

【研究紹介】

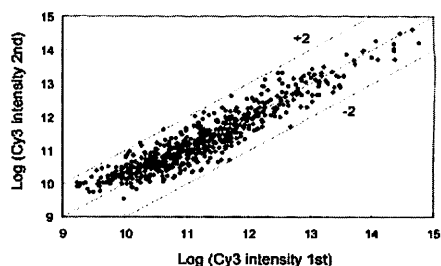
超微量肝組織を用いた肝炎・肝癌の病態解析
—微量細胞集団の網羅的遺伝子解析への応用—

Application of microarray analysis for small tissue sample
to hepatitis and hepatocellular carcinoma

金沢大学医薬保健研究域保健学系病態検査学
本 多 政 夫

はじめに

手術標本や生検組織を用いた解析は、疾病の診断や病態解析、予後や治療の反応性を知る上で益々重要なものとなっている。また貴重な臨床材料を如何に有効に利用できるかが、臨床材料を扱う上で重要な鍵となる。我々はウイルス性肝炎から肝細胞癌へ至る病態について微量肝生検材料を用いて網羅的に解析し、病態や治療効果に関わる重要な遺伝子を明らかにしてきた。また肝臓に僅かに集積する肝浸潤リンパ球をLaser capture micro-dissection (LCM)法を用いて採取し、得られた超微量サンプルから遺伝子発現プロファイルを得ることに成功している。このようにLCMを用いて顕微鏡下で解析したい領域を特異的に解析することが可能であり病態の解析に極めて有用である。本稿ではLCM技術を用いて得られた最新の知見を交えてLCMの有用性について紹介する。



(Hepatology 2006)

図3. 増幅に伴う遺伝子発現の歪み

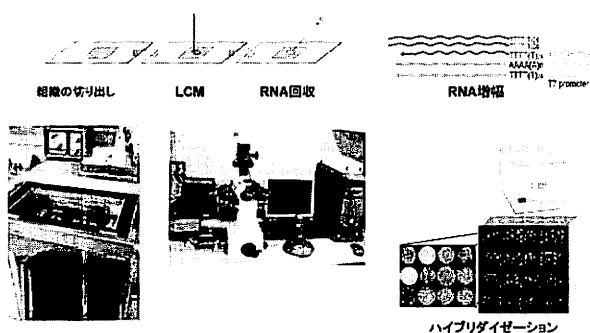
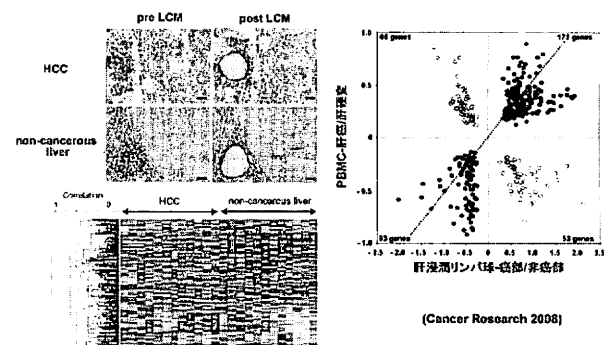
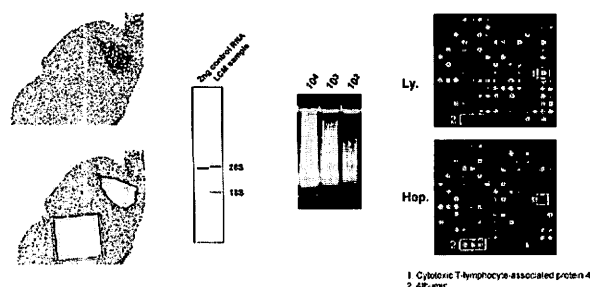


図1. Laser capture micro-dissection (LCM) の実際



(Cancer Research 2008)

図4. LCMによる肝局所浸潤リンパ球の解析



(Hepatology 2008)

図2. LCMによるサンプル採取とRNA増幅

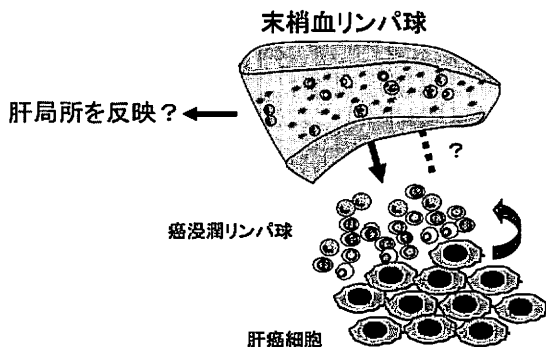


図5. 肝浸潤リンパ球と末梢血リンパ球

Laser capture micro-dissection(LCM)法の実際

手術及び生検サンプルから得られる肝組織には肝細胞以外に、伊東細胞、血管内皮、クッパー細胞など肝細胞以外の細胞が含まれている。特に肝炎に於いては免疫担当細胞の浸潤が顕著に認められるため、全肝組織を用いた解析は必ずしも肝細胞における遺伝子発現変化を反映していない可能性がある。Laser capture micro-dissection (LCM)法を用いることにより肝細胞あるいは門脈域浸潤リンパ球を区別して採取し、それぞれの遺伝子発現解析を行うことが可能である。我々は図1に示す手順で解析を行っている。OCT包埋肝生検組織を薄切し、スライドフィルム上に貼り付け、メタノールにて組織固定後、トルイジンブルー染色を行い、顕微鏡下で観察しながら肝浸潤リンパ球を採取した。得られた超微量組織からRNA分離を行い、T7RNAポリメラーゼを用いた増幅システムにより各遺伝子を均等に増幅した。我々の検討では400個程度の細胞から、2回のantisense RNA amplification法にて10-20 µgのantisense RNAが増幅され、肝小葉細胞、門脈域浸潤細胞を別々にマイクロアレイにて遺伝子発現解析することが可能であった(図2)。LCMを行うに当たっては、組織の固定・染色法、dissectionの方法(使用機種)、RNA抽出方法、2回のantisense RNA amplification法によるmRNAの増幅過程など幾つかの重要なステップに於いて、RNAの変性を防ぐ工夫が重要であった。LCMを巧く動かすには、多くの細胞を採取しようとするよりも、良質のRNAを如何に採取するかが重要である。通常、スライド数枚分で十分な解析が可能であった。マイクロアレイ解析で汎用されているプロトコルでは通常1回のantisense RNA増幅が行われるが、1回の増幅とLCMで用いる2回の増幅を比較した。発現比の歪みは2倍以内に抑えられており(図3)、解析手法としては許容範囲と考えられた。

LCM法の応用

LCM技術は様々な用途に応用可能であるが、我々はこれまでにあまり解析されていなかった腫瘍浸潤リンパ球について解析した。肝癌における浸潤リンパ球には、癌増殖に抑制的に働く細胞傷害性T細胞や、促進的にはたらく制御性T細胞など様々な免疫担当細胞が存在し、その生物学的意義・役割は診断及び治療の観点から興味もたれる。また、末梢血液単核球細胞も、免疫担当細胞より構成されており、宿主の免疫状態を反映している。C型肝炎を背景とした肝癌患者の外科的切除標本より、癌部浸潤リンパ球、および非癌部肝組織浸潤リンパ球をLCMにて分離、マイクロアレイを用いて包括的に遺伝子発現を解析した(図4)。

また、32名のC型肝炎硬変患者および30名のC型肝炎硬変肝癌合併患者のPBMCを採取しマイクロアレイを用いて同様に解析し

た。癌浸潤リンパ球において背景肝の肝浸潤リンパ球に比し発現が亢進した遺伝子群は、抗原提示、低酸素および酸化ストレス応答、ユビキチン・プロテアソーム蛋白分解、細胞周期、mRNAプロセスに関連したものであった。一方、興味深いことに、これらの遺伝子群は肝癌患者PBMCにおいても発現が亢進していることが明らかとなった(図4)。すなわち肝癌浸潤リンパ球の遺伝子発現の特徴が、全身の末梢組織を循環するPBMCにおいても反映されていることが初めて明らかとなった。このことは、癌患者におけるPBMCの遺伝子発現解析によって、癌局所の免疫応答を解析できる可能性を示唆するものであり(図5)、新しい癌診断法の一つとなる可能性を秘めている点で興味深い。現在、各種癌症例での検討を進めている。

今後の展望

LCM技術により様々な病態解析が可能である。これまでもB型慢性肝炎とC型慢性肝炎の病態の違いや両肝炎からの発現過程の違いを明らかにしてきた²⁴⁾。また、C型慢性肝炎例のインターフェロン療法の治療抵抗性の発現に肝細胞、肝浸潤リンパ球がそれぞれ異なった役割を果たすことを明らかにしつつある。今後、さらに解析法の感度を上げることにより、組織幹細胞や癌幹細胞の遺伝子発現解析を明らかにすることを目標としている。

引用文献

- 1) Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, Kaneko S. Different signaling pathways in the livers of patients with chronic hepatitis B or chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2006 Nov;44(5):1122-38.
- 2) Sakai Y, Honda M, Fujinaga H, Tatsumi I, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Kaneko S. Common transcriptional signature of tumor-infiltrating mononuclear inflammatory cells and peripheral blood mononuclear cells in hepatocellular carcinoma patients. *Cancer Res*. 2008 Dec 15;68(24):10267-79.
- 3) Honda M, Shimazaki T, Kaneko S. La protein is a potent regulator of replication of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C through internal ribosomal entry site-directed translation. *Gastroenterology*. 2005 Feb;128(2):449-62.
- 4) Iida H, Honda M, Kawai HF, Yamashita T, Shirota Y, Wang BC, Miao H, Kaneko S. Ephrin-A1 expression contributes to the malignant characteristics of {alpha}-fetoprotein producing hepatocellular carcinoma. *Gut*. 2005 Jun;54(6):843-51.
- 5) Honda M, Kaneko S, Kawai H, Shirota Y, Kobayashi K. Differential gene expression between chronic hepatitis B and C hepatic lesion. *Gastroenterology*. 2001 Mar;120(4):955-66.