

# 論文の内容の要旨

論文題目 腎細胞癌における TLR3 の発現および機能解析

指導教員 深山正久教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 15 年 4 月入学

医学博士課程

病因・病理学専攻

森川鉄平

## 1. 緒言

腎細胞癌 (RCC) は成人悪性腫瘍の 2-3% を占め、日本およびアメリカでは罹患率・死亡率ともに増加傾向にある。RCC の治療としては早期外科的切除が有効とされているが、根治的切除不能例や再発例のような進行性腎細胞癌には有効な治療法がない。すなわち、化学療法や放射線療法はほとんど効果を示さず、最も有効とされているインターフェロン  $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) やインターロイキン 2 といった免疫療法の奏効率も低い。本研究では、RCC の大部分を占める Clear cell RCC (CCRCC) に着目し、CCRCC の新たな治療標的となりうる分子を見出すことを目的とした。

## 2. 方法と結果

### A. CCRCC 特異的高発現遺伝子の探索

東京大学医学部附属病院で切除された RCC 30 例および非癌部正常腎 9 例の凍結組織から抽出した RNA ならびに 15 種類の正常臓器から抽出された市販の RNA を用いて網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、正常腎および各種正常臓器で発現が低く、CCRCC で特異的に発現が亢進している遺伝子として 36 遺伝子が選出された。その中から toll-like

receptor 3 (*TLR3*)に着目した。定量的 RT-PCR によって、正常腎と比較して CCRCC で *TLR3* の発現が亢進していることを確認した。

#### B. TLR3 タンパクの CCRCC での発現

CCRCC 組織での TLR3 タンパクの発現を調べるため、免疫ブロッティングおよび免疫染色での検討を行った。市販の抗 TLR3 モノクローナル抗体を用いた免疫ブロッティングでは *TLR3* 強制発現細胞株および CCRCC 組織において特異的なタンパク発現を認め、同抗体特異性の確認とともに、CCRCC 組織における TLR3 特異的発現の可能性が強く示唆された。次いで、同一の抗体を用いて多数症例の RCC 組織に対して免疫染色を行った。対象としては 1993 年から 2004 年にかけて東京大学医学部附属病院にて手術的に切除された原発性 RCC 208 例および CCRCC 肺転移巣 8 例のパラフィンブロックを用いた。原発性 RCC についてはティッシュマイクロアレイを作成して免疫染色を行った。結果として、CCRCC では 189 例中 184 例 (97.4%) に TLR3 の陽性像が得られた。Papillary RCC でも 11 例中 9 例 (81.8%) に陽性像を認めた。しかし、Chromophobe RCC では 8 例中全てが陰性だった。CCRCC の肺転移巣においても高頻度に TLR3 の発現を認めた。さらに、CCRCC 189 例について、TLR3 発現と臨床病理学的因子との相関を検討した。TLR3 高発現群では低発現群に比べて静脈侵襲が少ない傾向があったものの、TLR3 の染色強度と、年齢・性別・核異型度・pT・静脈侵襲との間に有意差は見られなかった。

#### C. RCC 細胞株に対する TLR3 リガンドの効果

8 種の RCC 細胞株を用いて *in vitro* での TLR3 の機能について検討を行った。まず、定量的 RT-PCR によって各細胞株での *TLR3* mRNA の発現を確認した。10  $\mu$ g の poly I:C (TLR3 リガンド) を投与して 72 時間後の生細胞数を MTT assay で評価したところ、5 個の細胞株で有意な増殖抑制効果を認め、*TLR3* の発現が高い株ほど強い増殖抑制効果を示す傾向があった。Poly I:C による増殖抑制効果は用量依存的であり、その機序としてはアポトーシスの誘導が考えられた。Poly I:C 投与によって *IFN $\beta$*  や各種サイトカインなどの発現が亢進した。siRNA を用いた *TLR3* 遺伝子のノックダウンにより、poly I:C による *IFN $\beta$*  発現誘導および増殖抑制効果は *TLR3* 依存的であることが示された。また、*IFN $\alpha$*  投与により、*TLR3* mRNA の発現および poly I:C による TLR3 下流遺伝子の発現、増殖抑制効果が増強した。

### 3. 結語

本研究では、TLR3 が CCRCC 組織で高発現していることを遺伝子レベル、タンパクレベルで初めて明らかにした。また、RCC 細胞株への poly I:C 投与により *IFN $\beta$*  などが誘導され増殖抑制効果を発揮すること、さらに、*IFN $\alpha$*  と poly I:C の併用によって相乗的な増殖抑制効果を発揮することなどを明らかにした。以上のことから、TLR3 は CCRCC に対する有望な新規分子治療標的候補であると考えられた。