

氏名・(本籍)	伊藤 智 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 955 号
学位授与の日付	平成 30 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	<b>INCREASED EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTOR 4 IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA-ITS CLINICOPATHOLOGICAL SIGNIFICANCE</b> (肝細胞癌における Toll 様受容体 4 の発現上昇・その臨床病理学的有意)
論文審査委員	(主査) 教授 後藤 明輝 (副査) 教授 本山 悟      教授 南條 博

## 学位論文内容要旨

INCREASED EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTOR 4 IN

HEPATOCELLULAR CARCINOMA—ITS CLINICOPATHOLOGICAL SIGNIFICANCE

( 肝細胞癌における Toll 様受容体 4 の発現上昇 - その臨床病理学的有意 )

申請者氏名 伊藤 智

### 研究目的

内毒素として知られているリポ多糖類 (LPS) は、グラム陰性細菌によって産生され、門脈を介して腸から肝臓に輸送される。

一方、LPS に特異的な Toll 様受容体 4 (TLR4) と呼ばれる受容体分子は、肝細胞の細胞膜上に発現される。LPS によって活性化される TLR4 タンパク質は、MyD88-NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路を関与させることによって、組織の修復、再生、および増殖に寄与する (1, 3-5)。したがって、LPS 誘導性炎症性肝障害と TLR4 媒介組織修復および/または増殖の組合せが肝細胞癌 (HCC) の発症につながる可能性があるかと仮定されている。

HCC のどのような臨床病理学的特徴が TLR4 発現に関連しているのか? この問題に取り組むために我々は、HCC およびその隣接する非癌性領域の両方における TLR4 タンパク質の免疫組織化学によって明らかにされる発現パターンを検査し、各臨床病理学的因子と HCC における TLR4 の発現の増加との相関の程度を分析した。

### 研究方法

#### 組織材料

2005 年から 2012 年に秋田大学医学部附属病院で手術された 99 例の手術材料を対象に、ホルマリン固定パラフィン浸透ブロックの HCC と非癌部肝組織が近接した部分を使用した。3  $\mu$ m にスライスし免疫組織化学と HE 染色を行った。

#### 免疫組織化学

一次抗体に抗 TLR-4 マウスモノクローナル抗体(クローン 76B357. 1, Abcam)を使用し、HRP 標識ポリマー法で行った。発色は DAB で行った。

#### 画像解析と定量化

TLR4 タンパクの免疫組織化学的陽性シグナル強度の解析と定量化には、ImageJ 1.51 j8 を使用した。顕微鏡で取り込んだ画像は 8bit グレースケールに変換し、ヒストグラムに表示された輝度を記録した。すべての分析は、画像分析および定量化陽性指数に基づいて実施した。

#### 統計解析

統計学的解析には、IBM SPSS Statistics Ver. 24 を使用した。

### 研究成績

TLR4 タンパク質の発現パターンは、胆管細胞、特に HCC 病変に隣接する非癌性領域においてしばしば起こる胆管反応部に最も強く発現していた。HCC と非癌性領域間の TLR4 免疫組織化学シグナル強度を同一肝臓で比較すると、TLR4 発現は非癌性領域よりも HCC 領域において有意に高かった ( $p < 0.0001$ )。

TLR4 発現レベルの引き上げは多様な臨床病理学的因子と一致し、性別、東京スコア、または組織学的グレードにかかわらず、TLR4 タンパク質は非癌性領域よりも HCC 領域でより強く発現していた。

TLR4 発現レベルは Edmondson II および III に分類される腫瘍には存在するが、I または IV には分類されず、非癌性領域よりも有意に高かった。

HCC は、主に膨張する成長パターンを示すが、eg または eg>ig と判定された腫瘍は、非癌性領域よりも TLR4 タンパク質の有意に強いシグナルを示していた。

肝炎ウイルスの状態に関しては、HBV 関連 HCC ではなく、HCV 関連 HCC は、非癌性領域と比較して、TLR4 タンパク質のかなりの量を発現していた。

### 結論

LPS の受容体 TLR4 への結合によって開始される NF- $\kappa$ B 媒介性 TLR4 シグナル伝達は、肝臓癌発生において中心的な役割を果たす。しかし我々は、HCC 病変は癌発生後でさえ、同じ肝臓における非癌領域の肝細胞と比較して、より多くの量の TLR4 タンパク質を発現することを見出した。臨床病理学的所見の中で、東京スコア、組織学的グレード、病期分類パラメータ、成長パターン、肝炎ウイルス感染の 5 つの要因が、HCC における TLR4 発現の増加と有意な相関を示した。腫瘍ステージ T2 および T3 ならびに東京スコアは、腫瘍サイズに基づく指標であり、T4 は血管侵襲の因子に影響される傾向がある。我々の結果は、TLR4 が浸潤よりもむしろ HCC 細胞の増殖をアップレギュレートする可能性を示唆し、TLR4 発現と T2 および T3 のステージングとの有意な相関をもたらすことを示している。

一貫して、TLR4 発現を伴う eg または eg>ig と判定される膨張成長パターンの相関も有意であり、TLR4 発現が、HCC 細胞の細胞-細胞接着を損なうことなく接触阻害から逃れることを可能にすることを示唆している。一方で、細胞-細胞接着の喪失に起因する成長パターンである浸潤は TLR4 とは独立しているようである。

肝臓は、本質的および生理学的状態において LPS の最高密度に遭遇する臓器である。したがって肝臓は、LPS 誘発細胞傷害作用に対して効率的な防御応答を発達させるようにプログラムすることができ、LPS の発癌作用が優勢となる。LPS 誘発肝障害および TLR4 シグナル伝達は肝癌発生に関与しているが、TLR4 シグナル伝達もまた HCC の進行に寄与する、すなわち腸から肝臓に輸送される LPS が HCC の進行を促進することを示している。したがって、腸内細菌叢の品質を改善することは、HCC の予防およびその予後の改善の両方につながる。これらの側面は、実験的および臨床的研究を通じてさらに注意深く検証されるべきである。

# 学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主査： 後藤 明輝

申請者： 伊藤 智

論文題名： 英文 INCREASED EXPRESSION OF TOLL-LIKE RECEPTOR 4 IN  
HEPATOCELLULAR CARCINOMA — ITS CLINICOPATHOLOGICAL SIGNIFICANCE

和訳 肝細胞癌における Toll 様受容体 4 (TLR4) の発現上昇 - その臨床病理学的意義

## 要旨

著者の研究は、論文内容要旨に示すように、肝細胞の細胞膜上に発現するリポ多糖類(LPS)に特異的な受容体分子である Toll 様受容体(TLR4)が LPS によって活性化され、MyD88-NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路を介し、組織修復、再生および増殖を繰り返すことにより、肝細胞癌(HCC)の発症につながる可能性があるとの仮説のもとに、HCC 部組織と隣接する非癌部肝組織における TLR4 発現量を免疫組織染色により比較し、臨床病理学的特徴である腫瘍径、病期分類、分化度、発育様式などの各因子を統計学的に解析し検討したものである。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

### 1) 斬新さ

さまざまな固形癌における TLR4 発現と予後に関する報告は多く見られるが、HCC 細胞における TLR4 発現については、発現強度が予後と逆相関するとの報告はあるものの、肝細胞癌発症後組織における臨床病理学的事項に関連した報告は非常に少ない。しかし、各因子における臨床病理学的特徴を調査することにより、HCC 発症後にも同一肝における非癌部の肝細胞と比較して、より多くの TLR4 たんぱく質を発現することを見出し、浸潤よりも膨張増殖をアップレギュレートする可能性を示唆し、ステージングとの有意な相関と TLR4 の発

現が接着を維持しながらの増殖を可能にしていることも見出した。

また、免疫組織染色の用手法における測定誤差を加味して、測定輝度と比から求めた指数による定量化は、染色強度比較における誤差の軽減に貢献できたと考えられる。

### 2) 重要性

LPS 誘発肝傷害および TLR4 シグナル伝達は、肝癌発生と共に HCC の進展に関与する。すなわち、グラム陰性細菌によって産生され、内毒素として知られている LPS が門脈を介して腸管から肝に輸送、HCC の進展を促進することを示している。したがって、腸内細菌叢の品質を改善することは重要であり、HCC の予防および予後の改善が期待される。

### 3) 研究方法の正確性

免疫組織学的陽性強度の評価方法は、一般的に陽性部の占める割合、複数人による主観的判定の集計が行われている。本研究では、免疫組織学的陽性部を計測した輝度から指数を求めることで客観性のあるデータを求め検討を行った。いずれも統計学的検討を加えており、客観的な評価法で、正確性があると考えられる。

### 4) 表現の明瞭さ

臨床病理学的特徴事項を詳細に分析し、進展、発育、病期分類等との相関を明らかにするための研究目的、方法、実験結果、考察を簡潔、明瞭に記載していると考ええる。

以上述べたように、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。