

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08618

研究課題名（和文）涙液を用いた新しい乳癌早期診断法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a new breast cancer early diagnosis method using tear fluid

研究代表者

國久 智成 (Kunihisa, Tomonari)

神戸大学・医学部附属病院・特命講師

研究者番号：50839800

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）：早期乳癌診断のためのリキッドバイオプシーの手法としてエクソソームなどの細胞外小胞を超高感度に検出する方法として竹内らの開発したTearExo法を用いた共同研究をおこなっている。TearExo法は、細胞外小胞の表面に発現しているタンパク質に対する抗体と蛍光レポーター分子を導入したナノ空孔をもつセンサチップを用いて、細胞外小胞を自動分析する方法である。今後TearExo法の臨床応用に向けて、より多くの検体を用いた精度の検証を行うために目標症例数を100例とし、神戸大学の倫理委員会の承認を得て、かつ涙液のサンプリングを行うことができた。安定した基板の大量生産が必要であることが判明し、取り組んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳癌は女性のがんの中では一番罹患者数が多く、また他のがんに比べて比較的若くに発症することなどの特徴を持つ疾患である。一方乳癌は検診などによる早期発見によって、早期治療介入につながり、予後が改善することがわかっている。一般的に乳癌の早期発見のために、マンモグラフィを用いた検診が行われている。研究者らはマンモグラフィよりも簡便、低侵襲、高感度な検査方法を模索するうちに、涙液中に乳癌由来のマイクロRNAが含まれていることを発見した。次に涙液中の乳癌由来物質の中で、より特異性の高い物質として細胞外小胞に着目し、これを使って低侵襲、高感度の乳癌早期診断の治療法の開発を目指している。

研究成果の概要（英文）：We are conducting joint research using the TearExo method developed by Takeuchi et al., which is a liquid biopsy method for early breast cancer diagnosis that detects extracellular vesicles such as exosomes with ultrahigh sensitivity. The TearExo method is a method for automatically analyzing extracellular vesicles using a sensor chip with nanopores into which antibodies against proteins expressed on the surface of extracellular vesicles and fluorescent reporter molecules are introduced. In order to verify the accuracy of the TearExo method using a larger number of specimens, we have set a target number of 100 cases for clinical application of the TearExo method, obtained approval from the Ethics Committee of Kobe University, and conducted tear sampling. We have found that mass production of stable substrates is necessary for data analysis, and we are working on this.

研究分野：breast cancer

キーワード：breast cancer early diagnosis tear liquid biopsy exosome extracellular vesicles

1. 研究開始当初の背景

乳癌は日本人女性の中で最も多いがんであり、その患者数、死亡者数は増え続けている。また乳癌の発症年齢のピークが50歳前後と欧米に比べて若いことも、社会問題となっている。乳癌検診は一般的にマンモグラフィを用いて行われているが、この方法は、X線を用いた画像撮影を行うことから、医師が読影する必要があるため検診コストが高い。検査は強い痛みを伴う場合もあり、また、予約も取りにくいなど検診に対する障壁も高く、日本では検診受診率が40%程度と低迷する原因になっている。

また、マンモグラフィで写し出す乳房は皮膚、乳腺組織と脂肪から構成されるが、特にアジア人の若い女性に多く見られる、乳腺の密度が高く、乳腺内に含まれる脂肪の少ない高濃度乳腺は、不鮮明なマンモグラフィ像を与え、正確な乳がんの診断を困難にしている。高濃度乳腺の場合、マンモグラフィによる検診では非高濃度乳腺と比べ感度・特異度が低く、発見される腫瘍が大きい。そのため超音波検査を併用した検診も検証されているが、コスト、精度管理、煩雑さなどが問題となっている。

体液を用いて簡便・迅速に疾病の診断が行えるリキッドバイプシーの技術は、高い注目を集めている。残念ながら、乳癌においては、感度と特異度の高いバイオマーカーはこれまで見つかっておらず、乳癌のリキッドバイプシーは、未だ開発されていない。

我々の研究室では癌の早期発見、治療効果の評価、再発のリスク評価のリキッドバイプシーのターゲットとして涙液に着目している。まず健常ボランティアの涙液と血清中のエクソソームをウエスタンブロッティングによる抗CD9抗体、抗CD63抗体で検出すると涙液のエクソソームマーカー(CD9、CD63)の発現が有意に高かった。これはエクソソームを検出する精製過程で夾雑物を除去するために超遠心分離を行うが、もともと血清よりも涙液の方が他の夾雑物が少ないので、精製過程で除去されるエクソソームが少ないのではないかと推測している。また乳癌患者と健常者の涙液エクソソームの中に含まれているmicroRNAを比較するとmiR-21とmiR-200cの相対量は乳癌患者の方が健常者よりも統計学的に有意に多いことが判明した。これは世界で初めて涙液から乳癌由来物質が検出されることを証明した報告である(Inubushi et al. *Anticancer Res.*2020;40(6):3091-3096)。

乳癌患者から採取した涙液から分離したエクソソーム中に乳癌由来のmiRNAを発見し、最近、癌細胞から放出されるエクソソームなどの細胞外小胞が、癌の悪性化や転移に関与していることが報告され、様々な癌を検出するためのバイオマーカーとして期待されている。現在、細胞外小胞の検出は、免疫測定法(ELISA)や内包するマイクロRNA測定により行われているが、超遠心やサイズ排除クロマトグラフィーなどの前処理を必要とし、必ずしもリキッドバイプシーのツールとして満足のいくものとは言い難い。

2. 研究の目的

乳癌の新たな診断法として、細胞外小胞を腫瘍マーカーとした超高感度で選択性の高い乳癌のリキッドバイプシーを確立する。本研究では、血液、その他の体液より夾雑物が少なく採取も容易な涙液に着目し、涙液中の細胞外小胞を用いた乳癌検診のためのリキッドバイプシーを開発することを目的とする。

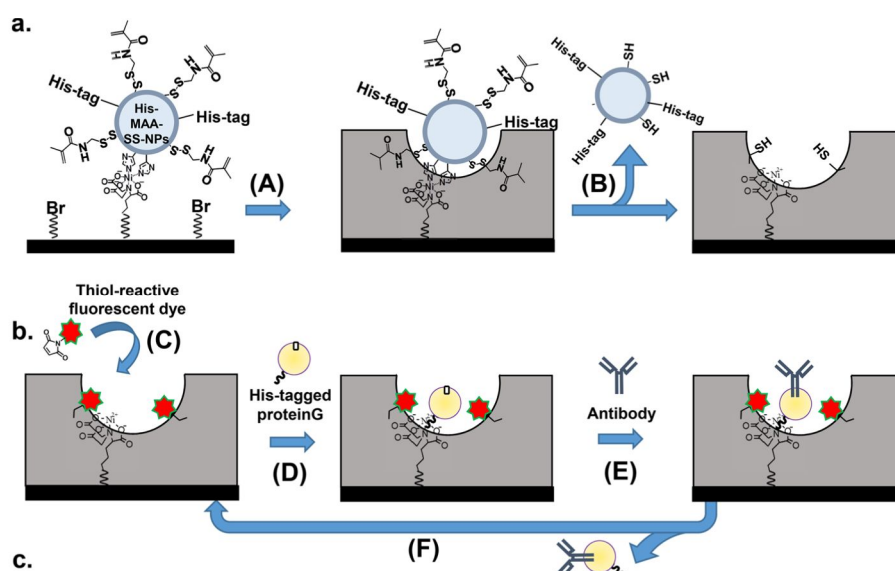
涙液を用いるメリットは複数個ある。第一に先述の通り涙液中には夾雑物が少ないという

ことである。涙の採取を行う際にはドライアイの診断で用いるようなシルマー試験紙を用いて行う。眼瞼結膜にシルマー試験紙を挟んで、濾紙に涙を吸収させる。シルマー試験紙の結膜付着部は切り取って、残りの部分をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）に浸し、涙液の成分を溶出させる。この操作によってタンパク質などの夾雑物は濾過される。次にリキッドバイオプシーでよく用いられる血清や血液は血管穿刺にて採血を行うことから侵襲的手技となり、一般的には病院などの医療機関の医療スタッフが行うことになる。一方シルマー試験紙を用いた採涙であれば医療スタッフでなくともでき、被験者が自ら行うことも可能である。本研究においてはこの涙液を用いて、癌のリキッドバイオプシーをより高精度で簡便に行う方法を検討した結果、神戸大学工学部の竹内研究室で開発中の Tear Exo 法に着目した。その結果、当教室と竹内研究室との合同研究を行うことができるようになった。

3. 研究の方法

再発乳癌のように腫瘍量が多く、多臓器まで転移している乳癌患者と比べ、検診では乳腺内に病変がとどまって、腫瘍量も少ない、小さな乳癌であっても検出できる感受性が必要とされる。そのため、本研究では、竹内らの開発した細胞外小胞を免疫測定法の1000倍の超高感度に検出できる TearExo 法を用いることにし、竹内研究室と共同研究を行うことにした。TearExo 法は、細胞外小胞の表面に発現しているタンパク質に対する抗体と蛍光レポーター分子を導入したナノ空孔をもつセンサチップを用いて、細胞外小胞を超高感度に自動分析する方法である。この手法の特徴は下記の通りである。 除タンパクや超遠心などの前処理が不要； 細胞外小胞表面のタンパク質を認識し、インタクトの細胞外小胞を測定； 超高感度である(市販のELISAキットの約1000倍の感度)； 測定時間が短い(5-30分)

このような従来にはない超高感度測定系による細胞外小胞の迅速な測定は独自性が高く、また、感度の低い従来法では得られなかった、前処理をしていないインタクトの細胞外小胞の正確な情報は、新たな知見につながり、得られる成果は、高い創造性をもつ。



Toshifumi Takeuchi et al. J. Am. Chem. Soc. 2020, 142, 14, 6617-6624

4. 研究成果

乳がん患者の涙サンプルを用いるため、神戸大学の倫理委員会に研究計画書を提出し、承認を得た。その後、神戸大学医学部附属病院および神戸大学医学部附属病院 国際がん医

療・研究センターで手術を行うステージ 0～3C までの乳癌患者(同意の得られた手術予定患者 100 症例) を集めた。対象患者は術前および術後に涙と血清を採取して 4 で保存し、処理を行った後に -80 で凍結保存した。サンプル採取は終わることができたが、TearExo 法による解析に際し、大量の基盤を安定して作成するシステムが必要となったため、そのシステム構築に取り掛かり、基盤の大量供給の体制が構築できた。今後採取したサンプルを解析していく予定である。

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
研究分担者	谷野 裕一 (Tanino Hirokazu) (50285392)	和歌山県立医科大学・医学部・博士研究員 (24701)	
研究分担者	犬伏 祥子 (Inubushi Sachiko) (60585959)	神戸大学・医学研究科・特命講師 (14501)	
研究分担者	竹内 俊文 (Takeuchi Toshifumi) (70179612)	神戸大学・工学研究科・教授 (14501)	

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