抹消血液細胞を用いた病態解析の可能性

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 酒井, 佳夫 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/30260

金沢大学十全医学会雑誌　第120巻　第2号　62－66（2011）

【総説】

末梢血液細胞を用いた病態解析の可能性

Potential utilization of peripheral blood cells for pathological analysis of diseases

金沢大学医薬保健研究域血液情報統御学
（臨床検査医学）
酒　井　佳　夫

血液は，比較的非侵襲的に採取できる，日常診療において欠かすことのできない，臨床検査における重要な検体である．全身を循環する末梢血液には，生体内の状態に関する豊富な情報が含有されている．測定検査技術の進歩は，血液検体の含有する多くの情報を計測し，解析することを可能にしてきた．血液中に存在する赤血球，白血球，血小板等の細胞のうち，白血球は，さまざまな表現型，機能をもつ細胞集団であり，生体内の変化に対応したさまざまな動的変化を呈する．健常状態では，生体の防御に重要な役割をはたしている．疾患においては，細菌感染症における好中球増多，核の左方移動，ウイルス感染にともなうリンパ球増多，アレルギー疾患，寄生虫感染症における好酸球増多など，病態に応じた特徴的な変化を示すことが知られており，診断における一助にもなる．疾患と宿主免疫は，密接に関連している．自己免疫性疾患においては，宿主の免疫制御機構の異常が病態と考えられる．癌においても，宿主の不十分な癌免疫能がその発生，進展に関わっていると考えられる．また，代謝性疾患である糖尿病では，易感染性，悪性腫瘍のリスクの増大など臨床経験より免疫機能が低下していると考えられ，さらに肥満，脂質異常症などを呈する生活習慣病についても病因として，慢性炎症が関与していると考えられる．このように，宿主免疫機能は，さまざまな疾患の病態に関与していると考えられ，免疫担当細胞を豊富に含有する末梢血液細胞は，疾患に応じた特徴的な変化を呈し，潜在的に含有していると推察される．しかしながら，血液細胞を検体とした検査による病態の評価，解析は，未だに極めて限定的である．

DNAマイクロアレイは，1995年にStanford大学より，その基盤的技術が報告され[1]，現在までにその技術，および測定データの解析方法が急速，飛躍的に開発され発展した．現在では，アノテーションされている遺伝子，およびその機能が未だ完全に解明されていない遺伝子を含め，おおよそ全遺伝子についての発現を解析することが可能になった．この網羅的遺伝子発現解析によって，血液細胞の遺伝子発現変化を評価することにより，疾病に応じた血液細胞の応答について，表現型評価および限定された機能的評価では困難である複雑多岐な病態変化を明らかにできる可能性を考え，これまでに，癌，糖尿病の末梢血液細胞を対象とした遺伝子発現解析を行い，疾病評価，診断の可能性について検討を行ってきた．

1．C型肝硬変に合併した肝癌に対する宿主免疫応答と末梢血液細胞の遺伝子発現の特徴[2]

C型肝硬変は，C型肝炎ウイルスの持続感染に伴う肝の慢性炎症に伴って，肝細胞の壊死，再生を，線維化を伴いながら繰り返し，最終的に肝小葉構造が破壊され再生結節を伴う高度の線維化を呈した状態である．C型肝硬変においては，年率およそ6～7%の頻度で肝細胞癌が発生する[3]．肝細胞癌は，しばしば炎症細胞浸潤を伴っている．しかしながら，集簇する局所炎症細胞の役割，その生物学的特徴，意義は明らかでない．そこで，肝細胞癌局所の炎症細胞について，遺伝子発現の特徴を解析し，さらに宿主全身の応答として末梢血液単核球細胞の遺伝子発現の特徴を検討した．

肝癌浸潤炎症細胞の遺伝子発現パターンの特徴

外科的治療を受けた肝細胞癌患者12例の肝癌組織における癌部および非癌部浸潤炎症細胞をレーザーキャプチャーマイクロダイセクションによって分離，RNAを精製した（図1）．遺伝子発現については，目的のmRNAをCy5にてラベルした逆転写DNA生成物と，リファレンスとしての健常者末梢血液単核球細胞のmRNAをCy3にてラベルした逆転写DNA生成物を等量混合し，約3万のオリゴDNA遺伝子プローブを搭載したDNAチップ（AceGene Human Oligo Chip 30K，日立ソフト）にハイブリダイゼーションし，各プローブに対する蛍光強度を測定し，遺伝子発現レベルを評価した．遺伝子発現データの解析には，BRB array tool (NCI)，MetaCore (GeneGo) を用いた．

肝癌浸潤炎症細胞について，非癌部の炎症細胞と比較して有意に発現が亢進していた遺伝子773個の遺伝子が関連する生物学的プロセスについて解析を行ったところ，Antigen presentation，Ubiquitin-proteasomal proteolysis，ER and cytoplasm，mRNA processing，Transcription by RNA polymerase II，Double-strand breaks repair，ESR1-nuclear pathway，Cell cycle，Response to hypoxia and oxidative stressのプロセスが示された．また，これらの遺伝子がどの種の炎症細胞において主に発現しているものであるか，Gene Expression Omnibus (NCBI) に公開されている炎症細胞の遺伝子発現データを用いて解析を行ったところ，マクロファージ，CD4細胞において発現が認められることが明らかとなった．免疫染色でも，CD14細胞，CD4細胞の集積が癌炎症細胞において確認され，さらにCD4陽性細胞は，非癌

部肝硬変組織と比較して，より散在的に分布していることが示された (図2)．このように，肝癌浸潤炎症細胞の遺伝子発現パターンは，免疫染色で示される炎症細胞を反映し，かつ癌周辺における低酸素，酸化ストレス状態，それに伴う細胞周期をはじめとした転写，翻訳への影響，また，癌抗原についての免疫細胞の提示など，癌組織における微小環境の特徴を示していることが明らかとされた．

肝癌合併C型肝硬変患者の末梢血液単核球細胞の遺伝子発現の特徴

上記の如く，遺伝子発現解析によって肝癌局所の浸潤炎症細胞の，癌局所における特徴が，明らかとされることが示された．次に，肝癌合併C型肝硬変患者および非合併C型肝硬変患者の末梢血液細胞の遺伝子発現を解析，比較検討し，さらに上記の癌局所の炎症細胞の遺伝子発現の特徴との関連を検討した．肝細胞癌患者30名およびC型肝硬変患者32名より，末梢血液単核球細胞をフィコール比重遠心法にて分離，RNAを精製，前述と同様に遺伝子発現を測定した．各々の遺伝子発現の類似性を階層クラスタリングにて検討したところ，肝硬変を多数しめるクラスタ，肝癌を多数しめるクラスタ，肝硬変および肝癌をほぼ同数含むクラスタが形成されることが示された (図3)．また，肝硬変患者と比較して，肝癌の末梢血液単核球細胞において有意に発現が亢進していた867遺伝子が関連する生物学的特徴について検討を行ったところ，Ubiquitin-proteasomal proteolysis and ER, mRNA processing, Antigen presentation, Cell Cycle, Apoptosis, TCR signaling and immune related, Response to hypoxia and oxidative stressが示された．これらの特徴のうち，Ubiquitin-proteasomal proteolysis, mRNA processing, Antigen presentation, Cell Cycle, Response to hypoxia and oxidative stressは，肝癌局所の浸潤炎症細胞の遺伝子発現の特徴において示唆されたプロセスであり，全身を循環する血液細胞の遺伝子発現の特徴にも局所の癌周囲環境からの影響を反映する可能性が示唆された．また，肝癌局所浸潤炎症細胞と肝癌患者末梢血液単核球細胞に共通して有意な変化を示した遺伝子についてネットワーク解析を行ったところ，redox

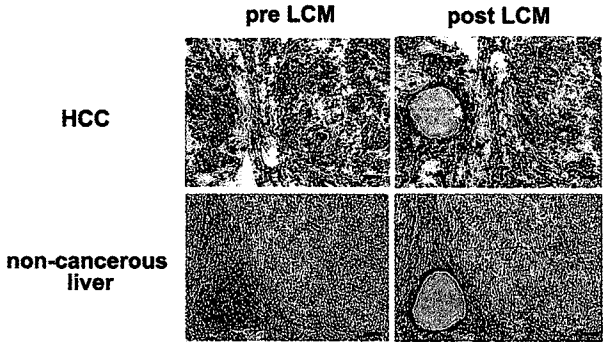

図1．レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) による浸潤炎症細胞の分離．肝細胞癌 (HCC) および非癌部背景肝組織の炎症細胞を選択的に分離回収し，RNAを抽出．(文献2からの改変)

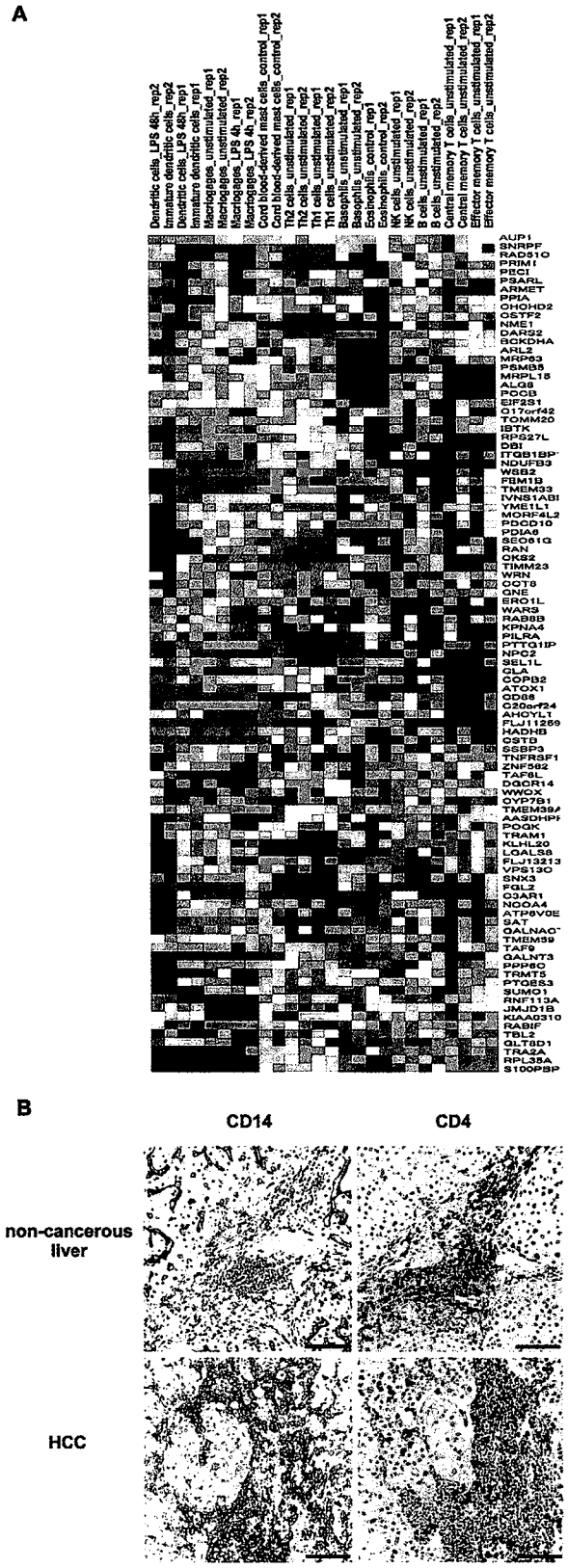

図2．肝細胞癌および非癌部背景肝組織の炎症細胞．A. 非癌部背景肝組織の局所炎症細胞と比較して，肝癌局所炎症細胞において発現が亢進していた遺伝子に関する，公開されているGene Expression Omnibusの炎症細胞の遺伝子発現データを用いた一方向階層クラスタリングによるヒートマップ．肝癌局所炎症細胞において発現が亢進している遺伝子は，マクロファージ，CD4陽性細胞において発現が認められる．B. 免疫染色．肝癌炎症細胞におけるCD4陽性細胞は，より散在的に存在している．(文献2からの改変)

system, ubiquitin-proteasome system, cell cycleに関連したnucleophosmine, SMAD3, PCNAを中心としたネットワークが示され，一部JAK3, FoxP3など免疫関連遺伝子が含まれていた (図4)

血液における肝細胞癌の腫瘍マーカーとして，α-フェトプロテイン，異常プロトロンビン (PIVKA-II) が臨床において用いられているが，前者は特異度に，後者は感度において問題がある．遺伝子発現プロファイルによるC型肝硬変における肝癌合併と非合併の判別についての検討を行ったところ，表1に示す如く，癌群と非癌群について，80%以上の例において正確に判別された．C型肝硬変における肝癌患者における末梢血液単核球細胞の遺伝子発現には，癌局所の炎症細胞と共通の生物学的特徴が反映され，非癌患者のそれとは異なった発現の特徴を示すことより，C型肝硬変患者における肝癌合併の有無についての，新たな判別スクリーニングツールとなる可能性が示唆された．

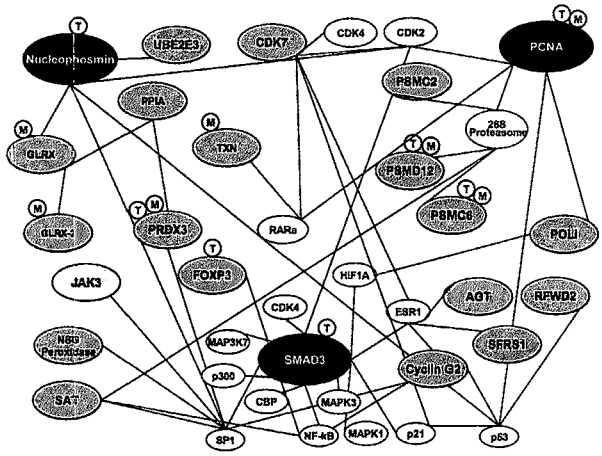

図4．肝癌局所浸潤炎症細胞と肝癌合併C型肝硬変患者の末梢血液単核球細胞に共通して有意な変動を示した遺伝子間ネットワーク解析．nucleophosmine, PCNA, SMAD3を中心としたネットワークが示され，一部JAK3, FoxP3など免疫関連遺伝子が含まれている．(文献2より抜粋)

2. 大腸癌，膵癌，胃癌患者の末梢血液全血細胞の遺伝子発現プロファイルの特徴と診断ツール開発の可能性について[4)]

肝癌合併C型肝硬変患者における末梢血液単核球細胞の遺伝子発現の特徴は，肝癌非合併患者と異なり，遺伝子発現解析による癌判別の可能性が示唆された．そこで，他の消化器癌 (大腸癌，膵癌，胃癌) においても，癌に伴い末

表1．末梢血液単核球細胞の遺伝子発現によるsupport vector machineによる群予測 (文献2より改変)

群分類カテゴリ	群	例数	誤群分類例数	分類P値	分離遺伝子数 (P<0.002)
C型肝硬変(LC-C)	LC-C	32	8	<0.0005	1430
vs					
肝癌(HCC)	HCC	30	2		
年齢	>68	31	12	0.317	32
	≦68	31	16		
性別	Male	25	15	0.178	20
	Female	37	9		
ALT(IU/l)	>50	26	20	0.82	28
	≦50	36	14		
AFP(ng/ml)	>20	29	10	0.02	301
	≦20	33	10		

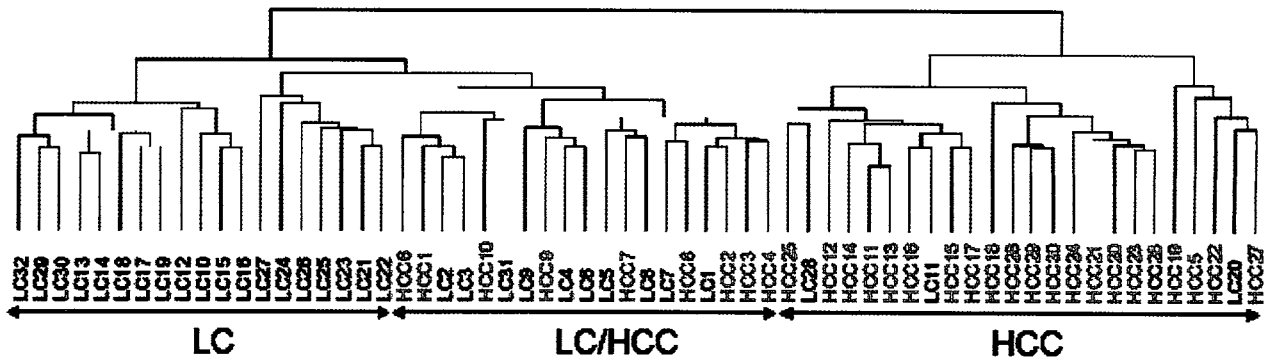

図3．C型肝硬変および肝癌合併C型肝硬変例の末梢血液単核球細胞の遺伝子発現による階層クラスタリング (文献2より抜粋) (LC：C型肝硬変，HCC：肝癌)

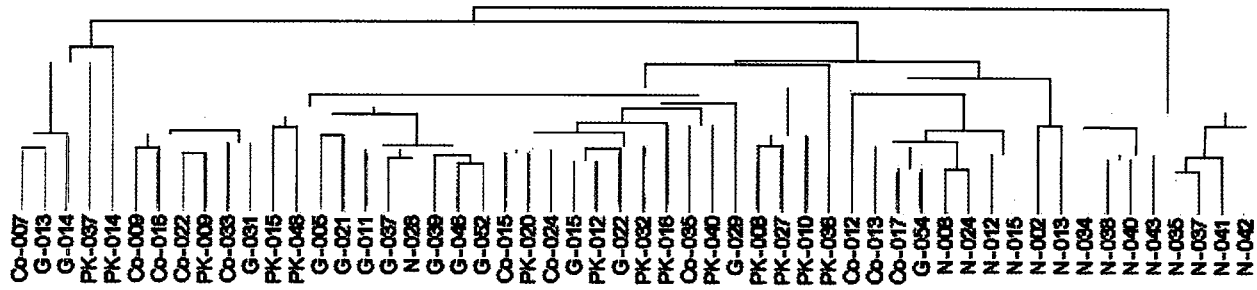

図5．消化器癌における全血末梢血液細胞の遺伝子発現パターンの階層クラスタリング (Co：大腸癌，PK：膵癌，G：胃癌) (文献4からの改変)

梢血液細胞の遺伝子発現の特徴は変化しているのか検討を行った．消化器癌39例（大腸癌11例，膵癌14例，胃癌14例）および健常者15例について，全末梢血液細胞の遺伝子発現を解析した．本検討では，末梢血液を採取後，ただちに細胞を破砕しRNAを即時安定化するPAXジーンRNA採血管（Qiagen）を用いてtotal RNAを獲得した．DNAマイクロアレイは，4x44K Whole Human Genome Microarray (Agilent) を用い，発現データの解析には，GeneSpring GX software (Agilent) およびMetaCore (GeneGo) を用いた．階層クラスタリングによる遺伝子発現パターンの類似性の検討では，これらの消化器癌患者と健常者が概ね区別されるクラスタが形成された（図5）．消化器癌患者と健常者の間で発現に差を認めた遺伝子プローブ数は，p値が0.05未満で，両群間で2倍以上の差では1348個，p値が5.0×10^{-5}未満で，1.7倍以上の差で841個，p値が5.0×10^{-6}未満で，3倍以上の差で25個であった．p値が5.0×10^{-5}未満で，1.7倍以上の差での841個が関連する生物学的プロセス解析では，免疫惹起状態を示唆するネットワークが示唆された（表2）．群判別予測解析をsupport vector machineにて行ったところ，90%以上の対象について，健常者と癌を判別できた（表3）．消化器癌患者と健常者の間でp値が5.0×10^{-6}未満で，3倍以上の差を示した25個の遺伝子を用いて，別の消化器癌37例（大腸癌11例，膵癌18例，胃癌8例），および健常者15例の検証群について，癌判別を解析したところ，検証群に対しても，感度，特異度ともに87%以上にて判別が可能であった（表4）．以上の結果から，大腸癌，膵癌，胃癌における

表2．末梢血液細胞において，大腸癌，膵癌，胃癌患者と健常者間において発現量の差を認めた遺伝子の関連する生物学的プロセス（文献4からの改変）

生物学的プロセス
Development_Ossification and bone remodeling
Cytoskeleton_Regulation of cytoskeleton rearrangement
Cell cycle_Mitosis
Immune_Phagosome in antigen presentation
Immune_Antigen presentation
Apoptosis_Apoptotic mitochondria
Inflammation_IgE signaling
Cytoskeleton_Actin filaments
Cell adhesion_Leucocyte chemotaxis
Development_Hedgehog signaling

表3．Supvervised learning method (SVM) による群予測分析（文献4からの改変）

臨床カテゴリー	亜群	症例数	誤分類例	分類正確度	発現量に差を認めた遺伝子数	
					$p<0.05$, Fold>2	$p<5.0 \times 10^{-6}$, Fold>3
健常者vs癌	健常者	15	2(1)*	87(93)*	1348	23
	癌	39	1(0)*	97(100)*		
年齢	≧65	30	-	-	0	0
	<65	24	-	-		
ステージ	0-II	11	2	82	45	0
	III-IV	28	3	89		
胃癌,大腸癌vs膵癌	胃癌,大腸癌	25	2	92	44	0
	膵癌	14	4	71		
大腸癌vs.胃癌	胃癌	14	-	-	0	0
	大腸癌	11	-	-		

*誤分類例数，および23遺伝子での分類正確度

表4．末梢血液細胞の遺伝子発現について，大腸癌，胃癌，膵癌と健常者の間で有意差を認めた遺伝子25個による，検証群に対するSVMによる癌判別の検討（文献4からの改変）

予測カテゴリー	感度(%)	特異度(%)	陽性適中率(%)	陰性適中率(%)
癌 vs. 健常者	100(37/37)	87(13/15)	95(37/39)	100(13/13)

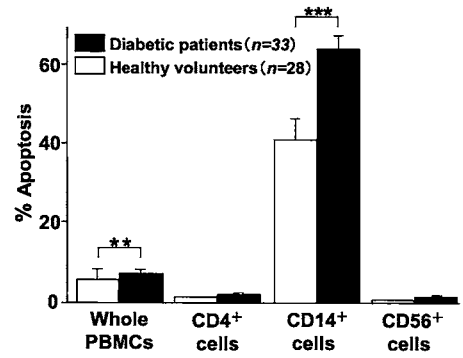

図6．糖尿病患者および健常者の末梢血液単核球細胞における，採取後3時間におけるアポトーシス出現頻度．糖尿病患者において，CD14陽性細胞がアポトーシス出現をより多く認めた．（文献6より抜粋）

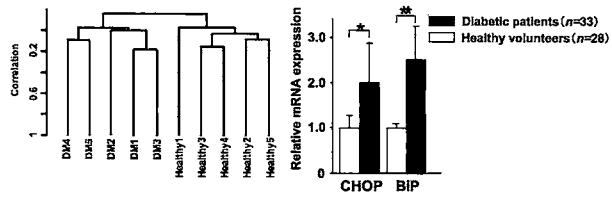

図7．2型糖尿病患者の末梢血CD14陽性細胞の遺伝子発現による階層クラスタリングおよび発現変化のある遺伝子が関与する生物学的プロセス．（文献6より抜粋）

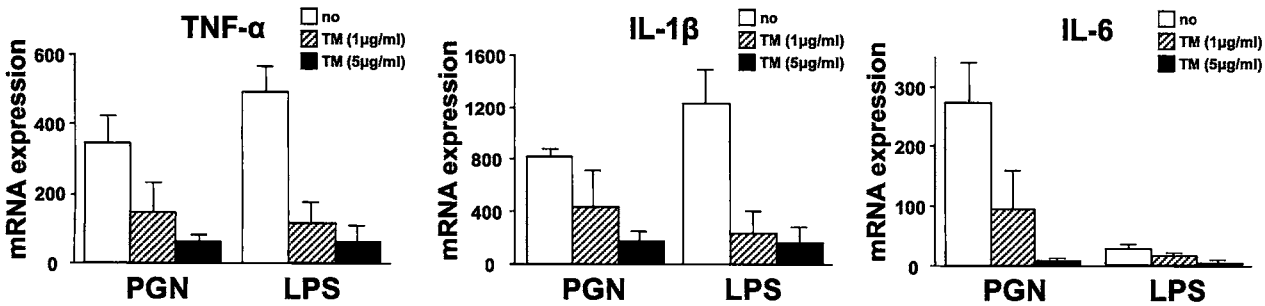

図8．Tunicamycin処理単球細胞に対するTLRリガンド刺激によるサイトカイン発現定量（リアルタイムPCR）．ヒトCD14陽性細胞をTunicamycin添加培地にて3時間培養後，プロスタグランジンン，リポポリサッカライドにて6時間刺激し，遺伝子発現を測定した．Tunicamycin処理を行った単球では，TLRリガンドに対するサイトカイン遺伝子発現の低下が認められた．（文献6より抜粋）

末梢血液細胞の遺伝子発現は，健常者と異なる特徴を有し，癌において健常者とは異なる発現を示す遺伝子の発現解析を末梢血液細胞について行うことにより，癌を判別することができる可能性が示唆された．

3. 糖尿病患者における末梢血液細胞の特徴と免疫状態の評価[5,6]

糖尿病は，現代において最も健康を脅かしている疾患の一つである[7]．糖尿病患者においては，さまざまな合併症が生じるが，免疫機能が低下していることも，易感染性，悪性腫瘍の発生率が比較的高いことなどの臨床経験より推察されている[8]が，その詳細については未だ明らかではない．糖尿病患者と健常者間では，末梢血液単核球細胞の遺伝子発現プロファイルの特徴に違いがあることを見出してきたが，その一つにストレス応答に関連したapoptosisがその特徴として見られた[5]．そこで，糖尿病患者の末梢血液細胞の脆弱性について検討を行ったところ，CD14陽性単球分画のアポトーシス細胞出現頻度が，健常者に比較して有意に高いことが示された (図6)．さらに，単球のもつ貪食能，pathogen pattern recognition moleculesであるtoll-like receptor (TLR) 2，3，4に対するligandsに対する反応としてのpro-inflammatory cytokinesの発現が減弱していることが明らかとされた．糖尿病患者と健常者の単球の遺伝子発現をDNAマイクロアレイ (AceGene Human Oligo Chip 30K) にて測定し，発現パターンの類似性を解析比較したところ，完全に異なるクラスタを形成した (図7)．さらに，糖尿病患者の単球において発現が亢進していた813個の遺伝子について，関連する生物学的プロセスを解析したところ，Golgi apparatus，Unfold protein binding intracellular protein transportと，ER-Golgiシステムについての特徴が示され，さらにBip，CHOPのER stress関連分子の発現が糖尿病患者の単球において亢進していることを確認した (図7)．そこで，この単球の機能低下について，ER stressが関連している可能性について検討を行ったところ，N-linked glycosilation inhibitorであるER stressを誘導するtunicamycin処理をした単球は，TLRおよびアダプター分子であるMyd88の発現に影響せず，TLR ligandに対するproinflammatory cytokinesの発現低下が示され，TLRシグナルの伝達系に影響していることが示唆された (図8)．このように，遺伝子発現の特徴を解析することにより，糖尿病患者の単球がER stressの状態におかれ，その結果，脆弱性，病原体に対する炎症惹起能の低下をきたしていることが明らかとすることができた．糖尿病患者における易感染性についての一因であると考えられ，末梢血液細胞の遺伝子発現解析を進めることによって，免疫機能についての病態を解明できる可能性が示唆された．

おわりに

以上のように，末梢血液細胞の遺伝子発現解析によって，悪性腫瘍の病態解析および癌判別が可能であることが示唆された．また，糖尿病における免疫機能についての病態解析においても有用であることが示された．血液は全身のさまざまな状態についての豊富な情報を含有しており，血液中細胞の遺伝子発現解析を網羅的に行うことにより，これまでに明らかとされていなかった疾病に関する生体情報が明らかとされることが示された．現在では，次世代シーケンサの開発によって，遺伝子の発現については，個々における遺伝子配列そのものを高速に解読可能となった．また，遺伝子発現の制御を行う新たな核酸として，micro RNAの存在が発見され[9]，その生物学的な意義の解明も急速に発展している[10]．こうした核酸に関する測定技術の開発，新しい知見が解明，蓄積され，データの解析技術も飛躍的に進歩し，新しい生物学的あるいは病態学的解析，解釈が可能となってきている．今後こうした技術の進歩を，比較的簡便に採取できる血液検体の解析に応用し，疾病における遺伝子発現の特徴を解明し，さらにその病態における意義を詳細に解析することによって，末梢血液細胞を用いた新しい臨床検査技術の開発も可能であると考えている．

文献

1) Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO: Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995, 270(5235):467-470.

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, 68(24):10267-10279.

3) Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 2003, 362(9399); 1907-1917.

4) Honda M, Sakai Y, Yamashita T, Sakai A, Mizukoshi E, Nakamoto Y, Tatsumi I, Miyazaki Y, Tanno H, Kaneko S: Differential gene expression profiling in blood from patients with digestive system cancers. *Biochem Biophys Res Commun* 2010, 400(1):7-15.

5) Takamura T, Honda M, Sakai Y, Ando H, Shimizu A, Ota T, Sakurai M, Misu H, Kurita S, Matsuzawa-Nagata N *et al*: Gene expression profiles in peripheral blood mononuclear cells reflect the pathophysiology of type 2 diabetes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007, 361(2):379-384.

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, 59(3):634-643.

7) Zimmet P, Alberti KG, Shaw J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. Nature 2001;414(6865):782-787

8) Stumvoll M, Goldstein BJ, van Haeften TW. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* 2005; 365(9467): 1333-1346.

9) Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993, 75(5):843-854.

10) Kim VN, Han J, Siomi MC: Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009, 10(2):126-139.