

## 論文の内容の要旨

### 1 申請者

防衛医科大学校 川口 真

### 2 論文題目

次世代シーケンシングを併用した HiCEP 法による腎細胞癌遺伝子発現データベースの構築と腫瘍マーカーの探索

### 3 目的

腎細胞癌には、早期診断に活用できる特異的な腫瘍マーカーが現時点では存在しない。このため早期発見には超音波検査や CT (computed tomography) などの画像診断に頼らざるを得ず、血液検査などでの簡便なスクリーニング方法がない。近年、包括的高感度転写産物プロファイリング (HiCEP; high coverage gene expression profiling) 法が日本発の技術として開発された。HiCEP 法は、256 対のプライマーセットを用いて cDNA を網羅的に増幅し、mRNA の発現量を高い感度と再現性で、低発現 mRNA を含めて測定可能にした技術である。本研究の目的は、この HiCEP 法を用い、腎細胞癌において新規の特異的腫瘍マーカーを同定することである。しかし、HiCEP 法では解析により同定したマーカー候補遺伝子の塩基配列の決定に、煩雑な追加操作が必要となる欠点があり、本研究ではその問題を次世代シーケンサーシング (next generation sequencing; NGS) を併用したデータベース化により克服した。この NGS を併用した HiCEP 法 (NGS-HiCEP) による遺伝子発現解析を癌部組織および肉眼的非癌部組織において実施した。本研究は、これまでほとんどなされていない、癌患者の臨床検体を用いた HiCEP 法による腫瘍マーカーの探索に挑戦するものである。

### 4 対象並びに方法

2014 年 6 月より防衛医科大学校病院において手術を受けた腎細胞癌患者 42 名より検体採取を行った。手術において摘出した組織より癌部および肉眼的非癌部の組織を採取し、mRNA の抽出を行った。HiCEP 法による解析は、すべて淡明細胞型の腎細胞癌で病期の異なる 6 症例を選択し、1 症例ごとに癌部と肉眼的非癌部の検体を用い、合計で 12 検体の解析を行った。次に、HiCEP 法により得られた HiCEP ピークの遺伝子の同定を行うために、HiCEP フラグメントの NGS 解析を行い、腎細胞癌の遺伝子発現データベースの構築を行った。この NGS-HiCEP により得られたマーカー候補遺伝子について、HiCEP 法で用いなかった症例のうち、34 症例の mRNA を用いてリアルタイム PCR による再現実験を行った。

### 5 結果

NGS-HiCEP による 6 症例の腎細胞癌組織の癌部・非癌部の解析により、腎細胞癌の遺伝子発現データベースの構築に成功した。発現解析においては、癌部において非癌部よりも 5 倍以上発現の増加している HiCEP ピークを 12 個認め、遺伝子の同定を行った。12 個のう

ちすでに腎細胞癌との関連が報告されているものが8個あり、残りの4個については未報告の遺伝子であった。リアルタイム PCR による再現実験においても、12個のマーカー候補遺伝子は癌部において発現の増加が認められた。

## 6 考 察

ヒトやその疾患を対象とした HiCEP は、これまでにほとんど報告がない。本研究ではヒトの検体、特に腎細胞癌を対象とした HiCEP を実施して、腎細胞癌で発現上昇を認める HiCEP ピークの同定に成功することができた。一方で、HiCEP 法による発現解析においては、ピークに該当する遺伝子の同定のためにピーク分取と TA クローニングといった煩雑な追加実験が必要になるという問題点があるが、本研究ではこの問題点を解決するために NGS による HiCEP フラグメントの網羅的解析、すなわち NGS-HiCEP を実施して塩基配列の同定を行った。これらの方法により腎細胞癌の遺伝子発現データベースの構築を構築できたことは、ヒトを含む哺乳類の検体において世界で初めての成果である。また NGS-HiCEP を用いたデータベースの構築により、腎細胞癌組織において発現が増加している遺伝子として新規遺伝子4個を含む12個の遺伝子を同定することができ、さらにリアルタイム PCR による再現実験においてもこれら12個の遺伝子の発現増加が認められ、NGS-HiCEP の有用性が確認された。

## 7 結 論

NGS-HiCEP を用いて、ヒトを含む哺乳類検体において初めて腎細胞癌組織の遺伝子発現データベースの構築に成功した。癌部と肉眼的非癌部の発現の違いを比較することにより、癌部において非癌部と比べて5倍以上発現が増加している遺伝子を新規遺伝子4個を含めて12個同定した。これらはリアルタイム PCR を用いた再現実験においても、癌部において発現が増加していることが確認された。再現性が高く、低発現の転写物の検出に強いという HiCEP 法の利点を活用し、これまでに発見できなかった腎細胞癌の早期診断マーカーや予後予測マーカーの発見に寄与し、腎細胞癌患者の個別化医療の推進につながることを期待できる。