

令和 6 年 5 月 27 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：21K08778

研究課題名（和文）涙を用いた大腸癌術後再発早期検出法の開発とその応用

研究課題名（英文）Development and application of an early detection method for postoperative recurrence of colorectal cancer using tears

研究代表者

松田 武（Matsuda, Takeru）

神戸大学・医学研究科・特命准教授

研究者番号：30782734

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、大腸がん患者の血清や涙からエクソソームを分離し、miRNAの発現解析を行うプラットフォームを構築した。また、切除不能な転移性大腸がん患者におけるCDX2の発現低下と予後との関連を明らかにした。今後は症例数を増やし、エクソソーム中のmiRNAやタンパク質の解析を進めることで、再発や転移に関連するバイオマーカーの同定を目指す。さらに、マウスモデルを用いて転移ニッチの解析やエクソソームの役割、転移メカニズムの解明に取り組む。CDX2の発現低下に関連するエクソソームの探索も進め、新たな治療標的の発見につなげていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、大腸がんの予後予測や治療戦略の改善に寄与することが期待される。エクソソームを用いたりキッドバイオプシーによるバイオマーカーの開発は、患者負担の少ない検査法の確立につながる可能性がある。また、転移ニッチの解明や、CDX2の発現低下に関連するエクソソームの同定は、転移の予防や治療法の開発、予後不良患者に対する個別化治療の実現に貢献すると考えられる。本研究で得られた知見は、他のがん種にも応用可能であり、がん研究全体の発展および臨床応用を目指したトランスレーショナルリサーチの推進に寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, a platform was established to isolate exosomes from the serum and tears of colorectal cancer patients and analyze miRNA expression. The research also revealed a correlation between reduced CDX2 expression and poor prognosis in unresectable metastatic colorectal cancer (mCRC) patients. Future aims include increasing sample size, analyzing exosomal miRNAs and proteins to identify biomarkers for recurrence and metastasis, and using mouse models to investigate metastatic niches, exosome roles, and metastasis mechanisms. Exploring exosomes related to reduced CDX2 expression may lead to new therapeutic targets. This study lays the foundation for exosome analysis in colorectal cancer and highlights the association between reduced CDX2 and poor outcomes in unresectable mCRC.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 エクソソーム 術後サーベイランス 早期再発検出 涙 転移ニッチ micro RNA

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大腸癌術後再発は大腸癌全体の 30%に上り、かつ再発となった場合は根治困難である。再発検出には、本邦では術後サーベイランス (術後 5 年間の定期的な CT 検査と腫瘍マーカー採血) が推奨されるが、これらが十分効果的であることを示すエビデンスはない。より侵襲的なサーベイランスによって予後改善するとの報告があり、早期検出の重要性が強調される。CT 検査は転移巣の早期発見には十分な解像能があるとは言えず、頻回の検査は被爆やコストの問題を孕む。腫瘍マーカー検査は、大腸癌全体での平均陽性率は 40-60% 程度に過ぎず、半数近くの再発転移症例の診断には使用できない。大腸癌術後の治療戦略上、より鋭敏な再発検出方法の確立は必須の課題であると考えられた。

このため、バイオマーカー開発が必要である。エクソソームを含む患者体液中の細胞外小胞 (small extracellular vesicles) 内容物をバイオマーカーとして疾患病状を検知する Liquid biopsy への期待は大きい。我々の研究グループは、涙液を用いた新しいがん検知技術 TearExo 法を開発した。これは世界初の化学ナノ加工技術を用い、特殊検出試薬なしの高い操作性と高い測定感度を実現し、微量体液中の細胞外小胞エクソソームを超高感度で検出可能なシステムである。エクソソーム表面に発現するタンパク質抗原に対する抗体を用いた全自動検出システムであり、従来必要であった数時間の前処理は不要で、10 分以内で 100 μ L 中に約 50 個程度のエクソソームを検出できる超高感度・高速測定を達成している。患者自身でも容易に採取可能な涙液を用いて、本法にて乳癌の検知が可能なのは実証済みである。涙液と TearExo 法を用いたがん細胞由来エクソソーム検出は、簡便かつ高感度にごん細胞由来エクソソームを処理・検出・解析できる解析パイプライン構築を可能とし、大規模前向き観察研究の実施をより現実的なものとする期待される。従来のがん関連エクソソームの検出には 12 時間程度を要し、ハイスループット解析システムとしては実用的と言えない状況であった。近年、国立がん研究センターの研究グループが、エクソソーム膜上に存在するタンパク質を異なる修飾が施された 2 種類の抗体 (抗 CD9 抗体 + 抗 CD147 抗体) で挟み込み、血液中から大腸癌特異的エクソソームを短時間で検出する方法を開発した。本法による大腸癌存在診断は CEA や CA19-9 といった従来の腫瘍マーカーよりも信頼性が高く、これにより血液中のエクソソームを用いた大腸癌診断の可能性が示された。

転移指向性ニッチに関連したエクソソーム検出についても検討したい。

2. 研究の目的

涙液由来エクソソームを迅速に集積し、大腸癌術後再発に対して高感度・高特異度を有する臓器特異的再発バイオマーカーを同定する。また、患者特異的再発バイオマーカーの有用性を示す。すなわち、大腸癌の有無に関するエクソソーム検出を行う。次に、大腸癌術後再発の高感度バイオマーカーの開発を、独自開発のがん由来涙液エクソソームを超高感度で検出する TearExo 法を用いて涙液エクソソームによる大腸癌術後サーベイランス法を開発する。

術後サーベイランスの問題点を解決するために、(1) 臓器特異的転移の検出のバイオマーカー、(2) 患者個人の再発検出マーカー、(3) 病勢に関与する MDSC の分化に関与するエクソソームの解析を行う。この革新的な術後サーベイランスシステムの開発は、極めて創造性が高い。

3. 研究の方法

miR-221 など RNA 成分の検出による確認)。採取された exosome を miRNA 検出で確認する。まず、大腸癌細胞株由来エクソソームの単球系細胞 (細胞株 THP-1、末梢血単球細胞) への影響を検討する。この部分は超遠心と ELISA 法で検証する。

次に、大腸癌原発巣切除例組織培養液由来エクソソームと単球系細胞 (THP-1、末梢血単球細胞) への影響を検討する。超遠心と ELISA 法で検証し、RNA シーケンスを行う。さらに、大腸癌原発巣切除例のエクソソーム検出と定量。術前後で TearExo 法の検証を行う。

症例集積に応じて、大腸癌同時性肝転移症例、同時性肺転移症例に対するエクソソーム検出とエクソソーム解析 術前後で TearExo 法でのエクソソーム検証を行う。臓器転移指向性エクソソームの表面抗原の同定にはプロテオミクス解析を行う。転移指向エクソソーム表面抗原の妥当性を検証する。

さらに、原発性大腸癌切除例に対するエクソソーム検出例の集積と観察研究 (術前、術後、3 ヶ月、6 ヶ月、1 年での涙液採取)。採取期間は 1 - 1.5 年を想定している。

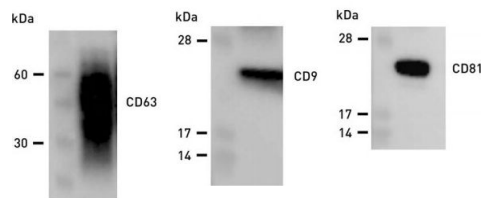
原発性大腸癌切除例における抗体取得とチップ作成と個別化再発マーカーの確認。

以上を段階的に計画を進め、大規模前向き臨床研究へと進める。

4. 研究成果

まず、エクソソーム検出と microRNA 検出のための、妥当性試験を行った。大腸がん細胞株 DLD-1, WiDr, LoVo, SW1116, HCT116, SW480, SW837 からエクソソームを分離し、qPCR で miRNA (miR-

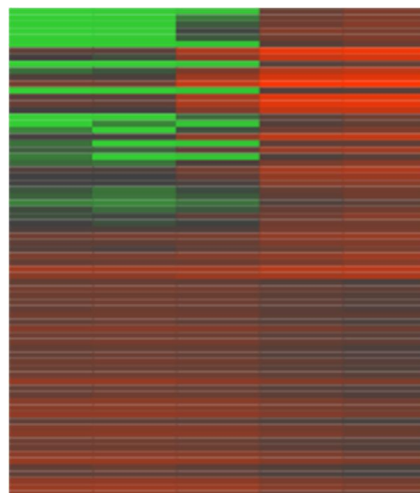
39, miR-21, miR-486-5p, miR-150) の発現を確認することで、エクソソーム検出と miRNA プライマーの精度のチェックを行った。エクソソームマーカーである CD9(24kDa)、CD63(30-60kDa)、CD81(25kDa) の発現も確認し、エクソソームの分離が適切に行われたことを確認した。



次に、Stage - の大腸がん手術患者を対象に、術後 1 カ月、術後 3-6 カ月の時点で血清と涙を採取し、エクソソームを分離して qPCR で miRNA (miR-39, miR-21, miR-486-5p, miR-150) の発現を確認した。現在、症例集積は 20 例まで進んでいる。

術前、術後 1 週間、

切除症例の再発バイオマーカー検索として、無再発例 3 例と再発例 2 例の microRNA 解析を行い、現在解析中です。また、症例集積中に肝転移を生じた症例に対し、エクソソームのプロテオミクス解析を試みているが、解析は現在進行中であり、継続して研究を行う。これらの結果から、エクソソーム解析のための解析プラットフォームは構築され、症例集積と解析結果が待たれる状況です。今後は、症例数を増やし、再発や転移に関連するエクソソーム中の miRNA やタンパク質を同定することで、新たな予後バイオマーカーや治療標的の発見につなげていきたい。



次に、転移指向性ニッチを検討するために、大腸がん細胞株 MC38 を用いた肝転移モデルを作成し、解析を進めることとした。当初の研究計画では、大腸癌切除症例に関するエクソソームサンプル採取を 100-200 例まで集積する予定であったが、コロナウイルス感染症の影響などにより、計画が遅延した。そのため、マウスモデルを用いた解析へと方針を変更し、モデルを作成して転移ニッチに関する研究を推進している状況である。マウスモデルを用いることで、エクソソームの役割や転移ニッチ形成のメカニズムをより詳細に解析できると期待している。

大腸癌 再発なし-#01
大腸癌 再発なし-#02
大腸癌 再発なし-#03
大腸癌 再発あり-#04
大腸癌 再発あり-#05

また、バイオマーカー研究として、切除不能な転移性大腸がん (mCRC) におけるホメオボックス転写因子 CDX2 の発現低下と予後との関連を調査した。2008 年から 2015 年の間に原発巣切除を受けた mCRC 患者 29 例を対象に、CDX2 の発現を免疫組織化学的に評価し、CDX2 高発現群と CDX2 低発現群に分類して予後を比較した。その結果、CDX2 低発現群では全生存期間が有意に短縮し (25.32 カ月 vs 37.67 カ月、 $p=0.03$)、無増悪生存期間も短縮する傾向があることが明らかになった (12.9 カ月 vs 17.4 カ月、 $p=0.37$)。さらに、原発巣切除後に化学療法を受けた 2 例で病理学的完全奏効が得られた。これらの結果から、CDX2 の発現低下は切除不能な mCRC の予後不良と関連しており、CDX2 が予後バイオマーカーとなる可能性が示唆された。今後は、CDX2 の発現低下に関連するエクソソームを探索し、新たな治療標的の同定につなげていきたいと考えている。

本研究では、エクソソーム解析のためのプラットフォームを構築し、大腸がん患者の血清や涙からエクソソームを分離して miRNA の発現解析を行った。また、切除不能な mCRC 患者における CDX2 の発現低下と予後との関連を明らかにした。しかし、症例集積の遅れや解析結果の不足など、いくつかの課題も残されている。今後は、症例数を増やしてエクソソーム中の miRNA やタンパク質の解析を進め、再発や転移に関連するバイオマーカーの同定を目指す。また、マウスモデルを用いた転移ニッチの解析を進め、エクソソームの役割や転移メカニズムの解明に取り組みます。CDX2 の発現低下に関連するエクソソームの探索も進め、新たな治療標的の発見につなげていきたいと考える。

本研究の成果は、大腸がんの予後予測や治療戦略の改善に寄与すると期待される。エクソソームを用いたリキッドバイオプシーによるバイオマーカーの開発は、患者の負担が少ない検査法の確立につながる可能性がある。また、転移ニッチの解明は、転移の予防や治療法の開発に貢献すると考えられる。CDX2 の発現低下に関連するエクソソームの同定は、新たな治療標的の発見や予後不良患者に対する個別化治療の実現に寄与することが、期待される。今後は、これらの研究をさらに発展させ、大腸がん患者の予後改善に貢献する。エクソソーム解析や転移ニッチの研究は、他のがん種にも応用できる可能性があり、がん研究全体の発展にも寄与すると期待される。また、本研究で得られた知見を基に、臨床応用を目指した translational research を推進していきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe A, Yamashita K, Fujita M, Arimoto A, Nishi M, Takamura S, Saito M, Yamada K, Agawa K, Mukoyama T, Ando M, Kanaji S, Matsuda T, Oshikiri T, Kakeji Y	4. 巻 14
2. 論文標題 Vaccine Based on Dendritic Cells Electroporated with an Exogenous Ovalbumin Protein and Pulsed with Invariant Natural Killer T Cell Ligands Effectively Induces Antigen-Specific Antitumor Immunity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 171 ~ 171
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14010171	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Miyako S, Matsuda T, Koma Y, Koide T, Sawada R, Hasegawa H, Yamashita K, Harada H, Urakawa N, Goto H, Kanaji S, Oshikiri T, Kakeji Y	4. 巻 11
2. 論文標題 Significance of Wnt/ -Catenin Signal Activation for Resistance to Neoadjuvant Chemoradiotherapy in Rectal Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biomedicines	6. 最初と最後の頁 174 ~ 174
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/biomedicines11010174	査読の有無 無
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 Abe T, Matsuda T, Sawada R, Hasegawa H, Yamashita K, Kato T, Harada H, Urakawa N, Goto H, Kanaji S, Oshikiri T, Kakeji Y	4. 巻 38
2. 論文標題 Patients younger than 40?years with colorectal cancer have a similar prognosis to older patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 International Journal of Colorectal Disease	6. 最初と最後の頁 191
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00384-023-04488-5	査読の有無 無
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 Mukohyama J, Agawa K, Yamashita K, Matsuda T, Shinoda M, Itano O, Kakeji Y	4. 巻 43
2. 論文標題 CDX2 Is a Prognostic Biomarker for Unresectable Metastatic Colorectal Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3763 ~ 3767
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticancer.16561	査読の有無 無
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 Shimada A, Matsuda T, Sawada R, Hasegawa H, Yamashita K, Harada H, Urakawa N, Goto H, Kanaji S, Oshikiri T, Kakeji Y	4. 巻 13
2. 論文標題 The modified Glasgow prognostic score is a reliable predictor of oncological outcomes in patients with rectal cancer undergoing neoadjuvant chemoradiotherapy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-023-44431-w	査読の有無 無
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1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 向山 知佑
2. 発表標題 大腸癌手術前後における腸内細菌と代謝物の変化についての検討
3. 学会等名 第34回日本消化器癌発生学会総会
4. 発表年 2023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	掛地 吉弘 (Kakeji Yoshihiro) (80284488)	神戸大学・医学研究科・教授 (14501)	
研究分担者	山下 公大 (Yamashita Kimihiro) (80535427)	神戸大学・医学部附属病院・特命准教授 (14501)	
研究分担者	竹内 俊文 (Takeuchi Tishihumi) (70179612)	神戸大学・工学研究科・教授 (14501)	

6. 研究組織（つづき）

	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 Yuichi) (50285392)	神戸大学・医学部附属病院国際がん医療・研究センター・特命教授 (14501)	
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	向山 順子 (Mukohyama Junko) (70734987)	神戸大学・医学研究科・医学研究員 (14501)	
研究分担者	中野 秀雄 (Nakano Hideo) (00237348)	名古屋大学・生命農学研究科・教授 (13901)	
研究分担者	藤田 貢 (Fujita Mitsugu) (40609997)	近畿大学・医学部・准教授 (34419)	

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