

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

かわぐち まこと  
川口 真

(泌尿器科学専攻)

防衛医科大学校

令和元年度



## 目次

第 1 章 背景	1
第 2 章 次世代シーケンシングを併用した HiCEP 法による 腎細胞癌の遺伝子発現データベースの構築	3
2-1. 目的	3
2-2. HiCEP 法の原理と特徴及び問題点	3
2-3. 対象及び方法	5
2-3-1. 対象	5
2-3-2. 腎細胞癌組織からの mRNA の抽出と血液検体の収集	5
2-3-3. HiCEP 法による RNA 発現解析	6
2-3-3-1. HiCEP フラグメントの作成	6
2-3-3-2. HiCEP 法における選択的 PCR	6
2-3-3-3. キャピラリー電気泳動	7
2-3-4. NGS による HiCEP フラグメントの網羅的解析	8
2-3-5. HiCEP ピークのデータベース構築	8
2-4. 結果	8
2-4-1. HiCEP 法による腎細胞癌組織の遺伝子発現解析	8
2-4-2. NGS による塩基配列の同定と関連遺伝子の検索	9
第 3 章 NGS-HiCEP により同定されたマーカー候補遺伝子の評価	10
3-1. 目的	10
3-2. 対象及び方法	10

3-2-1. 組織からの RNA 抽出とリアルタイム PCR	10
3-2-2. 内在性コントロールの選定	11
3-2-3. リアルタイム PCR	11
3-2-4. $\Delta\Delta\text{Ct}$ 法による発現解析	11
3-3. 結果	12
3-3-1. リアルタイム PCR による発現解析	12
3-3-2. 癌関連遺伝子発現データベースを用いた検討	13
第 4 章 考察	14
第 5 章 結論	18
謝辞	19
略語一覧	20
用語集	21
付記	25
参考文献	27
図表	32

## 第 1 章

### 背景

腎細胞癌には、早期診断マーカーとして尿中 aquaporin-1 (AQP-1) や perilipin2 (PLIN2) の測定(1)や、血中 carbonic anhydrase 9 (CA9) の測定(2)などの試みはあるものの、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。したがって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、診断が遅れがちになる。このため現状では血液検査などでの簡便なスクリーニング方法がない。同様に腎細胞癌の予後予測に用いられている腫瘍マーカーも確立していない。

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、疾患マーカーとして活用可能な疾患特異的に発現している遺伝子の検索に期待が寄せられている(3)。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をもって調べることができる方法で、低発現の mRNA も含めて高感度の検出を可能にした技術である。そこで本研究で、この HiCEP 法を用いて腎細胞癌における新規の特異的腫瘍マーカーを同定することを目的に研究を計画した。しかし、既報の HiCEP 法ではマーカー候補遺伝子のピークを発見できても、その塩基配列の決定による遺伝子の同定に煩雑な追加同定操作が必要となるという欠点がある。本研究ではこの問題点について、次世代シーケンシング (next generation sequencing; NGS) を併用することにより HiCEP フラグメントの塩基配列情報をデータベース化して

以降の検索をシステム化することにより克服した。すなわち、この NGS を併用した HiCEP 法 (NGS-HiCEP) による遺伝子発現解析を、癌部組織及び肉眼的非癌部組織において比較検討することにより、新規腎細胞癌のマーカーについての研究を実施した。このように、本研究は、これまで有効な早期発見法がほとんどなかった腎細胞癌について、臨床検体を用いた腫瘍マーカーの探索に挑戦するものである。

なお本研究は、いずれもヘルシンキ宣言に従い、防衛医科大学校倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号:2917)。

## 第2章

### 次世代シーケンシングを併用した HiCEP 法による

### 腎細胞癌の遺伝子発現データベースの構築

#### 2-1. 目的

HiCEP 法は、高感度かつ網羅的、定量的な遺伝子発現解析を行うことが可能であり、実験の再現性も非常に高いといった特徴がある。しかし、得られたピーク(転写物)の解析には、再度の電気泳動によるピークの個別分取と精製、cDNA シーケンシングが必要であり、原法では転写物の配列決定に時間と手間を要する。このような問題点に対し、NGS を用いて HiCEP フラグメントの配列の網羅的解析を行い、その遺伝子発現データベースの構築を行うことを試みた。これまでに、癌組織を含むヒトの臨床検体を用いた HiCEP 法による解析についての報告はほとんどなく、特に HiCEP 法と NGS を併用した NGS-HiCEP の実施例は世界で初めての報告となる。本研究では、腎細胞癌における特異的腫瘍マーカーを探索するため、NGS-HiCEP による網羅的解析をシステム化するとともに、臨床例における腎細胞癌組織の遺伝子発現データベースの構築を行った。

#### 2-2. HiCEP 法の原理と特徴及び問題点

HiCEP 法は、放射線医学総合研究所において開発された RNA の網羅的発現解析手法で(3)、HiCEP フラグメントの作成、選択的 PCR、キャピラリー電気泳動の3つの過程から成る。まずは検体から抽出した RNA について、逆転写した cDNA の 5' 及び 3'

末端をそれぞれ 2 種類の制限酵素で切断し、そこにすべての転写物に共通するアダプター配列を結合させる。両端にアダプター配列を結合させた転写物を HiCEP フラグメントと呼ぶ(図 1)。次に、アダプター配列を標的としたプライマーを設計し、HiCEP フラグメントの PCR を行って増幅するが、この際にアダプター配列から 2 塩基内側までを標的とするプライマー設計(図 2)を行うことで、内側 2 塩基の組み合わせに応じた転写物のみを選択して PCR にて増幅することが可能となる(図 3)。この選択的 PCR の際に用いるプライマーセットは、DNA の塩基は ATGC の 4 種類であるので、フォワード側が  $4^2 = 16$  通り、リバーズ側も 16 通りとなり、積算すると  $16 \times 16 = 256$  通りの組み合わせを準備することですべての配列の転写物をプライマーセットごとに増幅することができる(図 3)。最後に、アダプター配列選択的 PCR でプライマーセットごとに増幅した転写物をキャピラリー電気泳動で発現解析を行う(図 4)。キャピラリー電気泳動で得られたピーク波形は、サンプル間で比較可能であり、ピークの高さで発現量の比較を行う。

HiCEP 法では、HiCEP フラグメントに処理することができれば転写物の解析が可能となるため、ほとんどの転写物を網羅的に解析することが可能である。また、PCR にて増幅を行うため、低発現の転写物も感度良く検出することが可能であり、実験の再現性も高いという特徴がある(4)。DNA マイクロアレイ法が既知の遺伝子セットを対象に遺伝子発現を cDNA ハイブリダイズさせることにより調べる解析法であるのに対して、HiCEP 法は HiCEP フラグメント化できれば未知の転写物でも cDNA レベルで解析可能であることから網羅性に優れている。また、次世代シーケンサーを使用した RNA シーケンスでは、発現量について断片化した塩基配列の本数(depth)で検出するため、発現量が少ない転写物の解析にはキャピラリー電気泳動の蛍光強度で検出を行う HiCEP 法の方が有用である。



しかし、HiCEP 法では転写物の塩基配列情報は得られないため、ピークの転写物の同定を行う場合にはピークの分取や TA クローニングが追加で必要となるという問題点がある。本研究ではこの問題を解決するため、NGS による HiCEP フラグメントの網羅的解析を併用することで、HiCEP フラグメントの塩基配列を同定し、さらにデータベース化することを目指した。

## **2-3. 対象及び方法**

### **2-3-1. 対象**

2014 年 6 月より 2019 年 3 月までの間、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。検体については、手術において摘出した組織より癌部及び肉眼的非癌部の組織を収集した。検体の採取にあたっては、患者からインフォームド・コンセントを得た上で行った。

### **2-3-2. 腎細胞癌組織からの mRNA の抽出と血液検体の収集**

防衛医大病院において、根治的腎摘除術もしくは腎部分切除術を施行された腎癌組織より、病理診断に影響しない部位を採取した。腎摘除術では癌部組織のほかに腫瘍から離れた肉眼的非癌部組織も採取した。腎部分切除術では癌組織とともに切除される肉眼的非癌部組織は少ないが、切除マージンとする 5 mm の正常組織から病理診断に影響しない部位を採取した。採取後は即座に RNA later (Qiagen) に浸し、6 時間から 12 時間かけて RNA later で安定化させた後、-80℃に凍結保存した。組織からの RNA の抽出には、RNeasy<sup>®</sup> Plus Mini (Qiagen) を用いた。

### 2-3-3. HiCEP 法による RNA 発現解析

腎細胞癌患者のうち、6名の淡明細胞型の組織検体を用いて HiCEP 法による発現解析を行った。6名の病期などの臨床情報については表 1 に示す。癌部及び肉眼的非癌部の組織から抽出した RNA を用い、計 12 サンプルの解析を行った。HiCEP 法は、HiCEP フラグメントの作成、選択的 PCR、キャピラリー電気泳動の 3 つのステップから成る手法である(3)。HiCEP 法による解析は共同研究先である放射線医学総合研究所にて Fukumura らの方法(3)により実施された。

#### 2-3-3-1. HiCEP フラグメントの作成

抽出された RNA を逆転写酵素 (oligo(dT) primer: Thermo Fisher Scientific) を用いて二重鎖 cDNA へと変換した。二重鎖 cDNA は 5' 末端側を制限酵素 *MspI* (タカラバイオ) で切断し、図 5 に示す *MspI* アダプターを結合させた。同様に 3' 側は制限酵素 *MseI* (New England BioLabs) で切断し、図 5 に示す *MseI* アダプターを結合させた。両端に 2 つのアダプターが結合された転写物を HiCEP フラグメントと呼び、以降の実験で発現解析を行った。

#### 2-3-3-2. HiCEP 法における選択的 PCR

HiCEP フラグメントは両端に共通のアダプター配列をもつため、その配列を標的としたプライマーによって網羅的に PCR を行うことができる。まずは Pre-amplification として、Pre-amplification primer-F (5'-AATGGCTACACGAACTCGGT-3') 及び Pre-amplification primer-R (5'-AAGTATCGTCACGAGGCGTC-3') を用いて HiCEP フラグメントの PCR を行い一次増幅させる (図 5)。次に増幅した HiCEP フラグメントを 256

個のチューブに分注して、それぞれを 256 種類のプライマーで選択的 PCR を行う。選択的プライマーは、アダプター配列の内側 2 塩基までを標的として設計されており、2 塩基内側の組み合わせを変えることで対応する転写物のみを増幅することができる。フォワード (*MspI* 切断側) のプライマーには 5'-ACTCGGTTCATGACACGGNN-3'を、リバーズ (*MseI* 切断側) のプライマーには 5'-AGGCGTCCTACTGCGTAANN-3'を用いる。ここで、NN の組み合わせは AGTC の 4 通りの掛け合わせとなるので、フォワード側で  $4 \times 4 = 16$  通り、リバーズ側で  $4 \times 4 = 16$  通りであり、この両者を組み合わせた  $16 \times 16 = 256$  通りとなる (図 2)。以上のように、選択的 PCR によってプライマーセットの配列に応じた HiCEP フラグメントを特異的に増幅することができる (図 3)。なお、その後の解析を考慮して選択的プライマーには蛍光色素を結合させてある。

### 2-3-3-3. キャピラリー電気泳動

選択的 PCR を行った HiCEP フラグメントは、プライマーセットごとに ABI Prism 3130 (Thermo Fisher Scientific) にてキャピラリー電気泳動を行った。選択的 PCR の増幅産物は蛍光色素を結合させているため、蛍光強度により発現量を計測することが可能である。また泳動距離や速度に応じて、分子量すなわち塩基数を予測することが可能である。これにより縦軸に発現量、横軸に塩基数を表すピーク波形を描くことが可能となり、ピークの高さを検体間で比較することができる (図 4)。

ピーク波形は、MS-3000HTS Viewer を用いて検体間で比較した。また Subio Platform (Subio: <https://www.subioplatform.com/>) にて、数値化した蛍光強度をもとに発現量の比較解析を行った。

#### 2-3-4. NGS による HiCEP フラグメントの網羅的解析

ピークの塩基配列を決定するため、NGS を用いて HiCEP フラグメントの網羅的解析を行った。次世代シーケンサーは Ion PGM (Thermo Fisher Scientific) を用いた。

Pre-amplification を行った HiCEP フラグメントを、Ion Plus Fragment Library Kit

(Thermo Fisher Scientific) を用いてライブラリ作成し、チップには Ion 318 Chip Kit v2 を用いた。NGS を用いた一般的な RNA シークエンスとは異なり、HiCEP フラグメントは断片化することなくライブラリ作成を行った。

#### 2-3-5. 腎細胞癌の HiCEP ピークのデータベース構築

HiCEP フラグメントはすべて両端に共通するアダプター配列が結合されている。またキャピラリー電気泳動の結果から、使用した選択的プライマーの種類、予想される発現量、予想される塩基数などの情報が得られる。これらの情報をもとに、NGS にて得られた塩基配列のデータをそれぞれ HiCEP ピークに振り分けていくことで、HiCEP ピークの塩基配列の決定を行った。これにより、腎細胞癌標本の癌部、肉眼的非癌部における遺伝子発現データベースの構築を行った(図 6)。

### 2-4. 結果

#### 2-4-1. HiCEP 法による腎細胞癌組織の遺伝子発現解析

腎細胞癌組織 6 症例の癌部及び肉眼的非癌部の計 12 検体を用いて HiCEP 法による遺伝子発現解析を行った。その結果、1 検体当たり 58,478 個の HiCEP ピークを認めた。これを、プライマーセットごとに平均すると、1 プライマーセットあたり 228 個の HiCEP ピークを認めた。Subio Platform を用いて、6 症例すべてにおいて非癌部と比

べ癌部で 5 倍以上発現が増加した 30 bp 以上の転写物のピークで、かつ MS-3000HTS Viewer にてその波形を確認することにより、腎細胞癌で特異的に発現が増加している 14 個の HiCEP ピークを同定した(図 7, 8)。

#### 2-4-2. NGS による塩基配列の同定と関連遺伝子の検索

構築した腎細胞癌の HiCEP データベースを活用して、癌部において肉眼的非癌部よりも 5 倍以上発現が増強していた 14 個の HiCEP ピークについて、NGS 結果をもとにした塩基配列の決定と該当する遺伝子の同定を行った。全 14 個のピークのうち、塩基数が 400 と長いもの 2 個を除く、12 個について塩基配列の同定が可能であった。得ら

れた塩基配列をもとに、遺伝子検索データベースである BLAST<sup>®</sup>

(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)を用いて関連する遺伝子を検索した。Primer セット TA-tt の 34 番目のピークは、「peak ID TA-tt 34」の様に呼称することとした。「peak ID TA-tt 34」は、carbonic anhydrase 9 (CA9)と同定された(図 9)。同様に、「peak ID GC-ac 52」は stanniocalcin 2 (STC2) (図 10)、「peak ID AT-tg 61」は ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (ENPP3) (図 11)、「peak ID GC-gt 84」は scavenger receptor class B member 1 (SCARB1) (図 12)、「peak ID GA-at 208」は egl-9 family hypoxia inducible factor 3 (EGLN3) (図 13)、「peak ID GT-ct 51」は、endothelial cell specific molecule 1 (ESM1) (図 14)、「peak ID CA-ca 105」は angiopoietin 2 (ANGPT2) (図 15)、「peak ID CT-tt 161」は semaphorin 5B (SEMA5B)であることがわかった(図 16)。これら 8 個の遺伝子は、すでに腎細胞癌との関連が報告されている遺伝子であった。一方、残りの 4 個の遺伝子は腎細胞癌との関連がまだ報告されていない新規の遺伝子であった。以上の解析結果をまとめて表 2 に示す。

## 第3章

### NGS-HiCEP により同定されたマーカー候補遺伝子の評価

#### 3-1. 目的

NGS-HiCEP を用いた腎細胞癌組織の網羅的遺伝子発現解析により検出した 12 個の腫瘍マーカー候補について、HiCEP 法で用いた検体とは別の腎細胞癌症例の検体を用いてリアルタイム PCR (SYBR green 法) による再現解析を行った。また、癌関連遺伝子発現データベースを用いて、遺伝子の発現と生命予後との関連についての検討を行った。

#### 3-2. 対象及び方法

##### 3-2-1. 組織からの RNA 抽出とリアルタイム PCR

2-3-1. において収集した 42 症例の腎細胞癌検体のうち、NGS-HiCEP に用いた 6 症例を除く 36 症例を対象とした。癌部組織および非癌部組織からの RNA 抽出には、RNeasy® Plus Mini (Qiagen 社) を用いた。BioAnalyzer (Agilent 社) にて RNA の quality check や濃度測定を行い、RNA Integrity Number が 7 以上、RNA 濃度が 10 ng/ $\mu$ L 以上となった 34 症例を用いた。2 症例については quality check の結果、対象から除外とした。NGS を併用した HiCEP 法による解析において抽出した遺伝子のうち、リアルタイム PCR におけるプライマー設計が可能であった 12 遺伝子 (腎細胞癌との関連がすでに報告されているもの 8 個及び新規の遺伝子 4 個) に関して SYBR green 法

による発現解析を行った。

### 3-2-2. 内在性コントロールの選定

SYBR green 法を用いたリアルタイム PCR においては、発現量の測定を行う手法として相対定量法である $\Delta\Delta Ct$ 法を用いた(5)。相対定量法による発現量の測定においては、多くの組織や細胞中に共通して一定量発現する遺伝子であるハウスキーピング遺伝子をリファレンスとして発現量を補正する必要がある、これを内在性コントロールと呼ぶ。腎細胞癌組織及び肉眼的非癌部組織において、発現が一定で安定している内在性コントロールを選定するために、Human Housekeeping Gene Primer Set (タカラバイオ社)を用いて予備実験を行った。検体として RNA が高品質で比較的多く抽出可能であった腎細胞癌症例 2 例の癌部及び肉眼的非癌部の RNA を用いた。

### 3-2-3. リアルタイム PCR

2-4-2.において塩基配列の同定が可能であった 12 個についてリアルタイム PCR のプライマー設計を行った。リアルタイム PCR の際の逆転写酵素として、SuperScript IV VILO Master Mix with ezDNase Enzyme (Thermo Fisher Scientific 社)を用いた。SYBR green 法の反応試薬として PowerUp SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific 社)を用いた。1 検体につき 3 回のリアルタイム PCR を行い、Ct 値の測定を行った。

### 3-2-4. $\Delta\Delta Ct$ 法による発現解析

3 回の Ct 値の平均をとり、内在性コントロールの Ct 値と比較することで相対定量を行

った。PCR では 1 サイクルごとに 2 倍に DNA が増幅されるため、Ct 値での差 1 は 2 倍の発現量を意味する。このように、内在性コントロールと対象遺伝子との Ct 値の差 ( $\Delta$ Ct) を求めることで、ある対象遺伝子が内在性コントロールと比較して何倍の発現量を示しているかを求めることが可能となる。次に遺伝子間での  $\Delta$ Ct 値の差 ( $\Delta\Delta$ Ct 値) を求めることで、サンプル間での発現量の比較が可能となる。

### 3-3. 結果

#### 3-3-1. リアルタイム PCR による発現解析

Human Housekeeping Gene Primer Set を用いた内在性コントロールの予備実験において、癌部と肉眼的非癌部の発現量の解離が少なかった TATA-binding protein (TBP) は、別の腎細胞癌の発現解析の論文(6)において用いられていた実績もあり、本研究において内在性コントロールとして採用した。

既知遺伝子の 8 個については、CA9 が 1,495 倍 ( $\pm 282.8$ : 標準誤差)、STC2 が 185 倍 ( $\pm 137.9$ )、ENPP3 が 62.3 倍 ( $\pm 33.2$ )、SCARB1 が 44.7 倍 ( $\pm 8.6$ )、EGLN3 が 34.4 倍 ( $\pm 5.3$ )、ESM1 が 31.3 倍 ( $\pm 6.2$ )、ANGPT2 が 31.0 倍 ( $\pm 7.9$ )、SEMA5B が 15.9 倍 ( $\pm 3.8$ ) であった (図 17A)。新規遺伝子 4 個については、Gene A が 100.6 倍 ( $\pm 17.4$ )、Gene B が 29.6 倍 ( $\pm 6.0$ )、Gene C が 3.5 倍 ( $\pm 0.56$ )、Gene D が 2.5 倍 ( $\pm 0.3$ ) であった (図 17B)。12 個すべての候補遺伝子について、非癌部と比べて癌部において発現が増加している結果となった。



### 3-3-2. 癌関連遺伝子発現データベースを用いた検討

TCGA (The Cancer Genome Atlas)に登録されているデータを用いて、候補遺伝子の発現量と生命予後との関連について検討を行った(cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>))。12 個の候補遺伝子について、TCGA の淡明型腎細胞癌の RNA シークエンスのデータセットを用い Kaplan-Meier 解析を行ったところ、発現量と生存について相関を認めたのは、SCARB1 (Z score =  $\pm 2.1$ , P value = 0.037) と Gene C (Z score =  $\pm 2.0$ , P value = 0.017) の 2 つであった。他の遺伝子については、TCGA のデータセットを用いた検討では、発現量と生存についての相関は認めなかった(図 18)。

## 第4章

### 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。本研究ではヒトの腎細胞癌と非癌部の検体を対象とした 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、ピーク分取とその直接シーケンスまたは TA クローニングによる配列決定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。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。

腎細胞癌の遺伝子発現データベースの解析において、対象とした 6 症例すべてにおいて発現が 5 倍以上になるものをスクリーニングしたところ、同定された腫瘍マーカー候補となる遺伝子は、すでに腎細胞癌との関連が報告されているものが 8 個と、報告されていない新規の遺伝子が 4 個であった。以下、既知遺伝子 8 個について個々に考察を行った。①carbonic anhydrase 9 (CA9) は二酸化炭素と水を可逆的に結合させ、重炭酸イオンと水素イオンを産生する反応を触媒する酵素のひとつであり、低酸素やアシドーシス、腫瘍細胞の発生などに反応して細胞周囲に重炭酸イオンを産生し、pH の調節を行う。膜貫通蛋白質で、主に胃や腸に発現している(7)。腫瘍は低酸素になりやすく解糖系の代謝により細胞内のアシドーシスが進行するが、腫瘍細胞におけ

る CA9 の活性化は pH を調節することで腫瘍細胞の生存率を高める(8)。そのため、CA9 は悪性腫瘍におけるバイオマーカーとして関心を集めており、血清 CA9 濃度の上昇は腎細胞癌(9)や前立腺癌(10) の予後に関連する。また、胃癌の早期診断マーカーとして有用であることも報告されている(11)。②stanniocalcin 2 (STC2) は、ホモ二量体糖蛋白質をコードする遺伝子であり、腎臓及び腸管におけるカルシウム及びリンの輸送、または細胞内におけるカルシウムとリンの恒常性に寄与する(12)。様々な癌腫において発現が増加することがわかっており、肝細胞癌の増殖との関連(13)、肺癌の予後予測バイオマーカー(14)、頭頸部扁平上皮癌における局所の浸潤や転移との関連(15)などが報告されている。腎細胞癌においては、STC2 発現が上昇することにより癌細胞の浸潤性が上がり、予後が不良となることが報告されている(16)。

③ectonucleotide pyrophosphatase / phosphodiesterase 3 (ENPP3) は、細胞外 ATP の加水分解を行う酵素をコードする遺伝子であり、細胞外 ATP の加水分解を介して肥満細胞や好塩基球を抑制する調節因子としての働きが報告されている(17)。癌における機能や役割は明らかとなっていないが、淡明型腎細胞癌組織において特異的に発現が増えていることが報告されており、ENPP3 に対する抗体治療薬である AGS16F が腎細胞癌治療薬として第 I 相臨床試験が行われている(18)。④scavenger receptor class B member 1 (SCARB1/SR-B1) は HDL コレステロールに対する細胞膜受容体をコードする遺伝子で、HDL コレステロールの細胞内輸送を行う(19)。癌との関連においては、鼻咽頭癌(20)、前立腺癌(21)、乳癌(22)などにおいて発現が増加し、予後との相関が示されている。腎細胞癌に関しては、淡明型腎細胞癌組織において、SCARB1 の発現の増加と予後との関連が示され、バイオマーカーとしての可能性が報告されている(23)。また腎細胞癌に関するゲノムワイド関連解析においてゲノムワイド有意となった

遺伝子座として SCARB1 が挙げられている(24)。⑤egl-9 family hypoxia inducible factor 3 (EGLN3/PHD3)は細胞内の酸素センサーとして、低酸素誘導因子(HIF)の活性に関わる酵素をコードし、特に HIF2  $\alpha$  に対する調節機能が強い(25)。癌抑制に関わる VHL 遺伝子関連蛋白が不活化し HIF 経路が活性化されると、淡明型腎細胞癌発生の原因になることが報告されている。EGLN3 は淡明細胞型腎細胞癌において発現が増えている(26)。⑥endothelial cell specific molecule 1 (ESM1)は、肺や腎の内皮細胞に発現する分泌に関わる蛋白をコードする遺伝子で、炎症のある状態や肥満、敗血症、悪性腫瘍があると発現が多くなる(27)。50 歳以下の腎細胞癌患者において術前と術後の血清 ESM1 濃度の比較した場合、術後に ESM1 濃度が有意に減少するという報告があり、早期診断や術後の再発のモニタリングに有用である可能性が示唆されている(28)。⑦angiopoietin 2 (ANGPT2)は、ANGPT1 及び血管内皮のチロシンキナーゼに対するアンタゴニストをコードする遺伝子である(29)。ANGPT2 の機能を阻害すると腫瘍血管の密度や成長が低下するため、腫瘍の血管新生や進行に関わることが示唆されている(30)。腎細胞癌患者と健常者の血液検体の比較では、ANGPT2 は腎細胞癌患者において増加していることが報告されており、腎細胞癌の早期診断マーカーの可能性が示唆されている(31)。⑧semaphorin 5B (SEMA5B)は、神経系の発生における軸索の成長を調節する蛋白質をコードする遺伝子である(32)。腎細胞癌病理組織標本のマイクロダイセクションと cDNA マイクロアレイによる発現解析において、SEMA5B の発現増加を認めている(33)。

これまでに腎細胞癌との関連性が報告されていない新規遺伝子については、肺の絨毛運動に関わる遺伝子、DiGeorge 症候群(低カルシウム血症、胸腺低形成、心流出路障害)に関わる遺伝子、肝臓における成長ホルモンのシグナル伝達に関わる遺

伝子などが見つかり、さらなる解析を予定している。

リアルタイムPCRによる発現解析では、NGS-HiCEPにおいて確認されたマーカー候補遺伝子のすべてにおいて、再現性を伴って発現が増加していることが確認された。従来使用されてきた網羅的発現解析手法であるマイクロアレイ法では、結果の再現性が低いことに問題があったが、HiCEP法では再現性が極めて高いという特徴がリアルタイムPCRにおいて示されたと考えられる。また、同定された12個の遺伝子については、腎癌との関連性がすでに報告されている重要なものも含まれており、NGS-HiCEPの手法としての有用性が確認された。今回、我々が構築した腎細胞癌の遺伝子発現データベースを用いて、臨床病期や病理組織学的所見の差による遺伝子発現の違いについても解析が進んでおり、腫瘍の悪性度の違いによって約60個のHiCEPピークを抽出してさらなる解析を実施中である。本研究により、NGS-HiCEPの有用性が確認されたため、今後は血液検体を用いて早期診断マーカーの発見を目指したいと考えている。

以上の通り、NGS-HiCEPによる解析により、腎細胞癌の早期診断や予後予測マーカーの同定と分子病態のさらなる解明が期待できると思われる。

## 第 5 章

### 結論

NGS を併用した HiCEP 法 (NGS-HiCEP) を用いて、腎細胞癌組織の遺伝子発現データベースの構築に初めて成功した。本データベースを用いて癌部と肉眼的非癌部の遺伝子発現の違いを比較することにより、非癌部と比べて癌部において 5 倍以上発現が増加している遺伝子を 12 個同定した。これらの 12 遺伝子すべてにおいて、別の腎細胞癌症例のサンプルを対象としたリアルタイム PCR による再現実験を実施したところ、癌部において確かにそれらの遺伝子の発現が増加していることが確認できた。NGS-HiCEP が極めて高い再現性と低発現転写物の正確な検出に優れていることが証明された。この手法とデータベースの活用が、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及び分子病態のさらなる解明に寄与し、腎細胞癌患者の個別化医療の推進につながるものと期待される。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、症例解析をご指導いただきました防衛医科大学校泌尿器科学講座教授 伊藤敬一先生、本研究におけるご指導ならびに本研究論文のご高閲を賜りました、防衛医科大学校分子生体制御学講座教授 四ノ宮成祥先生に深謝いたします。また、本研究全般において直接ご指導いただきました同講座准教授 松尾洋孝先生、HiCEP 法による遺伝子解析のご支援をいただきました放射線医学総合研究所放射線障害治療研究部 安倍真澄先生、荒木良子先生、統計解析においてご支援いただきました国立遺伝学研究所人類遺伝研究部門助教 中岡博史先生、防衛医科大学校数学研究室准教授 中村好宏先生、同衛生学公衆衛生学講座准教授 中島宏先生、検体・臨床情報の収集にご協力をいただいた防衛医科大学校泌尿器科学講座の皆様、そして多大なご支援を賜りました防衛医科大学校分子生体制御学講座の皆様に、この場をかりて御礼申し上げます。

## 略語一覽

**Ct; threshold cycle**

**HiCEP; high coverage gene expression profiling**

**NGS; next generation sequencing**

**ncRNA; non-coding ribonucleic acid**

**CA9; carbonic anhydrase 9**

**STC2; stanniocalcin 2**

**ENPP3; ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3**

**SCARB1; scavenger receptor class B member 1**

**EGLN3; egl-9 family hypoxia inducible factor 3**

**ESM1; endothelial cell specific molecule 1**

**ANGPT2; angiopoietin 2**

**SEMA5B; semaphorin 5B**

**TBP; TATA-binding protein**



## 用語集

### 腎細胞癌

腎臓の尿細管上皮から発生する悪性腫瘍で、成人の悪性腫瘍の2～3%を占める。2017年の腎癌による死亡は全癌死の1%を占めている。近年、CT・超音波検査などの画像診断機器の進歩により、無症状の早期腎癌の発見が増加している。治療は局所であれば外科的切除が行われているが、転移を有する場合の全身治療としては分子標的薬や免疫チェックポイント阻害薬が使用されている。組織型は淡明細胞型腎細胞癌が約80%と大多数を占め、乳頭状腎細胞癌が5%、嫌色素性腎細胞癌が3%で続く。遺伝性腎癌症候群として、VHL 遺伝子変異による von hippel-Lindau 病、FLCN 遺伝子変異による Birt-Hogg-Dubé (BHD) 症候群などが知られている。

### HiCEP (high coverage gene expression profiling)

放射線医学総合研究所において AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 法をもとに開発された mRNA の網羅的発現解析手法である(参考文献3)。従来法である DNA マイクロアレイ法が、全転写物のうち10～30%を対象とするのに対し、HiCEP 法では70～80%の転写物を対象とすることが可能である。また高感度、高再現性という特徴を持つ。

### 次世代シーケンサー (next generation sequencer)

遺伝子、ゲノムなど DNA の塩基配列を解析する装置をシーケンサーと呼ぶ。従来型では、キャピラリー電気泳動装置を用いた dideoxy 法 (サンガー法) によるシーケン

シングが行われていた。2007 年に開発された次世代シーケンサーでは、サンガー法と比べると1度に解析される塩基の長さ(リード長)は短いものの、膨大な数のリード数を同時に解析することが可能となり、これにより多数の DNA 情報の解析と低コスト化を実現した。

## リアルタイム PCR

PCR の増幅量をリアルタイムでモニターし解析する方法であり、電気泳動が不要で迅速性と定量性に優れている。リアルタイム PCR にはサーマルサイクラーと分光蛍光光度計を一体化した専用の装置が必要となる。PCR の際に蛍光色素を結合させ、増幅量を蛍光強度としてリアルタイムに継続することで、縦軸に蛍光強度、横軸に PCR サイクル数とする増幅曲線を得ることができる。増幅曲線をもとに検量線を作成することで発現遺伝子量を求める方法や、 $\Delta\Delta Ct$  法で相対的に発現量を比較する方法がある。

## Ct 値(Threshold cycle)

リアルタイム PCR の初期サイクルにおける蛍光シグナルをベースラインとし、ベースラインから統計学的に有意な増加を認める蛍光シグナルレベルを閾値(Threshold line)と設定する。対象遺伝子の増幅曲線が Threshold line と交差する点のサイクル数を Ct 値(Threshold cycle)とし、Ct 値を相対比較することで対象遺伝子の発現量を求めることが可能となる。

## RNA Integrity Number (RIN)

サンプルから抽出した RNA の品質を評価する指標のひとつ。Bio Analyzer (Agilent 社)による測定において、RNA の分解の程度を 1~10 の数値で表したもの。RIN 値が 7 以上であれば RNA の分解が少なく高品質とされる。

## ハウスキーピング遺伝子

多くの組織や細胞中に共通して一定量発現する遺伝子のこと。常に発現され、細胞の維持、増殖に不可欠な遺伝子である。GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、 $\beta$ -アクチン、 $\beta$  2-マイクログロブリン、HPRT 1 (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1) などがある。

## 内在性コントロール

同一種類のサンプルであれば、ハウスキーピング遺伝子の発現量が変わらないことを前提として、測定対象遺伝子との Ct 値を比較することにより  $\Delta\Delta$ Ct 法による相対的発現量解析を行う。この際に、あらかじめ測定を行うサンプルにおいてハウスキーピング遺伝子の測定を行い、サンプル間で発現の差を認めないものを内在性コントロールとして選定する。

## $\Delta\Delta$ Ct 法

内在性コントロールと比較して、測定対象遺伝子が何サイクル早く、あるいは何サイクル遅く Threshold Line に到達するかを検出し、相対定量する方法。1 サイクル早い (Ct 値が 1 少ない) 場合は、もとの遺伝子サンプル濃度が 2 倍多いことを示し、1 サイクル

ル遅い(Ct 値が 1 多い)場合は、もとの遺伝子サンプル濃度が半量であることを示す。実際の解析においては、A というサンプルでの遺伝子発現に関し、内在性コントロールとの Ct 値の差( $\Delta\text{CtA}$ )を求める。同様に B というサンプルでの遺伝子発現の内在性コントロールとの差( $\Delta\text{CtB}$ )を求める。 $\Delta\text{CtA}$ と $\Delta\text{CtB}$ の差( $\Delta\Delta\text{Ct}$ )を求めると、サンプル A の遺伝子発現に対しサンプル B の遺伝子発現が何倍となるかは、 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ で求めることができる。

### 癌関連遺伝子発現データベース

TCGA (The Cancer Genome Atlas) は、米国がん研究所 (National Cancer Institute: NCI) と米国ヒトゲノム研究所 (National Human Genome Research Institute: NHGRI) の共同プロジェクトであり、癌種ごとにマイクロアレイや RNA シーケンスなどのサンプルの臨床情報をまとめたデータベースである。全世界に公開されており、必要なデータをダウンロードして解析することが可能である。

## 付 記

本論文の一部は、

2019 AACR (American Association for Cancer Research) annual meeting

発表者: Makoto Kawaguchi, Hirotaka Matsuo, Ryoko Araki, Seiko Shimizu, Mikiya Takao, Akiyoshi Nakayama, Yosuke Kitamura, Masumi Abe, Keiichi Ito, Nariyoshi Shinomiya

タイトル: Development of a gene expression database of renal cell carcinoma cases by NGS-combined HiCEP to identify tumor markers.

日時: 2019 年 3 月 29 日 - 4 月 3 日

場所: Atlanta

第77回日本癌学会学術総会

発表者: 川口真、松尾洋孝、清水聖子、高尾幹也、中山昌喜、山本順司、伊藤敬一、四ノ宮成祥

タイトル: Development of the gene expression database of renal cell carcinoma cases to identify the tumor markers.

日時: 2018年9月26-29日

場所: 大阪

## 第 28 回泌尿器科分子・細胞研究会

発表者:川口真、松尾洋孝、荒木良子、清水聖子、高尾幹也、中山昌喜、湯野川春信、安倍真澄、四ノ宮成祥、伊藤敬一

タイトル:次世代シーケンサーを併用した HiCEP 法による腎癌の遺伝子発現データベースの構築と腎癌マーカーの同定

日時:2019 年 2 月 22 日

場所:下関

## 第 107 回日本泌尿器科学会総会

発表者:川口真、松尾洋孝、荒木良子、清水聖子、高尾幹也、中山昌喜、北村陽典、湯野川春信、安倍真澄、四ノ宮成祥、伊藤敬一

タイトル:HiCEP 法と次世代シーケンサーを併用した腎癌組織の遺伝子発現データベースの構築と腎癌マーカーの同定

日時:2019 年 4 月 18-21 日

場所:名古屋

に発表した。

## 参考文献

1. Morrissey JJ, Mellnick VM, Luo J, Siegel MJ, Figenshau RS, Bhayani S, et al. Evaluation of Urine Aquaporin-1 and Perilipin-2 Concentrations as Biomarkers to Screen for Renal Cell Carcinoma: A Prospective Cohort Study. *JAMA Oncol.* 2015;1(2):204-12.
2. Takacova M, Bartosova M, Skvarkova L, Zatovicova M, Vidlickova I, Csaderova L, et al. Carbonic anhydrase IX is a clinically significant tissue and serum biomarker associated with renal cell carcinoma. *Oncol Lett.* 2013;5(1):191-7.
3. Fukumura R, Takahashi H, Saito T, Tsutsumi Y, Fujimori A, Sato S, et al. A sensitive transcriptome analysis method that can detect unknown transcripts. *Nucleic Acids Res.* 2003;31(16):e94.
4. Mitani Y, Suzuki K, Kondo K, Okumura K, Tamura T. Gene expression analysis using a modified HiCEP method applicable to prokaryotes: a study of the response of *Rhodococcus* to isoniazid and ethambutol. *J Biotechnol.* 2006;123(3):259-72.
5. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>( $\Delta\Delta C_T$ ) Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
6. Bismar TA, Bianco FJ, Zhang H, Li X, Sarkar FH, Sakr WA, et al. Quantification of G250 mRNA expression in renal epithelial neoplasms by real-time reverse transcription-PCR of dissected tissue from paraffin sections. *Pathology.* 2003;35(6):513-7.
7. Pastorekova S, Parkkila S, Parkkila AK, Opavsky R, Zelnik V, Saarnio J, et al. Carbonic anhydrase IX, MN/CA IX: analysis of stomach complementary DNA sequence and expression in human and rat alimentary tracts. *Gastroenterology.* 1997;112(2):398-408.

8. Ditte P, Dequiedt F, Svastova E, Hulikova A, Ohradanova-Repic A, Zatovicova M, et al. Phosphorylation of carbonic anhydrase IX controls its ability to mediate extracellular acidification in hypoxic tumors. *Cancer Res.* 2011;71(24):7558-67.
9. Buscheck F, Fraune C, Simon R, Kluth M, Hube-Magg C, Moller-Koop C, et al. Aberrant expression of membranous carbonic anhydrase IX (CAIX) is associated with unfavorable disease course in papillary and clear cell renal cell carcinoma. *Urol Oncol.* 2018;36(12):531.e19-e25.
10. Smith AD, Truong M, Bristow R, Yip P, Milosevic MF, Joshua AM. The Utility of Serum CA9 for Prognostication in Prostate Cancer. *Anticancer Res.* 2016;36(9):4489-92.
11. Shen Q, Polom K, Williams C, de Oliveira FMS, Guergova-Kuras M, Lisacek F, et al. A targeted proteomics approach reveals a serum protein signature as diagnostic biomarker for resectable gastric cancer. *EBioMedicine.* 2019;44:322-33.
12. McCudden CR, James KA, Hasilo C, Wagner GF. Characterization of mammalian stanniocalcin receptors. Mitochondrial targeting of ligand and receptor for regulation of cellular metabolism. *J Biol Chem.* 2002;277(47):45249-58.
13. Wu F, Li TY, Su SC, Yu JS, Zhang HL, Tan GQ, et al. STC2 as a novel mediator for Mus81-dependent proliferation and survival in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* 2017;388:177-86.
14. Na SS, Aldonza MB, Sung HJ, Kim YI, Son YS, Cho S, et al. Stanniocalcin-2 (STC2): A potential lung cancer biomarker promotes lung cancer metastasis and progression. *Biochim Biophys Acta.* 2015;1854(6):668-76.
15. Yang S, Ji Q, Chang B, Wang Y, Zhu Y, Li D, et al. STC2 promotes head and neck squamous cell carcinoma metastasis through modulating the PI3K/AKT/Snail signaling.



Oncotarget. 2017;8(4):5976-91.

16. Meyer HA, Tolle A, Jung M, Fritzsche FR, Haendler B, Kristiansen I, et al. Identification of stanniocalcin 2 as prognostic marker in renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2009;55(3):669-78.

17. Tsai SH, Kinoshita M, Kusu T, Kayama H, Okumura R, Ikeda K, et al. The ectoenzyme E-NPP3 negatively regulates ATP-dependent chronic allergic responses by basophils and mast cells. *Immunity*. 2015;42(2):279-93.

18. Donate F, Raitano A, Morrison K, An Z, Capo L, Avina H, et al. AGS16F Is a Novel Antibody Drug Conjugate Directed against ENPP3 for the Treatment of Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2016;22(8):1989-99.

19. Murao K, Terpstra V, Green SR, Kondratenko N, Steinberg D, Quehenberger O. Characterization of CLA-1, a human homologue of rodent scavenger receptor BI, as a receptor for high density lipoprotein and apoptotic thymocytes. *J Biol Chem*. 1997;272(28):17551-7.

20. Zheng Y, Liu Y, Jin H, Pan S, Qian Y, Huang C, et al. Scavenger receptor B1 is a potential biomarker of human nasopharyngeal carcinoma and its growth is inhibited by HDL-mimetic nanoparticles. *Theranostics*. 2013;3(7):477-86.

21. Schorghofer D, Kinslechner K, Preitschopf A, Schutz B, Rohrl C, Hengstschlager M, et al. The HDL receptor SR-BI is associated with human prostate cancer progression and plays a possible role in establishing androgen independence. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13:88.

22. de Gonzalo-Calvo D, Lopez-Vilaro L, Nasarre L, Perez-Olabarria M, Vazquez T, Escuin D, et al. Intratumor cholesteryl ester accumulation is associated with human breast cancer proliferation and aggressive potential: a molecular and clinicopathological

study. BMC Cancer. 2015;15:460.

23. Xu GH, Lou N, Shi HC, Xu YC, Ruan HL, Xiao W, et al. Up-regulation of SR-BI promotes progression and serves as a prognostic biomarker in clear cell renal cell carcinoma. BMC Cancer. 2018;18(1):88.

24. Purdue MP, Johansson M, Zelenika D, Toro JR, Scelo G, Moore LE, et al. Genome-wide association study of renal cell carcinoma identifies two susceptibility loci on 2p21 and 11q13.3. Nat Genet. 2011;43(1):60-5.

25. Appelhoff RJ, Tian YM, Raval RR, Turley H, Harris AL, Pugh CW, et al. Differential function of the prolyl hydroxylases PHD1, PHD2, and PHD3 in the regulation of hypoxia-inducible factor. J Biol Chem. 2004;279(37):38458-65.

26. Miikkulainen P, Hogel H, Seyednasrollah F, Rantanen K, Elo LL, Jaakkola PM. Hypoxia-inducible factor (HIF)-prolyl hydroxylase 3 (PHD3) maintains high HIF2A mRNA levels in clear cell renal cell carcinoma. J Biol Chem. 2019;294(10):3760-71.

27. Delehedde M, Devenyns L, Maurage CA, Vives RR. Endocan in cancers: a lesson from a circulating dermatan sulfate proteoglycan. Int J Cell Biol. 2013;2013:705027.

28. Kim KH, Lee HH, Yoon YE, Na JC, Kim SY, Cho YI, et al. Clinical validation of serum endocan (ESM-1) as a potential biomarker in patients with renal cell carcinoma. Oncotarget. 2018;9(1):662-7.

29. Huang H, Bhat A, Woodnutt G, Lappe R. Targeting the ANGPT-TIE2 pathway in malignancy. Nat Rev Cancer. 2010;10(8):575-85.

30. Brunckhorst MK, Xu Y, Lu R, Yu Q. Angiopoietins promote ovarian cancer progression by establishing a procancer microenvironment. Am J Pathol. 2014;184(8):2285-96.

31. Gayed BA, Gillen J, Christie A, Pena-Llopis S, Xie XJ, Yan J, et al. Prospective

evaluation of plasma levels of ANGPT2, TuM2PK, and VEGF in patients with renal cell carcinoma. *BMC Urol.* 2015;15:24.

32. Liu RQ, Wang W, Legg A, Abramyan J, O'Connor TP. Semaphorin 5B is a repellent cue for sensory afferents projecting into the developing spinal cord. *Development (Cambridge, England).* 2014;141(9):1940-9.

33. Hirota E, Yan L, Tsunoda T, Ashida S, Fujime M, Shuin T, et al. Genome-wide gene expression profiles of clear cell renal cell carcinoma: identification of molecular targets for treatment of renal cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2006;29(4):799-827.

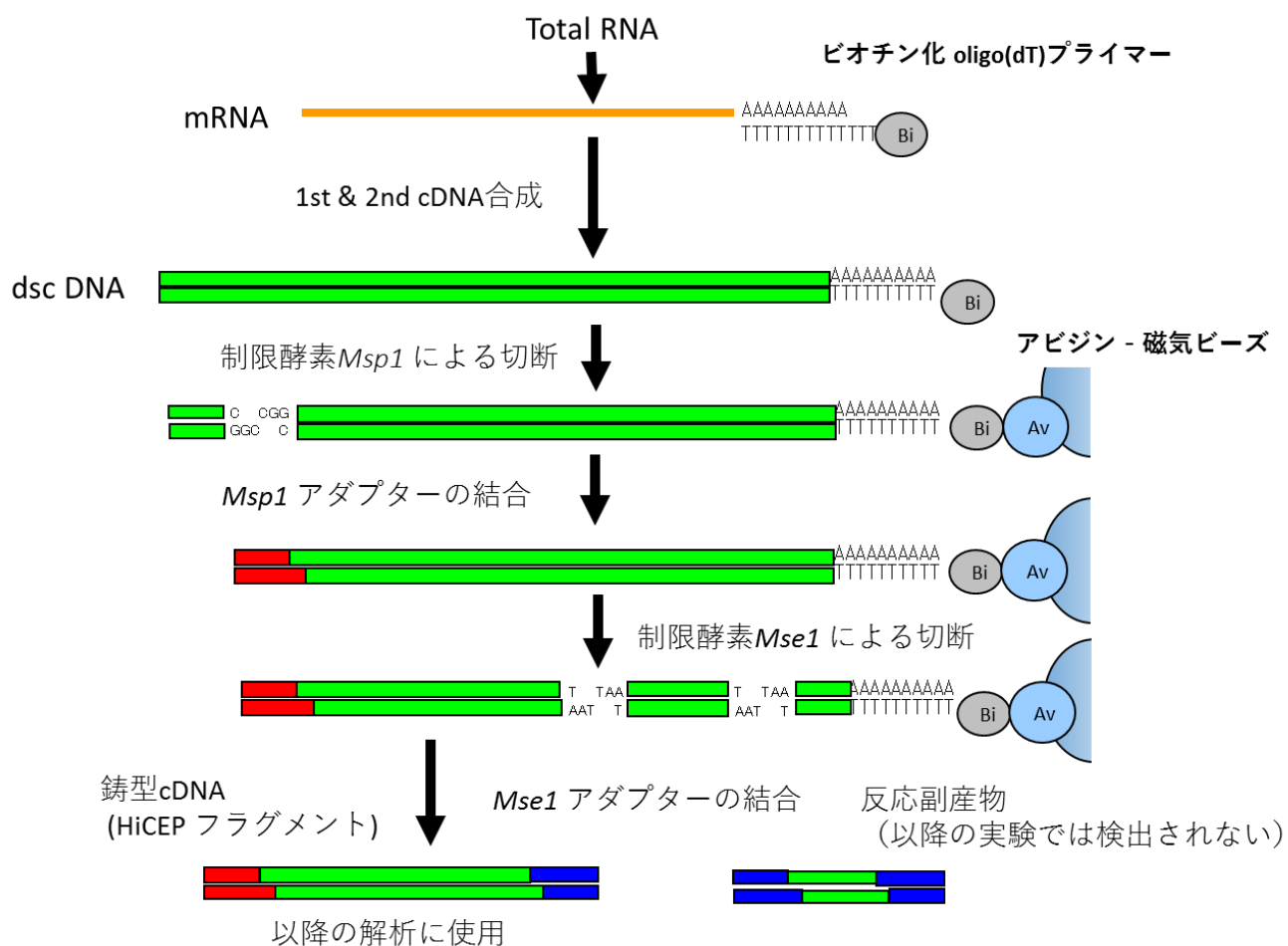
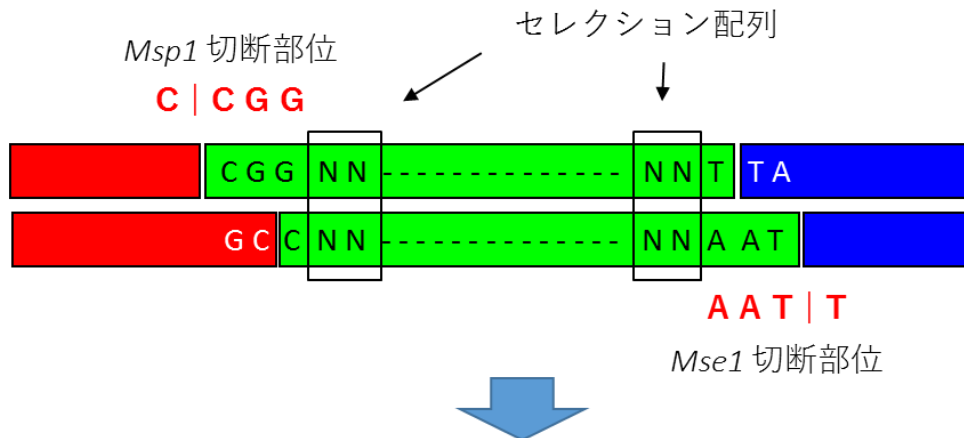


図1 HiCEP フラグメントの作成

mRNA から逆転写により作成した cDNA の 5' 側を *Msp1* で、3' 側を *Mse1* で制限酵素処理する。次いで、5' 側には *Msp1* アダプターを、3' 側には *Mse1* アダプターを結合させて、すべての転写物の両端を共通の塩基配列にする。アダプター配列を結合させた転写物を HiCEP フラグメントと呼び、以降の過程で発現量の解析を行う。

## HiCEPフラグメントの塩基配列



## セレクション配列に応じたプライマーによりPCRを行う

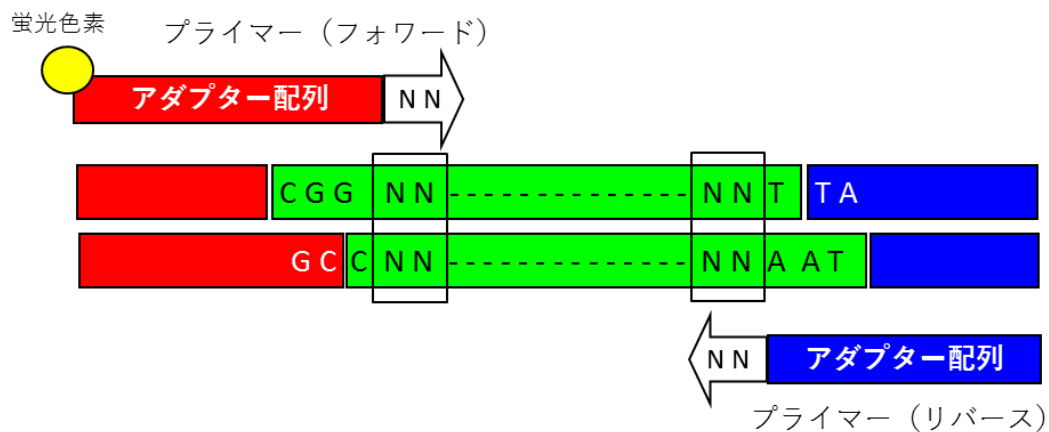


図2 HiCEP法のための256通りのプライマーセットの準備

HiCEPフラグメントのアダプター配列を対象としてプライマーを設計することで、HiCEPフラグメントを網羅的にPCRすることが可能である。制限酵素での切断部位配列より内側2塩基をセレクション配列とする。アダプター配列からセレクション配列までを含むプライマーを設計することで、セレクション配列に応じた転写物のみを選択的にPCRすることが可能である。セレクション配列はATGCの4塩基のすべての配列の組み合わせを網羅するため、フォワードプライマーが $4 \times 4 = 16$ 通り、リバースプライマーが $4 \times 4$ の16通りであり、すべてのプライマーセットの組み合わせは $16 \times 16 = 256$ 通りとなる。

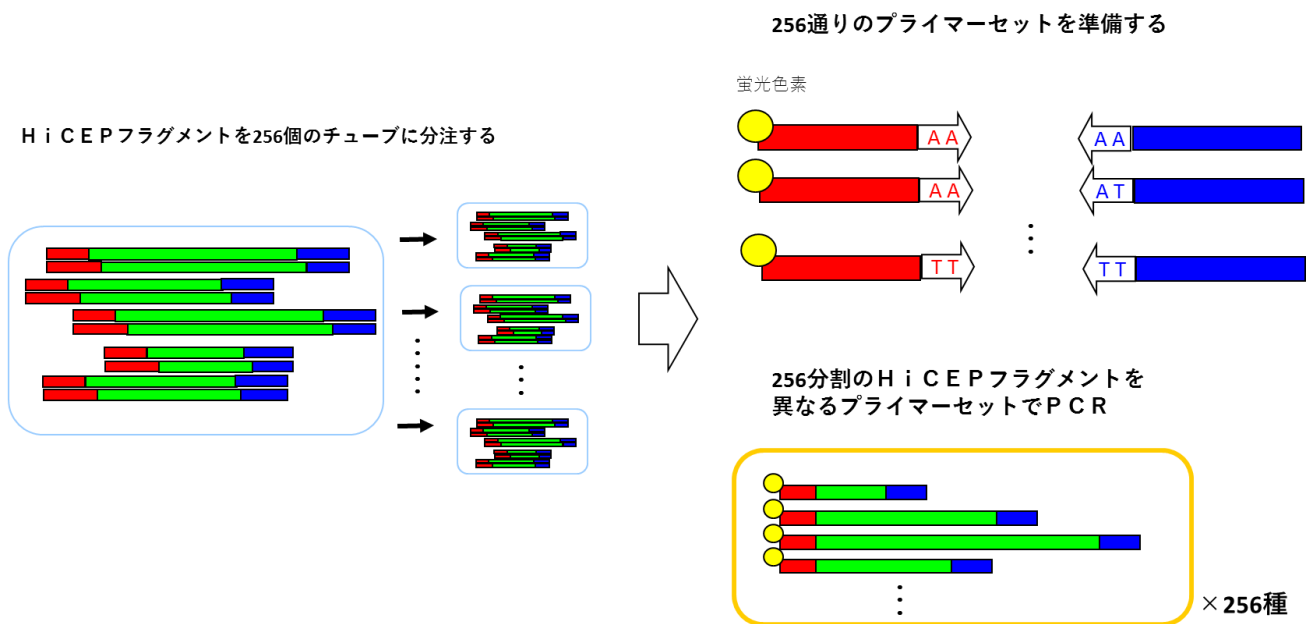
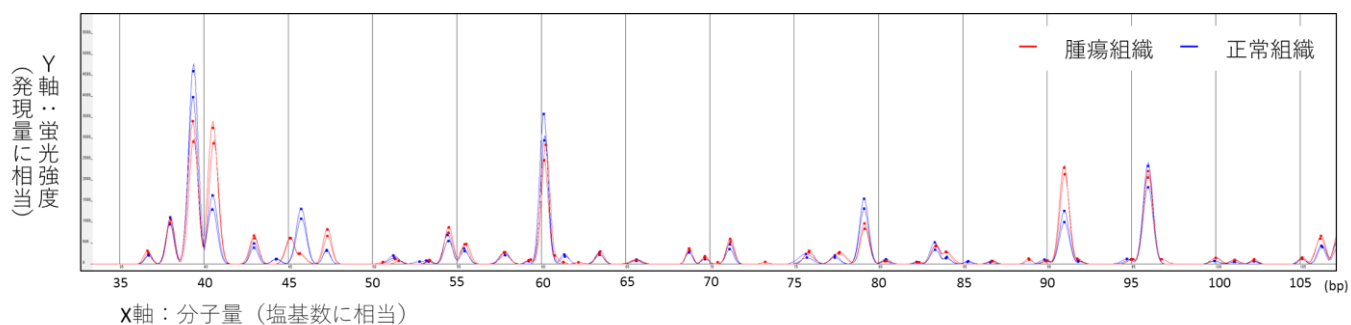


図3 HiCEP 法における選択的 PCR

Pre-amplification として、アダプター配列を対象としたプライマーを用いて HiCEP フラグメントを網羅的に PCR する。次に、増幅させた HiCEP フラグメントを 256 個のチューブに分注する。256 通りのプライマーセットを準備し、それぞれのチューブを 1 セットずつのプライマーセットを用いて PCR する。これによりプライマーセットの配列に応じた転写物を選択的に PCR する。



**図 4 キャピラリー電気泳動による HiCEP ピークの分離**

プライマーセットごとにキャピラリー電気泳動を行って HiCEP ピークを分離することにより、発現量の解析を可能とした。プライマーには蛍光色素が結合されており、蛍光強度によって遺伝子の相対的発現量を求めることが可能である。横軸に分子量(塩基数に相当)、縦軸に蛍光強度(発現量に相当)となるピーク波形を描くことができ、ピークの高さを検体間で比較することが可能である。

## A アダプター配列

### *Msp1* adaptor - F

5'-AATGGCTACACGAACTCGGTTCATGACA-3'

### *Msp1* adaptor - R

5'-CGTGCATGAACCGAGTTCGTGTAGCCATT-3'

### annealed *Msp1* adaptor

5'-AATGGCTACACGAACTCGGTTCATGACA-3'  
3'-TTACCGATGTGCTTGAGCCAAGTACTGTGC-5'

### *Mse1* adaptor - F

5'-AAGTATCGTCACGAGGCGTCCTACTGCG-3'

### *Mse1* adaptor - R

5'-TACGCAGTAGGACGCCTCGTGACGATACTT-3'

### annealed *Mse1* adaptor

5'-AAGTATCGTCACGAGGCGTCCTACTGCG-3'  
3'-TTCATAGCAGTGCTCCGCAGGATGACGCAT-5'

## B プライマー配列

### Pre-amplification primer - F

AATGGCTACACGAACTCGGT

### Pre-amplification primer - R

AAGTATCGTCACGAGGCGTC

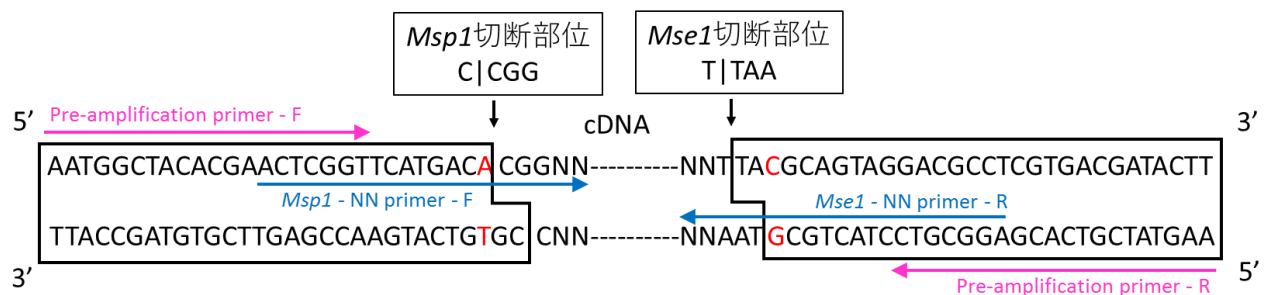
### *Msp1* - NN primer - F

ACTCGGTTCATGACACGGNN

### *Mse1* - NN primer - R

AGGCGTCCTACTGCGTAANN

## C HiCEPフラグメントにおけるプライマーの標的配列



## 図5 HiCEPフラグメント作成のためのアダプター配列及びプライマー配列

A には HiCEP フラグメントの作成に使用する 2 種類のアダプターの配列を示す。B には Pre-amplification に使用するプライマーと、選択的 PCR に使用するプライマーの配列を示す。NN の配列はセレクション配列を表し、A/G/T/C の 4 種類から組み合わせを変えて 256 種類のプライマーセットを用いる。C には HiCEP フラグメントとプライマーの標的となる配列を示す。矢印は Pre-amplification 及び選択的 PCR においてプライマーの標的となる配列を示す。アダプター配列を結合させて HiCEP フラグメントを作成後に再度制限酵素で切断されないように、C の赤字に示すように制限酵素認識配列とならないようアダプター配列はデザインした。



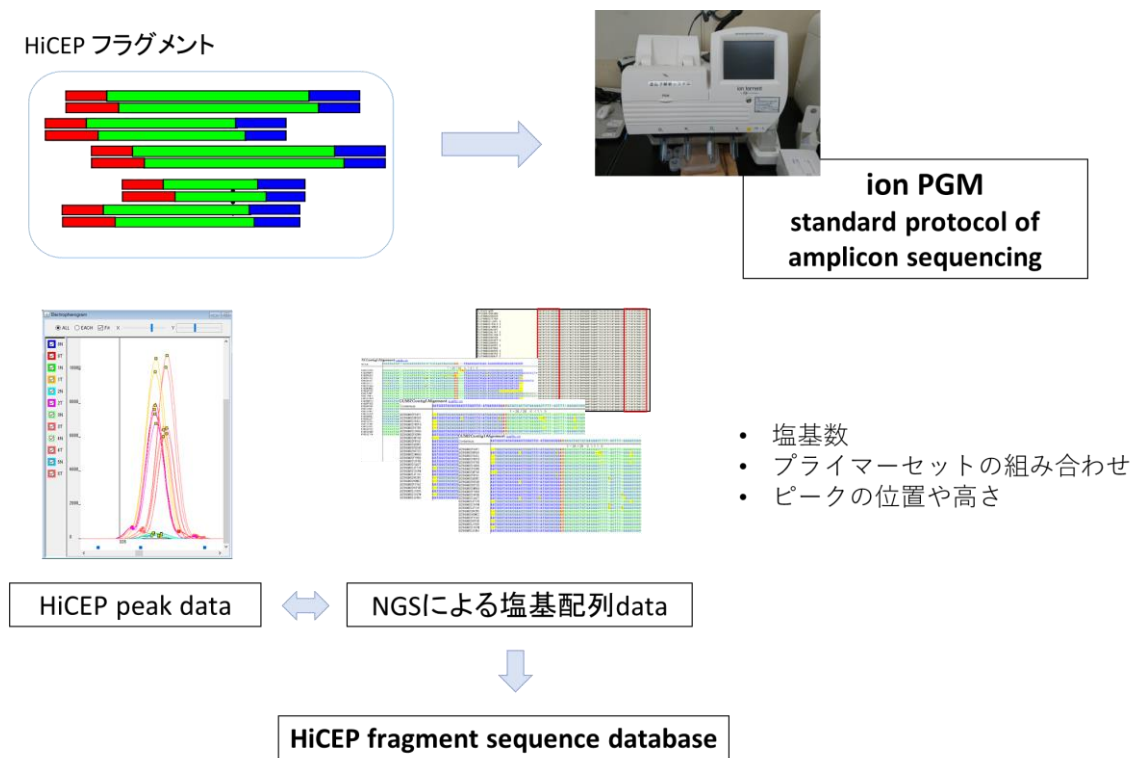
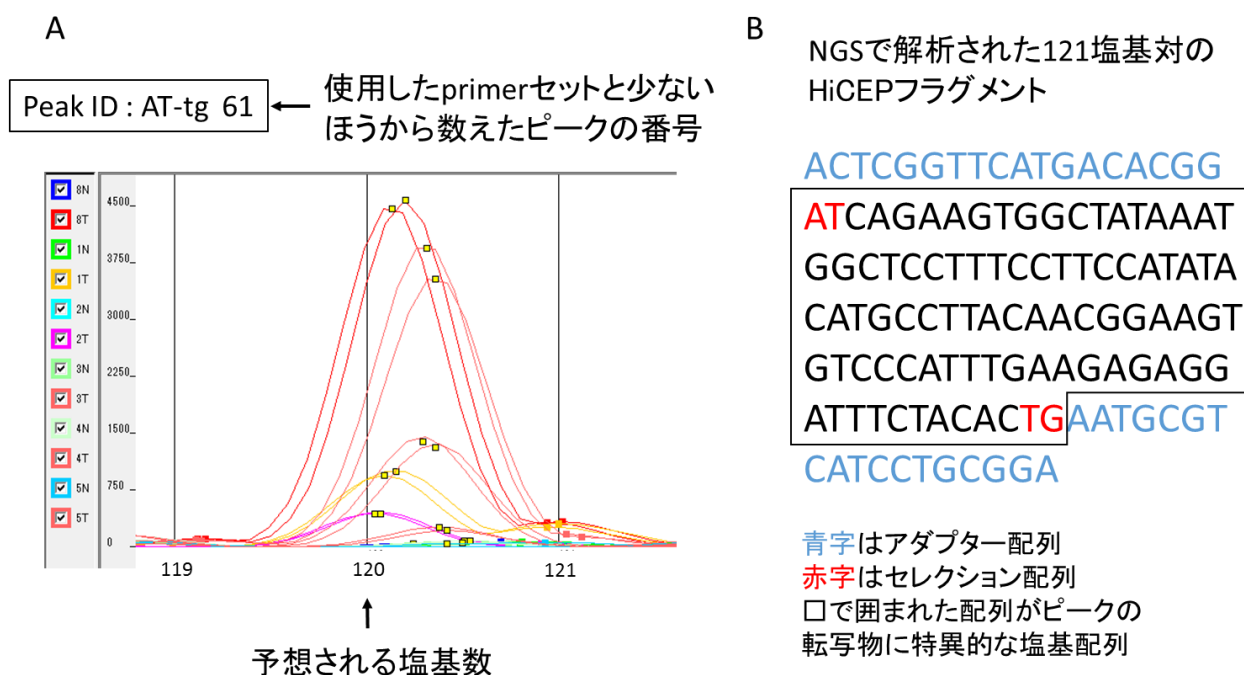


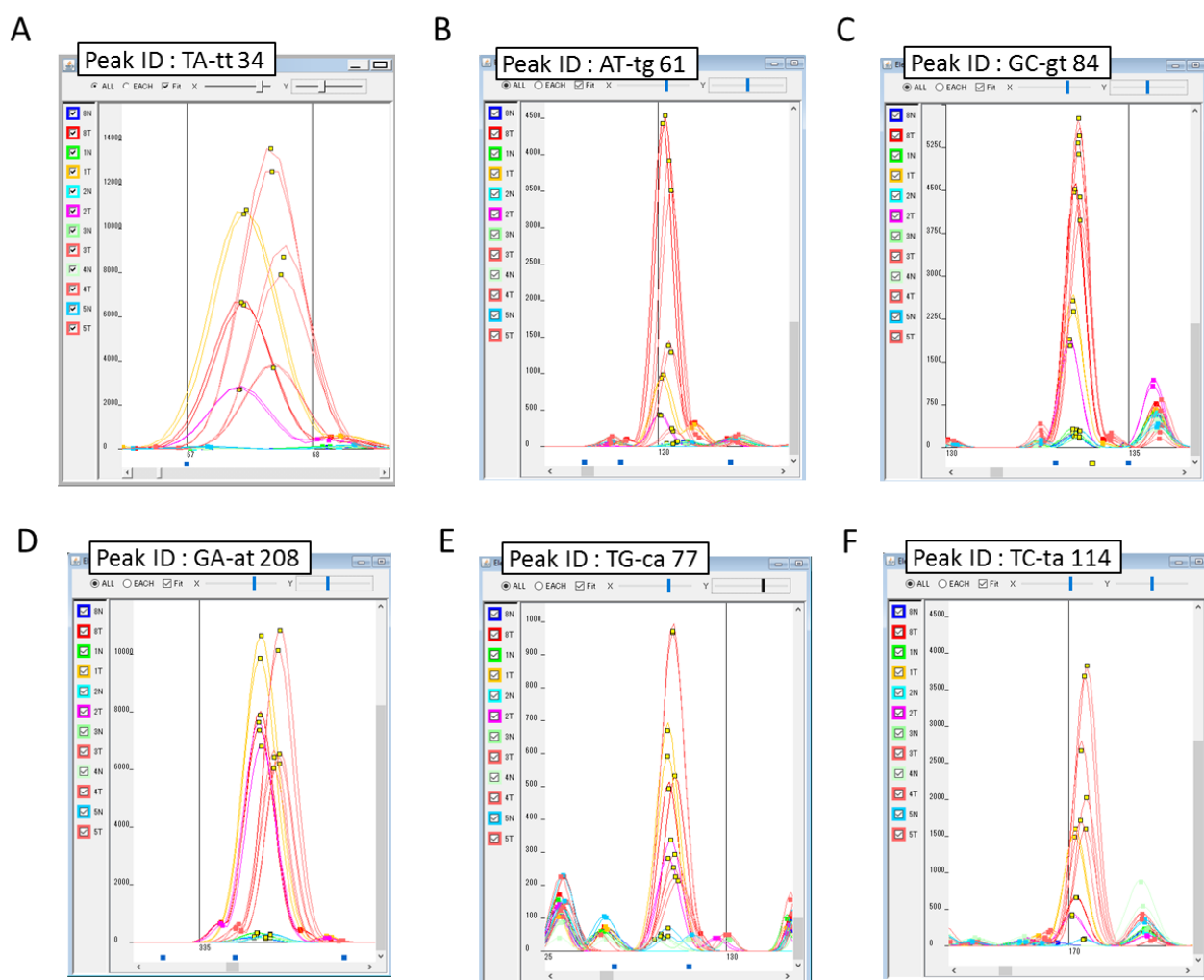
図 6 NGS-HiCEP による腎細胞癌の遺伝子発現データベースの構築

キャピラリー電気泳動の結果から着目したピークの同定を行うためには、ピークの分取と TA クローニングによる塩基配列の同定という煩雑な追加実験が必要となる。この問題点を解決するために NGS を用いて HiCEP フラグメントの網羅的塩基配列の解析を行い、HiCEP フラグメントの遺伝子発現データベースの構築を試みた。HiCEP 法の過程で、アダプター配列、プライマーセットの塩基配列、ピークの位置や高さといった情報が得られており、これらの情報をもとに NGS 解析結果の塩基配列をそれぞれのピークに当てはめることで塩基配列の同定を行った。この「NGS を併用した HiCEP 法 (NGS-HiCEP)」を用いて、ヒトを含む哺乳類検体の解析を行ったのは、今回のわれわれの研究が世界で最初の報告となる。



**図 7 NGS による HiCEP ピークの塩基配列の同定**

NGS で HiCEP フラグメントの網羅的な塩基配列の解析を行ったデータをもとに、それぞれの HiCEP ピークに対応する塩基配列を当てはめる作業を行った。A に示すように、選択的 PCR で使用した primer セットはあらかじめわかっているため、アダプター配列から内側 2 塩基までの HiCEP ピークの塩基配列を推定することが可能である。キャピラリー電気泳動の移動距離から予想される塩基数が求められるため、NGS から得られた塩基配列のうち、5' 及び 3' 両端の配列とそれらに挟まれた塩基数が合致する配列が目的の HiCEP ピークの塩基配列となる (B)。対応する塩基配列が複数存在する場合は、隣り合う HiCEP ピークを確認し、ピークの高さに応じた発現量を推定してより適応するピークを選択する。



**図 8 発現量の比較において抽出した腎細胞癌特異的 HiCEP ピーク**

Subio platform を用いて蛍光強度を数値化し、癌部と肉眼的非癌部での発現の差について解析を行った。癌部において非癌部よりも 5 倍以上発現が増加している HiCEP ピークを 16 個認めた。そのうち、代表的な 6 つの HiCEP ピークの波形を A~F に示す。プライマーセットの組み合わせと塩基数のサイズによりピーク ID を表記した。

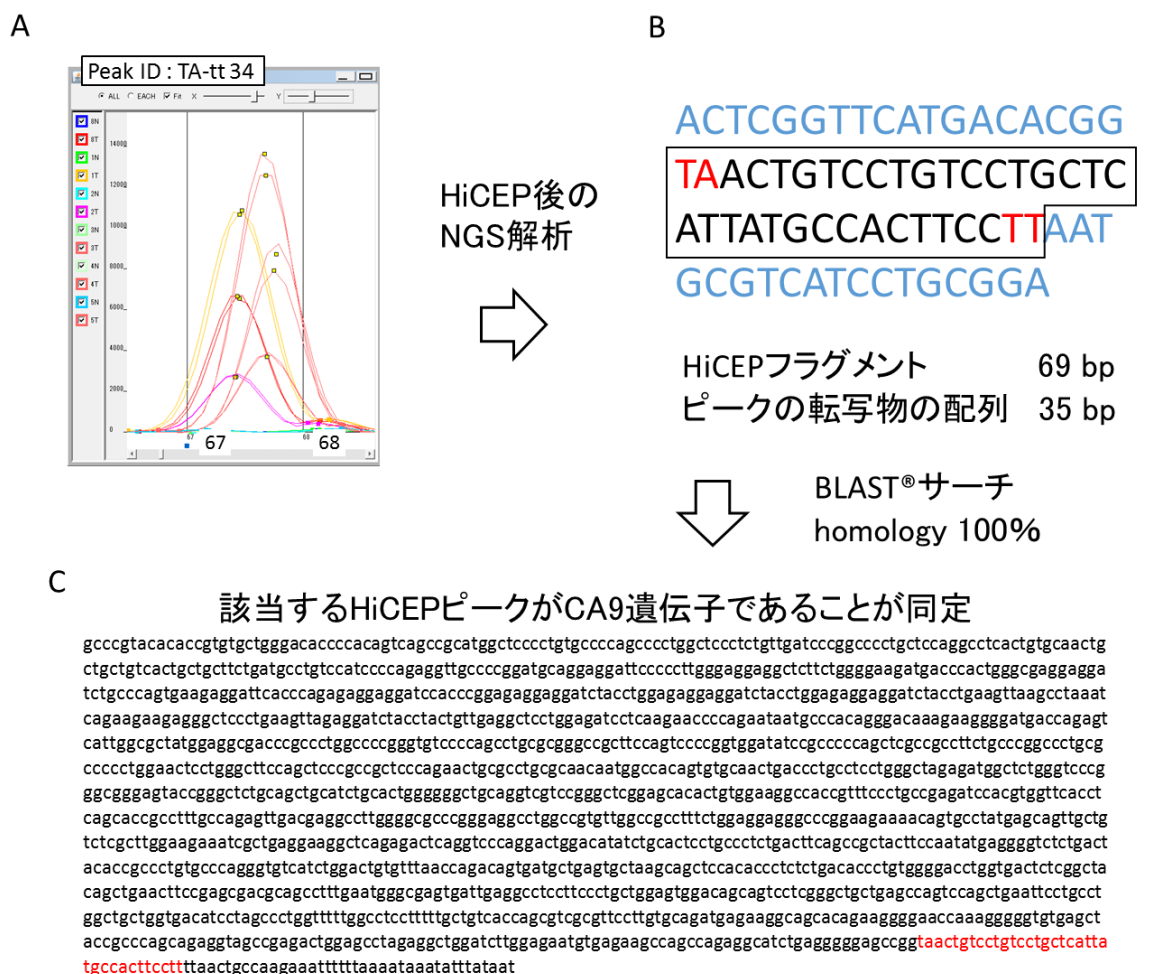
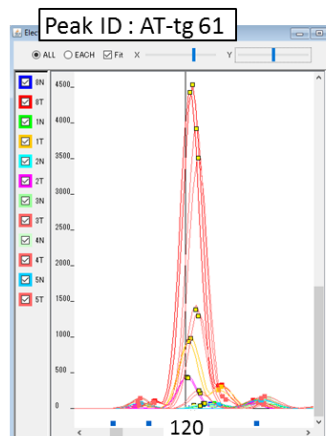


図9 腎細胞癌を対象とした NGS-HiCEP による CA9 遺伝子の同定

A に示す「Peak ID : TA-tt 34」の HiCEP ピークの塩基配列は、NGS 解析の併用により決定された(B)。「TAACTGTCCTGTCCTGCTCATTATGCCACTTCCTT」と決定された配列を BLAST®において検索したところ、100%の相同性で carbonic anhydrase 9 (CA9) 遺伝子と同定された(C)。B に示す配列の青字はアダプター配列を、赤字はセレクション配列を示す。C の CA9 遺伝子配列中の赤字部分が HiCEP ピークの転写物の配列に相当する。



A



HiCEP後の  
NGS解析



B

ACTCGGTTTCATGACACGG  
**AT**CAGAAAGTGGCTATAAAT  
 GGCTCCTTTTCTTCCATATA  
 CATGCCTTACAACGGAAG  
 TGTCCCATTTGAAGAGAG  
 GATTTCTACACT**TC****AATGCG**  
 TCATCCTGCGGA

HiCEPフラグメント 122 bp  
 ピークの転写物の配列 88 bp



BLAST®サーチ  
 homology 100%

C

該当するHiCEPピークがENPP3遺伝子であることが同定

ttgaactcttgcctcaagtgcactacctggcatccaaagtctggattacaggtgtggccactccaccagcctggcaagtaattggaacattctaaataaggtcacattcacaagtaatgggggtgggactcaacatatttagaggacacaaattcaac  
 ctataagacctatacagctcttattatcatttctcttaacatgctaaatcagaattcacatttatttaaccaggttgaggaaatacaggctatgtaaatgaaatgctgtatcattacatattgttcaatggagtttactatggcttaagttcaacatctgttcttatt  
 tgcagtggttctcaaacgtcgaggtgcaataaaactctctgggaagctgggtattcttgatcattctgagtcaggtattccacagggcacaacttgagaatgctgtctctagctcgaatggatgcaataaattctgttgaggagaccagattagaggccagcttg  
 ctcttcttcagatgactgttgcagaggaagattgctgtgactataagaggtgttgcgaaggagaaactcatggtctggaagaactgtgacacagccagcagctcagtcagtcagagagggttgaactgccaccagttatctgttctatggatgatttagagctg  
 aatatttatacactgggatactttaagccaatacaataaactgaaacatgtggaattcattcaaaatcatagagatgtatctacaaacacttcccaatcattacacattgtcacgggtgtgtacaggtcacatgcatcagcaataatgtatgat  
 gtaaatctcaacaagaattttcactttctcaaggacaaataatccagcctgggtggcatgggcaaccaatgtggctgacagcaatgtatcaagggttaaaagccgtacactctttggccggatcagaagtggtctatcttccctccatatacatgccttac  
**aacggaagtgtccattgaagagaggatttctacactgt**taaaatggctggactgccaaagctgaagaccaggtttatacattgtatttgaagaactgattcctctggacatgcaggtggaccagtcagtcagagtaataaagcctacaggttagatcatg  
 cttttgggatgttgatggaagcctgaagcagcgaatttgcacaactgtgcaatcattctctgctgacacatggaatggaccagactattgtaacaagatggaatacatgactgattttccagaataaactctctacatgacgaaggcctgccccgcacac  
 gagctcataatatacctcatgacttttttagtttaattctgaggaattgtgaaacactcagttgcgaaaacactgacattcaagccctattgactcctgatttgcgaagcagctcactatgccaagaactcagaatcgaagaagttcatcttctggatcaaca  
 gtggctgctgttaggagtaatacaaatgaggaaggcaacatggtatacaatgagtttaggagcagggactcttctggcacatggaccagttttaaagagaagactgaagttgaacatttgaataatgaggtctataacctaattgtgtgatctt  
 ctacgattcaaccagcaccacaaatgggaaccctggtagtttaaacatctctgaaggctcctttatgagccatccatgcagagggagggtgcaagttttctgttggcttgcataatccatgcccacagagctctctgactgtttctccctcacctacaaaatagta  
 ctacgtggacaagtgatcagatgctaaatctcaccacgaagaataacagcacaagtgaaatgaatttgcatttgggagggcctagggtactgcagaagaacgtggaccactgtctcttaccacagggaatagtcaggatttggaaaagctagaggatgcc  
 catgtggagttatatacagctccccagttgggagacacatgctctgctcccactgtccagacgtctcgggctgagtcagggttctctctctgagagcgaataatgtctcttatttagcagacaagaatcacaccaggtctctctatctctccagcaatag  
 aacatcagatagccaatagatgctttaaattactagcaatttggtagctatgataagaattcagaataatggtggactctccacaggttctcttataaaacatgccacagaagaatggagtaattggttagtgaccaatattgattataatgatggccatt  
 tgaatcctcagatgaaattaccaaacatttagccaacactgatttccatcccaacacactttgtgtgtgctgacaggttgtaaaacagagccacacacggaaactgcctgggtgctggatgtctacccttatctcctccagcactacacagctggagagc  
 tgcctgaaggtaaacagaagctcttgggttgaagaagatttacagctacattgcccgggtcgtgtagaagctctcactgggtgactctatcaggataaagtgacgctgtctcgaatttgcacataagacataattaccaactttgaaccactatttaa  
 cttaataatgtctacttaataataattactgtataaagtaatttggcaaaataaagtgatttttctggagaattgaaataaagtttctatttctcctgaagctcccaaaagccataattttattatctcttttctcttcaattcatgaatgatattttaaggtta  
 tatttttcacagagatgagctatattacaccttcttttgggtttcttaaaacttaactcatgacagatatactcttattattgtttatctactcagaatcttgaatatatttctgccagaatattcaacaaaggagagaacaaagaagatgtctcact  
 tgggaactgaatcaacttaaaatcagtttgtcacaacattttgtatttggcgaatgctgattaaaataaaatgcacaga

図 11 腎細胞癌を対象とした NGS-HiCEP 法による ENPP3 遺伝子の同定

図 9 に示した手順にて、NGS-HiCEP 法により腎細胞癌で発現増加を示す遺伝子として ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (ENPP3) が同定された。





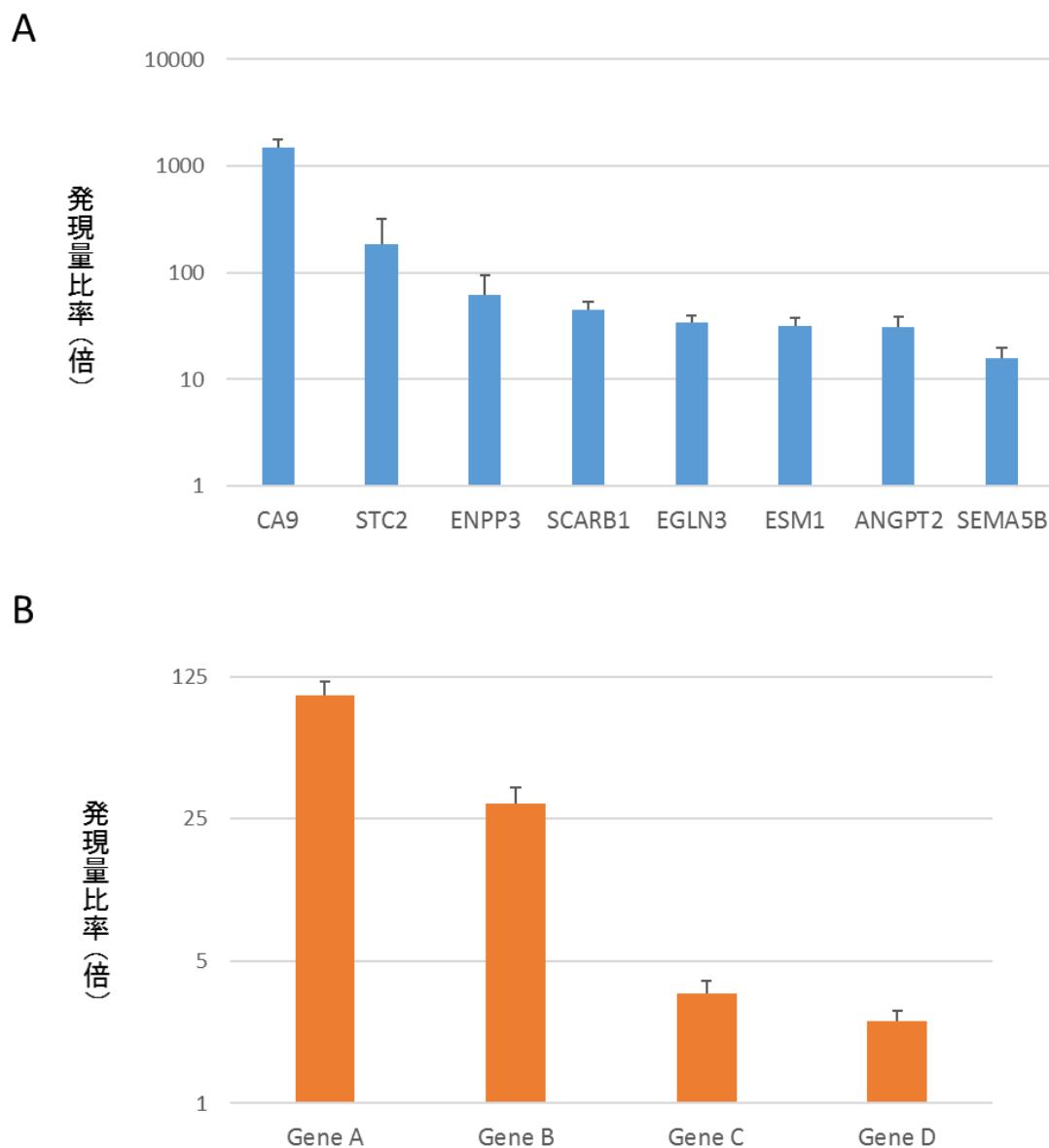












**図 17 SYBR green 法による発現解析**

NGS-HiCEP 法による発現解析で癌部において発現が増加していた遺伝子について、SYBR green 法によるリアルタイム PCR を用いて再現解析をおこなった。 $\Delta\Delta C_t$  法による比較を行い、各遺伝子における発現量比 (癌部:肉眼的非癌部) を求めた。A には 8 個の既知遺伝子の結果を、B には 4 個の新規遺伝子の結果を示す。

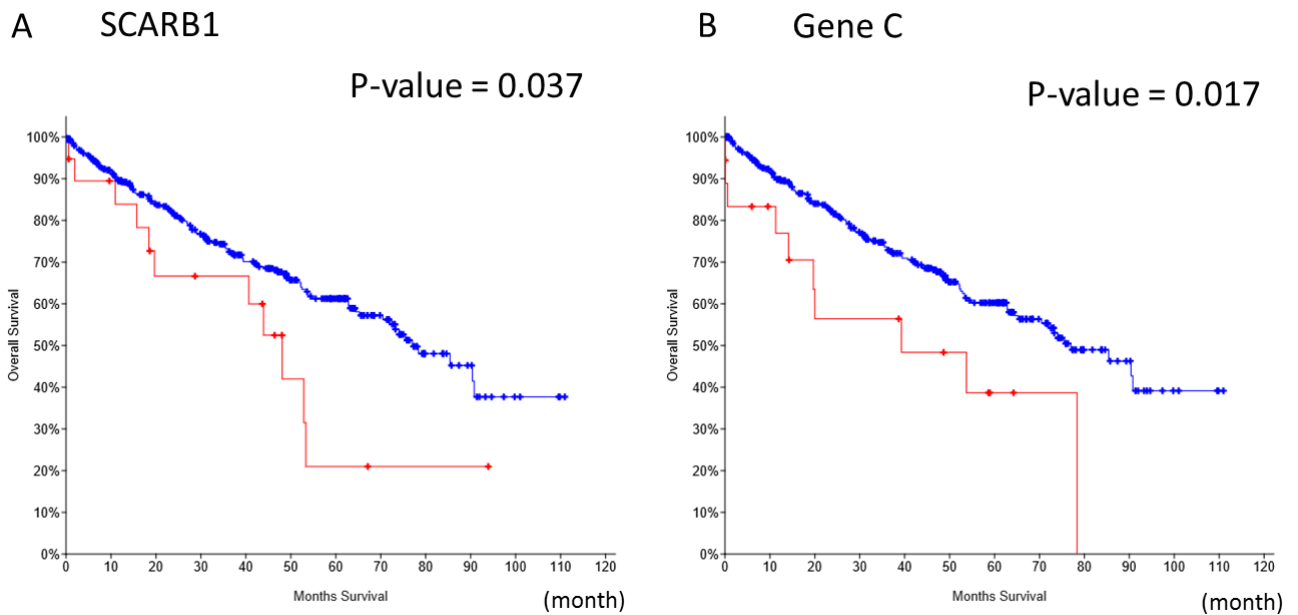


図 18 TCGA データを用いた Kaplan-Meier 生存曲線による検討

cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>) を用いて、TCGA データセットによる 12 個の候補遺伝子の発現量と生存への影響について検討を行った。12 個の候補遺伝子について、TCGA の淡明型腎細胞癌の RNA シークエンスのデータセットを用い Kaplan-Meier 生存曲線による検討を行った。12 遺伝子のうち、発現量と生存について相関を認めたのは、A に示す SCARB1 (Z score =  $\pm 2.1$ , P value = 0.037) と B に示す Gene C (Z score =  $\pm 2.0$ , P value = 0.017) の 2 つだった。他の遺伝子については TCGA のデータセットを用いた検討では、発現量と生存について相関を認めなかった。相関を認めた 2 つの遺伝子については、予後予測マーカーとして利用できる可能性が示唆された。

表 1 HiCEP 法による解析を行った腎細胞癌 6 症例の臨床データ

	age	gender	cell type	grade	Fuhrman grade	pT stage	N (0 or 1)	M (0 or 1)	V (0 or 1)	Ly (0 or 1)
1	65	Female	Clear cell	G2	2	1b	0	0	0	0
2	59	Male	Clear cell	G2	2	1b	0	0	1	0
3	66	Male	Clear cell	G2>G3	2	2a	0	0	1	0
4	65	Male	Clear cell	G2>G3	3	3a	0	1	1	0
5	82	Male	Clear cell	G3	4	3a	0	0	0	0
6	67	Female	Clear cell	G3>G2	4	3b	1	1	1	0

N; リンパ節転移の有無

M; 遠隔転移の有無

V; 病理組織学的診断における静脈浸潤の有無

Ly; 病理組織学的診断におけるリンパ管浸潤の有無

表 2 発現量の比較により同定された HiCEP ピークの遺伝子

primer set	peak ID	sequence length	gene
TA-tt	34	35	CA9 (carbonic anhydrase 9)
GC-ac	52	56	STC2 (stanniocalcin 2)
AT-tg	61	88	ENPP3 (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3)
GC-gt	84	101	SCARB1 (scavenger receptor class B member 1)
GA-at	208	302	EGLN3 (egl-9 family hypoxia inducible factor 3)
GT-ct	51	62	ESM1 (endothelial cell specific molecule 1)
CA-ca	105	182	ANGPT2 (angiopoietin 2)
CT-tt	161	203	SEMA5B (semaphorin 5B)
TG-ca	77	97	Gene A
AC-aa	148	177	Gene B
TC-ta	114	135	Gene C
CG-ca	20	37	Gene D