論 文 内 容 の 要 旨

Toll-like receptor 4 mediates the suppressive effect on the tumor behavior in cutaneous squamous cell carcinoma

有棘細胞癌における Toll 様受容体 4 の腫瘍抑制的な効果について

日本医科大学大学院医学研究科　皮膚粘膜病態学分野

大学院生　　三神 絵理奈

International Journal of Oncology 掲載予定

【背景と目的】

有棘細胞癌 (Cutaneous squamous cell carcinoma: SCC)は高齢者に多く、頻度の高い皮膚悪性腫瘍である。多くは早期に外科的切除される一方で、リンパ節転移や遠隔転移をきたした進行例には確立された治療法が無く予後不良である。皮膚 SCC の転移や進行に関わる分子の解明は進行例に対する診断や新たな治療開発にとって重要である。

Toll 様受容体 4 (Toll-like receptor 4: TLR4) は様々な癌での発現が報告されており、予後、細胞増殖、さらに遊走能・浸潤能などとの関与が報告されている。しかし皮膚 SCC での報告は少なく、その機能も未だ明らかにはなっていない。CD44 は細胞間や細胞外基質との接着因子として知られており、皮膚 SCC を含む多くの癌で発現や細胞遊走能・浸潤能への関与が報告されている。しかし、皮膚 SCC における TLR4 と CD44 の関連とその機能は未だ不明である。

本研究では、SCC とその前駆病変の病理組織標本を用いた免疫組織化学的解析と、ヒト皮膚 SCC 細胞株を用いた実験結果から、TLR4 の SCC における病理学的・細胞生物学的特徴を明らかにし、さらに CD44 との関連を解明する事を目的とした。

【方法】

1. 病理組織標本を用いたTLR4とCD44の免疫組織化学

日本医科大学付属病院皮膚科で切除されたSCC 26例とSCCの前駆病変である日光角化症(Actinic keratosis: AK) 5例とボーエン病(Bowen's disease: BD) 5例の計36例のホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織を用いてTLR4とCD44の免疫組織化学染色を施行した。各標本のTLR4発現は画像解析ソフトウェア・HistoQuestを用いて“TLR4 integrated intensity”として評価した。

2. ヒト皮膚SCC細胞株を用いたTLR4の機能解析とCD44の発現変化

ヒト皮膚SCC細胞株2種類 (HSC-1, HSC-5) と不死化ケラチノサイト細胞株 (HaCaT) を用いて、TLR4をsiRNAでノックダウン(KD)し、TLR4 KD(siTLR4)群とコントロール(siCtrl)群におけるTLR4とCD44のmRNA発現変化をRT-qPCR法、蛋白質発現変化をWestern blot法で解析した。また、細胞遊走能・浸潤能の変化はボイデンチャンバー法で解析し、細胞形態の変化やTLR4とCD44の細胞内での局在変化・発現変化を蛍光免疫染色法にて解析した。

【結果・考察】

SCC のTLR4 integrated intensityはAKとBDを合わせたAK/BD群に比較して有意に高値であった。SCC群を組織型で分類すると、TLR4は転移や再発のリスクが高い低分化型で散在性に細胞膜中心に発現が見られる傾向があり、角化傾向の強い高分化型ではびまん性に細胞質に発現が見られた。また、低分化型のTLR4 integrated intensityは中分化型と高分化型に比べて有意に低値を示した。CD44 については、低分化型では散在性に細胞膜に強く発現し、高分化型では発現が低い傾向が見られた。

siTLR4 群と siCtrl 群の細胞株を用いた実験では、細胞遊走能は 3 種類の細胞株全てのsiTLR4群で有意に上昇した。細胞浸潤能はHSC-1とHaCaTのsiTLR4群で有意な上昇を示した。CD44のmRNAレベルは3種類全てのsiTLR4群で上昇した。CD44のタンパク質レベルは、CD44s(standard form) は HSC-1 と HaCaT の siTLR4 群で有意に上昇し、約 140kDa のCD44v(variant form)はHSC-5とHaCaTのsiTLR4群で有意な上昇を示した。

TLR4 の蛍光免疫染色では、特に HSC-1 の siCtrl 群で細胞質に強く局在する傾向を認めた。siTLR4 群の全ての細胞株で仮足様の突起の増加が観察され、遊走能や浸潤能の上昇との関連が示唆された。特にHSC-1では、siTLR4群のTLR4局在が細胞質で減少し、細胞膜に強く局在する傾向が見られた。ImageJを用いた画像解析から、HSC-1とHaCaTのsiTLR4群におけるTLR4の蛍光強度の有意な低下を認め、さらにHSC-1のsiTLR4群でCD44の蛍光強度の有意な上昇を認めた。

これらの結果よりTLR4が皮膚SCCの悪性度に関与し、CD44との相互作用を介して細胞遊走・浸潤性を抑制的に制御する可能性が示唆された。

【結論】

本研究は皮膚SCCの動態にTLR4が抑制的に関与し、これにCD44が相互作用することを示し、SCCでのTLR4の発現低下が悪性度上昇に関与することを示唆した初めての報告である。