

# 後天性嚢胞腎随伴性腎細胞癌における糖鎖関連遺伝子の次世代シーケンサー解析

川西邦夫\*1 岡谷千晶\*2 長田道夫\*1

\*1 筑波大学医学医療系腎血管病理学 \*2 産業技術総合研究所細胞分子工学研究部門 分子細胞マルチオミクス研究グループ

key words : 透析腎癌, 後天性嚢胞腎, 後天性嚢胞腎随伴性腎細胞癌, 糖鎖関連遺伝子, 次世代シーケンサー解析

## 要 旨

透析患者では腎細胞癌 (renal cell carcinoma; RCC) の罹患率が非透析例の約 15 倍に増加する。近年、透析に関連して生じる後天性嚢胞腎 (acquired cystic kidney disease; ACKD) を母地とする後天性嚢胞腎随伴性腎細胞癌 (acquired cystic disease associated renal cell carcinoma; ACD-RCC) が、WHO 腎細胞性腫瘍分類第 4 版に記載され注目を集めている。ACD-RCC は画像検査での検出が難しく、診断に有用なバイオマーカーが求められている。既存の腫瘍マーカーの多くが癌特異的な糖鎖構造を認識することから、我々は透析腎癌の糖鎖構造解析を進めてきた。この度、平成 30 年度日本透析医会公募研究助成のもと、ACD-RCC に特徴的な糖鎖遺伝子を見出すべく次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析を行った。ACD-RCC と透析例の clear cell RCC の癌部における 220 の糖鎖関連遺伝子発現を比較すると、ACD-RCC ではシアル酸やフコースの修飾に関わる糖鎖遺伝子の発現が優位に亢進していた。相補的に進めている TIA かけはし研究の糖鎖解析とも合致する結果であり、本研究の成果をもとに透析例に特異的な糖鎖構造のキャリアタンパク質の同定を行い、透析腎癌、特に ACD-RCC の検出に応用可能なバイオマーカーの開発を目指す。

## 緒 言

国内に 30 万人以上存在する透析患者では、腎細胞癌 (renal cell carcinoma; RCC) の罹患率が非透析例

の約 15 倍に増加することが知られる。sporadic な腎癌との違いを明確にするため、我が国では「透析腎癌」の呼称が用いられている。透析の初期に認められる RCC の組織型は非透析での腎癌に多い淡明型腎細胞癌 (clear cell RCC) であるが、透析年数が進むと、後天性嚢胞腎 (acquired cystic kidney disease; ACKD) を母地とする後天性嚢胞腎随伴性腎細胞癌 (acquired cystic disease associated renal cell carcinoma; ACD-RCC) の発生頻度が増加する。

ACKD は、血液浄化療法導入前の腎不全患者の 7~22% に認められ、透析歴 2~4 年では 60%、8 年以上で 90% 以上と高い罹患率を示す非遺伝性嚢胞疾患である<sup>1,2)</sup>。ACKD の発生機序は不明だが、遺伝性嚢胞疾患と異なり腎臓以外の臓器に嚢胞の形成が生じないことから、腎不全の固有腎に生じるエピジェネティックな機序が示唆される。ACKD に合併する腎癌については Dunnill<sup>3)</sup> らが剖検例の報告をしている。我が国においては、石川ら<sup>4)</sup>がその詳細を報告し広く検討が行われてきた<sup>1,2,4)</sup>。透析腎癌に特異的な組織型として、ACD-RCC<sup>5)</sup>の概念が確立し、WHO 腎細胞性腫瘍分類第 4 版 (2016) に追加された。ACD-RCC はかつて乳頭状腎細胞癌 (papillary RCC) などに分類されていたこともあった<sup>4)</sup>。病理学的には胞巣状・篩状・微小嚢胞状・嚢胞状の形態像を示し、好酸性顆粒状の細胞質を持ち、核異形は中等度~高度が多いとされる<sup>6)</sup>。腫瘍内のシュウ酸カルシウム結晶の集積、細胞質液胞 (cytoplasmic microvacuoles) の存在も ACD-RCC の多くで認められる<sup>6)</sup>。免疫組織化学では papillary RCC と

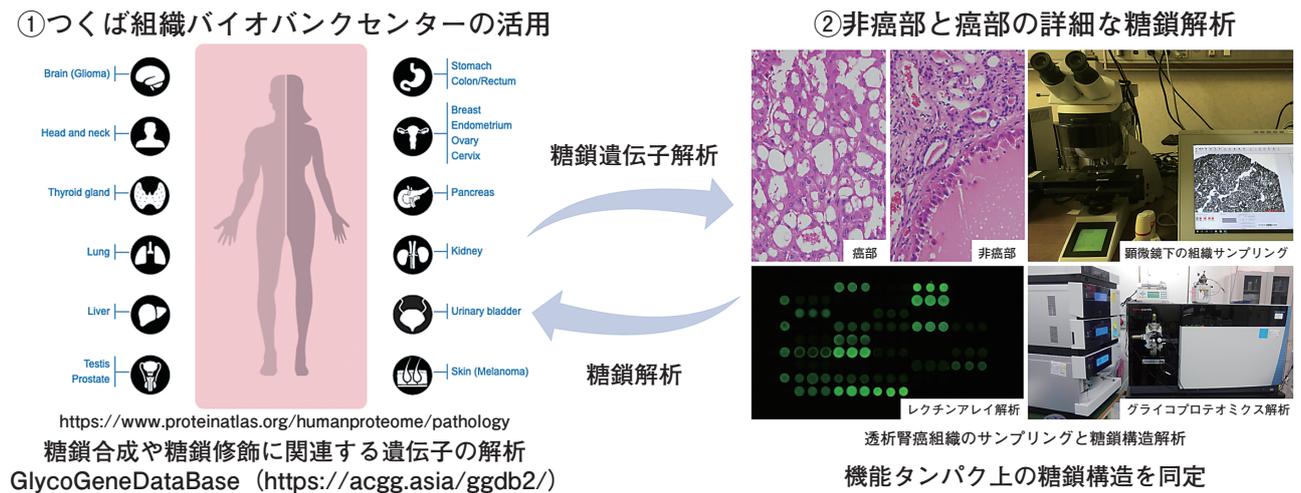


図1 透析腎癌の糖鎖関連遺伝子と糖鎖構造の網羅的解析 (TIA かけはし研究)

同様に  $\alpha$ -methyl-acyl-coenzyme A racemase (AMACR), RCC marker, CD10 が陽性で, CK7 は陰性 (clear cell RCC は AMACR と CK7 は陰性; CD10 と RCC Marker は陽性) である<sup>6)</sup>. 近藤らが報告した世界最大規模の透析腎癌の臨床病理学的解析<sup>7)</sup>によると, 透析腎癌における ACD-RCC (clear cell RCC) の発生頻度は, 透析年数 10 年まででは 7.6% (76.1%), 透析年数 10~15 年で 43.6% (38.1%) と clear cell RCC よりも頻度が多くなり, 15~20 年では 50.7% (21.6%) と高率になる<sup>7)</sup>. 33 万人を超える血液透析患者全体の約半数が 5 年以上の長期透析例である我が国では, 今後も長期透析患者数の増加が見込まれており, ACD-RCC を含む透析腎癌へのさらなる対策が求められている.

透析腎癌, 非透析例の sporadic な腎癌を含めて, 特異的な腫瘍マーカーはこれまでに見出されていない. 腎癌全体の診断は画像診断が基本となり, 非透析例では尿細胞診や針生検診断での確定診断が可能である. 透析例では基本的に尿細胞診や針生検の適応はなく, 定期的なエコー, CT 検査によるスクリーニングが行われている<sup>8)</sup>. 短期透析かつ高齢の透析腎癌症例では, clear cell RCC の頻度が高く dynamic CT で造影効果が得られるため, 画像診断が有用である. 他方, 長期透析かつ若年例では, ACKD 病変 (嚢胞) が多発することに加え, ACD-RCC を含む clear cell RCC 以外の組織型が増加する. このため, dynamic CT で造影効果が得られにくく画像診断は困難となる. MRI による評価に加えて, perflubutane microbubbles による造影超音波や PET-CT が透析腎癌の画像診断に有用との報告<sup>9)</sup>はあるが, より低コストかつ簡便に施行可能な特

異的バイオマーカーの開発が求められている.

現在, 筑波大学と産業技術総合研究所 (産総研) は, つくばヒト組織バイオバンクセンターにおける病理組織の研究応用実績, 筑波大学ゲノム生物学の NGS 解析実績, 産総研細胞分子工学研究部門分子細胞マルチオミクス研究グループの糖鎖解析実績を活用し, 透析腎癌の病理組織を対象に網羅的な遺伝子発現解析と糖鎖解析を両方向性に実践できる研究体制 (TIA かけはし) を構築している (図 1). 今回, ACD-RCC の糖鎖合成や糖鎖修飾に関連する遺伝子の発現を世界で初めて次世代シーケンサーを用いた RNAseq により解析した.

## 1 対象・方法

つくばヒト組織バイオバンクセンターは, 遺伝子解析を含む研究利用の同意が得られた手術検体を多数保管している. 本研究においては, 透析腎癌を含む腎癌全般の研究利用について, つくば臨床医学研究開発機構 (T-CReDO) による倫理審査で承認を受けた (「透析腎癌と非透析腎癌における新規バイオマーカーの探索」(R1-021)).

バイオバンクに登録された ACD-RCC (n=3), 透析例の clear cell RCC (n=3), 非透析例の clear cell RCC (n=3) のホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin fixed paraffin embedded; FFPE) 検体中の癌部, 非癌部を顕微鏡下にマッピングしたのち, 理研ジェネシス (https://www.rikengenesys.jp) で RNAseq を施行した. Maxwell RSC RNA FFPE Kit (Promega) を用いて RNA を抽出後, ライブラリーは TruSeq RNA

Exome Kit (Illumina), Agilent TapeStation 4200 (Agilent Technologies), KAPA Library Quantification Kit (Kapa Biosystems) により調製し, シークエンスには Illumina NovaSeq 6000 を用いた. クオリティコントロール (cutadapt (v1.2.1)<sup>10</sup>) ののち, リード終端の Poly-A/T を PRINSEQ (v0.19.2)<sup>11</sup> によって除去した. 遺伝子発現解析には, ヒトゲノムリファレンス (GRCh37/hg19) と TopHat (v2.0.13)<sup>12</sup> を用いた. マッピングしたリードは Cufflinks (v2.2.1)<sup>13</sup> によりアッセンブルした. 発現差異解析 (differential expression analysis, DEA, fold change と統計解析) は, Cuffquant によってノーマライズされた fragments per kilo base per million map reads (FPKM) を用いて Cuffdiff (Cuffquant and Cuffdiff are programs involved in the Cufflinks package) により施行した. Heatmap の作図には iDEP9.2 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/idep/>) を用いた.

## 2 結果

透析腎癌で最も多い2種類の組織型である ACD-RCC と clear cell RCC の mRNAseq の結果を図2と図3に示す. Heatmap (1231 遺伝子, 図2) では, 癌部 (cancer; CA) では遺伝子発現傾向が ACD-RCC と clear cell とで明瞭に分別できた. それぞれの非癌部組織 (background; BG) の差異は少なかった (179 遺伝子, 図2). ACD-RCC と透析例の clear cell RCC の癌部の糖鎖関連遺伝子 (220 遺伝子: GlycoGeneDataBase) の発現を比較すると, ACD-RCC では, シアル酸の修飾に関わる alpha-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 2 や beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6 をコードする *ST6GALNAC2* や *ST3GAL6*, フコースの修飾に関わる galactoside (3/6/8)-L-fucosyltransferase (*FUT3*, *FUT6*, *FUT8*) を含む遺伝子発現が亢進していた (11 遺伝子, 図3A, B). 以上の結果は TIA かけはし研究 2019 で行ってい

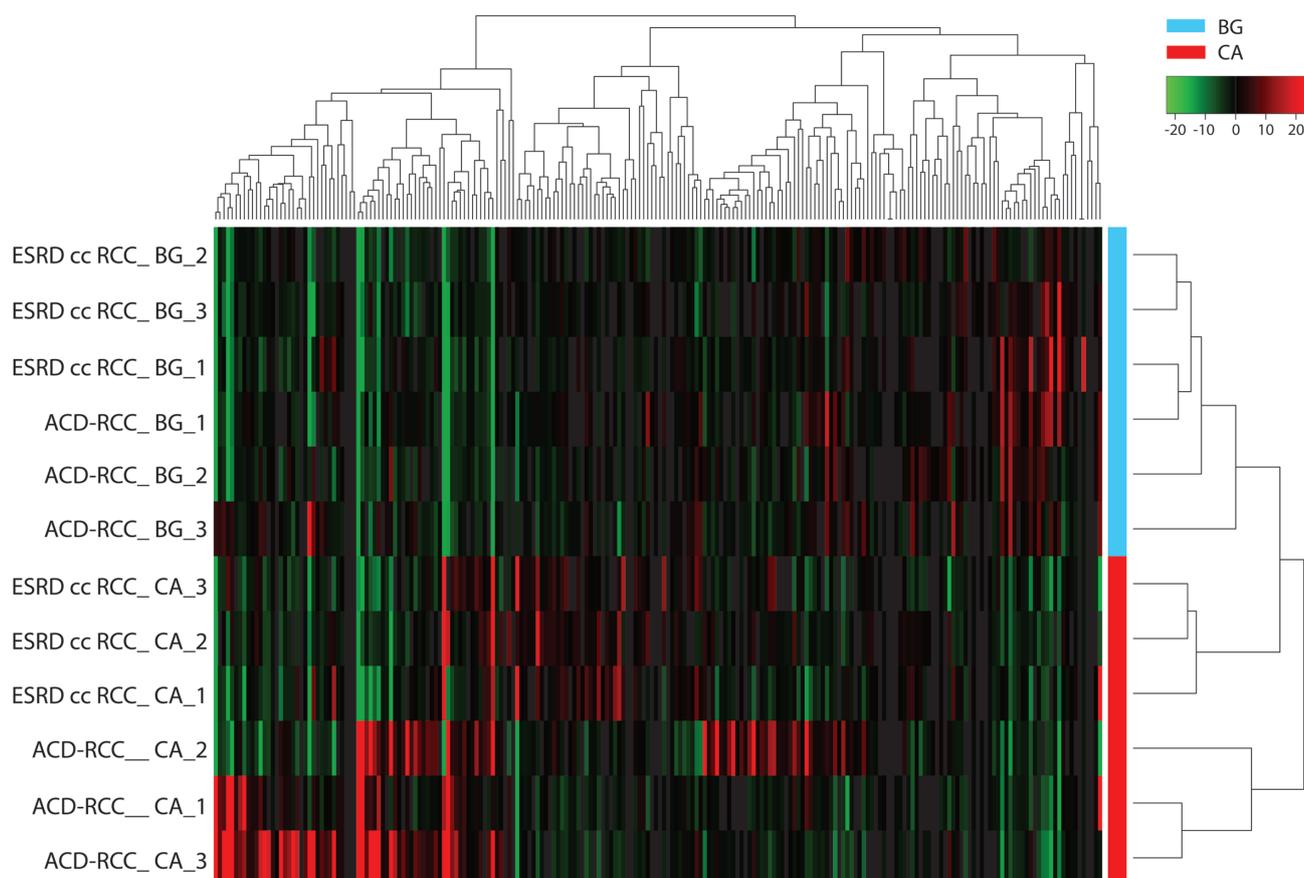


図2 透析腎癌の mRNAseq と糖鎖関連遺伝子の解析

Heatmap 解析. 透析例の clear cell RCC (end stage renal disease, ESRD cc RCC, n=3), ACD-RCC (n=3). 非癌部 (BG), 癌部 (CA).

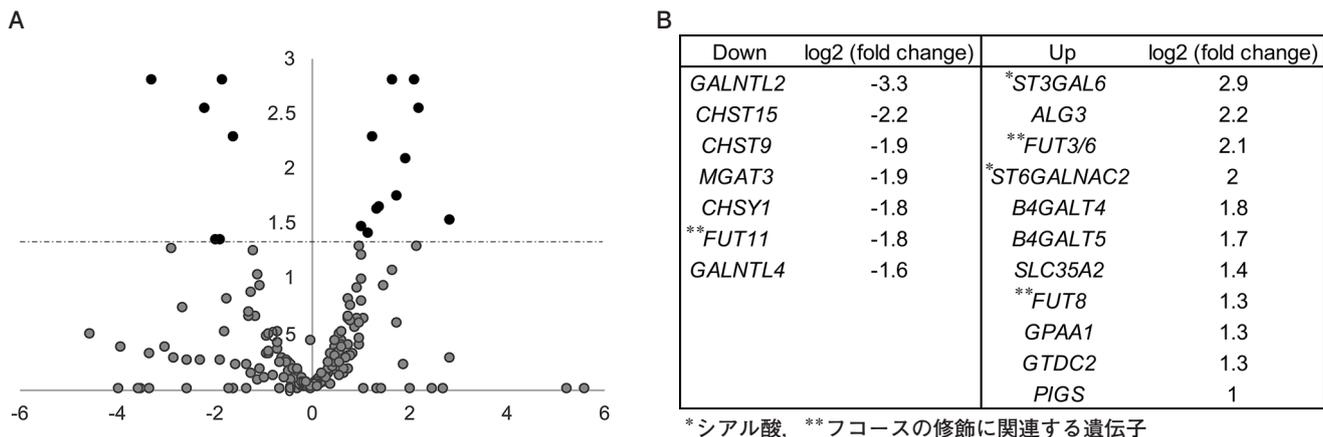


図3 透析腎癌の糖鎖関連遺伝子の解析

- A) 透析例の clear cell RCC (癌部) と比較した ACD-RCC (癌部) における糖鎖関連遺伝子の発現解析 (220 遺伝子). x 軸:  $\log_2$  (fold change), y 軸:  $\log_{10}$  (q-value).  
 B) ACD-RCC (癌部) で有意に発現が変化している糖鎖関連遺伝子.

るレクチンアレイによる糖鎖解析, レクチンによる組織染色の結果とも合致した (投稿準備中). なお, 非癌部では ACD-RCC と透析例の clear cell RCC との間に糖鎖関連遺伝子発現の有意な差異を認めなかった. また, 対照として行った非透析例と透析例の clear cell RCC の遺伝子発現解析においては, 癌部 (209 遺伝子) に対し, 非癌部 (856 遺伝子) で発現の差異がより顕著であった. 同様に糖鎖遺伝子の発現において, 癌部では有意な差異は認めないが, 非癌部では 12 遺伝子で有意な差異を認めた.

### 3 考察

ACD-RCC は 2016 年の WHO 分類 (4 版) に追加されて以降, その研究が急速に進んでいる. 2020 年 7 月現在, 報告されている NGS 解析は検索しえた範囲で後述する 1 件のみと少ないが, 今後は報告が増えると思われ. これまで Microarray や FISH 法などにより 3, 7, 16, 17 番染色体の異常や gain<sup>14-17</sup>, がん抑制タンパク質の一つであるサイクリン依存性キナーゼ阻害 2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) をコードする *CDKN2A/p16* の異常との関連<sup>18</sup>が報告されている. また, NGS を使った最新の報告<sup>19</sup>では, ヒストンメチルトランスフェラーゼの一つである lysine N-methyltransferase 2C をコードする *KMT2C* や, 結節性硬化症 (tuberous sclerosis complex; TSC) の原因遺伝子として同定された癌抑制遺伝子ファミリーの一つである *TSC2* の異常が報告された. 今回, 検索しうる限りにおいて, 世界で初めて ACD-RCC と透析例

の clear cell RCC の FFPE 検体を用いた RNA seq を施行し, 糖鎖遺伝子の発現の差異を調べたところ, ACD-RCC では clear cell RCC に比べシアル酸とフコースの修飾に関わる酵素の遺伝子発現が優位に亢進していることがわかった.

細胞表面の糖鎖は, 糖タンパク質・糖脂質などの複合体として存在し, 細胞の認識など生体内の多様な機能を介在している. 糖鎖末端に存在するシアル酸は, 細胞の認識など生体内の多様な機能を介在する<sup>20,21</sup>. シアル酸修飾酵素がメチル化などのエピジェネティックなメカニズムにより機能の亢進あるいは低下をきたすと, 生体の正常なシアル酸修飾が行われなくなり, 癌疾患や肥満などの生活習慣病疾患の発症に関与することが示されている<sup>22,23</sup>. 腎疾患では, IgA 腎症と *ST6GALNAC2* や  $\alpha 2, 6$ -sialyltransferase (*ST6GalNAc-II*) の多型によるシアル酸修飾異常の関連<sup>24</sup>が報告されている. また, シアル酸修飾型の IgG は免疫抑制能を増加させ, 自己抗体にシアル酸修飾を行うと疾患モデルで自己免疫性疾患が軽減されることが示され<sup>25</sup>, 種々の自己免疫性疾患モデルや臨床研究が行われている. 生体はシアル酸構造を認識するシアル酸結合免疫グロブリンタイプレクチン (sialic acid-binding immunoglobulin-type lectins; Siglecs) を備え, 進化の過程でヒトは Siglec 1~14 の Siglec ファミリーを持つに至った<sup>26</sup>. Siglec は主に炎症細胞に発現しており, immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif (ITIM) 様の構造により, 炎症細胞に抑制系や刺激系のシグナルを伝達する. 免疫チェックポイント受容体である PD-1

(programmed death receptor-1)と同様に、Siglecの腫瘍微小環境 (tumor microenvironment; TMA)における役割についての報告<sup>27,28)</sup>が続いている。

本研究とかけはし2019で見出したACD-RCCでのシアル酸の発現亢進は、Siglecを介したTMAと関連する可能性があり、今後さらなる検討の余地がある。他方、糖タンパク質のフコシル化 (フコースが付加される)は癌の転移や炎症に関与し、細胞質内で合成されたGDPフコースをゴルジ装置に運ぶトランスポーターの発現量の関与が指摘されている<sup>29)</sup>。また、臨床応用されているバイオマーカーエピトープの多くがシアル酸やフコースを含み、CA19-9, Tn/SiaTn, CEA, AFP (AFP-L3)などの腫瘍マーカー、Stage Specific Embryonic Antigens (SSEA)などの発生分化マーカーがその代表である。見出した糖鎖構造をバイオマーカー開発に発展させるには、透析腎癌の多数症例での組織解析とその糖鎖のキャリアタンパク質の同定 (質量分析)が必要であり、TIAかけはし2020では、新たな多施設共同研究を開始した。今後、透析腎癌の診断に役立つバイオマーカーの開発 (血清サンプルなど)を目指して解析を進める予定である。

#### 4 結論

透析腎癌の主要な組織型である、ACD-RCCとclear cell RCCのFFPE検体からRNA抽出に成功した。次世代シーケンサーを用いたRNAseqにより糖鎖合成・糖鎖修飾に関連する220の酵素遺伝子を解析し、ACD-RCCではシアル酸やフコースの修飾に関わる酵素の遺伝子発現が亢進していることを見出した。本研究と相補的に進めている糖鎖解析 (TIAかけはし研究2019)では、レクチンアレイ解析、レクチン染色による組織評価などにより、ACD-RCC組織検体中のシアル酸、フコースを含む糖鎖の増加を確認している。また本研究の結果に基づき、ACD-RCCに特異的な糖鎖構造とそれを認識するレクチンが、病理診断に有用であるかを検証し、新たな多施設共同研究 (TIAかけはし研究2020)を開始している。今後、見出した糖鎖構造のキャリア分子の同定を行い、透析腎癌、特にACD-RCCの検出に応用可能なバイオマーカーの開発を目指す。

本研究は、平成30年度日本透析医会公募研究助成

事業「後天性嚢胞腎におけるNGSを用いた網羅的遺伝子発現解析 (平成31年2月25日透医第2019009号)」のもと施行された。

本研究における申告すべきCOIはない。

#### 文 献

- 1) Ishikawa I, Saito Y, Onouchi Z, et al. : Development of acquired cystic disease and adenocarcinoma of the kidney in glomerulonephritic chronic hemodialysis patients. *Clin Nephrol* 1980; 14 : 1-6.
- 2) Ishikawa I : Acquired Cystic Disease of the Kidney and Renal Cell Carcinoma-Complication of Long-Term Hemodialysis. Tokyo : Springer, 2007; 1-111.
- 3) Dunnill MS, Millard PR, Oliver D : Acquired cystic disease of the kidneys : a hazard of long-term intermittent maintenance haemodialysis. *J Clin Pathol* 1977; 30 : 868-877.
- 4) Ishikawa I, Kovacs G : High incidence of papillary renal cell tumours in patients on chronic haemodialysis. *Histopathology* 1993; 22 : 135-139.
- 5) Tickoo SK, dePeralta-Venturina MN, Harik LR, et al. : Spectrum of epithelial neoplasms in end-stage renal disease : an experience from 66 tumor-bearing kidneys with emphasis on histologic patterns distinct from those in sporadic adult renal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2006; 30 : 141-153.
- 6) Foshat M, Eyzaguirre E : Acquired Cystic Disease-Associated Renal Cell Carcinoma: Review of Pathogenesis, Morphology, Ancillary Tests, and Clinical Features. *Arch Pathol Lab Med* 2017; 141: 600-606.
- 7) Kondo, T, et al. : Acquired cystic disease-associated renal cell carcinoma is the most common subtype in long-term dialyzed patients : Central pathology results according to the 2016 WHO classification in a multi-institutional study. *Pathol Int* 2018; 68: 543-549.
- 8) Ishikawa I : Renal cell carcinoma in dialysis patients : Radiological imaging and pathology of renal cell carcinoma complicated with acquired cystic disease of the kidney. *Malign Tumours* 2010; 1 : 21-31.
- 9) Ishikawa I, Morita K, Hayama S, et al. : Imaging of acquired cystic disease-associated renal cell carcinoma by contrast-enhanced ultrasonography with perflubutane microbubbles and positron emission tomography-computed tomography. *Clin Exp Nephrol* 2011; 15 : 136-140.
- 10) Martin M : Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet. journal* 2011; 17 : 10-12.
- 11) Schmieder R, Edwards R : Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics* 2011; 27 : 863-864.
- 12) Trapnell C, Pachter L, Salzberg SL : TopHat : discovering

- splice junctions with RNA-Seq. *Bioinformatics* 2009; 25 : 1105–1111.
- 13) Trapnell C, Williams BA, Pertea G, et al. : Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol* 2010; 28: 511–515.
- 14) Pan CC, Chen YJ, Chang LC, et al. : Immunohistochemical and molecular genetic profiling of acquired cystic disease-associated renal cell carcinoma. *Histopathology* 2009; 55: 145–153.
- 15) Kuntz E, Yusenkov MV, Nagy A, et al. : Oligoarray comparative genomic hybridization of renal cell tumors that developed in patients with acquired cystic renal disease. *Hum Pathol* 2010; 41: 1345–1349.
- 16) Inoue T, Matsuura K, Yoshimoto T, et al. : Genomic profiling of renal cell carcinoma in patients with end-stage renal disease. *Cancer Sci* 2010; 103 : 569–576.
- 17) Kuroda N, Yamashita M, Kakehi Y, et al. : Acquired cystic disease-associated renal cell carcinoma: an immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization study. *Med Mol Morphol* 2011; 44 : 228–232.
- 18) Kuroda N, Naroda T, Tamura MA, et al. : Acquired cystic disease-associated renal cell carcinoma : a clinicopathological study of seven cases. *Pol J Pathol* 2017; 68 : 306–311.
- 19) Shah A, Lal P, Toorens E, et al. : Acquired Cystic Kidney Disease-associated Renal Cell Carcinoma (ACKD-RCC) Harbor Recurrent Mutations in KMT2C and TSC2 Genes. *Am J Surg Pathol* 2020; doi: 10.1097/PAS.0000000000001530.
- 20) Varki A : Glycan-based interactions involving vertebrate sialic-acid-recognizing proteins. *Nature* 2007; 446 : 1023–1029.
- 21) Schnaar RL, Gerardy-Schahn R, Hildebrandt H : Sialic acids in the brain: gangliosides and polysialic acid in nervous system development, stability, disease, and regeneration. *Physiol Rev* 2014; 94 : 461–518.
- 22) Miyazaki K, Ohmori K, Izawa M, et al. : Loss of disialyl Lewis(a), the ligand for lymphocyte inhibitory receptor sialic acid-binding immunoglobulin-like lectin-7 (Siglec-7) associated with increased sialyl Lewis(a) expression on human colon cancers. *Cancer Res* 2004; 64 : 4498–4505.
- 23) Kaburagi T, Kizuka Y, Kitazume S, et al. : The Inhibitory Role of  $\alpha$ 2,6-Sialylation in Adipogenesis. *J Biol Chem* 2017; 292 : 2278–2286.
- 24) Zhu L, Tang W, Li G : Interaction between variants of two glycosyltransferase genes in IgA nephropathy. *Kidney Int* 2009; 76 : 190–198.
- 25) Anthony RM, Kobayashi T, Wermeling F, et al. : Intravenous gammaglobulin suppresses inflammation through a novel T (H)2 pathway. *Nature* 2011; 475 : 110–113.
- 26) Schwarz F, Fong JJ, Varki A : in *Advances in Experimental Medicine and Biology : Biochemical Roles of Eukaryotic Cell Surface Macromolecules*. Springer International Publishing, Cham, 2015; 1–16.
- 27) Stanczak MA, Siddiqui SS, Trefny MP, et al. : Self-associated molecular patterns mediate cancer immune evasion by engaging Siglecs on T cells. *J Clin Invest* 2018; 128 : 4912–4923.
- 28) Wang J, Sun J, Liu LN, et al. : Siglec-15 as an immune suppressor and potential target for normalization cancer immunotherapy. *Nat Med* 2019; 25 : 656–666.
- 29) Moriwaki K, Noda K, Nakagawa T, et al. : A high expression of GDP-fucose transporter in hepatocellular carcinoma is a key factor for increases in fucosylation. *Glycobiology* 2007; 17 : 1311–1320.