

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：17701

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21375

研究課題名(和文)エクソソームとcfDNAを利用した腫瘍の超特異的&超高感度診断法の開発と臨床実証

研究課題名(英文)Rapid and specific diagnosis for tumor using exosome and cfDNA

研究代表者

三浦 直樹(Miura, Naoki)

鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・教授

研究者番号：80508036

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍特異的エクソソーム解析では、犬乳腺腫瘍の転移に関連して発現の減少など、各細胞株間で表面レクチンの発現の違いが見られた。エクソソーム含有RNA解析では、転移巣と原発巣の犬のメラノーマの細胞株に特異的な変化を確認した。犬の臨床サンプルでエクソソーム含有標的マイクロRNAが症例でどの程度の感度と特異度があるかを確認した。さらに、マイクロRNA以外のnon-coding RNAの含有に関しても、特異性を発見し報告した。腫瘍特異的cfDNA解析では、犬メラノーマ組織でSNPsを次世代シーケンスで選別し、4種類の全く新規SNPsを選別し変異を確認したが、臨床サンプルでは変異を確認できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、獣医臨床領域では初めてとなるエクソソームの腫瘍特異的な表面レクチンの発現の違いを確認できた。この結果は、今後、腫瘍マーカーのより選択的な選別の一助となると同時に、エクソソームを利用したDDSの標的ともなる。次にエクソソームに特異的に含有されるnon-coding RNAの網羅的解析から、腫瘍に特異的な発現含有パターンを確認することができ、今後の臨床バイオマーカーとして、より適切な指標が作成可能となる。特に転移病変と原発病変の細胞から分泌されるエクソソームの違いを確認できたことで、腫瘍のより選択的な病態の把握が可能となる。

研究成果の概要(英文)：Tumor-specific exosome analysis revealed differences in surface lectin expression between cell lines, including decreased expression associated with canine mammary tumor metastasis. Exosome-containing RNA analysis identified specific changes in metastatic and primary canine melanoma cell lines. Clinical canine samples were used to determine the sensitivity and specificity of exosome-containing target microRNAs in case-control studies. In addition, we found specificity for the inclusion of non-coding RNAs other than microRNAs and reported the results. In tumor-specific cfDNA analysis, we selected SNPs in canine melanoma tissues by next-generation sequencing and confirmed mutations in four completely novel SNPs. Still, we could not confirm mutations in clinical samples.

研究分野：臨床獣医学

キーワード：犬 エクソソーム non-coding RNA cfDNA 腫瘍

1. 研究開始当初の背景

研究代表者はこれまでの科研費課題で犬腫瘍を含む動物の疾患関連マイクロ RNA 発現解析を行ってきた (*FEBS J.*2019, *Oncol Rep.* 2019, *Int J Mol Sci* 2019, *Oncol Lett* 2019, *Vet Comp Oncol* 2018, *J Anim Sci.* 2017, *PLoS One.*2017). この数年、腫瘍学では small RNA 分子であるマイクロ RNA が腫瘍発生に重要な役割を担うことが知られている。さらに、血液癌マーカーとしてマイクロ RNA が着目され、腫瘍特異的な血中マイクロ RNA の報告は多くある。血中マイクロ RNA の多くはエクソソームと呼ばれる小胞体に含まれ、腫瘍を含む様々な細胞から分泌される。

近年では液体バイオプシー (Liquid Biopsy: 腫瘍組織バイオプシーに対して、体液(血液, 尿, 脳脊髄液など)に含まれる物質を利用して病態を診断する) が盛んに研究されているが、Liquid biopsy で腫瘍を診断するためには、特定の腫瘍に限定的な分子の発見が必須である。つまり、血液中の腫瘍に特異的な分子を特定する“より選択的で、より特異的な分子”が必要である。さらに、その分子の生物活性(癌悪性化や転移)機序を解明することは、革新的な治療に繋がる。

腫瘍の Liquid Biopsy の代表として、腫瘍由来エクソソームや循環腫瘍細胞の検出が試みられているが、現状ではこれらの方法には限界がある。特に特定の腫瘍由来のものを的確に同定することが困難で問題である。これまでに、腫瘍由来エクソソームの接着分子の発現パターンと転移が関連することは知られているが、未だに的確に、且つ特異的に腫瘍由来エクソソームの分離は難しい。また、腫瘍由来細胞の検出の代わりに循環 cell-free DNA (腫瘍由来 SNPs の検出) も試みられているが、腫瘍に限定されたより特異度の高い新規の SNPs の発見が必要である。

腫瘍は、人医療や獣医医療において、既存の最良の診断・治療法でも克服できていない。動物の腫瘍は自然発症し、マウスなどで人為的に作成したものに比較して人の腫瘍により近い。つまり、犬の腫瘍を利用したより有効な診断・治療ターゲットの探索と臨床外挿は腫瘍研究モデルとして人と動物医療双方に新しい扉を開く。

本申請では獣医臨床腫瘍領域から、人医療にも応用可能な“腫瘍限定変化”の“より選択的な”検出法の開発に未だ人医療、獣医医療の双方で成功していない方法で挑戦する。研究成果によりこの方法が確立されれば、研究対象の腫瘍を追加することで、将来的に多くの腫瘍で、この腫瘍の存在&術後残存&転移の超特異的・超高感度検出法は人医療&獣医医療に共通に応用が可能となる。

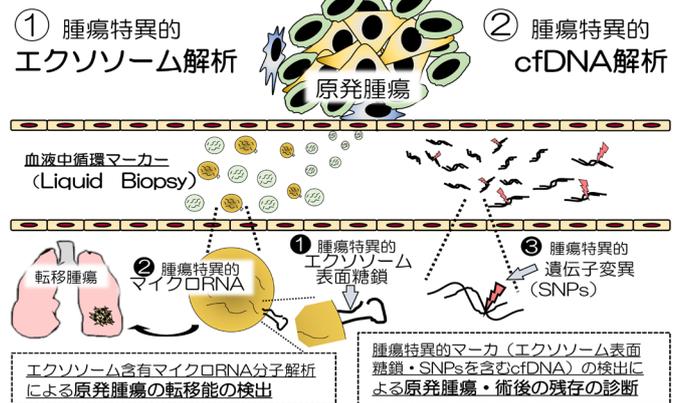
2. 研究の目的

人も動物も腫瘍で問題となるのは、悪性腫瘍の転移、初期腫瘍の検出、術後の残存腫瘍の確認、治療効果の高感度なモニタリング、ではないかと思われる。本研究ではこれらの問題を解決するために血液中に存在する腫瘍関連分子の特性を利用した2つの目的を設定した。

目的1(図中①):腫瘍が分泌するエクソソームの表面の特異的な分子(糖鎖修飾)を利用した選択的分離(図中①)と腫瘍関連エクソソームに含まれるマイクロRNAの同定(図中②)から、腫瘍に特異的な血中循環エクソソームを検出する。既に研究代表者は犬のメラノーマ細胞株を使って、分泌エクソソームに特異的な糖鎖分子の確認を行う。さらに、次世代シーケンス(NGS)でメラノーマ転移株のエクソソーム含有マイクロRNAなどスクリーニングして、このターゲットマイクロRNAの検出法を確立して、転移能や悪性能を予測する。

目的2(図中②):腫瘍では遺伝子の変異(SNPs)が生じることはよく知られている。今回、新規の腫瘍に限定したSNPsを確定し、そのSNPsを含むDNAの断片を循環血中で検出する。特にDNA断片変位の検出感度が非常に高いデジタルPCRを利用して、数コピーの遺伝子から検出することで、超高感度な腫瘍の存在確認に挑む。

腫瘍の超特異的&超高感度診断法への挑戦



3. 研究の方法

(1)腫瘍特異的エクソソーム解析(図中①)

①エクソソーム表面の腫瘍特異的糖鎖の同定と選択的抽出法の確立(図中①)

レクチンアレイで選別したエクソソーム表面の糖鎖を確認、腫瘍の種類などによる違いがあるかを確認する。その後、特異的レクチンを同定して分離を試みる。

②腫瘍関連エクソソーム含有マイクロRNAの同定と活性確認(図中②)

腫瘍細胞株が分泌するエクソソーム中のマイクロRNAをNGSでスクリーニングし、標的マイクロRNAを決定する。このターゲットマイクロRNAの検出法を確立して、転移能や悪性能を予測する。その他、培養条件を変化させることなどで、含有するRNA分子に変化が出るかなども、詳細に解析する。

(2)腫瘍特異的cfDNA解析(図中②)

①血液循環cfDNAの腫瘍特異的SNPsの同定と測定法の確立(図中③)

NGSを利用して腫瘍に特異的限定したSNPsを検出する。検出したSNPsを含むDNA断片を検出する方法を確立する。

(3)Liquid biopsyの実証試験(図中タイトル:腫瘍の超特異的&超高感度診断法への挑戦)

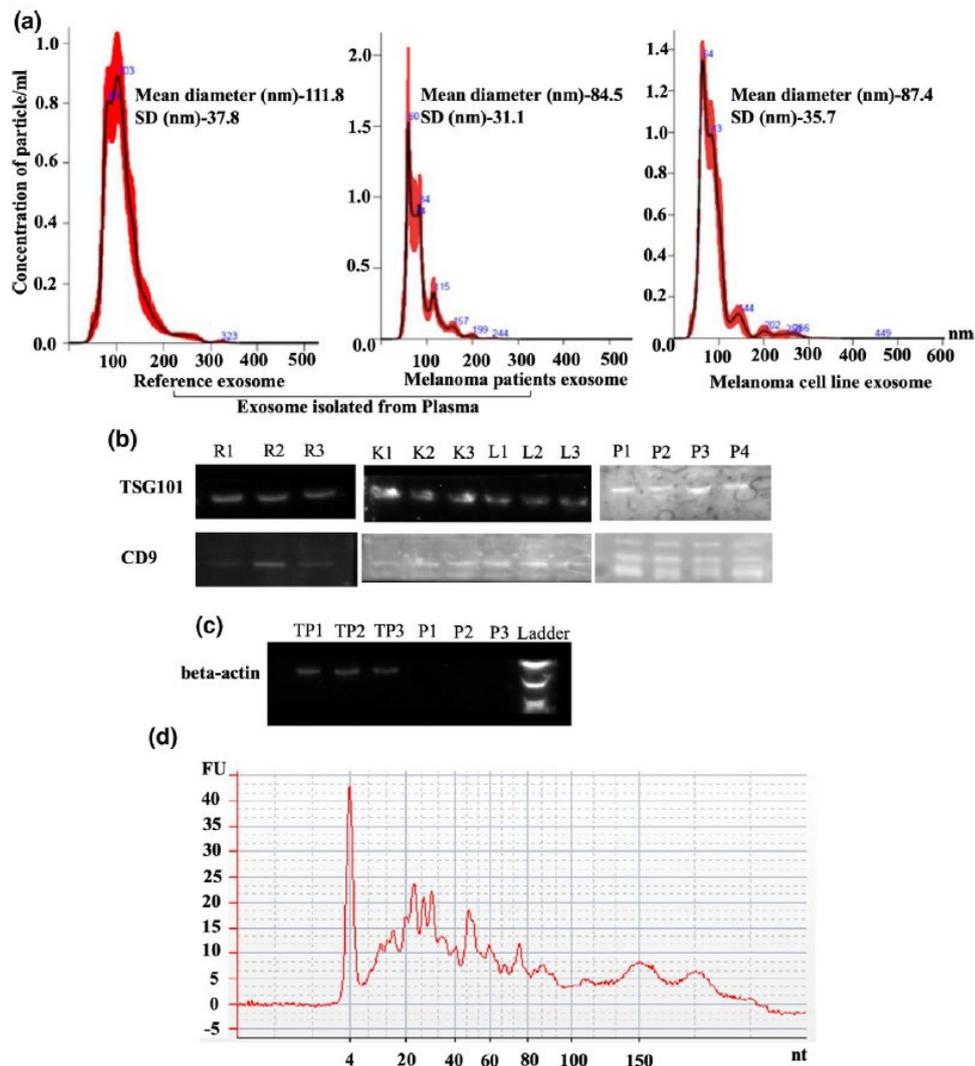
①Liquid biopsyとしてエクソソームとcfDNAの臨床サンプルでの調査(図中点線内)

大学の実臨床例で、診断時と手術の前後で、血液を採取して研究で確立した手法で測定を行う。大学の症例のみならず、全国7カ所の開業動物病院(大学院生が院長)でもサンプルを得る。

4. 研究成果

(1)腫瘍特異的エクソソーム表面糖鎖解析では、腫瘍罹患犬と非罹患犬の血中のエクソソームを分離して、レクチンアレイ解析を実施した。その結果、特に犬乳腺腫瘍の転移巣で Sia α 1-2-6Gal の発現の減少が特徴的に捉えられた。その他にも、各細胞株間において表面糖鎖でレクチン特異性の発現の違いが見られた。しかしながら、ある特定の腫瘍のエクソソームのみに発現する超特異的糖鎖は存在せず、ほとんどの糖鎖がまんべんなく発現していた。

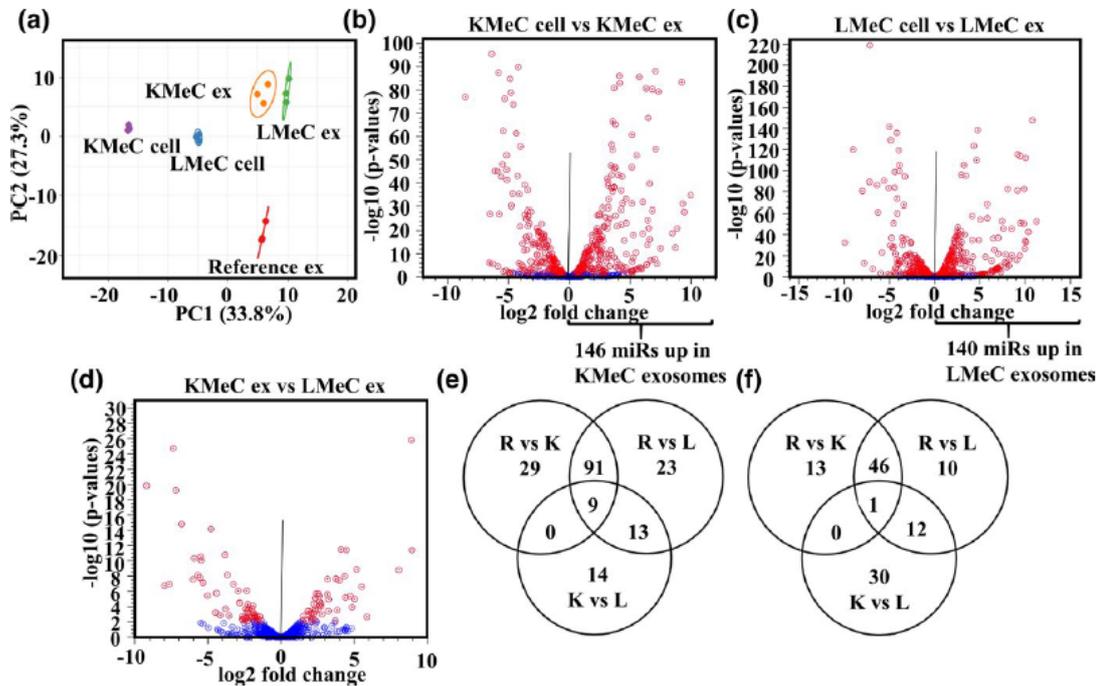
(2) 昨年度に確立した犬の腫瘍関連エクソソームの単離法を利用して、性質の異なる複数の犬のメラノーマの細胞株からエクソソームを分離して解析した。下図に示すように、分離した分子の大きさと(a)、同時に表面抗原も確認し(b, c)、エクソソームの分離が正しく行われていることを証明した。エクソソームから抽出した small RNA 分子(d)も確認した。



(3) 原発巣と転移巣により、腫瘍関連エクソソーム含有マイクロ RNA を NGS でスクリーニングし、標的マイクロ RNA を確認した。犬のメラノーマの細胞株の中で、原発巣から分離された株(原発株:KMeC)とリンパ節転移巣から分離された株(転移株:LMeC)の含有する miRNA をプロファイルした。各細胞株の培養上清中エクソソームが含有する miRNA をプロファイリングした。コントロールとしてはがんではない犬の血漿中のエクソソーム(Reference)とした。

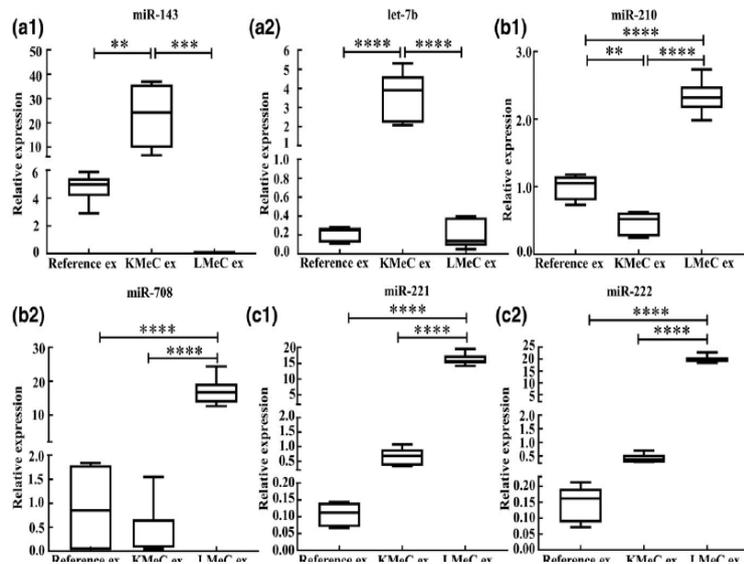
その結果を下図に示す。PCA 解析では Reference のエクソソーム(Reference ex)が最も異なる場所に位置した。次に、細胞株同士、分泌エクソソーム同士がクラスターで近似した(図中の a)。この結果ではコンポーネント 1 はエクソソームの何であら化の特性を反映していると考えられ、コンポーネント 2 はメラノーマという腫瘍に関連した因子があることが可能性として示された。次に非常に興味深いのは、原発巣でも転移巣でも、エクソソームを放出する親細胞と放出されたエクソソームの含有する miRNA が結構異なっている点である。このことは、図中の(b)と(c)の比較が示す結果である。この発見は、人の腫瘍や組織サンプルではいくつかの細胞で知られていることであるが、メラノーマでは人も含めて、私の知る限り最初の観察で、

その後、人のメラノーマでも同様の現象が報告されている。また、原発巣と転移巣から出てくる EVs の含有 miRNA は大きく異なり、腫瘍の性質に依存した miRNA 含有エクソソームが放出されることを動物のがんでも証明した。



また、各細胞株で異なる発現パターンを示す microRNA を確認した(右図)。原発巣由来細胞株でのみ増加する miR-143 let7b や転移巣由来細胞株でのみ増加する miR-210 や miR-708, 原発巣、転移巣と段階的に増加する miR-221 や miR-222 などが確認された。

さらに、犬の臨床サンプルでエクソソーム含有



標的マイクロ RNA の臨床診断能を検討し報告した。さらに、マイクロ RNA 以外の non-coding RNA の含有に関しても、特異性を発見した。

(4)腫瘍特異的 cfDNA 解析では、犬メラノーマ組織で共通に変異した SNPs を次世代シーケンスで選別し、4 種類の全く新規のターゲットの SNPs を選別できた。ターゲット SNPs に対するデジタル PCR とリアルタイム PCR で使用可能なプライマー&プローブセットを独自にデザインした。デザインしたプライマー&プローブセットの特異性を一度にすべて確認するためのポジコンとネガコン配列も独自に設計し、確認した。ポジコンとネガコンではすべての反応は上手くできた。しかしながら、選出した SNPs は細胞株では変異を確認することはできなかった。今後、選出方法の再確認とさらに多くの臨床サンプルでの確認が必要となる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Husna Al Asmaul, Rahman Md Mahfuzur, Lai Yu Chang, Chen Hui Wen, Hasan Md Nazmul, Nakagawa Takayuki, Miura Naoki	4. 巻 34
2. 論文標題 Identification of melanoma specific exosomal miRNAs as the potential biomarker for canine oral melanoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pigment Cell & Melanoma Research	6. 最初と最後の頁 1062 ~ 1073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pcmr.13000	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Iwanaga Tomoko, Fukushima Ryuji, Nagasato Tomoka, Maruyama Ikuro, Miura Naoki	4. 巻 33
2. 論文標題 Analysis of blood clotting with the total thrombus analysis system in healthy dogs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Veterinary Diagnostic Investigation	6. 最初と最後の頁 357 ~ 361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1040638721991862	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Chen Hui-Wen, Lai Yu-Chang, Rahman Md Mahfuzur, Husna Al Asmaul, Hasan MD Nazmul, Miura Naoki	4. 巻 818
2. 論文標題 Micro RNA differential expression profile in canine mammary gland tumor by next generation sequencing	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 146237 ~ 146237
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2022.146237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Husna Al Asmaul, Rahman Md Mahfuzur, Chen Hui Wen, Hasan Md Nazmul, Nakagawa Takayuki, Miura Naoki	4. 巻 in press
2. 論文標題 Long non coding RNA and transfer RNA derived small fragments in exosomes are potential biomarkers for canine oral melanoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Veterinary and Comparative Oncology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/vco.12818	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Hino Y, Rahman MM, Lai YC, Husna AA, Chen HW, Nakagawa T, and Miura N	4. 巻 782
2. 論文標題 Hypoxic miRNAs expression are different between primary and metastatic melanoma cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 145552
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.gene.2021.145552	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwanaga T, Fukushima R, Nagasato N, Maruyama I and Miura N	4. 巻 33
2. 論文標題 Analysis of blood clotting with the total thrombus analysis system in healthy dogs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 J Vet Diagn Invest	6. 最初と最後の頁 357-361
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1177/1040638721991862	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 6件)

1. 発表者名 Md. Nazmul Hasan, Al Asmaul Husna, Md Mahfuzur Rahman, Hui-Wen Chen, Naoki Miura,
2. 発表標題 Long non-coding RNA derived small RNA fragments in canine mammary malignant tumor
3. 学会等名 SaSSOH 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yasunori Hino, Md. Mahfuzur Rahman, Al Asmaul Husna, Hui-Wen Chen, Md. Nazmul Hasan, Takayuki Nakagawa and Naoki Miura
2. 発表標題 Hypoxic non-coding RNA signature in canine oral melanoma
3. 学会等名 SaSSOH 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Miura N
2. 発表標題 The application of small non-coding RNA in the veterinary field. Primarily focus the transcriptome analysis in canine tumor and bovine mastitis
3. 学会等名 26th Annual International Scientific Conference (ASCon XXVI) Bangladesh Society for Veterinary Education and Research (BSVER) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Al Asmaul Husna, Md. Mahfuzur Rahman, Yu-Chang Lai, Hui-Wen Chen, Md. Nazmul Hasan, 中川貴之、三浦直樹
2. 発表標題 Exosomal miRNAs profile in canine oral melanoma
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hui-Wen Chen, Yu-Chang Lai, Md. Mahfuzur Rahman, Al Asmaul Husna, Md. Nazmul Hasan, 畑井仁、三好宣彰、三浦直樹
2. 発表標題 MicroRNAs differential expression profile in Canine Mammary Gland Tumor by Next-Generation Sequencing
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩崎隆、Md. Mahfuzur Rahman, Yu-Chang Lai, Al Asmaul Husna, Hui-Wen Chen, Md. Nazmul Hasan, 野崎信裕、畑井仁、三好宣彰、三浦直樹
2. 発表標題 MicroRNA transcriptome profile of canine hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名	Md. Mahfuzur Rahman、Yu-Chang Lai、Al Asmaul Husna、Hui-Wen Chen、Md. Nazmul Hasan、中川貴之、三浦直樹
2. 発表標題	Identification of hypoxia-regulated miRNA signature in canine oral melanoma
3. 学会等名	第163回日本獣医学会学術集会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名	Md. Mahfuzur Rahman、Yu-Chang Lai、Al Asmaul Husna、Hui-Wen Chen、Md. Nazmul Hasan、Nobuhiro Nozaki、Naoki Miura
2. 発表標題	DIFFERENTIALLY EXPRESSED MICRORNAS RECOGNIZE FAST AND SLOW PROGRESSING CANINE HEPATOCELLULAR CARCINOMA
3. 学会等名	The 5th International Symposium on Veterinary Science (AJIVE) (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Al Asmaul Husna、Md. Mahfuzur Rahman、Yu-Chang Lai、Hui-Wen Chen、Md. Nazmul Hasan、Naoki Miura
2. 発表標題	IDENTIFICATION OF TUMOR SPECIFIC EXOSOMAL MIRNAS BY PROFILING CANINE ORAL MELANOMA
3. 学会等名	The 5th International Symposium on Veterinary Science (AJIVE) (国際学会)
4. 発表年	2021年

1. 発表者名	Hui-Wen Chen、Yu-Chang Lai、Al Asmaul Husna、Md. Mahfuzur Rahman、Md. Nazmul Hasan、Naoki Miura
2. 発表標題	DOWN-REGULATED MIR-1-3P AND MIR-133 FAMILY IN CANINE MAMMARY GLAND TUMOR
3. 学会等名	The 5th International Symposium on Veterinary Science (AJIVE) (国際学会)
4. 発表年	2021年

〔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
研究分担者	高橋 雅 (Takahashi Masashi) (40750419)	鹿児島大学・農水産獣医学域獣医学系・准教授 (17701)	
研究分担者	古澤 悠 (Furusawa Yu) (30791793)	鹿児島大学・共同獣医学部・特任助教 (17701)	
研究分担者	畑井 仁 (Hatai Hitoshi) (40566535)	岩手大学・農学部・特任教授 (11201)	
研究分担者	川原 幸一 (Kawahara Ko-ichi) (10381170)	大阪工業大学・工学部・教授 (34406)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------