

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：15501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14586

研究課題名（和文）リキッドバイオプシーに基づく犬腫瘍性疾患の早期診断法に関する研究

研究課題名（英文）Research for early detection of canine tumor based on liquid biopsy

研究代表者

上林 聡之（Kabayashi, Satoshi）

山口大学・共同獣医学部・助教

研究者番号：50796414

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、健常犬および症例犬より血液を採取し、血漿に微量に含まれるDNAを抽出しその濃度を比較することで、犬の腫瘍のバイオマーカーとして利用できるかを調査した。腫瘍罹患犬は健常犬と比較して有意に高いDNA濃度を示すことが明らかとなった。また、DNA濃度は炎症マーカーであるCRPの検査値と有意に相関していることが明らかとなった。さらに、DNA濃度はリンパ系悪性腫瘍で特に高値を示していた。しかしながら、過去の報告と異なり、転移の有無とcfDNA濃度の間に相関性は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果より、犬のcfDNA濃度測定が腫瘍性疾患の早期発見に役立つ可能性が示唆された。この手法の利点は、必要なものが血液のみであるため、患者への侵襲性を低減できること、そして繰り返しの検査が可能であることである。腫瘍の遺伝子変異の検出も可能であるため、将来的な応用の可能性も期待できると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we aimed to develop a biomarker for canine tumor. Small amount of DNA in patients' and healthy dogs' plasma were extracted. Then DNA concentration was compared between those two groups.

Higher concentration of DNA was shown in tumor group compared to healthy group. DNA levels were correlated with CRP, an inflammation marker. Furthermore, particularly in lymphoid tumor such as lymphoma or acute lymphocytic leukemia showed higher DNA concentration. However, unlike previous reports, no correlation was found between the presence of metastasis and DNA concentration.

研究分野：獣医学

キーワード：獣医学 腫瘍 早期診断 リキッドバイオプシー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

獣医学の発展に伴い、犬における腫瘍性疾患を原因とする死亡率は増加している。腫瘍の発見は遅れがちで、来院時には既に相当進行した状態であり、治療の施しようのない場合もある。そのため、より簡便に、早期で腫瘍性疾患を発見する手法が望まれている。近年、人医学領域では、血漿等の体液成分中に含まれる微小な腫瘍由来材料を用いた、リキッドバイオプシーの概念が発達している。この手法の利点は、侵襲性が低く、繰り返し検査を行うことができるという点にある。一方で、獣医学分野におけるリキッドバイオプシーの研究はほとんど行われておらず、その有用性が評価されていなかった。

2. 研究の目的

腫瘍罹患犬より採取した血漿より、cell-free DNA (cfDNA) を分離し、健常犬と比較することで、腫瘍性疾患の早期診断バイオマーカーとして利用可能かを明らかにすること。

3. 研究の方法

山口大学動物医療センターを受診した腫瘍性疾患の犬より、飼い主の同意を得た上で血液を 5ml 採取し、ただちに血漿を分離する。分離した血漿は -80 で保存し、QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit を用いて cfDNA を抽出する。抽出した DNA は dsDNA 特異的な検出により、濃度を測定する (Qubit 3.0, Thermo Fischer Scientific)。

4. 研究成果

2018 年 6 月から 2020 年 3 月まで検体を採取した。総数は 69 頭で、健常群 12 頭、症例群 57 頭 (非腫瘍性疾患 9 頭、腫瘍性疾患 48 頭) であった。症例の雌雄、年齢、体重、C 反応性蛋白 (CRP) との相関性を解析したところ、cfDNA 濃度は CRP と相関があることが明らかとなった (表 1)。健常群、症例群における cfDNA 濃度の中央値はそれぞれ、0.299ng/μl、0.481ng/μl であり、2 群の間には有意差が認められた (図 1)。

Disease group

cfDNA [ng/μL]	Age [month]	BW [kg]	CRP [mg/dL]
0.481 (0.103-25.6)	130 (45-174)	7.98 (3.6-28)	0.8* (0.00-20)

cfDNA concentration in disease group

• P < 0.05
Spearman's rank correlation coefficient

表 1. 疾患群の各パラメータ

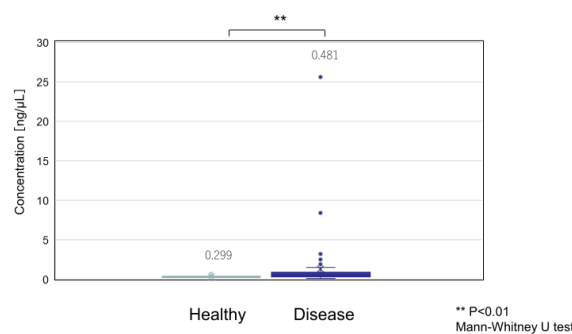


図 1. 健常群と疾患群の cf 濃度の比較

良性腫瘍と悪性腫瘍の比較では、cfDNA 濃度に有意差は認められなかった。一方、悪性腫瘍をその由来から上皮系、非上皮系、血液系 (独立円形細胞系) に分けて解析を行ったところ、血液系の悪性腫瘍はその他の悪性腫瘍より有意に高い cfDNA 濃度を示すことが明らかとなった (図 2)。過去の報告において転移の有無は cfDNA の放出と相関することが示されているが、本研究では転移との関連性は認められなかった (図 3)。

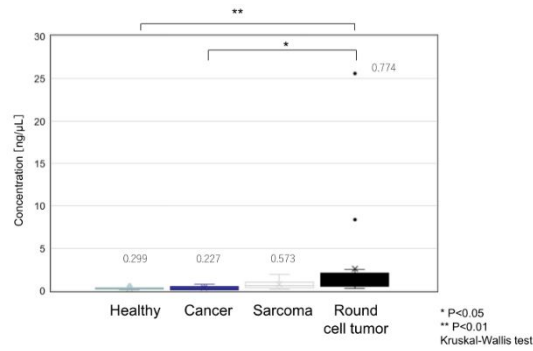


図 2. 健常群と各悪性腫瘍の cfDNA 濃度の比較

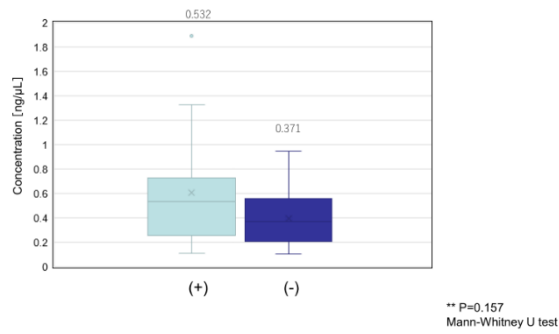


図 3. 転移の有無による cfDNA 濃度の比較
(+)は転移あり、(-)は転移なしを表している

以上の結果より、犬の cfDNA 濃度の測定は、特に血液系の腫瘍において、バイオマーカーとして利用可能であることが示唆された。今後は症例数を増やして上皮系腫瘍・間葉系腫瘍における cfDNA 濃度の意義を探索するとともに、リンパ腫症例より得られた cfDNA を材料として、PCR による遺伝子再構成の検出が可能かを調査する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----