

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19591161

研究課題名（和文）末梢血単核球の発現プロファイルと肝病態

研究課題名（英文）Gene expression profiling of peripheral mononuclear cells in blood and liver disease

研究代表者

本多 政夫（HONDA MASAO）

金沢大学・保健学系・教授

研究者番号：00272980

研究成果の概要：肝炎肝組織は多くのリンパ球浸潤を伴っており、様々な免疫担当細胞の浸潤が肝臓で認められる。これらが末梢血リンパ球の遺伝子発現変化として現れている可能性がある。本研究では末梢血液細胞の遺伝子発現の肝病態を反映する指標としての可能性を検討した。まず、25 例の健常例と 88 例の C 型慢性肝炎症例の末梢血液の遺伝子発現プロファイルを解析した。健常例と C 型慢性肝炎症例の末梢血液の遺伝子発現は大きく異なっており、階層クラスター解析や Support vector machine を用いた教師付学習法に於いて 100% の分類が可能であった。C 型慢性肝炎症例の末梢血液では蛋白翻訳、インターフェロン、アポトーシスシグナルの活性化を認め健常者と大きく異なった免疫状態を呈することが明らかとなった。次に、32 例の C 型肝硬変症例と 30 例の C 型肝硬変肝癌合併症例の末梢血単核球（PBMC）の遺伝子発現を解析した。両群の遺伝子発現も大きく異なっており、肝癌合併症例では、抗原提示、ユビキチンプロテアソーム系、細胞周期、ストレス応答に関わる遺伝子群の発現亢進が認められた。また 12 例の外科的切除肝癌組織より癌部および非癌部浸潤リンパ球をレーザーキャプチャーマイクロダイセクションにて選択的に回収し遺伝子発現を解析すると、肝癌浸潤リンパ球の遺伝子発現は非癌部浸潤リンパ球に比べ、抗原提示、ユビキチンプロテアソーム系など末梢血液で発現亢進した同様の遺伝子群が発現亢進しており、癌局所の浸潤リンパ球の遺伝子発現情報が末梢血の遺伝子発現変化として反映されることが明らかとなった。以上より末梢血液の遺伝子発現情報により肝局所の免疫状態、病態を解析できる可能性が示唆され、肝病態の診断、治療効果判定に応用できる可能性が示唆された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・膠原病・アレルギー内科学

キーワード：末梢血単核球、遺伝子発現、肝炎、肝癌

1. 研究開始当初の背景

これまでの多くの報告は、生検や手術で得られた患部組織を解析したものであり、組織採取は患者への侵襲を伴う。末梢血液細胞を用いて病態の診断が可能になれば外来での採血のみで検査が終了するので、このシステムがいったん確立すれば医療・診療システムに果たす役割も大きいと考えられる。

これまでに正常肝から慢性肝炎、さらには肝癌へ至る一連の病態における肝組織での遺伝子発現プロファイリング解析を行い、病態の進展に関わる分子機構を明らかにしてきた。

2. 研究の目的

肝炎肝組織は多くのリンパ球浸潤を伴っており、様々な免疫担当細胞の浸潤が肝臓で認められる。これらが末梢血リンパ球の遺伝子発現変化として現れている可能性がある。本研究では末梢血液細胞の遺伝子発現の肝病態を反映する指標としての可能性を検討した。

3. 研究の方法

I) 健常例25例、C型慢性肝炎例88例、C型肝硬変症例32例、肝癌合併C型肝硬変症例30例の末梢血液から単核球 (PBMC) を分離後、RNAを抽出し、antisense RNA増幅法にて1回増幅後、Cy3及びCy 5でラベリングし約3万遺伝子を搭載したAceGene(日立ソフト)を用いて発現プロファイルを解析した。

II) スキャナーはScan Array Express(Perkin Elmer)、スポット画像解析はDNASIS Array(日立ソフト)、データ解析および統計解析にはBRB-Array tool(NCBI)を用いた。

III) パスウェイ解析にはMetaCore™(GeneGo)を用いた。

4. 研究成果

25例の健常例と88例のC型慢性肝炎例の末梢血液の遺伝子発現プロファイルを解析した。健常例とC型慢性肝炎例の末梢血液の遺伝子発現は大きく異なっており、階層クラスター解析やSupport vector machineを用いた教師付学習法に於いて100%の分類が可能であった。C型慢性肝炎例の末梢血液では蛋白翻訳、インターフェロン、アポトーシスシグナルの活性化を認め健常者と大きく異なった免疫状態を呈することが明らかとなった。

次に、32例のC型肝硬変症例と30例のC型肝硬変肝癌合併症例の末梢血単核球(PBMC)の遺伝子発現を解析した。両群の遺伝子発現も大きく異なっており、肝癌合併症例では、抗原提示、ユビキチン・プロテアソーム系、細胞周期、ストレス応答に関わる遺伝子群の発現亢進が認められた。

さらに12例の外科的切除肝癌組織より癌部および非癌部浸潤リンパ球をレーザーキャプチャーマイクロダイセクションにて選択的に回収し、遺伝子発現を解析した。肝癌浸潤リンパ球においては、T細胞およびマクロファージで特徴的に発現する遺伝子が多数発現しており、免疫組織染色にて確認した。有為に発現亢進を示した遺伝子773個が関連する生物学的プロセスは、抗原提示、低酸素および酸化ストレスへの応答、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り、末梢血液で発現亢進した同様の遺伝子群が発現亢進していた(下表)。以上より癌局所の浸潤リンパ球の遺伝子発現情報が末梢血の遺伝子発現変化として反映されることが明らかとなった。

肝癌浸潤リンパ球、肝癌患者PBMCにおいて発現亢進した遺伝子に関する共通の生物学的プロセス

Antigen presentation

Ubiquitin-proteasomeal proteolysis

mRNA processing

Cell cycle

Response to hypoxia and oxidative stress

健常者とC型慢性肝炎例では末梢血液の遺伝子発現が大きく異なることを明らかにした。また、肝癌浸潤リンパ球の遺伝子発現プロファイルを包括的に解析することにより、癌局所の免疫応答の特徴を明らかにした。また、肝癌浸潤リンパ球の特徴が、全身を循環するPBMCの遺伝子発現に反映されていることを初めて見出した。このことは、末梢血液の遺伝子発現情報により肝局所の免疫状態、病態、発癌の有無を解析できる可能性を示唆しており、肝病態の診断、治療効果判定に応用できる可能性が示唆された。

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16件)

1. Yamashita T, Honda M, Takatori H,

- Nishino R, Minato H, Takamura H, Ohta T, Kaneko S. Activation of lipogenic pathway correlates with cell proliferation and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 有. 50(1). 100-110. 2009.
2. Minagawa H, Honda M, Miyazaki K, Tabuse Y, Teramoto R, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Ueda T, Kamiyo K, Kaneko S. Comparative proteomic and transcriptomic profiling of the human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 有. 366(1). 186-192. 2008.
 3. Teramoto R, Minagawa H, Honda M, Miyazaki K, Tabuse Y, Kamiyo K, Ueda T, Kaneko S. Protein expression profile characteristic to hepatocellular carcinoma revealed by 2D-DIGE with supervised learning. *Biochim Biophys Acta*. 有. 1784(5). 764-772. 2008.
 4. Nishino R, Honda M, Yamashita T, Takatori H, Minato H, Zen Y, Sasaki M, Takamura H, Horimoto K, Ohta T, Nakanuma Y, Kaneko S. Identification of novel candidate tumour marker genes for intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Hepatol*. 有. 49(2). 207-216. 2008.
 5. Mizukoshi E, Honda M, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Kaneko S. Expression of multidrug resistance-associated protein 3 and cytotoxic T cell responses in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 有. 49(6). 946-954. 2008.
 6. Matsuzawa-Nagata N, Takamura T, Ando H, Nakamura S, Kurita S, Misu H, Ota T, Yokoyama M, Honda M, Miyamoto K, Kaneko S. Increased oxidative stress precedes the onset of high-fat diet-induced insulin resistance and obesity. *Metabolism*. 有. 57(8). 1071-1077. 2008.
 7. Takamura T, Misu H, Matsuzawa-Nagata N, Sakurai M, Ota T, Shimizu A, Kurita S, Takeshita Y, Ando H, Honda M, Kaneko S. Obesity Upregulates Genes Involved in Oxidative Phosphorylation in Livers of Diabetic Patients. *Obesity (Silver Spring)*. 有. 16(12). 2601-2609. 2008.
 8. Minagawa H, Yamashita T, Honda M, Tabuse Y, Kamiyo K, Tsugita A, Kaneko S. Comparative analysis of proteome and transcriptome in human hepatocellular carcinoma using 2D-DIGE and SAGE. *Protein J*. 有. 27(7-8). 409-419. 2008.
 9. 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*. 有. 68(24). 10267-10279. 2008.
 10. Aburatani S, Sun F, Saito S, Honda M, Kaneko S, Horimoto K. Gene systems network inferred from expression profiles in hepatocellular carcinogenesis by graphical gaussian model. *EURASIP J Bioinform Syst Biol*. 有. 47212. 2007.
 11. Matsuzawa N, Takamura T, Kurita S, Misu H, Ota T, Ando H, Yokoyama M, Honda M, Zen Y, Nakanuma Y, Miyamoto K, Kaneko S. Lipid-induced oxidative stress causes steatohepatitis in mice fed an atherogenic diet. *Hepatology*. 有. 46(5). 1392-1403. 2007.
 12. Takamura T, Honda M, Sakai Y, Ando H, Shimizu A, Ota T, Sakurai M, Misu H, Kurita S, Matsuzawa-Nagata N, Uchikata M, Nakamura S, Matoba R, Tanino M, Matsubara K, Kaneko S. Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells reflect the pathophysiology of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun*. 有. 361(2). 379-84. 2007.
 13. Komura T, Mizukoshi E, Kita Y, Sakurai M, Takata Y, Arai K, Yamashita T, Ohta T, Shimizu K, Nakamoto Y, Honda M, Takamura T, Kaneko S. Impact of diabetes on recurrence of hepatocellular carcinoma after surgical treatment in patients with viral hepatitis. *Am J Gastroenterol*. 有. 102(9). 1939-46. 2007.
 14. Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Noguchi C, Takahashi S, Iwao E, Fujimoto Y, Abe H, Maekawa T, Ochi H, Tateno C, Yoshizato K, Sakai A, Sakai Y, Honda M, Kaneko S, Wakita T, Chayama K. Infection of human hepatocyte chimeric mouse with genetically engineered hepatitis C virus and its susceptibility to interferon. *FEBS Lett*. 有. 581(10). 1983-7. 2007.
 15. Tateno M, Honda M, Kawamura T, Honda H, Kaneko S. Expression profiling of peripheral-blood mononuclear cells from patients with chronic hepatitis C

- undergoing interferon therapy. J Infect Dis. 有. 195(2). 255-67. 2007.
- Misu H, Takamura T, Matsuzawa N, Shimizu A, Ota T, Sakurai M, Ando H, Arai K, Yamashita T, Honda M, Yamashita T, Kaneko S. Genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately upregulated with fasting hyperglycaemia in livers of patients with type 2 diabetes. Diabetologia. 有. 50(2). 268-77. 2007.

[学会発表] (計 9 件)

- 本多政夫. 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-. BMB2008. 2008年12月9日. 神戸市.
- Mizukoshi E, Arai K, Yamashita T, Nakamoto Y, Honda M, Kaneko S. Cellular immune responses to multidrug resistance-associated protein 3 in the patients with hepatocellular carcinoma. 第 59 回アメリカ肝臓学会. 2008年11月2日. アメリカ.
- Honda M, Tatenno M, Nakamura M, Sakai A, Kaneko S. Gene expression profiling in liver of chronic hepatitis C patients undergoing interferon therapy reveals the signaling pathway of interferon resistance. 第 15 回 International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses. 2008年10月7日. アメリカ.
- 本多政夫, 酒井明人, 金子周一. インターフェロン治療による肝組織内発現遺伝子プロファイルの検討. 第 12 回日本肝臓学会. 2008年10月1日. 東京都.
- 本多政夫, 島上哲朗, 金子周一. C型肝炎ウイルス蛋白翻訳制御による複製抑制. 第 44 回日本肝臓学会. 2008年6月5日. 松山市.
- Honda M, Ueda T, Yamashita T, Nishino R, Takatori H, Kaneko S. Comprehensive gene expression analysis of iron metabolism-related genes in patients with chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. 第 58 回アメリカ肝臓学会. 2007年11月6日. アメリカ.
- 本多政夫, 上田晃之, 金子周一. 慢性肝炎、肝細胞癌における鉄代謝関連因子の網羅的発現解析. 第 43 回日本肝臓学会総会. 2007年5月31日. 東京都.
- 本多政夫, 上田晃之, 金子周一. 慢性肝炎、肝細胞癌における鉄代謝関連因子の網羅的発現解析. 第 93 回日本消化器病

- 学会総会. 2007年4月21日. 青森市.
- 本多政夫, 今村道雄, 酒井明人, 酒井佳夫, 茶山一彰, 金子周一. C型肝炎ウイルス感染に伴うヒト肝細胞キメラマウスの遺伝子発現プロファイル解析. 第 93 回日本消化器病学会総会. 2007年4月21日. 青森市.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本多 政夫 (HONDA MASAO)
金沢大学・保健学系・教授
研究者番号：00272980

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

金子 周一 (KANEKO SYUICHI)
金沢大学・医学系・教授
研究者番号：60185923

本多 裕之 (HONDA HIROYUKI)
名古屋大学・工学系研究科・教授
研究者番号：70209328