

## 第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

### 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, volume 54, number 6, 2019 掲載

DOI: 10.3892/ijo.2019.4790

皮膚の有棘細胞癌 (Cutaneous squamous cell carcinoma: 以下 CSCC) は頻度の高い皮膚悪性腫瘍であり、転移や進行に関わる分子の解明は重要である。Toll 様受容体 4 (Toll-like receptor 4: TLR4) と CD44 は様々な癌で遊走能・浸潤能などとの関与が報告されているが、CSCC での報告は少なく、その機能も明らかにはなっていない。そこで、申請者らは CSCC 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 CSCC 細胞株を用いた実験結果から、TLR4 の CSCC 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ことにした。

日本医科大学付属病院皮膚科で切除された CSCC 26 例と CSCC 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 例のパラフィン包埋組織を用いて、TLR4 と CD44 の免疫組織化学染色を施行した。また、2 種類のヒト CSCC 細胞株 (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) した。KD (siTLR4) 群とコントロール (siCtrl) 群における TLR4 と CD44 の mRNA 発現を RT-qPCR 法で、蛋白質発現を Western blot 法で解析した。さらに、細胞遊走能・浸潤能をボイデンチャンバー法で、細胞形態や TLR4 と CD44 の細胞内での局在・発現を蛍光免疫染色法にて解析した。

CSCC の TLR4 発現は AK/BD 群に比較して有意に高値であった。CSCC 群を組織型で分類すると、TLR4 は転移のリスクが高い低分化型で散在性に細胞膜中心に発現し、高分化型ではびまん性に細胞質に発現した。また、低分化型の TLR4 発現は中分化型や高分化型に比べて有意に低値を示した。CD44 は低分化型では散在性に細胞膜に強く発現し、高分化型では弱く発現した。また、細胞遊走能は 3 種類の細胞株全てで、siTLR4 群が siCtrl 群に比べて有意に上昇した。細胞浸潤能は HSC-1 と HaCaT で、siTLR4 群が有意に上昇した。CD44 の mRNA 発現は 3 種類全てで、siTLR4 群が有意に上昇した。CD44 の蛋白質発現は、CD44s

(standard form) は HSC-1 と HaCaT で、CD44v (variant form) は HSC-5 と HaCaT で、siTLR4 群が有意に上昇した。さらに、TLR4 の蛍光免疫染色では、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みられ、CD44 の蛍光強度の有意な上昇を認めた。

以上の結果から、TLR4 が CSCC の悪性度に関与し、CD44 との相互作用を介して細胞遊走・浸潤能を抑制的に制御する可能性が示唆された。

第二次審査では、①TLR4 発現の臨床的な予後への関与、②転移部位での TLR4 発現、③ TLR4 発現と細胞増殖能の関係、④皮膚における TLR4 のリガンド、⑤他の癌での TLR4 発現の遊走能、浸潤能への関与、などに関して質疑がなされ、それぞれに対して的確な回答が得られ、本研究に関する知識を十分に有していることが示された。

本研究は CSCC の動態に TLR4 が抑制的に関与することを示唆した初めての報告であり、その臨床的意義は高いと考えられた。以上より本論文は学位論文として価値あるものと認定した。