

原著 ヒト卵巣癌細胞株における Toll-like receptor シグナルパスウェイの解析

昭和大学医学部産婦人科学教室

林 昌貴 奥田 剛 千葉 博
長塚 正晃 岡井 崇

要約：卵巣癌は女性の死亡原因の中で最も重要なものの一つであるが、その発生、悪性化のメカニズムはほとんど解明されていない。一方、大腸癌、乳癌、肝臓癌等において癌細胞の発生や増殖が炎症と密接に関わっているという報告が多数認められている。婦人科領域における炎症は、臨床の現場においてしばしば認められ、感染は膣から子宮、さらには付属器（卵巣、卵管）へと上行する。しかし、卵巣癌における炎症との関連は報告も少なく、未だ詳細は不明である。さらに一部の卵巣癌（類内膜腺癌、明細胞腺癌）は慢性炎症類似状態ともいえる子宮内膜症がその発生に関係があるとされているが、メカニズムは不明である。Toll-like receptor (TLR) は細胞表面受容体で、病原体を感知し自然免疫を作動させ、パスウェイ下流でサイトカインを誘導することで炎症反応と関連する。ヒトでは10種類のTLRが知られており、各TLRは特異的アゴニストを認識し下流のNF- κ B, IFNなどのシグナルを活性化する。そして最終的にサイトカインやケモカインを誘導し、癌増殖や薬剤耐性にも関与するとされている。表層上皮性卵巣癌の組織型は漿液性、粘液性、類内膜、明細胞腺癌の4つが多く、本研究ではこれらの各細胞株を用いて、TLRシグナルパスウェイ関連遺伝子の発現を検討し、加えてTLR特異的アゴニストを用いたサイトカインの誘導による機能解析を行った。その結果、漿液性腺癌では細菌の慢性的な卵巣への暴露によるリポ蛋白に対する反応の関与が示唆された。粘液性腺癌においても、リステリア等の感染が関与している可能性が示唆された。明細胞腺癌では生物学的特性としてTLRパスウェイ関与の可能性は低いと思われた。類内膜腺癌ではその特徴として、細菌鞭毛構成蛋白であるフラジェリンの関与が示唆された。以上より各卵巣癌は組織型により癌細胞内TLRパスウェイの性質が異なっており、これが細胞増殖などの生物学的特性に影響を与えている可能性が示唆された。

キーワード：卵巣癌, toll-like receptor, NF- κ B, MyD88

近年、癌細胞の発生や増殖が炎症と密接にかかわっているという報告が多数認められる。炎症は免疫防御や組織修復やリモデリングに必要なプロセスであるが、同様のプロセスは組織損傷だけでなく、増殖サイクルの速い生殖細胞等でも起こっている。これらのプロセスは死滅した細胞の除去や新しい細胞の増殖を、血流供給を保ちながら行っている。また、それに付随してサイトカイン、ケモカインが主な制御因子として機能している。その一方で、慢性の感染と炎症は発癌のプロセスで重要な因子の一つであることが多くの研究で示されている。例えば大腸では、潰瘍性大腸炎やクローン病が癌と密接な関係にあり¹⁾、胃ではピロリ菌が胃癌の発生と密接な

関係を有するといわれている²⁾。その他、慢性肺炎と肺癌、慢性胆嚢炎と胆嚢癌、慢性膵炎と膵癌、肝炎と肝臓がんなど、多くの臓器で慢性炎症と癌の関係が指摘されている³⁻⁵⁾。また、NSAIDsを長期服用し抗炎症作用を働かせることにより炎症が抑制され、発生リスクが減少した癌があるという報告もされている⁶⁾。

卵巣癌の増殖や転移にも炎症でのマクロファージが関与するといわれており、また慢性炎症の類似状態である内膜症は、卵巣癌のリスクファクターと言われている⁷⁾。このように、卵巣癌でも炎症との関連性を示唆する報告はあるものの、そのメカニズムに関して不明な部分が多い。

免疫とは、生体に侵入した病原体を認識し排除するメカニズムである。哺乳類においては、獲得免疫と自然免疫に大きく分けることが出来るが、自然免疫は獲得免疫が活性化されるまでの一時的なものとして、非特異的な作用を持つと考えられてきた。Toll Like Receptor (TLR) は細胞膜表面に存在する受容体タンパク質で、作用機序としては、pathogen-associated molecular patterns (PAMPs)、例えばリポポリサッカライド (LPS)、ペプチドグリカン (PGN) といったウイルス、細菌、真菌などの病原体に特有の構成成分と結合し、二量体を形成することによってされている。さらに、非特異的免疫機序として、パスウェイ下流でサイトカインを誘導し、自然免疫を作動させる⁸⁾。このサイトカインの作用が炎症や癌増殖、薬剤耐性と関連しているとの報告がある。そのため、TLR は臓器炎症を説明するための危機感知受容体 (danger-sensing receptor) としても認識されるようになった。

Toll は *Drosophila* (ショウジョウバエ) の発生に必要な遺伝子として発見されたものであり、その後哺乳類でも相同性の高い遺伝子が発見され、これが TLR と命名された。TLR パスウェイは免疫系細胞に広く存在し、細菌の産生物やストレス因子に反応する。また TLR は、免疫システム以外でも粘膜上皮細胞やトロホプラスト細胞でも認められるという報告があり、同様に下流でサイトカインを発現する。TLR には細胞膜に存在する Membranal TLR (TLR1,2,4,5,6) と細胞質内に存在する Cytoplasmic TLR (TLR3,7,8,9) がある。Membranal TLR は細胞外のアゴニストを認識し、Cytoplasmic TLR は細胞内のシグナルを認識する。TLR10 は Membranal TLR で、尿路感染細菌にある分子をリガンドとするようであるが、現在のところ詳細は不明である。TLR パスウェイは myeloid differentiation factor-88 (MyD88) 依存性、非依存性があり、それぞれ下流で異なったシグナルでサイトカインやケモカインの発現を誘導する。MyD88 は TLR のアダプター蛋白であるが、ほとんどの TLR シグナルは通常の MyD88 依存性のパスウェイである。リガンドが結合した TLR には MyD88 が誘導され、Toll-Interleukin-1 Receptor (TIR) ドメインで結合する。続いて IRAK 蛋白と TRAF6 蛋白のリクルートにより下流の Nuclear factor- κ B (NF- κ B) シグナル

パスウェイや MAP kinase シグナルパスウェイ (ERK-CREB パスウェイ, JNK-API パスウェイ, p38 パスウェイなど) が活性化される。このカスケードは細胞増殖シグナルであると同時に、サイトカインやケモカインを産生する炎症反応のシグナルでもある⁹⁾。

ヒトにおける TLR は 10 種類のファミリーメンバーから構成されている。10 種類のうち、現在まで 9 種類の TLR において、少なくとも 1 つの特異的リガンドが同定されている。主なものとしては、TLR2 はグラム陽性菌の構成成分である PGN を認識し¹⁰⁾、TLR4 はグラム陰性菌の構成成分である LPS を認識する^{11,12)}。また、TLR3 は、ウイルスが細胞内で増殖する際に形成する 2 本鎖 RNA を認識する¹³⁾。一方で TLR9 は細菌 DNA に数多く存在し、哺乳動物の DNA には少ない非メチル化された CpGDNA を認識する¹⁴⁾。TLR に関する報告はほとんどが免疫システムに関するものであったが、最近では癌の発生や増殖に関する報告が目ざされている。例えば *Helicobacter pylori* と胃炎、胃癌の発生に TLR4 の発現が関連しているとの報告がある¹⁵⁾。また、肝癌の発生に関わる C 型肝炎ウイルスの感染、インターフェロンによる作用での TLR7 の発現変化も報告されている¹⁶⁾。そのような中で、卵巣癌に関する報告は現在のところあまり多くない¹⁷⁾。

表層上皮性卵巣癌は主に 4 つの組織型 (漿液性、粘液性、類内膜、明細胞腺癌) に分類され、異なった生物学的性質を有すると考えられている。本研究ではこれらの卵巣癌各組織型における TLR シグナルパスウェイ関連遺伝子の発現と機能が、各組織型の生物学的特性に関与するかを検討した。

研究方法

1. 細胞培養

定常状態での卵巣癌各組織型細胞における TLR パスウェイ関連遺伝子発現を評価するために、ヒト卵巣漿液性腺癌細胞株 JHOS-4 (RCB1678)、粘液性腺癌細胞株 JHOM-1 (RCB1676)、明細胞腺癌細胞株 JHOC-5 (RCB1520)、類内膜腺癌細胞株 OVK18#102 (RCB2535) を RIKEN Cell Bank (Tsukuba, Japan) より購入した。細胞は、JHOS-4, JHOM-1, JHOC-5 は Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM): Ham's F12 = 1 : 1 培養液 (fetal

Table 1 Functional Gene Groupings in RT² Profiler™ PCR Array

Toll-Like Receptors: LY64, SIGIRR, TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR6, TLR7, TLR8, TLR9, TLR10.

Adaptors & TLR Interacting Proteins: BTK, CD14, HMGB1, HRAS, HSPA1A, HSPD1, LY86 (MD-1), LY96 (MD-2), MAPK8IP3, MYD88, PELI1, RIPK2, SARM1, TICAM1, TICAM2, TIRAP, TOLLIP, TRIF.

Effectors: CASP8, EIF2AK2, FADD, IRAK1, IRAK2, MAP3K7 (TAK1), MAP3K7IP1 (TAB1), NR2C2, PPARA, PRKRA, ECSIT (SITPEEC), TRAF6, UBE2N, UBE2V1.

Downstream Pathways and Target Genes:

NFκB Pathway: CCL2, CHUK, CSF2 (GMCSF), CSF3 (GCSF), IFNA1, IFNB1, IFNG, IKBKB, IL1A, IL1B, IL2, IL6, IL8, IL10, IL12A, LTA, MAP3K1, MAP4K4, NFKB1, NFKB2, NFKBIA, NFKBIL1, NFRKB, REL, RELA, TNF, TNFRSF1A.

JNK/p38 Pathway: ELK1, FOS (c-Fos), JUN, MAP2K3, MAP2K4 (JNKK1), MAP3K1 (MEKK), MAPK8 (JNK1).

NF/IL6 Pathway: CLECSF9, PTGS2.

IRF Pathway: CXCL10, IFNA1, IFNB1, IFNG, IRF1, IRF3, TBK1.

Regulation of Adaptive Immunity: CD80, CD86, RIPK2, TRAF6.

bovine serum : FBS 10%, 0.1 mM NEAA, 50 IU/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin), OVK18#102 は Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 培養液 (FBS 10%, 50 IU/ml penicillin, 50 μg/ml streptomycin) で行った。37°C, CO₂ 濃度 5% 下で維持した。

2. リアルタイム PCR アレイを用いた TLR パスウェイの解析

上記細胞株より RNeasy Mini Kit (QIAGEN, CA) を用い Total RNA を抽出した。対照として, Human Ovarian Surface Epithelial Cell total RNA (Science Cell Research Laboratories, CA) を用いた。RT² First Strand Kit (SABiosciences, MD), 続いて TLR シグナルパスウェイ関連遺伝子に関し, RT² Profiler™ PCR Array: Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway (SABiosciences, MD) を用いて各パスウェイに代表的な遺伝子の発現の検討を行った。RT² Profiler™ PCR Array: Human Toll-Like Receptor Signaling Pathway 上に配列されている遺伝子群を Table 1 に示した。得られた結果を ΔΔCt 法にて Fold Change 解析を行った。

3. TLR シグナル機能の評価

各組織型別細胞株における TLR 機能評価をするため, 上記各細胞株に TLR 特異的リガンドを下記濃度で添加した。Pam3CSK4 (TLR1/2), 1 μg/

mL; Heat-killed *Listeria monocytogenes* (TLR2), 10⁸ cells/mL; Poly (I : C) (TLR3), 10 μg/mL; LPS (TLR4), 100 ng/mL; Flagellin (TLR5), 1 μg/mL; FSL-1 (TLR 6/2), 1 μg/mL; Imiquimod (TLR7), 0.5 μg/mL; ssRNA40 (TLR8), 0.5 μg/mL; CpG ODN (type B) (TLR9), 5 μM (Invivogen, CA). 添加 24 時間後, RNeasy Mini Kit (QIAGEN, CA) を用いて Total RNA を抽出, RT² First Strand Kit (SABiosciences, MD), RT² qPCR Primer Assay-SYBR Green HumanIL-6/CCL-2 (SABiosciences, MD) を用いて, TLR 下流のシグナルである NFκB の反応により誘導されるサイトカイン, Interleukin 6 (IL-6) と chemokine ligand 2 (CCL-2) の発現をリアルタイム PCR で検討した。結果は ΔΔCt 法にてアゴニスト非添加細胞株を対照として Fold Change 解析を行った。

結 果

1. 卵巣癌細胞株における TLR パスウェイ関連遺伝子発現

卵巣癌各細胞株で TLR パスウェイ関連遺伝子の発現検討を, リアルタイム PCR アレイを用いて行った。結果は各組織型毎に Table 2 から Table 5 に示した。また, 対照との比較を Fig. 1 に示した。漿液性腺癌細胞株 JHOS-4 では TLR6,7,8,10 が過剰

Table 2 Genes Over and Under Expressed in JHOS-4 Cells (Serous adenocarcinoma)

Genes Over-Expressed in JHOS-4 vs. Control Group	
Gene Symbol	Fold Regulation
CCL2	11.3252
CD80	8.0081
CHUK	4.1664
FOS	19.5619
HMGB1	7.8553
HSPA1A	8.157
IRAK1	4.8511
IRF3	4.4569
JUN	4.9192
CD180	4.7825
MAP3K1	7.7582
MAP3K7IP1	11.4115
NFKB2	6.5986
NFRKB	6.985
RIPK2	12.9599
SARM1	5.0822
ECSIT	5.2834
TLR6	7.6752
TLR7	15.9095
TLR8	6.4329
TLR10	4.3563
UBE2V1	4.4835
Genes Under-Expressed in JHOS-4 vs. Control Group	
Gene Symbol	Fold Regulation
CD14	-11.7865
CLEC4E	-497.3555
CSF2	-1119.8255
CSF3	-150.4661
CXCL10	-22.3677
IFNA1	-5.2053
IL1A	-2245.5057
IL1B	-1165.3533
IL6	-9.1193
IL8	-20.6329
IRAK2	-6.2995
IRF1	-4.1253
LY96	-56.36
TICAM2	-4.4263
TLR2	-9.2026
TLR3	-9.9604
TLR4	-34.4233
TICAM1	-4.4927
B2M	-4.0704

Table 3 Genes Over and Under Expressed in JHOM-1 Cells (Mucinous adenocarcinoma)

Genes Over-Expressed in JHOM-1 vs. Control Group	
Gene Symbol	Fold Regulation
TLR4	4.7962
TNFRSF1A	6.8347
Genes Under-Expressed in JHOM-1 vs. Control Group	
Gene Symbol	Fold Regulation
CCL2	-279.6547
CD14	-27.0449
CLEC4E	-701.1859
CSF2	-6201.9415
CSF3	-212.1314
CXCL10	-33.1485
FOS	-4.0231
HSPA1A	-522.9326
IFNB1	-4.2137
IL1A	-335.0456
IL1B	-80.1106
IL6	-6.3296
IL8	-215.5849
IRAK2	-10.417
IRF1	-12.5307
MAP2K3	-6.2838
MAP4K4	-4.9388
PELI1	-4.5209
PTGS2	-4.7659
SIGIRR	-191.0522
TIRAP	-4.3218
TLR2	-153.3868
TLR3	-8.1093
TLR5	-7.055
TNF	-419.7984
TICAM1	-18.9798

発現し、TLR2,3,4に発現低下を認めた。特にTLR7は15.9倍と高発現であった。粘液性腺癌細胞株JHOM-1ではTLR4の過剰発現を認め、逆にTLR2,3,5に発現低下を認めた。明細胞腺癌細胞株JHOC-5では定常状態では過剰発現しているTLRはなく、逆にTLR1,2,5,9、またTLR2,4,5,7,8,9のアダプターであるMyD88は発現が低下していた。類内膜腺癌細胞株OVK18#102では、過剰発現を示したTLRは認めず、TLR1,2,3,4,6は逆に発現低下を認めた。NF κ Bパスウェイ関連遺伝子は、4つの組織型で概して発現低下傾向であった。

Table 4 Genes Over and Under Expressed in JHOC-5 Cells (Clear cell adenocarcinoma)

Genes Over-Expressed in JHOC-5 vs. Control Group	
Gene Symbol	Fold Regulation
CLEC4E	23.6861
HSPA1A	13.5633
LTA	4.2164
HPRT1	4.0792
Genes Under-Expressed in JHOC-5 vs. Control Group	
Gene Symbol	Fold Regulation
CD14	-525.4304
CSF2	-14.382
CSF3	-157.6178
CXCL10	-81.1312
IFNA1	-5.4527
IFNB1	-13.6642
IL1A	-65.4769
IL1B	-103.0463
IRF1	-8.1664
MYD88	-623.2714
SARM1	-61.5153
SIGIRR	-232.2332
TLR1	-10.4061
TLR2	-676.4576
TLR5	-6.7048
TLR9	-7.9802
TICAM1	-7.783

2. 卵巣癌細胞株における TLR 機能

各卵巣癌細胞株で発現している TLR の機能評価を行うため、各 TLR 特異的アゴニストを添加し、その下流にある NF κ B パスウェイ転写産物であるサイトカイン IL-6 と CCL-2 の発現を検討した。結果は Fig. 2 に示した。漿液性腺癌細胞株では TLR6 アゴニストによって IL-6 が対照と比較して 8.3 倍、CCL-2 は 32 倍と高反応を示した。定常状態で高発現を認めた TLR6,7,8 は機能していると考えられるが、15.9 倍と過剰発現していた TLR7 においては一部機能を認めないものも含まれている可能性が示唆された。粘液性腺癌細胞株においては、IL-6 は TLR1 アゴニストによって強い誘導を認め TLR3,4,5,6,7 のアゴニストにより 2 倍以上誘導された。CCL-2 は TLR-2 のアゴニストで 2 倍以上誘導されたが、その他のアゴニストによる誘導は認められなかった。定常状態で過剰発現している TLR4 は機能的であると考え

Table 5 Genes Over and Under Expressed in OVK18#102 Cells (Endometrioid adenocarcinoma)

Genes Over-Expressed in OVK18#102 vs. Control Group	
Gene Symbol	Fold Regulation
CHUK	6.0862
HMGB1	8.0752
IRF3	6.1411
MAP3K7IP1	5.6594
NFKB2	21.5179
NFKBIL1	4.0735
NFRKB	5.1816
SARM1	17.3748
ECSIT	7.1857
TIRAP	4.2037
UBE2N	4.4618
UBE2V1	21.0746
HGDC	7.1379
Genes Under-Expressed in OVK18#102 vs. Control Group	
Gene Symbol	Fold Regulation
CCL2	-1611.0121
CD14	-144.814
CLEC4E	-368.0203
CSF2	-658.6522
CSF3	-111.338
CXCL10	-814.1366
HSPA1A	-107.0664
IFNB1	-9.6521
IL12A	-7.4573
IL1A	-3172.8203
IL1B	-2754.1761
IL6	-5154.0975
IL8	-18372.0195
IRAK2	-2203.6511
JUN	-35.8892
LY96	-267.5768
NFKBIA	-8.7888
PELI1	-31.9851
PTGS2	-191.477
SIGIRR	-40.3642
TLR1	-7.3506
TLR2	-477.8361
TLR3	-170.0123
TLR4	-34.5337
TLR6	-5.389
TNF	-2369.1299
TNFRSF1A	-31.6814
TICAM1	-5.7492

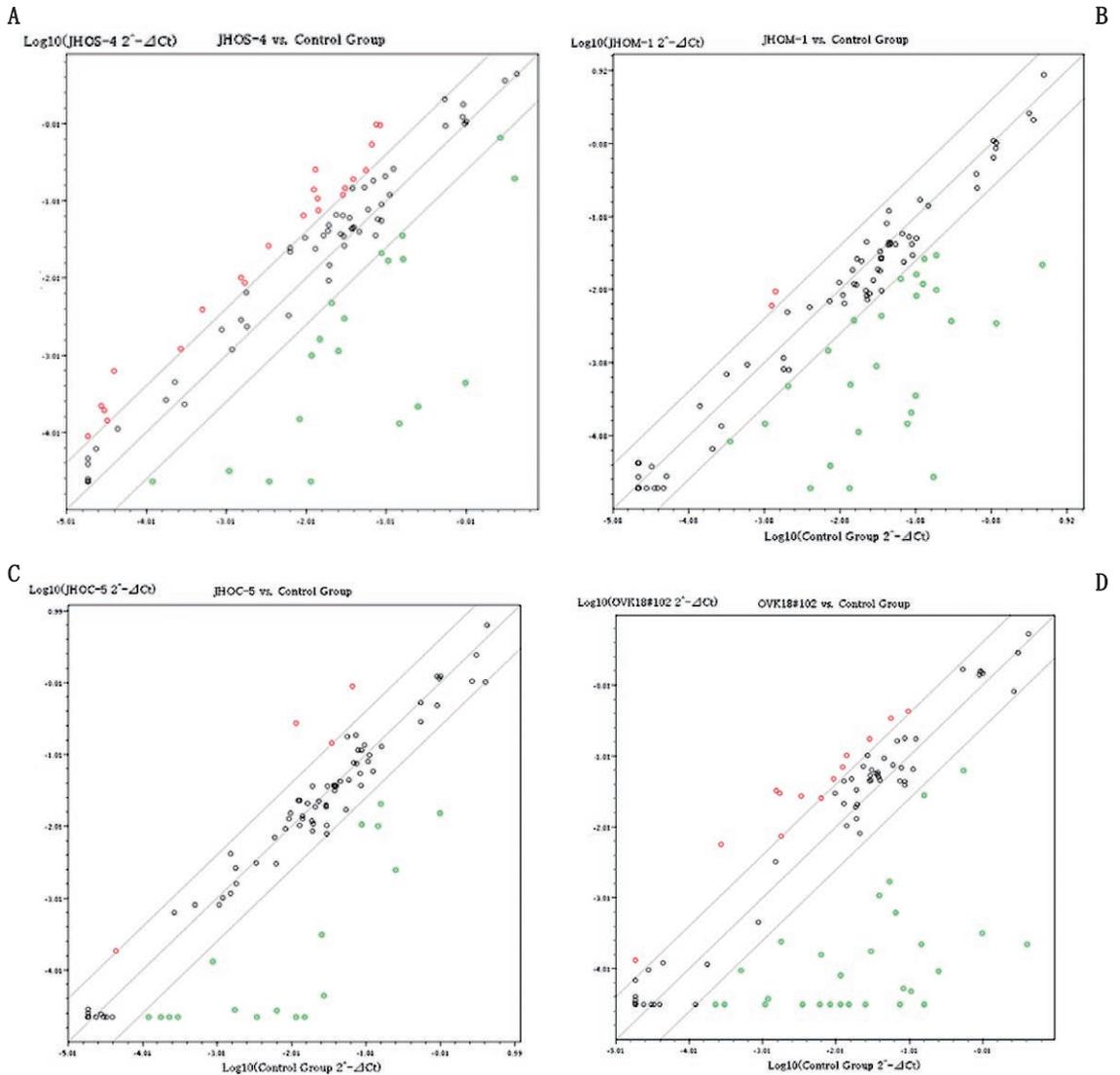


Fig. 1 Genes Over and Under Expressed in JHOS-4 (Panel A), JHOM-1 (Panel B), JHOC-5 (Panel C), OVK18#102 (Panel D) cells.

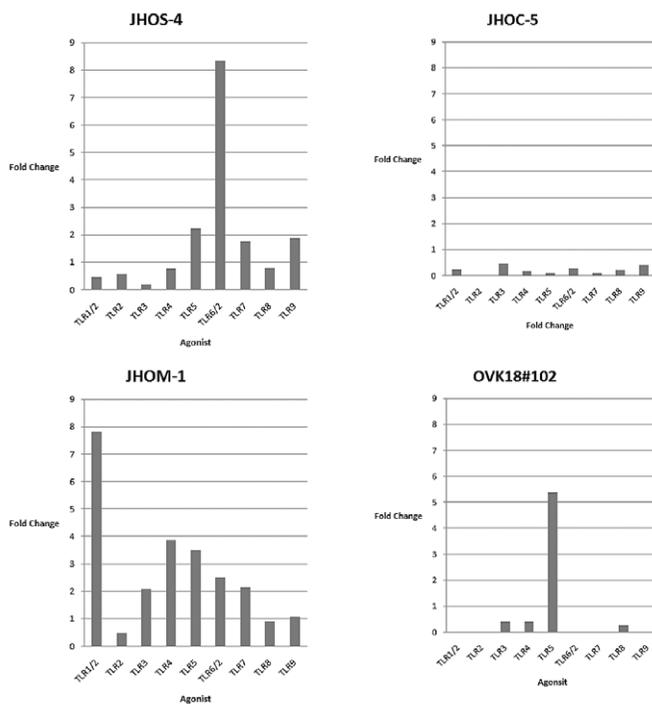
られたが、down regulateされていたTLR2,3,5もアゴニストにより誘導されたと思われる。明細胞腺癌細胞株においては、何れのアゴニストにおいても対照と比較してIL-6, CCL-2の高い誘導は認められなかった。類内膜腺癌細胞株ではTLR5アゴニストのみがIL-6では5倍以上、CCL-2では2倍以上の誘導を認めた。

考 察

付属器炎などの婦人科臓器の炎症は、臨床上市ば

しば認められる疾患である。しかしこれら炎症と卵巣癌の関連性は示唆されるものの、そのメカニズムは明らかではない^{18,19)}。TLRパスウェイは特異的アゴニストを認識し、悪性腫瘍への関与が報告されている²⁰⁾。正常卵巣上皮、上皮性卵巣腫瘍ではTLR2,3,4,5が発現し、また顆粒膜細胞内での発現を認めたとの報告もある¹⁷⁾。これは本実験結果と若干の相違を認めるが、卵巣癌細胞における遺伝子発現のパターンが組織亜型やGradeとの関連もあり、今後卵巣癌細胞株では樹立した癌の組織亜型や

A (IL-6)



B (CCL-2)

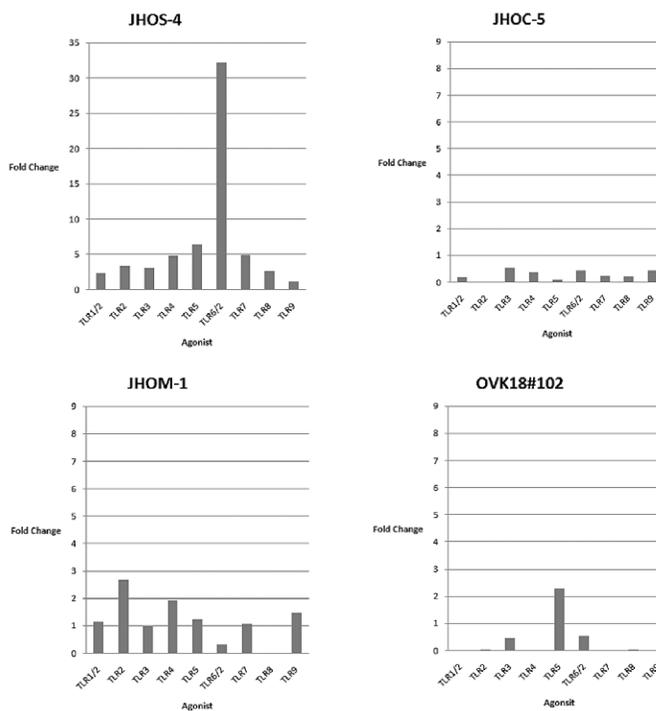


Fig. 2 Functional TLR signaling in ovarian cancer cell lines. Cell lines were stimulated with agonists for TLRs [Pam3CSK4 (TLR1/2) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; heat-killed *Listeria monocytogenes* (TLR2) 10^8 cells/mL; Poly (I : C) (TLR3) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$; LPS (TLR4) 100 ng/mL; Flagellin (TLR5) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; FSL-1 (TLR 6/2) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$; Imiquimod (TLR7) 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; ssRNA40 (TLR8) 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$; CpG ODN (type B) (TLR9) 5 μM] for 24 h and assessed for IL-6 (A) and CCL-2 (B) by Real Time PCR.

Gradeなども考慮する必要があるかもしれない。一方、間質内でTLRは発現していないとの報告がある¹⁷⁾。このことから、卵巣表面での外的要因からの感染防御システム、つまり経腔的、あるいは腹腔内からの病原曝露に対するTLRの作用が示唆される。子宮内膜においては、TLR4が上皮細胞と間質細胞で発現を示し、エストロゲンの作用により発現の変化を認めたという報告がある²¹⁾。また卵管性不妊の原因となる*Chlamydia trachomatis*感染症による卵管炎発症に、TLR2、TLR4の発現が関与しているという報告もある²²⁾。最近の研究では、ヒトパピローマウイルスが関与する子宮頸部異形成、子宮頸癌のGradeにTLR5とTLR9が関連しているともいわれている²³⁾。これらのことから、女性生殖器における感染に、それに関わる炎症と防御機構としてのTLRの役割が重要な意義を持っていると思われる。

本研究では、卵巣漿液性腺癌においては、TLR6,7,8,10が過剰発現していた。特にTLR7は15倍と強い発現を認めた。一方でTLR6アゴニストによる誘導ではCCL-2は8倍以上、IL-6は30倍以上と過剰に誘導された。TLR6およびTLR1、TLR2はヘテロ二量体となることで、マイコプラズマ由来のリポタンパク質やリポペプチドを細胞膜上で認識する²⁴⁾。また細菌、ウイルスや自己の核酸に反応するTLRとしてTLR7は1本鎖RNAを認識する²⁵⁾。卵巣への感染は、腹腔内細菌叢からの付着、経腔的、経消化管的等の要因で起こる。漿液性腺癌の上記TLRの過剰発現は、これらの慢性的な卵巣への曝露によるリポタンパク質に対する反応が、癌の増殖に関わっている可能性を示唆する。また、漿液性腺癌細胞におけるTLR7は定常状態で過剰発現をしているにもかかわらず、アゴニストにより誘導されたものの2倍以下であった。このことは、漿液性腺癌細胞におけるTLR7には、非機能的なものも含まれている可能性を示唆する。またこれには、この細胞内でのTLR7遺伝子変異、転写後の制御、さらにMyD88非依存シグナル異常の関与も考えられる。

粘液性腺癌ではIL-6はTLR1,3,4,5,6,7のアゴニストにより誘導され、CCL-2はTLR2のアゴニストで誘導されたが、その他のアゴニストによる誘導は認められなかった。このアゴニストの背景を考えると、粘液性腺癌ではリステリア等何らかの細菌の暴

露、それに対するトリアシル化メチルタンパクの反応或いはアポトーシスがNF- κ Bを活性化し、炎症そして癌増殖を導いている可能性がある²⁶⁾。

明細胞腺癌では定常状態で過剰発現しているTLRはなく、逆にTLR1,2,5,9およびMyD88の発現低下が認められた。また、TLRアゴニストによる誘導に関しても強い発現を認めなかった。明細胞腺癌では、卵巣内の子宮内膜症による慢性的な炎症が癌増殖を起こすとされている²⁷⁾。しかしながら、細胞株を用いた本研究では、この腫瘍の増殖等にどれだけTLRを介した反応が関与しているかを明確にすることが出来なかった。

類内膜腺癌では定常状態で過剰発現を示したTLRは認めず、逆にTLR1,2,3,4,6は発現低下していた。アゴニストによる誘導では、CCL-2、IL-6ともにTLR5のアゴニストであるフラジェリンにのみ誘導された。フラジェリンは細菌の鞭毛を構成するタンパク質の1種であり、経腔的な感染、あるいは何らかの常在菌による持続的な感染が、類内膜腺癌に影響を及ぼす可能性が示唆された²⁸⁾。

各卵巣癌細胞内で過剰発現し、アゴニストによる誘導でサイトカインを産生した上記の機能性TLRは、炎症性サイトカインを産生することにより癌細胞増殖や、癌細胞自身の生存に関与していると思われる。

TLR4とTLR2に関して、マウス癌細胞株を用いた研究で、アゴニスト添加で腫瘍の増殖を認めたとの報告がある²⁹⁾。また、TLRアダプター分子であるMyD88の欠損によりIL-6の産生低下を介して腫瘍増殖が抑制されたとの報告があるが、本実験においてはいずれの組織型においてもMyD88の過剰発現はなかった。しかしこれが抑制されていた明細胞腺癌細胞株においてはアゴニストへの反応性も低下していた。これにより明細胞腺癌ではdown regulateしていたTLR1,2,5,9のみならず、MyD88の発現低下も明細胞腺癌の生物学的特性に関与している可能性が示唆される。小腸腺癌モデルでMyD88抑制により腫瘍増殖が認められたという報告もあり、卵巣明細胞腺癌の腫瘍増殖とTLR機能の関連は興味深い³⁰⁾。

われわれは卵巣癌各組織型の細胞株を用いた解析で、TLRシグナルパスウェイ関連遺伝子の発現と機能が組織型により相違がある可能性を示し、TLR

アダプター蛋白である MyD88 を含め腫瘍細胞内で実際に機能している TLR を確認した。また漿液性腺癌細胞における TLR7 のように非機能性の TLR も含まれていることを示したが、このように腫瘍細胞内で異常発現しているものは、今後特異的バイオマーカーとして利用できる可能性もある。さらに今後の課題としては、卵巣癌細胞株で TLR アゴニスト添加によるサイトカイン誘導が NF κ B の活性化によるものかどうか、卵巣癌における腫瘍増殖と TLR 機能の関連、さらに組織型別 TLR の薬剤耐性への影響、そして臨床進行期を考慮したヒト卵巣癌組織での TLR 発現などの検討が望まれる。

なお、本研究の一部は、昭和大学学術研究奨励金と日本私立学校振興・共済事業団の私立大学等経常費補助金特別補助によって遂行された。

文 献

- 1) Balkwill F and Coussens LM: Cancer: an inflammatory link. *Nature* **431** : 405-406, 2004.
- 2) Ernst PB, Takaishi H and Crowe SE: Helicobacter pylori infection as a model for gastrointestinal immunity and chronic inflammatory diseases. *Dig Dis* **19** : 104-111, 2001.
- 3) Balkwill F and Mantovani A: Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet* **357** : 539-545, 2001.
- 4) Coussens LM and Werb Z: Inflammation and cancer. *Nature* **420** : 860-867, 2002.
- 5) Li Q, Withoff S and Verma IM: Inflammation-associated cancer: NF-kappaB is the lynchpin. *Trends Immunol* **26** : 318-325, 2005.
- 6) Gupta RA and Dubois RN: Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat Rev Cancer* **1** : 11-21, 2001.
- 7) Otsuka J, Okuda T, Sekizawa A, *et al*: K-ras mutation may promote carcinogenesis of endometriosis leading to ovarian clear cell carcinoma. *Med Electron Microsc* **37** : 188-192, 2004.
- 8) Janeway CA Jr and Medzhitov R: Innate immunerecognition. *Annu Rev Immunol* **20** : 197-216, 2002.
- 9) Takeda K and Akira S: TLR signaling pathways. *Semin Immunol* **16** : 3-9, 2004.
- 10) Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, *et al*: Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram positive bacterial cell wall components. *Immunity* **11** : 443-451, 1999.
- 11) Qureshi ST, Larivière L, Leveque G, *et al*: Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (TLR4). *J Exp Med* **189** : 615-625, 1999.
- 12) Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, *et al*: Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hypo responsive to lipopolysaccharide; evidence for TLR4 as LPS gene product. *J Immunol* **162** : 3749-3752, 1999.
- 13) Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, *et al*: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* **408** : 740-745, 2000.
- 14) Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, *et al*: A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* **408** : 740-745, 2000.
- 15) Hishida A, Matsuo K, Goto Y, *et al*: Toll-like receptor 4 +3725 G/C polymorphism, Helicobacter pylori seropositivity, and the risk of gastric atrophy and gastric cancer in Japanese. *Helicobacter* **14** : 47-53, 2009.
- 16) Chang S, Kodys K and Szabo G: Impaired expression and function of toll-like receptor 7 in hepatitis C virus infection in human hepatoma cells. *Hepatology* **51** : 35-42, 2009.
- 17) Zhou M, McFarland-Mancini MM, Husseinzadeh N, *et al*: Toll-like receptor expression in normal ovary and ovarian tumors. *Cancer Immunol Immunother* **58** : 1375-1385, 2009.
- 18) Risch HA and Howe GR: Pelvic inflammatory disease and the risk of epithelial ovarian cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **4** : 447-451, 1995.
- 19) Ness RB, Grisso JA, Cottreau C, *et al*: Factors related to inflammation of the ovarian epithelium and risk of ovarian cancer. *Epidemiology* **11** : 111-117, 2000.
- 20) Wang RF, Miyahara Y and Wang HY: Toll-like receptors and immune regulation: implications for cancer therapy. *Oncogene* **27** : 181-189, 2008.
- 21) 大須賀穰, 平田哲也: 子宮内膜における Toll-like receptor の意義. *Horm Front Gynecol* **16** : 309-317, 2009.
- 22) Ness RB, Goodman MT, Shen C, *et al*: Serologic evidence of past infection with *Chlamydia trachomatis*, in relation to ovarian cancer. *J Infect Dis* **187** : 1174-1152, 2005.
- 23) Kim WY, Lee JW, Choi JJ, *et al*: Increased expression of Toll-like receptor5 during progression of cervical neoplasia. *Int J Gynecol Cancer* **18** : 300-305, 2008.
- 24) Okusawa T, Fujita M, Nakamura J, *et al*: Relationship between structures and biological activities of mycoplasmal diacylated lipopeptides and their recognition by Toll-like receptor 2

- and 6. *Infect Immun* **72** : 1657-1665, 2004.
- 25) Lee J, Chuang TH, Redecke V, *et al*: Molecular basis for the immune stimulatory activity of guanine nucleoside analogs: activation of Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci USA* **100** : 6646-6651, 2003.
- 26) Aliprantis AO, Yang RB, Mark MR, *et al*: Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor2. *Science* **285** : 736-739, 1999.
- 27) Kobayashi H, Sumimoto K, Moniwa N, *et al*: Risk of developing ovarian cancer among women with ovarian endometrioma: a cohort study in Shizuoka, Japan. *Int J Gynecol Cancer* **17** : 37-43, 2007.
- 28) Chu WM, Ostertag D, Li ZW, *et al*: JNK2 and IKK beta are required for activating the innate response to viral infection. *Immunity* **11** : 721-731, 1999.
- 29) Huang B, Zhao J, Shen S, *et al*: Listeria monocytogenes promotes tumor growth via tumor cell toll-like receptor 2 signaling. *Cancer Res* **67** : 4346-4352, 2007.
- 30) Rakov-Nahoum S and Medzhitov R: Regulation of spontaneous intestinal tumor genesis through the adaptor protein MyD88. *Science* **317** : 124-127, 2007.

THE ANALYSIS OF TOLL-LIKE RECEPTOR SIGNAL PATHWAY IN HUMAN OVARIAN CANCER CELLS

Masaki HAYASHI, Tsuyoshi OKUDA, Hiroshi CHIBA,
Masaaki NAGATSUKA and Takashi OKAI

Department of Obstetrics and Gynecology, Showa University School of Medicine

Abstract — Inflammation has been implicated in the initiation and progression of ovarian cancer, although the mechanisms underlying this effect are still unclear. Toll-like receptors (TLRs) allow immune cells to recognize pathogens and to trigger inflammatory responses. The tumor cell expression of TLRs can promote inflammation and cell survival in the tumor microenvironment. The present study evaluated the changes in 84 genes involved in the TLR pathway using a real time PCR array in 4 different histological types of ovarian cancer cells. The functional activity for TLRs was also demonstrated by the stimulation of cell lines with specific agonists and release of the proinflammatory cytokines interleukin-6 and CCL-2. The results are as follows: TLR6, 7, 8, 10 were upregulated in serous carcinoma cells; in particular, there was 15.9-fold over-expression of TLR7. TLR4 was upregulated in mucinous carcinoma cells. In contrast, there was no upregulation of TLRs nor down regulation of TLRs while a downregulation of MyD88 TLR adaptor genes was observed in clear cell carcinoma cells. The TLRs that were upregulated in these cells were functional, except for TLR7 in serous adenocarcinoma. In endometrioid carcinoma cells in which no TLRs were upregulated without stimulation, IL-6 and CCL-2 were induced by TLR5. On the other hand, no induction of proinflammatory cytokines was observed in clear cell carcinoma cells. These results suggest that TLRs appear to play a role in the development and proliferation of ovarian cancer cells, and each histological type of TLR may differently manipulate the inflammatory pathway through TLRs to thereby characterize their biological properties.

Key words: ovarian cancer, toll-like receptor, NF- κ B, MyD88

[受付 : 1 月 25 日, 受理 : 2 月 4 日, 2010]