑制が誘導されていた。このことより、TLR3 の刺激を介する頭頸部癌細胞のアポトーシスは survivin を介する経路で誘導されることが示唆された。

④TLR2 を介する浸潤能変化

細胞株に Pam3CSK4 を添加・刺激し、actin filament, DAPI などの蛍光染色を行い、共焦点レーザー顕微鏡にて観察した。その結果、リガンド刺激後の細胞では、刺激のない細胞と比較して、filopodial formation がみられた。今後の検討は必要であるが、TLR2 を介する刺激は頭頸部癌細胞の浸潤能増加についても関与が示唆された。

結語

今回我々は頭頸部癌における TLR の発現とその機能について解析を行った。その結果、頭頸部癌においても TLR は発現しており、なかでも TLR2 および TLR3 は細胞間で発現の差はあったが、強く発現する傾向にあった。また、TLR2 を介する刺激を加えると細胞増殖が、TLR3 を介する刺激を加えると細胞のアポトーシスが誘導されることが明らかとなった。さらに、TLR2 を介する刺激は細胞増殖以外にも浸潤能増加にも関与が示唆され、今後、新たな機能が解明される可能性がある。今回の研究成果より、TLR2 については頭頸部癌の増殖や浸潤に関わる因子として、TLR3 については頭頸部癌のアポトーシスを誘導する因子として、いずれも臨床に直結する治療標的として応用が期待される。

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 1 件)

- ① Nozomi Nomi, Satoru Kodama, Masashi Suzuki; TLR3 signaling induces apoptosis in human head and neck cancer via survivin associated pathway, *Oncology Reports*. 2010. vol. 24 No. 1, 225-231 査読あり

[学会発表] (計 6 件)

- ① 能美 希, 児玉 悟, 鈴木正志; 頭頸部癌における TLR2 の発現とその機能解析. 第 35 回日本頭頸部癌学会, 2011. 6. 8-10, 名古屋市
- ② Nozomi Nomi, Satoru Kodama, Masashi Suzuki; Induction of survivin dependent cell apoptosis through TLR3 pathways in human head and neck cancer. XIX World Congress of Oto-Rhino-Laryngology. June 1-5 2009, Sao Paulo, Brasil.
- ③ 能美 希, 児玉 悟, 鈴木正志; 頭頸部癌における TLR の発現と生物学的意義. 第 27 回日本耳鼻咽喉科免疫アレルギー学会, 2009. 2. 12-14, 千葉市

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.oita-u.ac.jp/ent/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

能美 希 (NOZOMI NOMI)

大分大学・医学部・助教

研究者番号: 40468020

(2) 研究分担者

鈴木 正志 (SUZUKI MASASHI)

大分大学・医学部・教授

研究者番号: 60211314

渡辺 哲生 (WATANABE TETSUO)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号: 50231790

平野 隆 (HIRANO TAKASHI)

大分大学・医学部・講師

研究者番号: 20305056

児玉 悟 (KODAMA SATORU)

大分大学・医学部・講師

研究者番号: 40325717

(3) 連携研究者

なし