

機関番号：13301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20590766

研究課題名（和文） 癌浸潤リンパ球と末梢血液細胞の包括的遺伝子発現解析による癌免疫動態の解明

研究課題名（英文） Comprehensive gene expression analysis of cancer-infiltrating lymphocytes and peripheral blood cells for elucidation of cancer immunity kinesis

研究代表者

酒井 佳夫 (SAKAI YOSHIO)

金沢大学・医学系・准教授

研究者番号：80401925

研究成果の概要（和文）：

増殖から消褪までの特徴を示すマウス皮下肝癌モデルを用いて、癌局所の浸潤炎症細胞と末梢血液細胞の遺伝子発現プロファイルの解析を行った。末梢血液細胞の遺伝子発現プロファイルは、経時的グループ別に類似性を示した。腫瘍径がピーク期の際の腫瘍内炎症細胞と末梢血液細胞の遺伝子発現の共通した特徴には、IL-6 シグナル、変性蛋白に対する応答が示された。また、各々の特徴的なプロセスには、腫瘍内炎症細胞では、インターフェロンシグナル、NK 細胞傷害性、補体系が、末梢血液細胞では IL-10 応答、アンフォテリン応答がそれぞれ示された。包括的遺伝子発現解析によって、癌における局所と全身の炎症の共通および各々に特徴的な応答を解明できる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Using murine subcutaneous hepatoma model which shows the proliferating and succeeding extinguishing phases, analysis of gene expression profile for local cancer-infiltrating inflammatory cells as well as peripheral blood cells was performed. The features of gene expression profiles for peripheral blood were distinct depending on the groups divided by the days after cancer cells injection. The common feature of gene expression of local cancer-infiltrating inflammatory cells as well as peripheral blood cells for mice with the tumors at the maximum size levels showed IL-6 signal and response to unfolded proteins. As for the individually characteristic processes of gene expression, interferon signaling, NK cell cytotoxicity, complement system for local cancer-infiltrating inflammatory cells, and IL-10 anti-inflammatory response, amphoterin signaling for peripheral blood, were featured, respectively. These suggest that comprehensive analysis of gene expression of local cancer inflammatory response and peripheral blood cells will reveal the common as well as the distinguished features of local and systemic inflammatory responses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009 年度	900,000	270,000	1,170,000
2010 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学、遺伝子発現

### 1. 研究開始当初の背景

生体の免疫防御機構は、外来病原体から生体を防御する役割を担うほか、悪性腫瘍に対しても、その発生を監視、防御する役割をはたしている。ゆえに、癌に対する既存の治療法である外科的切除術、化学療法、放射線療法において、より優れた治療効果、根治的治療後における再発予防効果を得るために、宿主の癌に対する免疫の効果的な賦活方法の研究が注目されているが、その開発には、癌局所、および全身における宿主の免疫応答の理解が不可欠である。体内に癌が発生した場合、癌組織へのリンパ球浸潤が見られる。その浸潤リンパ球の役割はさまざまであり、細胞傷害性T細胞に代表される癌増殖進展を阻止する細胞群や、抗腫瘍免疫を抑制する制御性T細胞群の存在が知られている。一方、全身を循環している血液中の細胞においても、癌患者において、癌抗原に対する細胞傷害性T細胞、あるいは制御性T細胞が存在していることが知られている。また、持続する癌局所への浸潤リンパ球は、癌細胞が宿主免疫防御系回避能を獲得する **Immunoediting** の観点からも注目されている。包括的遺伝子発現解析の手法を用いることにより、担癌状態における免疫状態の新たな特徴が解明できる可能性を考えた。

### 2. 研究の目的

末梢血液細胞は、全身を循環し、末梢組織病変に応答していると考えられる。マウス癌モデルを用いて、局所炎症細胞および血液の細胞について、包括的遺伝子発現解析を行うことにより、癌免疫動態の解明を試みた。肝癌肝内播種、および大腸癌転移肝内播種マウスモデルを用いて、癌増殖時における癌局所浸潤リンパ球と、生体内最大リンパ組織の脾細胞、全身を循環する末梢血液細胞について、DNA マイクロアレイを用いた包括的遺伝子発現解析を行い、癌に対する宿主の免疫動態を局所と全身の観点から体系的に解析する。さらに免疫担当細胞サブセットを欠失した部分的免疫欠損状態、樹状細胞投与による癌免疫賦活状態における、癌浸潤リンパ球、脾細胞、末梢血液細胞の遺伝子発現解析を行い、生体の癌免疫機構に重要な新規遺伝子マーカー、細胞群の探索を目指す。

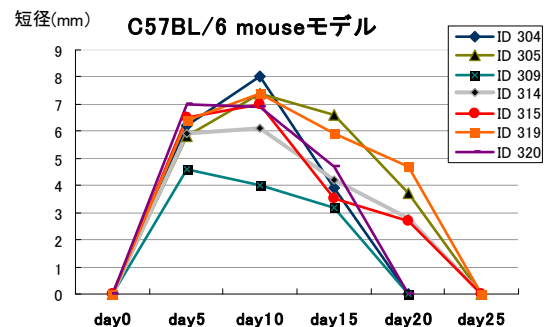
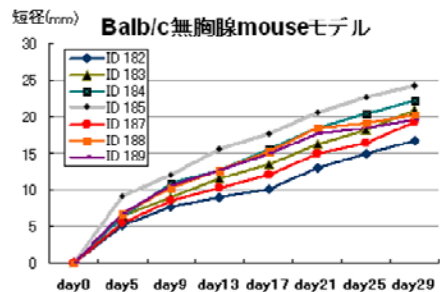
### 3. 研究の方法

マウス肝癌細胞株 Hepa1-6 を  $1 \times 10^7$  個、C57BL/6 (♀、8 週齢) あるいは Balb/c 無胸腺マウスの背部皮下に接種し、皮下肝癌モデルを作成、経時的に腫瘍径を計測した。C57BL/6 マウスを用いて、Hepa1-6 細胞接種前(day 0)、接種後 10 日 (day 10)、15 日 (day 15)、20 日 (day 20)、25 日 (day 25) (n=5) にて末梢血液細胞を採取、即時 RNAlater (Ambion) にて融解、RNA 抽出キット

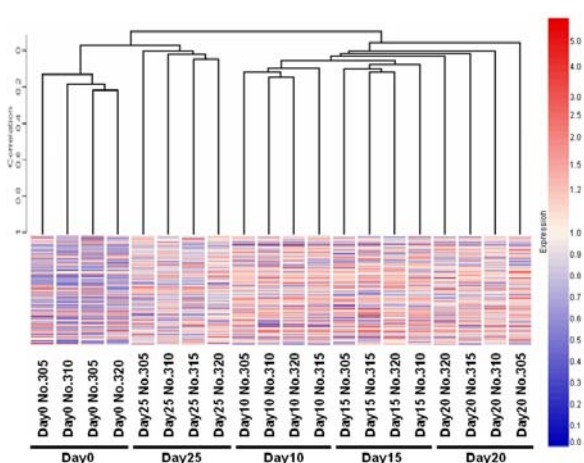
(Stratagene) にて RNA を経時的に抽出した (各々 n=5)。また、Hepa1-6 肝癌細胞株接種後、腫瘍径ピーク期の 10 日目 (day 10) に、腫瘍を切除、破碎し、フィコール比重遠心にて炎症細胞を分離し RNA を抽出、また、同じマウスより末梢血液細胞を採取し、RNA を抽出した (n=8)。抽出した RNA は逆転写酵素にて mRNA を cDNA に変換した。リファレンスとしての遺伝子発現には、無処置の C57BL/6J マウスの血液 RNA を用い、同様に cDNA を作製した。前者を Cy5、後者を Cy3 でラベルし、等量混合し、DNA チップ (DNA マイクロアレイ Whole Mouse Genome 4x44K Array (Agilent Technologies)) へハイブリダイゼーションし、遺伝子発現量を測定した。データ解析には、GeneSpring GX software (Agilent) および MetaCore (GeneGo) を用いた。

### 4. 研究成果

C57BL/6 マウスの皮下に Hepa1-6 を接種したマウスでは、皮下腫瘍は 10~15 日目に最大径となり、以後漸次縮小し、25 日目には消失した。一方、Balb/c 無胸腺マウスに Hepa1-6 を接種したマウスでは、皮下腫瘍は経時的な漸増を示し、C57BL/6 マウスにおける皮下腫瘍の増大、消退には、T 細胞が関与することが示唆された。C57BL/6 マウスの皮下への



Hepa1-6 細胞接種前後の、末梢血液細胞の経時的な遺伝子発現解析では、day0, day 25, day 10, day 15, day 20 の完全なクラスターが形成された。皮下における腫瘍の増大、および消退における局所免疫応答が、全身を循環する末梢血液細胞に影響し、遺伝子発現プロファイル変化にその特徴が反映されてい



ると考えられた。また、day 10での腫瘍内炎症細胞および血液細胞の遺伝子発現について、腫瘍内炎症細胞に関してリファレンスより発現が上昇した遺伝子プロブは、1.5倍以上では4833個、1.8倍以上では3493個、2.0倍以上では2851個であった。また、血液細胞RNAについては、1.5倍以上では2474個、1.8倍以上では、962個、2.0倍以上では489個であった。全血においてリファレンスより1.5倍以上の発現亢進を示した遺伝子2474個について、および腫瘍浸潤炎症細胞において1.8倍以上の発現亢進を示し、Hepa1-6細胞では1.8倍未満の発現量の遺伝子738個について、MetaCoreを用いてパスウェイマップ解析、プロセス解析を行った。両者共通に免疫系応答、アポトーシス、DNA損傷応答、組織再構築ならびに損傷修復のマップが示された。プロセスでは、炎症について、IL-6シグナルが共通し、血液細胞ではIL-10応答、アンフォテリン応答が、腫瘍炎症細胞では、インターフェロンシグナル、NK細胞傷害性、補体系がそれぞれ示された。また、変性蛋白に対する応答が共通したプロセスとして示された。包括的遺伝子発現解析によって、癌における局所と全身の炎症の共通および各々に特徴的な応答を解明できる可能性が示された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計11件)

- ① 酒井佳夫、金子周一、和田隆志 末梢血液を用いた核酸発現解析による新しい病態解析と診断方法開発の可能性 日本臨床検査自動化学会会誌 2011 vol.36, p.3-9 査読無し
- ② Honda M, Nakamura M, Tateno M, Sakai A, Shimakami T, Shirasaki T, Yamashita T, Arai K, Yamashita T, Sakai Y, Kaneko S. Differential interferon signaling in liver lobule

and portal area cells under treatment for chronic hepatitis C. J Hepatol. 2010 vol.53 p.817-26. 査読有

- ③ Shirasaki T, Honda M, Mizuno H, Shimakami T, Okada H, Sakai Y, Murakami S, Wakita T, Kaneko S. La protein required for internal ribosome entry site-directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication. J Infect Dis. 2010 vol.202 p.75-85. 査読有
- ④ Honda M, Sakai A, Yamashita T, Nakamoto Y, Mizukoshi E, Sakai Y, Yamashita T, Nakamura M, Shirasaki T, Horimoto K, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Hepatic ISG expression is associated with genetic variation in interleukin 28B and the outcome of IFN therapy for chronic hepatitis C. Gastroenterology. 2010 vol.139, p.499-509. 査読有
- ⑤ Steel J, Ramlogan C, Yu P, Sakai Y, Forni G, Waldmann T, Morris J. Interleukin-15 and its Receptor Augment Dendritic Cell Vaccination Against the neu Oncogene Through the Induction of neu Antibodies Partially Independent of CD4 Help. Cancer Res 2010 vol.70, p.1072-1081. 査読有
- ⑥ Komura T, Sakai Y, Honda M, Takamura T, Matsushima K, Kaneko S. CD14+ monocytes are vulnerable and functionally impaired under endoplasmic reticulum stress in patients with type 2 diabetes. Diabetes 2010, vol.59, p.634. 査読有
- ⑦ Ootsuji H, Honda M, Kaneko S, Usui S, Okajima M, Okada H, Sakai Y, Takamura T, Horimoto K, Takamura M. Altered hepatic gene expression profiles associated with myocardial ischemia. Circ Cardiovasc

Genet. 2010 vol.3, p.68-77. 査読有

- ⑧ Honda M, Sakai Y, Yamashita T, Yamashita T, Sakai A, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tatsumi I, Miyazaki Y, Tanno H, Kaneko S; Hokuriku Liver Study Group. Differential Gene Expression Profiling in Blood from Patients with Digestive System Cancers. Biochem Biophys Res Commun. 2010 vol.400, p.7-15. 査読有
- ⑨ Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Sunakozaka H, Sakai Y, Horimoto K, Kaneko S. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. Hepatology 2009 vol.49 p.1098-1112. 査読有
- ⑩ Sakai Y, Honda M, Fujinaga H, Tatsumi I, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S. ucular Inflammatory Cells and Peripheral Blood Mononuclear Cells in Hepatocellular Carcinoma Patients. Cancer Res 2008 vl.68,.p.10267-10279. 査読有
- ⑪ Tsuchiyama T, Nakamoto Y, Sakai Y, Mukaida N, Kaneko S. Optimal amount of monocyte chemoattractant protein-1 enhances antitumor effects of suicide gene therapy against hepatocellular carcinoma by M1 macrophage activation. Cancer Science 2008 vol.99 p.207-2082. 査読有

[学会発表] (計2件)

①酒井佳夫、本多政夫、金子周一：消化器癌における全血遺伝子発現の特徴  
第96回日本消化器病学会総会 平成22年4月24日 新潟市民芸術文化会館 第4会場 劇場 (新潟県)

②酒井佳夫、本多政夫、藤永晴夫、小村卓也、辰巳勇、水腰英四郎、中本安成、金子周一：肝臓浸潤リンパ球の遺伝子発現プロファイルの特徴と、それが及ぼす肝臓患者末梢血液単核球細胞への影響

第44回日本肝臓学会総会 平成20年6月5日 愛媛県民文化会館3階第8会議室 (愛媛県)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

酒井 佳夫 (SAKAI YOSHIO)  
金沢大学・医学系・准教授  
研究者番号：80401925

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし