

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17140

研究課題名（和文）超低侵襲を可能にする新規の体液診断マーカーを併用した放射線治療の開発

研究課題名（英文）Development of radiotherapy combined with a new diagnostic marker for body fluids that enables ultra-minimally invasiveness

研究代表者

川口 弘毅 (Hiroki, Kawaguchi)

神戸大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60781820

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）：エクソソームは血液をはじめとする体液中に存在する。これは正常細胞にもがん細胞にも存在し、両者に存在するエクソソームの違いを検出することでがん診断のツールとして用いる試みが行われている。我々は涙液に注目し、これを診断のツールとして用いることができれば低侵襲ながん診断のツールとして用いることができると考えた。本研究では乳がん患者において涙液ががん診断および予後予測に用いることができる可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではエクソソームに着目して涙液をがんの診断および予後予測におけるツールとして利用できる可能性を初めて示した。これまで血液などが主体であった診断手法が、広く涙液を用いることができれば、自宅でも簡便に施行可能なキットへの開発に結び付けることも可能になりうると考えられる。このことは検診受検率の上昇、がんの早期発見および診断治療、ひいてはがんにおける全体的な生存率向上に寄与できる可能性を秘めており、その社会的意義は高いと考える。

研究成果の概要（英文）：Exosomes are present in body fluids such as blood. They exist in both normal cells and cancer cells, and attempts are being made to use as a tool for cancer diagnosis by detecting the difference in exosomes present in both.

We focused on tear fluid and hypothesized if they could be used as a diagnostic tool, they could be used as a minimally invasive cancer diagnostic tool.

In this study, we found that tear fluid could be used for cancer diagnosis and prognosis in breast cancer patients.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：エクソソーム バイオマーカー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がんの早期発見は根治を目標とする上で重要である。そのため検診は非常に重要であり、それに関する啓蒙活動は種々行われている。しかし、それにもかかわらず本邦では検診の受診率は約30%程度とされ、極めて低い。理由として、時間が無い等の検診の煩わしさが目立つ。実際、検診及び健診・人間ドックを契機にがんが発見されたのは全体の10%あまりにとどまるとされる。また血液検査は軽微な侵襲で行える手法のひとつであるが、血液腫瘍マーカーにおいては感度の低さが問題点として挙げられ、腫瘍マーカーでのがんの検出感度は40~80%、特に早期がんの場合は20~30%にとどまる。たとえば、乳癌においては30歳代より罹患率が増加し始め、40~60歳代に罹患率のピークを認める。またライフスタイルの変化等を背景として死亡率は年々上昇傾向を認めている。片岡(2009年:第19回日本乳癌学会学術総会)では34歳以下の乳癌では発見契機に自己発見が多いと指摘し、また1975年から2000年のデータ(14万6690例)により、若年性乳癌の予後は非若年性乳癌に比べて有意に不良であることが示された。30-40代の女性世代は個々の私生活や社会的背景いずれの側面においても重大な局面を迎える年代の一つであり、癌の発見が遅れることによる損失は計り知れない。早期に乳癌が発見できれば乳房温存術など、比較的侵襲の少ない手法で根治を目指すことができる。そして、術後の放射線治療を行うことにより乳癌死亡率をさらに、有意に低下させることが可能となる。しかし、乳癌において最も普及している検診方法の一つであるマンモグラフィでは、高濃度乳房による、がんの診断困難さが問題となる。これら課題の解決には、病院に行かず自分で簡便にがんリスクを管理できる新たな診断法、そして感度の問題点を解決する新たな診断法の開発が必要である。

近年、エクソソームと呼ばれる、直径約100nm程度の細胞外小胞の細胞間コミュニケーションの役割が注目を集め、がんの転移や進展、薬剤耐性などだけでなく、再生医療分野や、アルツハイマーなど様々な症状の発症機構や、進行に関与していることが報告されている。

エクソソームは生体において、血液、唾液、尿、羊水、涙、母乳などさまざまな体液において確認され、タンパク質だけでなく mRNA や DNA など様々な遺伝物質を内包していることが報告されている。先行研究としては、国立がんセンター研究所において血液一滴で胃がん、食道がん、肺がんをはじめとした13種のがんにおける血液中の miRNA を利用した早期診断についての解析が実施されている。miRNA はエクソソームに内包されることで、高い保存性を保っているといわれている。また、エクソソームが含有しているタンパクが腫瘍マーカーとして使用が可能であることも報告されており、新たながんマーカーとしての役割に注目が集まっている。

参考文献: Eichelser C, et al. Increased serum levels of circulating exosomal microRNA-373 in receptor-negative breast cancer patients. *Oncotarget*. 2014 Oct 30;5(20):9650-63

2. 研究の目的

がん検診の普及を目指し、より簡便で病院外などで簡便にがん診断につながるシステムの構築を図るべく、涙由来のエクソソームを対象とした。特にバイオマーカーとしてエクソソーム内の miRNA など既に報告されているものを中心に、血清内および涙のエクソソームの挙動の解析を行い、涙を利用したがん検診の可能性について、既知のマーカーとともに、放射線感受性を糸口として、新たに利用可能となりうるマーカーを探索する。

3. 研究の方法

(1) 担癌患者および健常人の血液 5-10ml から血清(血漿)を単離し、その後、DNA・RNA・miRNA などの遺伝子単離、タンパク質の単離および超遠心法にてエクソソームの単離を実施する。体液由来サンプルはシルマー試験紙を両目に入れ、シルマー試験紙 20mm 程度まで涙が得られたタイミングで、PBS(-)にシルマー試験紙をいれることで採取する(右図参照)。各サンプルから得たエクソソームは内包する miRNA やタンパク質を抽出し、miRNA、CD 抗体などタンパク質についてのその発現量の変化等を検討する。

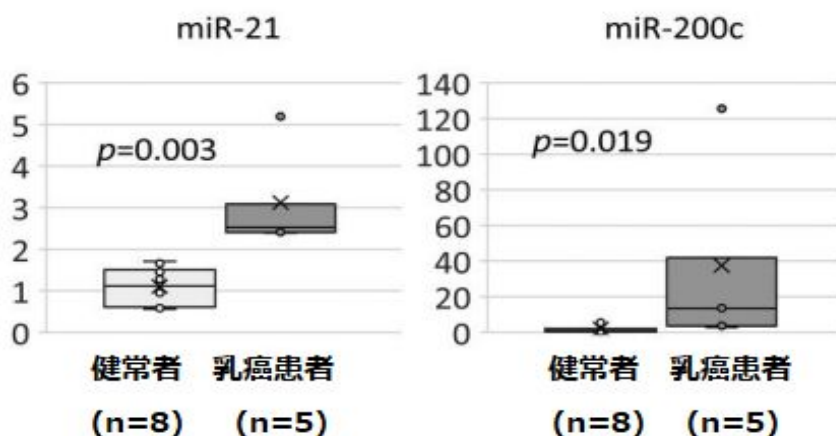


(2) 動物実験 モデルを作成することによって、涙液による腫瘍由来のエクソソームの挙動を探り、癌診断における涙液の有用性を検討する。ヌードマウスを用いてヒト由来の腺癌細胞株である MIA PaCa-2 およびヒト由来の大腸癌細胞株である HCT-116 を皮下に移植して血液および涙液を採取してそれぞれの癌細胞由来のエクソソームを計測する。

4. 研究成果

(1) 128 例の担癌患者および健常ボランティアから同意を得て涙液および血清を採取した。このうち、健常ボランティアからの涙を用いてウエスタンブロッティング法で抗 CD9/63 抗体を検出することによりエクソソームの確認を行ったところ、血清と比較して有意に高発現を示しており、涙液が血清同様にエクソソームを十分に含み、解析に足ることが判明した。また 8 人

の健常ボランティアと5人の進行乳癌患者の涙液サンプルを用いて miR-21、200c、1246、17-5p、373 を分析したところ、miR-21、200c についてそれぞれ進行乳癌患者において有意に増加していることが判明した。これにより涙中のエクソソームを用いることの乳癌患者におけるリキッドバイオプシーとしての有用性について、その可能性が示された（下図）。



(2) 皮下移植を行った MIA PaCa-2 については経時的に腫瘍増大が乏しく、また血液、涙液とも癌細胞由来のエクソソームの検出が微量であった。ただし、この過程でヒト由来の CD9 濃度を検出することによりヌードマウスの涙液から癌細胞由来のエクソソームを検出することおよび定量的に計測することが可能であることが示された。

HCT-116 については、多くが腹膜播種や鼠径への転移を呈した。しかし癌細胞由来のエクソソームの検出は、MIA PaCa-2 と同様に血液、涙液ともに微量にとどまった。

血中へのエクソソーム移行が少ないことに関しては皮下移植であり、血中移行するための血管新生があまり起きていない可能性も考えられ、最終年度にかけて移植の手法など検討を行ったが、検証が可能なエクソソーム検出の状態には至らなかった。

(3) 乳癌以外の疾患については、主に眼瞼悪性リンパ腫において涙液の検討を行い、悪性腫瘍由来のエクソソームの検出は行ったが、症例集積が少なく、有用なマーカーの候補の同定に至らなかった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 SACHIKO INUBUSHI, HIROKI KAWAGUCHI, SACHIKO MIZUMOTO, TOMONARI KUNIHISA, MOTOI BABA, YUKIYA KITAYAMA, TOSHIFUMI TAKEUCHI, ROBERT M. HOFFMAN and RYOHEI SASAKI	4. 巻 40
2. 論文標題 Oncogenic miRNAs Identified in Tear Exosomes From Metastatic Breast Cancer Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 3091-3096
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.14290	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

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------