

# PCR法による ヒト悪性腫瘍関連抗原遺伝子の発現解析

免疫細胞検査室<sup>1</sup>, 消化器外科<sup>2</sup>

岡田真一<sup>1</sup>, 高源ゆみ<sup>1</sup>, 杉村英一<sup>1</sup>, 古川隆二<sup>1</sup>, 有賀 淳<sup>2</sup>

# 目的

近年、ヒト悪性腫瘍関連抗原の同定が急速に進み、様々な抗原遺伝子の発現が解析されている。抗原遺伝子の塩基配列を基にヒトHLA型に結合可能な部位を合成したペプチドは、悪性腫瘍特異的免疫応答を体内で誘導できる可能性が考えられており、がんペプチドワクチンとしての臨床試験が実施されている。抗原遺伝子発現は均一ではないため、個々の腫瘍に発現する抗原遺伝子を解析してワクチンを選択することが必要であり、今回我々はヒト悪性腫瘍における抗原遺伝子発現のスクリーニング法の開発を試みた。

# サンプルからのRNA抽出方法

健常人末梢血単核細胞(PBMC)、ヒト胆嚢癌株(AG)、新鮮ヒト肝内胆管癌組織よりQIAGEN RNeasy Mini Kitを使用してRNAを抽出した。

1. 集めた細胞を2500rpm、5分間室温にて遠心する
2. 上清を捨てLysing Buffer 1ml を加え2500rpm、5分間室温にて遠心する
3. 上清を捨てPBS Buffer を5ml加え2500rpm、5分間室温にて遠心する
4. 上清を捨てbuffer RLT 1200 $\mu$ l加えボルテックスする
5. サンプルを1.5mlエッペンチューブに移して12000rpm、3分間室温にて遠心する
6. 上清を新しいエッペンチューブに移す
7. 70%エタノール600 $\mu$ l加えボルテックスし2000rpm室温にてスピンドウン
8. 2ml collection tube にのせたRNeasy mini columnに入れ10000rpm 1分間遠心する
9. collection tube内の濾液を捨てる
10. 残りのサンプルをRNeasy columnに入れ10000rpm 1分間遠心する
11. collection tube内の濾液を捨てる
12. buffer RW1 700 $\mu$ lをRNeasy columnに加え10000rpm 1分間遠心する
13. 新しい2ml collection tubeにRNeasy mini columnを移す
14. buffer RPE 500 $\mu$ lをRNeasy column加え10000rpm 1分間遠心する
15. collection tube内の濾液を捨てる
16. buffer RPE 500 $\mu$ lをRNeasy column加える12000rpm 2分間遠心する
17. 新しいエッペンチューブにRNeasy columnを移す
18. RNase free water 50 $\mu$ lをメンブレンに添加し1分間静置する
19. 10000rpm 1分間遠心する。RNAが抽出される

# PCRプロトコール(1)

## 1 マスターミックスを表に従って調製する

表 QIAGEN OneStep RT-PCRの反応成分

成分	容量／反応
マスターミックス	
RNaseフリー水	適量
5x QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer	10.0 $\mu$ l
dNTP Mix	2.0 $\mu$ l
プライマーF	1.0 $\mu$ M
プライマーR	1.0 $\mu$ M
QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix	2.0 $\mu$ l
RNAテンプレート	50ng/ $\mu$ l
トータル容量	50.0 $\mu$ l

腫瘍関連抗原のプライマーにDEPDC1及びLY6K(URLC10)、コントロールのプライマーにGAPDH及びACTBを使用した。

# PCRプロトコール (2)

- 2 マスターミックスを十分に混ぜ、PCRチューブに適量分注する
- 3 RNAテンプレートを各PCRチューブに添加する。
- 4 サーマルサイクラーを次のようにプログラムする

50°C 30分



95°C 15分



94°C 30秒

56°C 30秒

72°C 1分

} X40サイクル



72°C 10分

- 5 電気泳動する

# 健常人末梢血単核細胞 (PBMC) における癌抗原の発現状況

健常人末梢血単核細胞 (PBMC)



DEPDC1: DEP domain containing 1

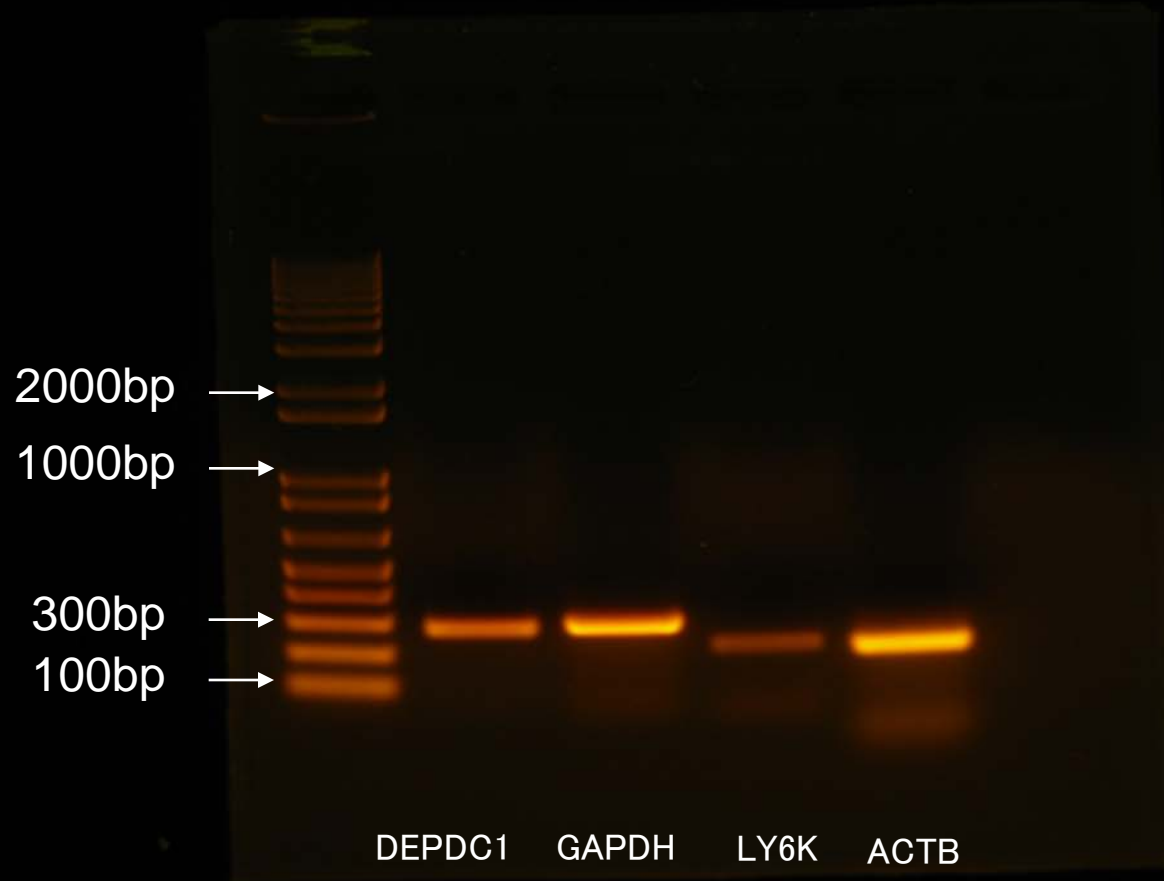
LY6K: Lymphocyte antigen 6 complex locus K

GAPDH, ACTB: ハウスキーピング遺伝子で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り、実験の陽性コントロールとして使用される。

元来DEPDC1, LY6Kは胆道腫瘍、肺癌、膀胱癌、食道癌などに発現している癌抗原であり、健常人末梢血単核細胞には発現していない。

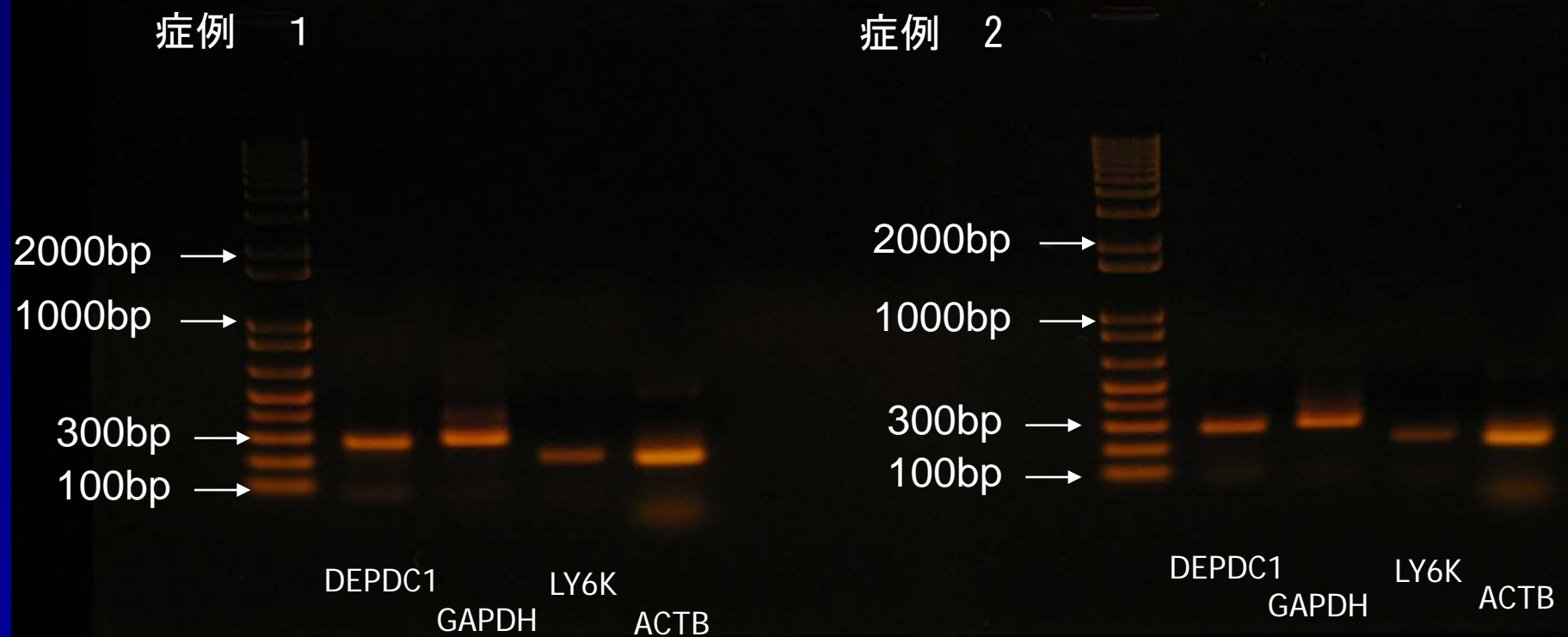
# ヒト胆嚢癌株(AG)における癌抗原の発現状況

ヒト胆嚢癌株(AG)



# 新鮮ヒト肝内胆管癌組織における癌抗原の発現状況

## 新鮮ヒト肝内胆管癌 組織





# 結語

RT-PCR法にてヒト悪性腫瘍関連遺伝子 DEPDC1及びLY6Kの発現解析が可能であった。今後、ペプチドワクチン対象抗原（現在10種類）の発現をスクリーニングする検査法を実用化することにより、個々の患者に最適なワクチンの選択が可能となると期待される。