

令和元年6月13日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K11036

研究課題名(和文) HiCEP法を用いた特異的腎細胞癌マーカーの同定と測定法の開発

研究課題名(英文) Identification of renal cell carcinoma (RCC)-specific markers by high coverage expression profiling (HiCEP) and development of detection method for those RCC markers

研究代表者

伊藤 敬一 (Ito, Keiichi)

防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・泌尿器科学・教授)

研究者番号：90260091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：我々はHiCEP法を用い腎細胞癌の発見や病期診断に応用しうるバイオマーカーの探索を行った。HiCEP法は256対のプライマーを用いてcDNAを網羅的に増幅する方法であり、低発現量のRNAも高感度・高信頼性で検出可能である。本法と次世代シーケンサーによる解析を組み合わせることで、腎癌のHiCEPフラグメントによる遺伝子発現データベースを構築した。非癌部と比べ癌部で5倍以上発現量の多い12個の候補遺伝子が同定された。これらの遺伝子に対してリアルタイムPCRを用いた組織発現解析を行い、他の腎癌検体においても非癌部と比較して発現が高いことが確認された。いずれも腎癌マーカーとして有望な遺伝子である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では既存の実験方法では見出し得なかった新たな腎細胞癌特異的発現分子を検出し、未だ確立されていない早期診断などの技術の開発を目指す学術的独自性のある研究である。まずNGSを併用したHiCEP法の報告はヒトを含む哺乳類検体において世界で初めてとなる。本研究の重要な点はHiCEP法という高感度の新規の方法で今まで検出されなかった腎細胞癌マーカーの候補遺伝子が同定されたことである。さらに、癌部と非癌部の発現量を比較しているため、腎細胞癌における早期診断や病勢診断に応用できる可能性がある。また4つの同定された新規遺伝子はこれまで腎癌との関連性が報告されておらず今後の発展が大いに期待される。

研究成果の概要(英文)：High coverage expression profiling (HiCEP) is an AFLP-based comprehensive gene expression analysis technique. HiCEP can detect low amounts of mRNA with high sensitivity and reliability. We performed next-generation sequencing (NGS)-combined HiCEP and tried to establish a gene expression database of renal cell carcinoma (RCC) cases to identify effective tumor markers. Six RCC cases were analyzed by HiCEP. Total RNA was extracted and transcribed to cDNA. Selective PCR by 256 kinds of primer pairs was used to amplify the HiCEP fragments. We compared the expression levels of HiCEP peaks in cancerous tissues with those in non-cancerous tissues. We determined the sequences of the HiCEP fragments by NGS, and developed the first cancerous tissue HiCEP fragment database. Also, we identified 12 genes which showed 5 times higher expression in cancerous tissues than in normal tissues. Those 12 genes were attractive candidates for RCC specific marker.

研究分野：泌尿器科悪性腫瘍

キーワード：腎細胞癌 早期診断 病期診断 バイオマーカー 包括的高感度転写産物プロファイリング 次世代シーケンサー リアルタイムPCR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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 (Fukumura R, et al. Nucleic Acids Res. 2003;31(16):e94)。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。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る。本研究ではその問題点を次世代シーケンサー (NGS; next generation sequencer) による網羅的解析を併用することでデータベース化し、克服することを試みた。この NGS を併用した HiCEP 法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、腎細胞癌の早期診断に応用しうるバイオマーカーの同定を試みた。さらに、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した。

2. 研究の目的

HiCEP 法は、高感度かつ網羅的、定量的な発現解析を行う事が可能であり、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、シーケンシングが必要であり、これまでは転写物の配列決定に時間と手間を要した。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、HiCEP フラグメントの遺伝子発現データベースの構築を行うことができれば、発現解析と遺伝子の同定の効率が格段に上がる。また、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 NGS を併用した HiCEP 法の報告はヒトを含む哺乳類検体において世界で初めてとなる。本研究は、腎細胞癌における特異的腫瘍マーカーの探索のため、NGS を併用した HiCEP 法による網羅的解析を行い、腎細胞癌組織における遺伝子発現データベースの構築を行うことを 1 つの目的としている。

さらに NGS を併用した HiCEP 法による腎細胞癌組織の網羅的遺伝子発現解析により検出した腫瘍マーカー候補について、HiCEP 法で用いた検体と別の腎細胞癌患者の臨床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う。そして、癌関連遺伝子発現データベースを用いて、遺伝子の発現と生存との関連についても検討を加えた。

3. 研究の方法

3-1. 対象

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 95 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および肉眼的非癌部の組織、手術前および手術後 1 週間後・手術後約 3 カ月後の血液を収集した。検体の採取にあたっては、インフォームド・コンセントを行い、同意書を取得した。

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。腎摘除術組織では癌部のほかに腫瘍から離れた肉眼的非癌部組織も採取した。腎部分切除術組織では癌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 以上腫瘍から離れた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 (Quiagen 社) で処理を行い、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、抽出キットとして RNeasy® Plus Mini (Quiagen 社) を用いた。血液検体は手術前および退院前日、退院後約 3 カ月後の 3 回採取を行った。RNA 抽出のため PAXgene® (Qiagen 社) 採血管を用いた血液採取と、LeukoLOCK® (Thermo Fisher Scientific 社) による白血球分離採取、血漿の採取を行った。

3-3. HiCEP 法による RNA 発現解析

腎細胞癌患者のうち、6 名の淡明細胞型腎細胞癌の組織検体を用いて HiCEP 法による発現解析を行った。癌部およ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。この解析は共同研究先である放射線医学総合研究所にて施行された。

3-4. HiCEP フラグメントの作成

抽出された RNA をピオチン化した逆転写酵素 (oligo(dT) primer) を用いて二重鎖 cDNA へと変換する。二重鎖 cDNA は 5' 末端側を制限酵素 Msp1 で切断し、Msp1 アダプター (5'-AATGGCTACACGAACTCGGTTTCATGACA-3') を結合させる。同様に 3' 側は制限酵素 Mse1 で切断し、Mse1 アダプター (5'-AAGTATCGTCACGAGGCGTCCTACTGCG-3') を結合させる。両端に 2 つのアダプターが結合された転写物を HiCEP フラグメントと呼ぶ。

3-5. 選択的 PCR

HiCEP フラグメントは両端に共通の配列をもつため、アダプター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、Msp1 out primer (5'-AATGGCTACACGAACTCGGT-3') および Mse1 out primer (5'-AAGTATCGTCACGAGGCGTC-3') を用いて HiCEP フラグメントの PCR を行い増幅させる。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 種類の選択的プライマーで PCR を行い、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 (Msp1 切断側) のプライマーは 5'-ACTCGGTTTCATGACACGGNN-3' を、リバーズ (Mse1 切断側) のプライマーは 5'-AGGCGTCCTACTGCGTAANN-3' を用いる。NN の組み合わせは AGTC の 4 通りがフォワード側で 4×4 の 16 通り、リバーズ側で 4×4 の 16 通りであるため、16×16 の 256 通りとなる。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 PCR することができる。選択的プライマーには蛍光色素を結合させてある。

3-6. キャピラリー電気泳動

選択的 PCR された HiCEP フラグメントは、プライマーセットごとに ABI Prism 310 (Thermo Fisher Scientific 社) にてキャピラリー電気泳動を行った。選択的 PCR で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計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。

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解析を行った。

3-7. 次世代シーケンサーによる HiCEP フラグメントの網羅的解析

ピークの塩基配列の決定を行うため、次世代シーケンサー (NGS) を用いて HiCEP フラグメントの網羅的解析を行った。シーケンサーは Thermo Fisher Scientific 社の Ion PGM 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 社) 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。

3-8. 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ている。これらの情報をもとに、NGS にてえ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、腎細胞癌組織の癌部、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。

3-9. 対象

収集した腎細胞癌検体組織から RNeasy® Plus Mini (Quiagen 社) を用いて RNA の抽出を行った。BioAnalyser (Agilent 社) にて RNA 濃度や quality check を行い、RNA Integrity Number が 7 以上、RNA 濃度が 10 ng/μL 以上となった 35 検体を用いた。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 個および新規の腎細胞癌関連遺伝子 4 個) に関して SYBR green 法による発現解析を行った。

3-10. 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 Ct 法を用いた (Livak KJ, et al. Method. Methods. 2001;25:402-8.)。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した。腎細胞癌組織およ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 例の癌部および肉眼的非癌部の RNA を用いた。

3-11. リアルタイム PCR

候補遺伝子のうち 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。その他の 2 個の遺伝子については、解析された塩基配列が 30 塩基対以下と短く、遺伝子の同定が困難でプライマー設計できなかった。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。

3-12. 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 値の 1 の差は 2 倍の発現量の差に相当する。内在性コントロールと対象遺伝子との Ct 値の差 (ΔCt) 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。さらに遺伝子間での Ct 値の差 (ΔCt 値) を求めることで、次にサンプル間での発現量の比較が可能となる。

3-13. TCGA (The Cancer Genome Atlas) データベースを用いた検討

TCGA に登録してあるデータを用いて、候補遺伝子の発現量と生存との関連について検討を行った。cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>) を用いて、淡明型腎細胞癌の TCGA データセットによる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。

4. 研究成果

4-1. HiCEP 法による発現解析

HiCEP 法による腎細胞癌組織の発現解析では、6 症例の癌部及び肉眼的非癌部の計 12 検体の解析を行った。1 検体当たり 58,478 個の HiCEP ピークを認めた。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 において、癌部において非癌部より 5 倍以上発現が増加する 16 個の HiCEP ピークが同定された。

4-2. NGS による塩基配列の同定と関連遺伝子の検索

HiCEP ピークの比較により、癌部において肉眼的非癌部よりも 5 倍以上発現していた 16 個のピークについて NGS 解析結果をもとに塩基配列の同定と関連する遺伝子について検索を行った。NGS 結果のデータベースから、16 個のうち塩基数が 400 以上であったもの 2 個、及び塩基数が 30 未満と短いもの 2 つを除く、12 個について塩基配列の同定が可能であった。塩基配列をもとに遺伝子検索データベースである BLAST[®] (<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 番目のピークを、以下「peak ID Ta-tt 34」の様に示す。「peak ID Ta-tt 34」は、carbonic anhydrase 9 (CA9) と同定された。同様に、「peak ID GC-ac 52」は stanniocalcin 2 (ST2) であった。「peak ID AT-tg 61」は ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 3 (ENPP3) であった。「peak ID GC-gt 84」は scavenger receptor class B member 1 (SCARB1) であった。「peak ID GA-at 208」は egl-9 family hypoxia inducible factor 3 (EGLN3) であった。「peak ID GT-ct 51」は、endothelial cell specific molecule 1 (ESM1) であった。「peak ID CA-ca 105」は angiopoietin 2 (ANGPT2) であった。「peak ID CT-tt 161」は semaphorin 5B (SEMA5B) であった。上記 8 個の遺伝子についてはすでに腎細胞癌との関連が報告された遺伝子であった。残りの 4 個は腎細胞癌との関連がまだ示されていない新規の腎細胞癌関連遺伝子であった。

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 TBP を内在性コントロールとして用いた。TBP については、腎細胞癌検体の SYBR green 法による解析で内在性コントロールとして報告されていた (Bismar TA, et al. Pathology. 2003;35(6):513-7)。TBP と対象遺伝子間での Ct 値の差を算出し、 ΔCt を求めた。さらに対象遺伝子間で ΔCt の差を算出し、 ΔCt を求めた。発現量比は $2^{(-\Delta Ct)}$ で求められるため、各遺伝子において肉眼的非癌部と比べて癌部において何倍の発現量となっているかを求めた。既知遺伝子の 8 個については、CA9 が 1447 倍 (± 277.7 : 標準誤差, standard error)、STC2 が 178 倍 (± 133.9)、ENPP3 が 60.5 倍 (± 32.2)、SCARB1 が 44.4 倍 (± 8.4)、EGLN3 が 33.4 倍 (± 5.2)、ESM1 が 30.6 倍 (± 6.0)、ANGPT2 が 22.6 倍 (± 6.2)、SEMA5B が 15.5 倍 (± 3.7) であった。

新規遺伝子 4 個については、Gene A が 22,200,000 倍 ($\pm 22,134,089$)、Gene B が 28.6 倍 (± 5.8)、Gene C が 3.5 倍 (± 0.54)、Gene D が 2.5 倍 (± 0.3) であった。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。

4-4. 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) に登録してあるデータを用いて、候補遺伝子の発現量と生存との関連について検討を行った。cBioPortal (<https://www.cbioportal.org/>) を用いて、淡明型腎細胞癌の 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 生存曲線による解析を行った。12 遺伝子のうち、発現量と生存について相関を認められたのは、SCARB1 (Z score = ± 2.1 , $P = 0.037$) と Gene C (Z score = ± 2.0 , $P = 0.017$) 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。

4-5. まとめ

NGS を併用した HiCEP 法を用いて、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 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。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文) (計 0 件) 令和元年 6 月 13 日現在、投稿準備中である。

(学会発表) (計 4 件)

1. Makoto Kawaguchi, Hirotaka Matsuo, Ryoko Araki, Seiko Shimizu, Mikiya Takao, Akiyoshi Nakayama, Yosuke Kitamura, Masumi Abe, Keichi Ito, Nariyoshi Shinomiya. Development of a gene expression database of renal cell carcinoma cases by NGS-combined HiCEP to identify tumor markers. 2019 AACR (American Association for Cancer Research) annual meeting, 2019
2. 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. Development of the gene expression database of renal cell carcinoma cases to identify the tumor markers. 第 77 回日本癌学会学術総会, 2018
3. 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. 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. 第 28 回泌尿器科分子・細胞研究会. 2019 年
4. 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. 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第 107 回日本泌尿器科学会総会. 2019 年.

(図書) (計 0 件)

(産業財産権) ○出願状況 (計 0 件)

6. 研究組織

- (1) 研究分担者 研究分担者氏名: 松尾洋孝 ローマ字氏名: Matsuo Hirotaka
所属研究機関名: 防衛医科大学校 医学教育部医学科進学課程及び専門課程
部局名: 分子生体制御学 職名: 准教授 研究者番号 (8 桁): 00528292
- (2) 研究協力者 研究協力者氏名: 川口真 ローマ字氏名: Kawaguchi Makoto