

# 学位論文の要旨

所属	三重大学大学院医学系研究科 生命医科学専攻 病態制御医学講座	氏名	田中 淳一郎
----	-----------------------------------	----	--------

## 主論文の題名

**Functional cell surface expression of Toll-like receptor 9 promotes cell proliferation and survival in human hepatocellular carcinomas**

## 主論文の要旨

細菌やウイルスなどの病原体が生体内に侵入すると、自然免疫が発動する。哺乳動物では自然免疫系のセンサーとして Toll 様受容体 (Toll-like receptor ; TLR) が存在し、ヒトでは TLR1-10 までが同定されている。その中で TLR9 は細菌、ウイルス由来の非メチル化 CpG モチーフである CpG-DNA を認識して炎症性サイトカインや刺激分子などを活性化し、生存にむけて重要な役割を担うパターン認識受容体であるとされている。形質細胞様樹状細胞や胃、小腸粘膜細胞、グリオーマ細胞、前立腺癌細胞、肺癌細胞などの細胞で発現が報告されているが、肝癌細胞における発現様式や機能についてはほとんど解明されていない。本研究では肝癌での TLR9 の発現を検討し、リガンドである CpG-DNA を用いて機能とそのシグナル機構の解明を行った。

まず、免疫染色法にて肝癌での TLR9 発現を調べた。肝癌組織では 85.7% で TLR9 発現が認められ、分化度の違いによる有意差は認めなかった。Western blotting では培養肝癌細胞での TLR9 蛋白が細胞内のみならず細胞膜にも発現しており、全長型 TLR9 が主に細胞膜に、切断型 TLR9 が主に細胞質内に発現していることを確認した。FACS 解析でも TLR9 が細胞表面に存在していることを確認した。これは、TLR9 が肝癌細胞の細胞膜と細胞質内に存在様式を変えて局在することを証明した初めての報告である。

次に、細胞膜 TLR9 の機能を調べるため、肝癌細胞を種々の濃度の CpG-DNA 存在化で培養したところ、濃度依存性に cell viability の増加が確認された。一方、細胞質内 TLR9 の機能を解明するため、lipofection を用いて CpG-DNA を細胞内に移入し肝癌細胞の cell viability を調べたが、変化は認められなかった。

CpG-DNA が、肝癌細胞に対する制癌剤の細胞毒性効果に及ぼす影響を調べるため、CpG-DNA と制癌剤 (CDDP, ADM) を併用投与し細胞膜 TLR9 を刺激したところ、制癌剤単独投与群では cell viability は低下していたが、併用投与群では ADM 単独投与群と比較し cell viability は著明に増加した。Transfected CpG-DNA と ADM を併用投与し細胞質内 TLR9 を刺激したところ、ADM 単独投与群と比較し cell viability は不変であった。CpG-DNA と ADM の併用投与が肝癌細胞内アポトーシス関連蛋白の発現レベルに及ぼす影響について Western blotting にて評価したところ、ADM 単独投与群と比較し併用投与群では Bcl-xL、survivin、XIAP や cFLIP 等の抗アポトーシス蛋白の発現が増加していた。

細胞膜 TLR9 を刺激した際に認められた肝癌増殖に関連した遺伝子の発現を評価するために、GeneChip microarray 解析を行ったところ、SNRPN, SMG1, MALAT1, SETBP1, NDRG4 等の腫瘍増殖や転移、アポトーシス抑制に密接に関連した遺伝子群の発現が up-regulate され、一方、KLF5, GDF5OS, ANKRD20B, ANKRD6 等の腫瘍抑制に関連した遺伝子群の発現が down-regulate されていた。これらの結果より肝癌細胞では細胞質内の他、細胞膜にも TLR9 が発現し、CpG-DNA の曝露により肝癌細胞増殖、腫瘍形成を促す可能性が示唆された。