

29. 腫瘍惹起性の遠隔臓器炎症が起こるしくみ

河岡 慎平

国際電気通信基礎技術研究所 佐藤匠徳特別研究所

Key words : 腫瘍, 炎症, 乳がん, サーカディアンリズム, 肝臓

緒言

腫瘍、特に悪性腫瘍（がん）は、個体全体の生理を攪乱し、最終的には個体を死に至らしめる。近年の分子生物学の発展により、腫瘍・がんそのものが持つ性質については、かなりの知識が蓄積されてきた¹⁾。一方で、腫瘍がどのように個体の生理を乱すのか、腫瘍によって攪乱された生理がどのように関連しあうのか、という問題については、大部分が謎に包まれている²⁻⁴⁾。例えば、腫瘍は肝臓などの遠隔臓器にしばしば炎症を引き起こす。ところが、腫瘍がどのように、何のために遠隔臓器に炎症を引き起こすのかは不明である。このほかにも、肝臓の肥大や、脂肪や筋肉の減少、食欲不振など、腫瘍は実に様々な異常を引き起こす。これらの生理的異常の相互の関連性を考察し、腫瘍惹起性の遠隔臓器炎症のしくみについての知見を得ることは、基礎医学として重要であるばかりでなく、がん患者の生活の質 (Quality of Life: QOL) を高めるという観点からも重要である。

筆者らは、マウス・ゼブラフィッシュを用いた実験系を活用し、腫瘍が個体にどのような影響をもたらすのかを解明しようとしている。本研究では、マウス 4T1 乳がん細胞を用いた実験系において、乳がんが個体に与える悪影響を経時的かつ半網羅的に調べることで、腫瘍惹起性の遠隔臓器炎症がおきるしくみに関する手がかりを得ることを試みた⁵⁾。

方法

1. 4T1 乳がんの移植

移植は二通りの方法で行った。1st recipient マウスに 5×10^5 cells/100 μ l の 4T1 細胞を移植した場合は、移植 7 日後に 1st recipient マウスを解剖してがん組織を摘出し、3 mm \times 3 mm \times 3 mm のがん組織片を 2nd recipient マウスに移植した。移植 3 日あるいは 7 日後に 2nd recipient マウスから肝臓、肺、腎臓/副腎、そして心臓を摘出し、液体窒素を用いて急速冷凍し、 -80°C のディープフリーザーで保管した。1st recipient マウスに 1×10^6 cells/100 μ l の 4T1 細胞を移植した場合は、移植 7 日後に 1st recipient マウスの肝臓を分析した。マウスは明期 12 時間・暗期 12 時間の環境下で飼育した。

2. 遺伝子発現解析

摘出した臓器は液体窒素中で粉々に破碎し、Trizol ならびに RNeasy mini キットを用いて RNA を抽出した。RNA は逆転写ののち qRT-PCR、あるいは RNA-seq 解析に供した。RNA-seq データは tophat2 ならびに cufflinks/cuffdiff を用いて解析した⁶⁻⁷⁾。GO 解析は <http://www.geneontology.org/page/go-enrichment-analysis> によって行った。概日リズム遺伝子の発現ピークは、qRT-PCR データをフィッティングすることによって得た⁸⁾。

3. フローサイトメトリー/組織切片

肝臓に対するフローサイトメトリー、組織切片解析は、それぞれ PI staining ならびに HE 染色によって行った⁵⁾。

結果

1. 4T1 乳がんによる正常臓器への影響 (図1)

4T1 乳がんによる正常臓器への影響を調べるために、4T1 乳がんをマウスに移植し、肝臓、肺、腎臓/副腎、そして心臓を対象に RNA-seq 実験を行った。この際、移植後 3 日と 7 日のサンプルを replicate として扱い、この 2 点で共通して観察される現象を探索した。*Sl100a8/9* 遺伝子の発現上昇から、肝臓ならびに肺では、その他の 2 臓器と比べて早期に炎症が起こっていることが示唆された。興味深いことに、時計遺伝子の一つである *Nr1d1* (*Rev-erb a*) の発現が肝臓において顕著に減少していることが判明した。

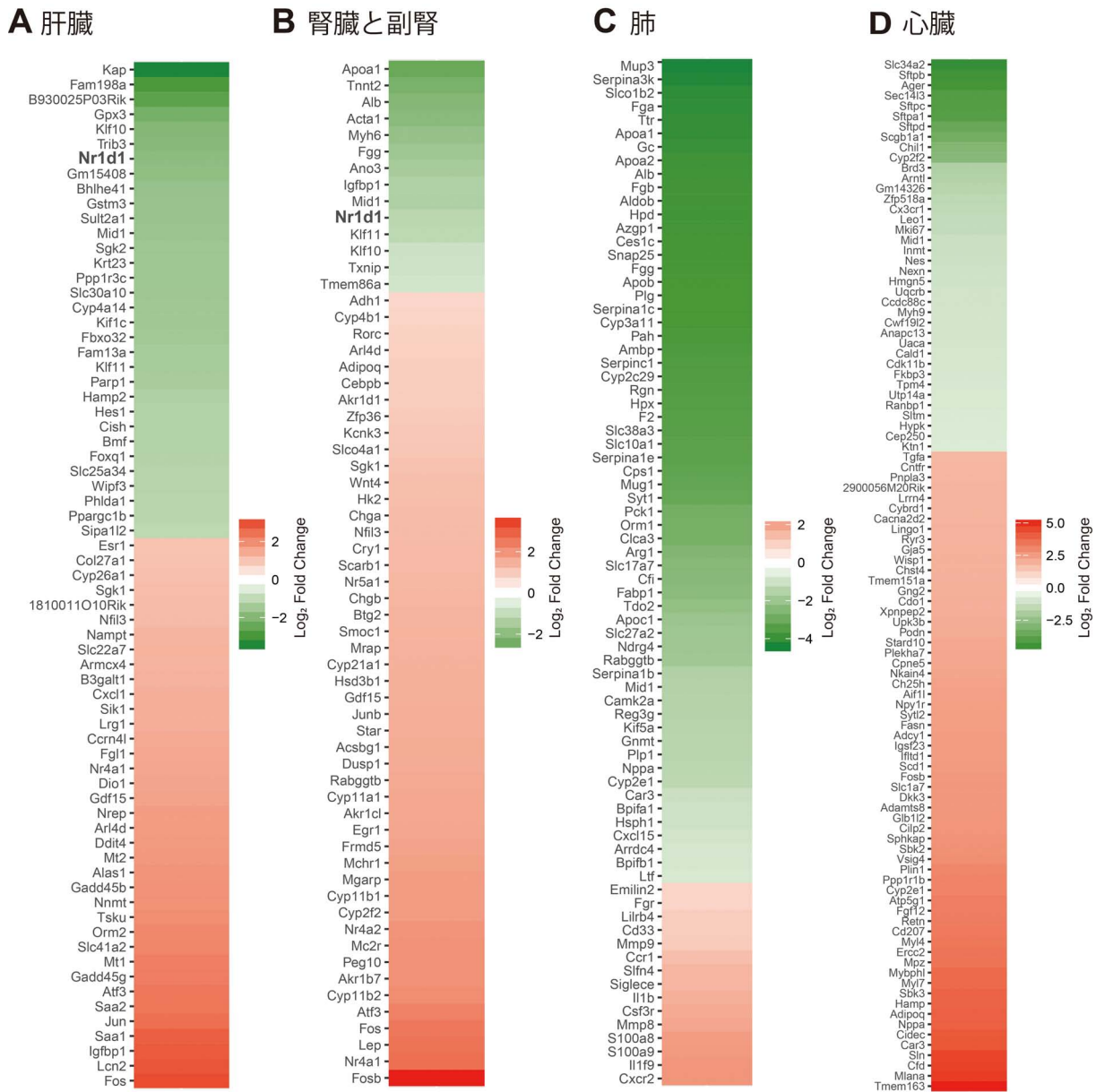


図1. 4T1 乳がんを移植した個体における正常臓器のトランスクリプトーム解析

4T1 乳がんを移植あるいは偽移植してから 3 日後と 7 日後のマウスからそれぞれ (A) 肝臓、(B) 腎臓と副腎、(C) 肺、(D) 心臓を摘出し、トランスクリプトーム解析を行った。3 日後と 7 日後のデータを反復として扱い、cufflinks/cuffdiff2 によって、4T1 移植によって統計的に有意な遺伝子発現変化を示した遺伝子を同定した。得られた遺伝子セットの発現量データを ggplot によってヒートマップ化したものが本図である。

2. 4T1 乳がんは肝臓における時計遺伝子の発現パターンを乱す (図 2)

1の結果から、4T1を持つ個体の肝臓では、炎症の他に、「概日リズム遺伝子の発現パターンの乱れ」が生じているのではないかと、という仮説を立てた。この仮説を検証するために、いくつかの時計遺伝子に対する qRT-PCR を行った。その結果、*Nr1d1* (*Rev-erba*) の他にも、*Rorc*、*Clock* といった重要な時計遺伝子の発現パターンが 4T1 移植によって攪乱されることがわかった。

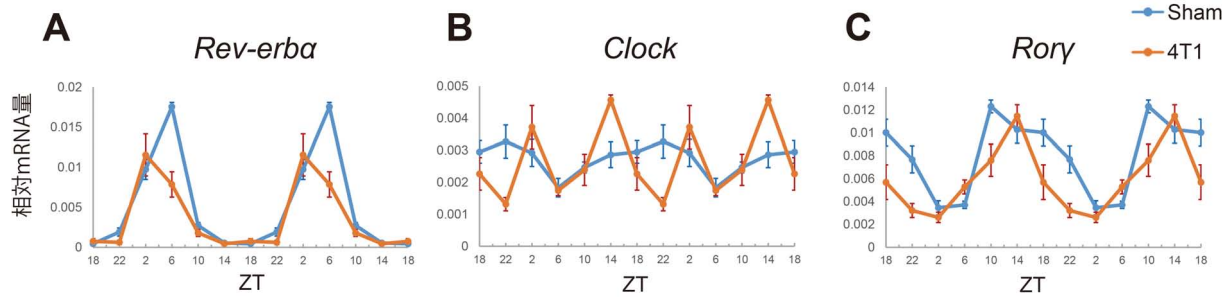


図 2. 4T1 乳がんは肝臓における時計遺伝子の発現パターンを乱す

4T1 乳がんを移植して 7 日後のマウスから、ZT02/06/10/14/18/22 の 6 タイムポイントで肝臓を摘出し、qRT-PCR 解析を行った。ZT00 がマウス舎が明期条件になったタイムポイントである。

3. 4T1 乳がんを移植した肝臓におけるサーカディアン転写トーム解析

1-2の結果に基づき、4T1 乳がんを移植した個体におけるサーカディアン転写トーム解析を行った。肝臓で発現する遺伝子を「概日リズム遺伝子」と「それ以外」に分類し、それぞれに対してバイオインフォマティクス解析を行った。

「それ以外」に分類された遺伝子のうち、全タイムポイントで発現に差異が認められた 182 個の遺伝子の GO 解析 (gene ontology 解析) を行った結果、4T1 乳がんを持つ個体の肝臓では 1 日中炎症が起きていることが判明した (図 3)。発現量の変化が顕著であった *S100A8* 遺伝子は代表的な炎症マーカーの一つである。実際、HE 染色の結果、4T1 乳がんを移植した個体の肝臓には、血球細胞が多数浸潤していた。これらのことから、4T1 乳がんを移植したマウスの肝臓では、1 日中炎症が起きていることが判明した。

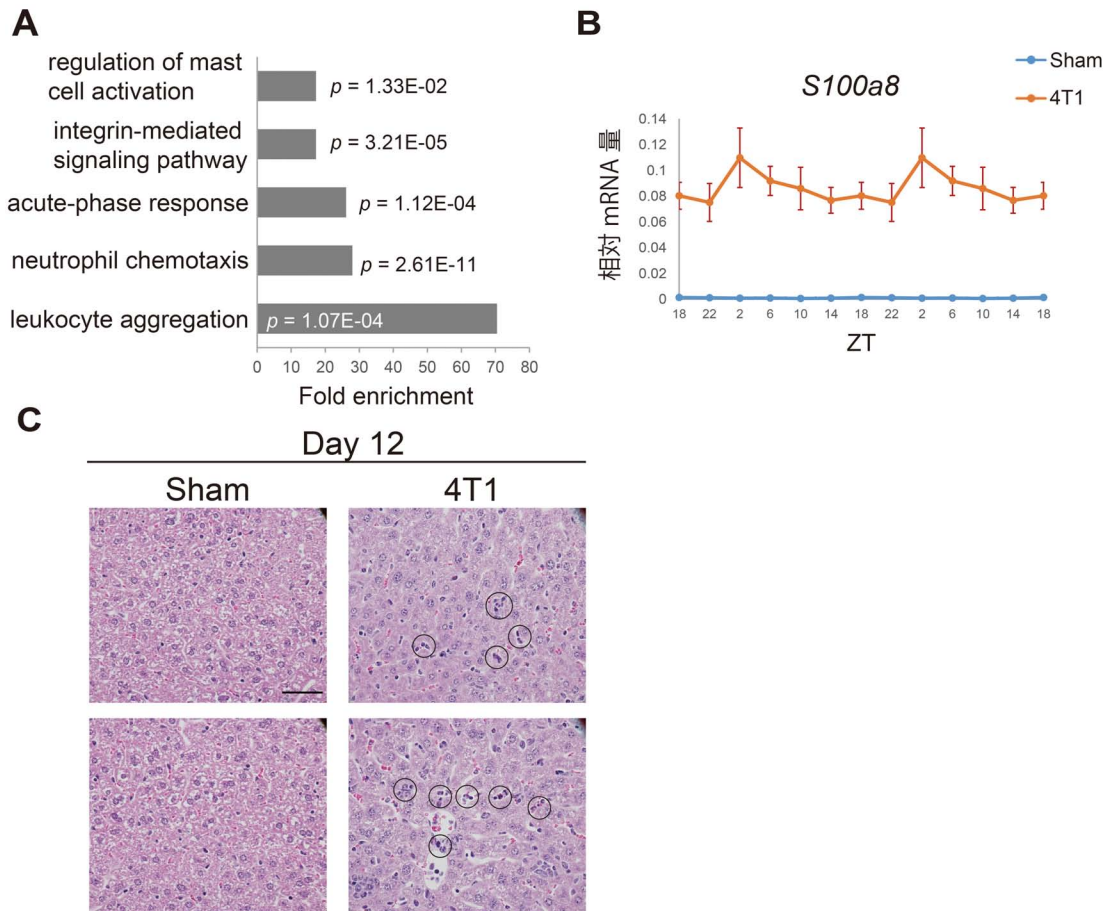


図 3. 4T1 乳がんを移植した個体の肝臓では 1 日中炎症が起こっている

(A) ZT02/06/10/14/18/22 におけるトランスクリプトーム解析を、各タイムポイント 2 反復ずつ、合計 24 サンプルに対して行い、結果を cuffdiff によって解析した。全タイムポイントで 4T1 乳がんによる統計的に有意な遺伝子発現変化を示した遺伝子の数は 182 個であった。182 個の遺伝子に対する GO 解析を行った結果、4T1 乳がんを移植した個体の肝臓では炎症が起きていることがわかった。(B) 代表的な炎症マーカー遺伝子として、*S100A8* 遺伝子の qRT-PCR データを示した。(C) 4T1 乳がんを移植してから 12 日後のマウスの肝臓に対する HE 染色像を示した (Scale bar: $50 \mu\text{m}$)。また、血球細胞の浸潤が顕著な領域を丸で囲んだ。

「概日リズム遺伝子」に分類され、かつ発現が乱れた概日リズム遺伝子のうち、*E2f8* 遺伝子、*Nlrp12* 遺伝子の発現パターンは昼夜逆転しており、*Cyp8b1* 遺伝子のリズムの振れ幅がかなり弱まっていた (図 4)。

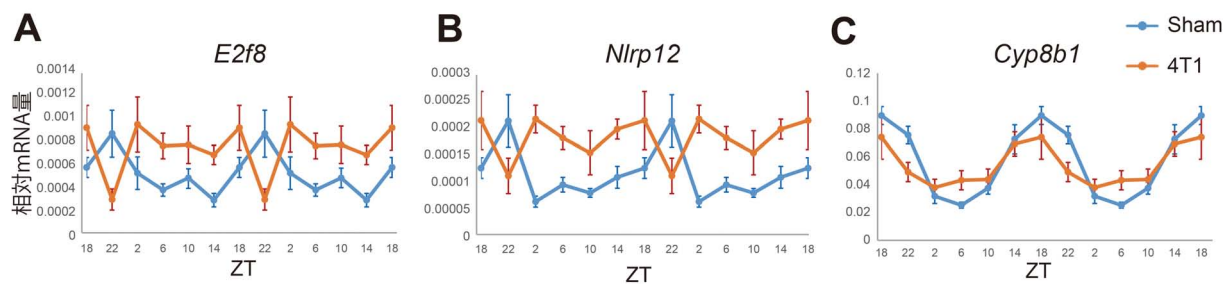


図 4. 4T1 乳がんは肝臓の概日リズム遺伝子の発現を乱す

4T1 乳がんによる特に興味深い影響を示した 3 つの遺伝子の qRT-PCR データを示した。数理解析の結果、コントロールマウスと比較して、4T1 乳がんを移植したマウスの肝臓における *E2f8* 遺伝子のピークタイムは 10.5 時間、*Nlrp12* 遺伝子のピークタイムは 7.9 時間ずれており、ほぼパターンが昼夜逆転していた。

4. 4T1 乳がんを持つ個体では肝細胞の倍数性に異常が生じる

E2f8 は細胞分裂ならびに細胞の倍数性を制御する遺伝子である⁹⁾。本遺伝子のノックアウトマウスは肝細胞の倍数性に異常をきたす。これらのことから、4T1 乳がんを移植したマウスの肝臓では、肝細胞の倍数性に異常が生じるのではないかと、という仮説を立てた。フローサイトメトリーを用いた解析の結果 (図 5)、4T1 乳がんを移植したマウスの肝臓では、2N の細胞に対して 4N の細胞が増加していることが判明した。*E2f8* 遺伝子の昼夜逆転パターンが本現象の直接の原因であるかはさらなる検証を待つ必要があるが、*E2f8* 遺伝子の発現パターンの乱れが倍数性の異常を引き起こす可能性が考えられた。

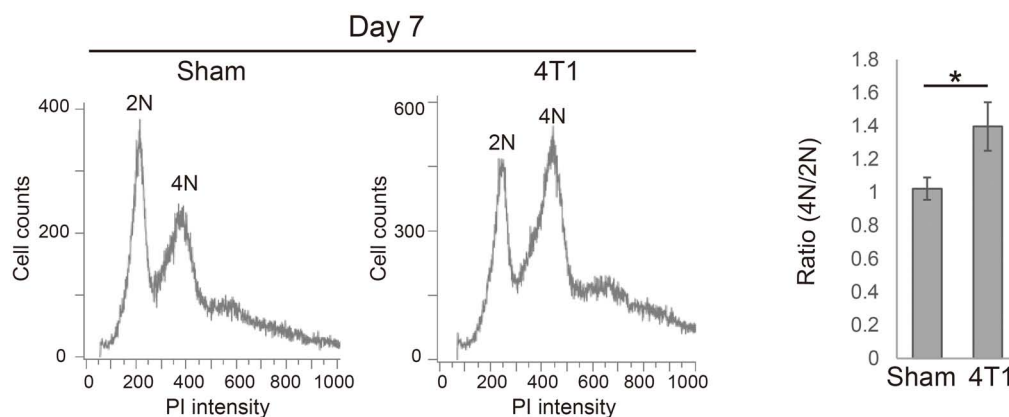


図 5. 4T1 乳がんの移植により、肝細胞の倍数性に異常が生じる

4T1 乳がんを移植して 7 日後の肝細胞の倍数性を、PI staining とそれに続くフローサイトメトリー解析によって分析した。得られた結果は student の *t* test によって検定した。*, $p < 0.05$ 。

考 察

本研究により、乳がんを持つ個体の肝臓において、腫瘍惹起性の炎症、概日リズム遺伝子の発現パターンの乱れ、肝細胞の倍数性の異常、が同時に起こっていることが判明した。このほかにも、肝臓の肥大や酸化ストレスの上昇など、様々な生理的異常が観察された⁵⁾。これらの生理的異常の相互の関係は今なお不明であるが、これらの異常が互いに密接に関連し合い、肝臓の生理を狂わせている可能性がある。今後、こういった腫瘍惹起性の異常をターゲットすること

により、がんを持つ個体の生理状態を向上させ、「がんと共存」を実現できるような戦略を探求していきたい。

共同研究者

本研究の共同研究者は、ATRの北條広朗氏、塩谷天博士、ATR／東京大学の荒井未来氏、東京大学の鈴木穰博士、大阪大学/国立循環器病研究センターの野尻崇博士、国立循環器病研究センターの寒川賢治博士、数理統計研究所の小山慎介博士である。

文 献

- 1) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-74. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- 2) Egeblad M, Nakasone ES, Werb Z. Tumors as organs: complex tissues that interface with the entire organism. *Dev Cell*. 2010;18(6):884-901. doi: 10.1016/j.devcel.2010.05.012.
- 3) Fearon KC, Glass DJ, Guttridge DC. Cancer cachexia: mediators, signaling, and metabolic pathways. *Cell Metab*. 2012;16(2):153-66. doi: 10.1016/j.cmet.2012.06.011.
- 4) McAllister SS, Weinberg RA. The tumour-induced systemic environment as a critical regulator of cancer progression and metastasis. *Nat Cell Biol*. 2014;16(8):717-27. doi: 10.1038/ncb3015.
- 5) Hojo H, Enya S, Arai M, Suzuki Y, Nojiri T, Kangawa K, et al. Remote reprogramming of hepatic circadian transcriptome by breast cancer. *Oncotarget*. 2017. doi: 10.18632/oncotarget.16699.
- 6) Trapnell C, Hendrickson DG, Sauvageau M, Goff L, Rinn JL, Pachter L. Differential analysis of gene regulation at transcript resolution with RNA-seq. *Nat Biotechnol*. 2013;31(1):46-53. doi: 10.1038/nbt.2450.
- 7) Kim D, Pertea G, Trapnell C, Pimentel H, Kelley R, Salzberg SL. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. *Genome Biol*. 2013;14(4):R36. doi: 10.1186/gb-2013-14-4-r36.
- 8) Liu D, Peddada SD, Li L, Weinberg CR. Phase analysis of circadian-related genes in two tissues. *BMC Bioinformatics*. 2006;7:87. doi: 10.1186/1471-2105-7-87.
- 9) Pandit SK, Westendorp B, Nantasanti S, van Liere E, Tooten PC, Cornelissen PW, Toussaint MJ, Lamers WH, de Bruin A. E2F8 is essential for polyploidization in mammalian cells. *Nat Cell Biol*. 2012 Nov;14(11):1181-91. doi: 10.1038/ncb2585.