




## 学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第442号	氏名	能美 希
審査委員会委員	主査氏名	川原克信	
	副査氏名	守山正胤	
	副査氏名	伊波英克	
<p>研究題目: Toll-like receptor 3 signaling induces apoptosis in human head and neck cancer via surviving associated pathway (頭頸部癌における Toll-like receptor 3 に対する刺激は survivin を介する経路で癌細胞のアポトーシスを誘導する)</p> <p>論文掲載雑誌名: Oncology report</p> <p>論文要旨:</p> <p>本研究は種々の細胞に存在し自然免疫系の重要なセンサーである Toll-like receptor (TLR)の①頭頸部癌細胞における発現、②リガンドの TLR3 発現に及ぼす影響、③アポトーシスを抑制する survivin 発現に及ぼす効果について細胞株を用いて検討したものである。</p> <p>方法は8種の頭頸部癌細胞株について RT-PCR法、real time RT-PCR 法、western blot 法、flow cytometry を用いて①TLR の発現、②TLR3 のリガンドである Polyinosinic:polycytidylic acid (poly I:C) を 0, 10, 100 <math>\mu\text{g}/\text{mL}</math> の濃度でそれぞれ TLR3 の発現量が異なる細胞株、SAS(過剰発現株), HO-1-u-1(中等度発現株), SCC25(非発現株)の培養液に添加し、24 時間後の TLR3 の発現の程度、さらに MTT assay、flow cytometry を用いて細胞増殖、アポトーシスを評価、そして③survivin の発現を RT-PCR 法、western blot 法で検討した。</p> <p>その結果、①頭頸部癌細胞株では TLR s の中で TLR2, TLR3 の発現が強い傾向がみられ、②アポトーシスの誘導は、TLR3 の発現量と poly I:C の添加量に依存し、さらに③すべての細胞株で survivin は同程度発現していたが、survivin 発現抑制の程度は各細胞の TLR3 発現量と poly I:C 濃度に依存することが明らかとなった。</p> <p>以上より、本研究は頭頸部癌の一部において poly I:C-TLR3 のシグナル伝達を介して survivin の発現を抑制し、アポトーシスを誘導することが可能であることを明らかにしたものであり、TLR3、あるいは TLR3 シグナル系によって発現抑制を受ける survivin を標的とした新たな治療法の開拓につながることを示唆され、頭頸部癌のみならず、肺癌、食道癌、乳癌など他の臓器癌の研究、治療に裨益するところ極めて大であり学位に値するものと判断する。</p>			

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 能美 希

## 論 文 題 目

Toll-like receptor 3 signaling induces apoptosis in human head and neck cancer via  
survivin associated pathway

(頭頸部癌における Toll-like receptor 3 に対する刺激は survivin を介する経路で  
癌細胞のアポトーシスを誘導する)

## 要 旨

【背景】 Toll-like receptor (TLR) は自然免疫系の重要なセンサーであり、種々の細胞に存在し、各メンバーが病原微生物の構成成分をそれぞれ特異的に認識する。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になってきた。一方で、最近の研究では 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。生体を侵略するはずの癌細胞自体が生体防御に関わる TLR を発現するという相反する現象が明らかとなってきたが、現在のところ癌細胞における TLR の発現およびその役割については不明な点が多い。今回、我々は頭頸部癌における TLR の発現について検討したので報告する。

【方法】 8 種類の異なる頭頸部癌細胞株において、RT-PCR 法、real-time RT-PCR 法、western blotting 法、flow cytometry を用いて TLR の発現について検討を行った。また、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 in vitro

で検討した。poly I:C はそれぞれ 0, 10, 100 µg/ml を培養液中に添加し、24 時間後の変化を観察した。細胞増殖、アポトーシスを MTT assay および Flow cytometry (Annexin V, PI) を用いて評価した。また、アポトーシス抑制タンパクである survivin の発現とアポトーシスとの関連について、RT-PCR 法および western blotting 法で検討した。

【結果】頭頸部癌細胞株では TLR2 および TLR3 の発現が強い傾向にあった。また、TLR3 は細胞内に発現していた。SCC25 (ヒト由来舌扁平上皮癌)、SAS (ヒト由来舌扁平上皮癌)、HO-1-u-1 (ヒト由来口腔扁平上皮癌) に対し、TLR3 のリガンドである poly I:C で細胞を刺激した。その結果、TLR3 を発現する細胞株では TLR3 の発現の程度によって、また poly I:C の濃度依存性に、アポトーシスが誘導されることが明らかとなった。また、各種細胞株においていずれも survivin は強発現していたが、癌細胞を poly I:C で刺激すると、同様に TLR3 の発現の程度によって、また poly I:C の濃度依存性に survivin の発現抑制がみられた。

【考察】今回我々は、頭頸部癌において mRNA レベル、タンパクレベルで TLR が発現していること、また TLR3 発現株では TLR3 刺激を介してアポトーシスが誘導されることを明らかにした。TLR3 は樹状細胞や各種上皮細胞に発現しており、ウイルスの増殖過程で産生される dsRNA を認識し、生体防御に重要な役割を担っている。今回の検討の結果、頭頸部癌では TLR3 は発現の程度の差はあるが、強く発現する傾向にあり、頭頸部癌における TLR3 は頭頸部癌の病態とも何らかの関連を持っている可能性が示唆された。一方で近年、乳癌、悪性黒色腫、前立腺癌、子宮頸癌、大腸癌、肝細胞癌で TLR3 を介する刺激が、癌細胞のアポトーシスを直接誘導するとの報告がみられるようになったが、今回の我々の結果もこれらを支持するものであった。また、survivin は G2-M 期に発現し、アポトーシス抑制タンパクとしてそれ自体が癌のバイオマーカーあるいは治療のターゲットとして注目されている。今回、頭頸部癌における TLR3 の刺激を介するアポトーシスは survivin の down-regulation を介して誘導されることを示したが、この現象を示す文献は他領域の癌においても報告がなく、我々が初めて報告した。

今回の検討で、頭頸部癌において TLR3 の刺激を介してアポトーシスを誘導できることが明らかとなり、TLR3 あるいは survivin との組み合わせで頭頸部癌の新たな治療の戦略となりうることが示唆された。