

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670712

研究課題名(和文) 頭頸部癌患者における頸部脂肪関連リンパ球集簇の網羅的ゲノム機能解析

研究課題名(英文) Genome-wide analysis of neck Fat-Associated lymphoid cluster(neck FALC) in head and neck cancer patients.

研究代表者

茶園 英明 (CHAZONO, Hideaki)

千葉大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：70313806

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：頸部脂肪内リンパ集簇(FALC)は免疫染色にてT細胞マーカーのCD3、B細胞マーカーであるCD20、CD79aにすべて陽性でT細胞、B細胞を含むことが示唆された。またNanog抗体にも陽性を示すことから、多機能幹細胞と同様に感染性炎症、癌浸潤による炎症などに対応できる細胞である可能性がある。網羅的遺伝子解析では通常のリンパ節と比較して頸部FALCではRPS4X、MIF、MIR4461、HBB、その他6つの未知の遺伝子に発現高値を認めた。リンパ節発生とリンパ節転移のメカニズムに関して頸部FALCの新しい関与がいくつか示された。

研究成果の概要(英文)：We analyzed neck Fat-Associated lymphoid cluster (neck FALC) in head and neck cancer. Neck FALC is like a lymph node, but not have a sheath with mature lymph node. FALC is likely to be the T cell because of CD3 positive in immunohistochemical staining. Similarly, FALC include the B cell because of CD20 and CE79a positive staining. This may indicate FALC is immature lymph node or precursor organization of the lymph node. FALC may include some multifunctional stem cells because of Nanog antibody positive but not cancer stem cell; it is all negative for CD44. Furthermore, we examined the gene expression in the lymph nodes and neck FALC using the next-generation sequencing. It showed a high expression of RPS4X, MIF, MIR4461 and HBB gene. These results may suggest the new findings about maturation of lymph node and lymph node metastasis.

研究分野：医歯薬学

キーワード：頸部リンパ節 脂肪関連リンパ球集簇 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

我々は頸部の脂肪組織内間隙に被膜を持たないリンパ球様の細胞集団を初めて見出し、検討を行ってきた。後にこれら細胞群と非常に類似した形態の細胞集簇について Moro K, Koyasu S,らによって FALC: Fat-Associated lymphoid cluster と定義され、マウスの腸間膜での詳細な報告が見られた。我々は頸部における同様な細胞について頸部脂肪関連リンパ球集簇(以下、頸部 FALC)として研究対象とし、平成 21 年度～平成 22 年度若手研究 B 課題番号:21791595 にてこれら細胞群の頭頸部癌患者の臨床データとの比較検討を行ったところ、これら細胞は 癌に近接する脂肪内で頸部 FALC が増加する傾向があった。癌細胞のシグナルが、これら細胞群を惹起した可能性が示唆され、癌に何らかの影響を受けた細胞集団である可能性が考えられた。

2. 研究の目的

我々は頭頸部癌患者の頸部脂肪組織内にリンパ球様の細胞群を初めて見出し、脂肪関連リンパ球集簇と命名した(2007年)。我々は、リンパ節とも呼べないようなこれらの細胞群の中に扁平上皮癌が増殖している稀な症例を見出したことにより、癌のリンパ節の重要なメカニズムを解明できるのではないかと仮説をたて検討してきた。そして、臨床的に癌患者の頸部リンパ節転移症例では転移のない頸部に比べて多くのリンパ節がみられることから、頸部 FALC が頸部リンパ節の成因に関係している可能性を考えた。形態としてリンパ球様の小細胞であることから、B リンパ球、T リンパ球との関連、癌による増殖を示すことから、がん幹細胞、再生細胞などの可能性を確認することを目的とし頸部 FALC の素性、成因について検討することとした。

3. 研究の方法

(1) 千葉大学医学部附属病院耳鼻咽喉・頭頸部外科において治療された頭頸部癌手術患者 9 例の頸部郭清検体から頸部リンパ節を採取し病理学的なリンパ節転移の検討を行う。本来、医療廃棄物として処理される頸部組織から筋肉、血管等を除去し脂肪組織を採取し(図 1)、この中から頸部 FALC を人為的に抽出する。頸部郭清組織内の頸部 FALC をホルマリン固定し、パラフィンブロック(FFPE)を作成した。

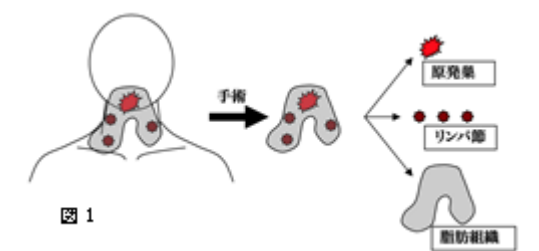


図 1

(2) リンパ節の T 細胞の表面マーカーの CD3、B 細胞のマーカー CD20、CD79a、扁平上皮癌幹細胞の表面マーカー CD44、多機能幹細胞のマーカーである Nanog 抗体について免疫染色を行った。

(3) 従来の FISH 法に比べ組織内の 1 コピーの RNA でも抽出が可能になったことから、頸部 FALC の FFPE から RNAscope®による RNA 抽出を行い、局所遺伝子発現量を次世代シーケンサーで網羅的に検索した。

4. 研究成果

(1) 9 症例、14 側の頸部郭清術後の検討を行い 13 領域で顕微鏡的に頸部 FALC の存在を確認できた。それぞれの免疫染色の結果を示す。

CD3 (T 細胞マーカー): (++)6, (+)7, (-)0.
頸部 FALC は頸部リンパ節になる前の前駆組織であり、リンパ節を形成しない段階で T 細胞の特徴をもったリンパ球が存在するのか確認した。その結果、頸部 FALC と考えられるものすべてに陽性を示しておりリンパ球が集簇した中での T 細胞の存在が示唆された。
CD20 (B 細胞マーカー): (++)4, (+)9, (-)0.
同様に B 細胞の特徴を持つ細胞についても検討した。頸部 FALC 内にリンパ濾胞と思われる領域が存在することがあり、その場合 CD20 はこの領域を中心として染色されていた。頸部 FALC からリンパ節を構築する過程において被膜を持つ成熟したリンパ節になる前段階でリンパ濾胞を形成することが示唆された。

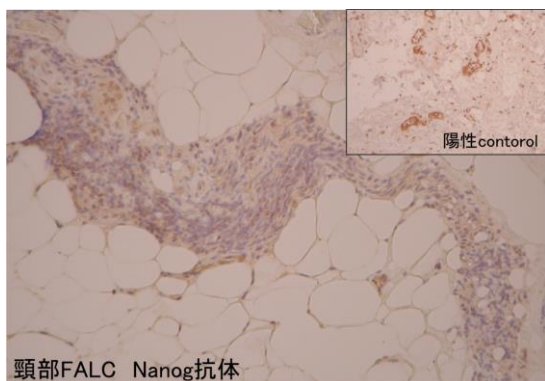
CD79a (B 細胞マーカー): (++)7, (+)6, (-)0.
CD20 同様に CD79a においても頸部 FALC 内にリンパ濾胞と思われる領域が存在することがあるときは、この領域を中心として染色されていた。若干 CD20 より染色性がよい印象であった。頸部 FALC からリンパ節を構築する過程において被膜を持つ成熟したリンパ節になる前段階でリンパ濾胞を形成することを示唆していると考えた。

CD44 (扁平上皮癌幹細胞の表面マーカー): 陽性コントロールと比較して 13 領域すべてにおいて CD44 に陽性となる部位は見られなかった。癌患者の頸部に癌細胞が流れでる時にまず癌幹細胞のような癌細胞の元になる細胞から発現し増殖する可能性を考慮にいたした検討であったが頸部 FALC 内にはそのような癌幹細胞は存在しないことを示唆しているものと考えた。

Nanog 抗体(多機能幹細胞のマーカー): (++)4, (+)7, (-)2. 多能性幹細胞の分子マーカーとして、Nanog は新規に同定されたホメオドメインタンパク質 2), 3) であり、ES 細胞や EG 細胞などの多能性幹細胞に特異的に発現し、STAT3 伝達系に依存することなく、幹細胞の未分化状態の確認に適した分子マーカーである。この染色が陽性(図 2)になるという

ことを考えると、頸部 FALC は頸部脂肪内に存在してまだ未分化で多機能性を持つ状態であることを示唆している。つまり癌浸潤や感染などによる炎症反応に対して抗原提示、リンパ球のモロクロナル増殖などディンジャーシグナルによって急速に適した免疫系を発動するために存在しているのではないかと推測される。このモデルはこれまでリンパ節の成因など未知の免疫システムの解明につながる可能性を有しており、リンパ節が形成するメカニズムについて興味深い結果であった。

図 2



(2)頸部 FALC の NGS (次世代シーケンス) を用いた網羅的な遺伝子解析
当初はホルマリン固定したパラフィンブロック (FFPE) からの RNA 抽出を検討していたが、実際に行ってみると RNA の分解が進んだ状態であり正確な検討が担保できないことがわかった。そこで RNA の分解がなるべく進行していないフレッシュな検体で改めて検討を行うこととした。TruSeq RNA Access Library Prep Kit を使用し、RNA 抽出後、頸部 FALC について網羅的な遺伝子解析を行うこととした。2例ずつ頸部 FALC と頸部リンパ節とで比較を行った。データは PRSEQ-lite v0.19.2 でトリミング、リード除去後に tophat v 2.0.9 (<http://ccb.jhu.edu/software/tophat/index.shtml>) でマッピングした。発現量をエクソン長と全マッピング数で補正した値である FPKM の算出は cufflinks v2.1.1 を用いた。結果はクオリティコントロールを通過したリードの割合は 99% と良好であった。結果、頸部 FALC で発現が亢進し、リンパ節で発現が見られなかった遺伝子は RPS4X、MIF。頸部 FALC で発現が亢進し、リンパ節で発現が低かったものとして MIR4461、HBB、その他、6つの未知の遺伝子による発現上昇も見られた。RPS4X は近年、癌を抑え込む遺伝子として注目されている⁴⁾が、このような遺伝子が亢進するなど頸部 FALC について新たな知見が得られたと思われる。

<引用文献>

①Moro K, Yamada T, Koyasu S. Innate production of T(H)2 cytokines by adipose tissue-associated c-Kit(+)Sca-1(+) lymphoid cells. Nature. 2010 Jan 28;463(7280):540-4.

②実験医学 Vol.21 No.15 (10月号) 2003

③Mitsui, K. et al. : Cell. 2003 May 30;113(5):631-42.

④Tsofack SP, Meunier L. : Low expression of the X-linked ribosomal protein S4 in human serous epithelial ovarian cancer is associated with a poor prognosis. BMC Cancer. 2013 Jun 22;13:303. doi: 10.1186/1471-2407-13-303.

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 0件)

[学会発表] (計 0件)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

茶菌 英明 (CHAZONO, Hideaki)

千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：70313806