

令和 6 年 5 月 17 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：21K07176

研究課題名（和文）がん早期診断における涙液エクソソームの有用性の検討

研究課題名（英文）Investigation of the usefulness of tear fluid exosomes in the early diagnosis of cancer

研究代表者

犬伏 祥子（Inubushi, Sachiko）

神戸大学・医学研究科・特命講師

研究者番号：60585959

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）：申請者は乳がん転移患者から涙液由来エクソソームを採取し、oncogenic miRNAが高発現していることを明らかにしていることから、本研究では原発性乳癌の患者由来の涙液にがん細胞由来エクソソームが含まれており、涙液エクソソームががんの早期診断に有用であることを明らかにする必要があると考え本研究の着手した。

患者から採取した涙液エクソソームのマイクロアレイ解析の結果をもとにqPCRの条件検討を行うとともに、涙液エクソソームおよび血液エクソソームの表面タンパクを解析し、腫瘍の有無や腫瘍背景などがエクソソームのHER2タンパクやエクソソーム数に大きく影響を及ぼしていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

乳がんの死亡率は上昇の一途をたどっており、現在では日本人女性の8人に1人が乳がんにかかるといわれ、早期発見により適切な治療が行われれば良好な経過が期待できるといわれているものの実に年間約13,000人の女性が乳がんになっており、その対策は急務である。さらに乳癌は40代～50代女性のがん死亡原因の第1位である。仕事や育児、介護などに追われている40代～50代女性には検診に行くこと自体のハードルの高さが問題となっている。そこで我々はより気軽に採取が可能である体液サンプルを利用した早期診断方法が必要であると考え、涙を用いた早期診断方法に着手した。

研究成果の概要（英文）：The applicants collected tear fluid-derived exosomes from patients with breast cancer metastasis and revealed that oncogenic miRNAs were highly expressed. The purpose of this study is to demonstrate that tear fluid from patients with primary breast cancer contains cancer cell-derived exosomes, and that tear exosomes are useful for early diagnosis of cancer. We are examining qPCR conditions based on the results of microarray analysis of tear exosomes collected from patients. By analyzing the surface proteins of tear exosomes and blood exosomes, we found that the presence or absence of a tumor and the tumor background greatly influence the appearance of exosomes.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：exosome 細胞外小胞 乳癌 涙 miRNA

### 1. 研究開始当初の背景

がん検診では、PSA (prostate-specific antigen) のような高感度の腫瘍マーカーが、前立腺がん以外には発見されておらず、細胞診や画像診断への依存から脱却できていない。そのため撮影した画像を医師が読影したり、細胞を採取し医師が診断するため、検診コストが高いことが問題である。特に乳がん検診で広く使われるマンモグラフィの読影は、がん検診の中でも診断が困難で、新たな技術を付加した改善が望まれている。また乳癌のピークは 40-50 代にあるが、近年は 20-30 代で発症する若年性乳癌も増加傾向にある。しかし、アジアの人は欧米人に比して高濃度乳腺と呼ばれ、マンモグラフィではがんを見つけにくい状態の人が多いため、エコーが応用されるつつあるが、精度管理、コスト、受診のしにくさなどが、受診率向上の点で問題となっている。以上のような現状から、簡便に検体が採取でき、検査室で自動解析が可能で、コストのかからない革新的がん検診技術が求められている。

エクソソームは 50-150nm の細胞外小胞体で、様々な体液に含まれ miRNA や mRNA、DNA やタンパクが内包されており、近年リキッドバイオプシーとして血液中などの体液エクソソームを利用した早期診断が注目されている。申請者らは患者自身が自宅などで手軽に採取可能かつ、サンプル採取に抵抗性が少ない涙液を利用した非侵襲性のがん検診ができないかと考えた。研究代表者らはがんの量が十分にあるだろうと推測される転移性乳癌患者由来の涙液エクソソームから miRNA を解析し、oncogenic miRNA である miR-21、miR-200c が高発現していることをすでに報告した。

### 2. 研究の目的

上記にも記したが、転移性乳癌のような乳癌由来のエクソソームが体内に大量にある状態において、涙に含まれるエクソソーム中に乳癌特異的な miRNA が高発現していることから、本研究の目的は涙液中に乳癌細胞から分泌しているエクソソームが存在することを明らかにし、その涙エクソソームを用いた乳癌の早期診断に向けて有用な検体であることを明らかにする。

### 3. 研究の方法

原発性乳癌患者の術前術後の涙サンプルを採取し、術前術後の涙由来エクソソームに含まれる miRNA の比較検討を実施する。今回は採取済みの 96 例の中から腫瘍量が多い 2 名の術前術後の涙液を用いて解析を実施した。

**涙液の採取**；涙液採取はドライアイテストなどで使用するシルマー試験紙を使用し、ドライアイテストと同様に下瞼にシルマー試験紙を挟み 5 分間目を閉じたのち、結膜に触れた部分を除去したのち涙が浸透したる紙部分のみを PBS に浸し 1 晩浸透させたのち遠心を行い、ろ紙の繊維などを遠心で除去した。

**エクソソーム単離および miRNA アレイ解析**；得られた涙液を超遠心にて 110,000 × g、4 で 90 分間遠心し、上清を廃棄した後 PBS で WASH を行い 110,000 × g、4 で 90 分間遠心したのち、エクソソームを単離した。得られたエクソソームを用い 3D-GENE (TORAY) を用いてマイクロアレイ解析を実施した。

#### 4. 研究成果

腫瘍量が比較的多い患者 A および患者 B の術前術後の涙由来エクソソームの miRNA を比較検討したところ、術前術後で 2 倍以上に変動を有したものを抽出した。結果、術前（腫瘍を有している状態）で患者 A および患者 B で共通して miRNA の発現が低値だったものが 24 種、術前共通して miRNA の発現が高値だったものが 28 種あった（図 1）。

#### 涙由来エクソソームのmiRNAアレイの解析結果

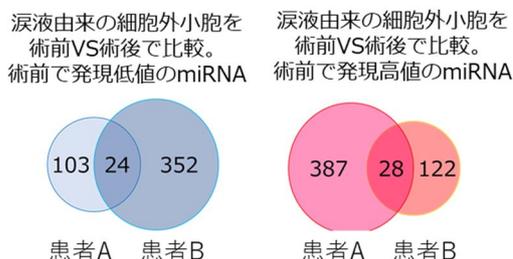
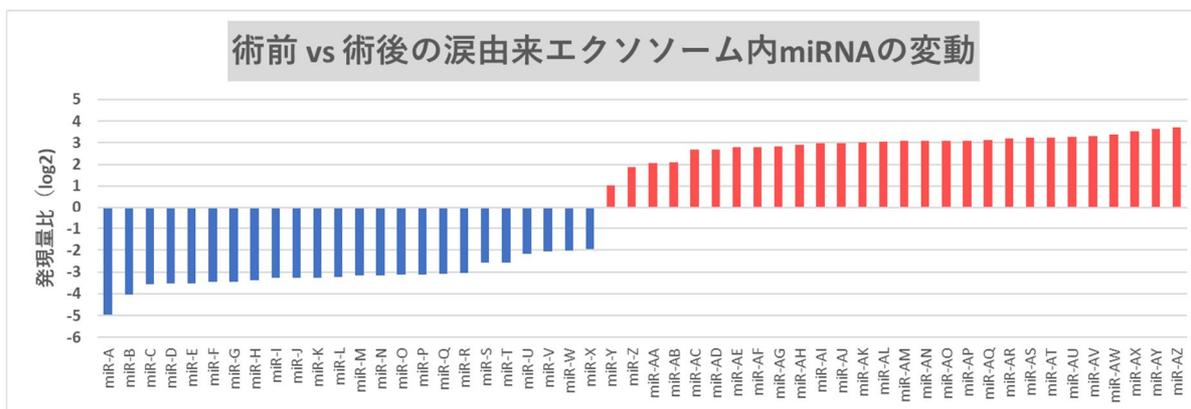


図 1: 涙由来エクソソームの miRNA アレイの結果  
術前で低発現だった miRNA (左)  
術前で高発現だった miRNA (右)

図 1 の結果から得られた術前術後の涙由来エクソソームの miRNA の発現量比を図 2 に示す（miRNA 名は伏字で記載）。



腫瘍を有する術前において miRNA の量が少なかった上位の miRNA において、他の腫瘍疾患において当該 miRNA が減少していることが明らかとなっている報告があることから、涙由来エクソソームに含まれる miRNA も同様の結果を示している可能性があるかと推測し、現在 qPCR 等を利用した涙由来エクソソームの解析の条件検討を実施している。同様に、術前サンプルにおいて miRNA が高発現であった miRNA においてもこれまで報告がなかった miRNA だけでなく、既に他の腫瘍疾患において報告があるものもあることから、さらなる解析を進めていく予定である。

今後、得られたマイクロアレイの結果と qPCR の結果を検討するとともに、涙と同じタイミングで採取した血清を用いた miRNA を解析し、涙と血液由来のエクソソームの比較検討も実施する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 MIZUMOTO SACHIKO, INUBUSHI SACHIKO, MIKI MAYUKO, NAKAMURA HARUNA, BABA MOTOI, YAMASHITA YUJI, YAMAMOTO MAYUKO, INOUE SHOTARO, TANINO HIROKAZU, KUNIHISA TOMONARI	4. 巻 43
2. 論文標題 Target-Oriented Classification of Triple-negative Breast Cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Anticancer Research	6. 最初と最後の頁 5067 ~ 5072
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.16706	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 INUBUSHI SACHIKO, KUNIHISA TOMONARI, MIZUMOTO SACHIKO, INOUE SHOTARO, MIKI MAYUKO, SUETSUGU ATSUSHI, TANINO HIROKAZU, HOFFMAN ROBERT M.	4. 巻 20
2. 論文標題 Methionine Restriction Increases Exosome Production and Secretion in Breast Cancer Cells	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Cancer Genomics - Proteomics	6. 最初と最後の頁 412 ~ 416
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/cgp.20393	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3件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 犬伏祥子
2. 発表標題 涙液内の乳癌由来miRNAの同定
3. 学会等名 第20回日本乳癌学会 近畿地方会 （招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 犬伏祥子、國久智成、水本紗千子、三木万由子、井上翔太郎、谷野 裕一
2. 発表標題 メチオニン制限による乳がん細胞のエクソソーム産生への影響
3. 学会等名 日本細胞外小胞学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sachiko Inubushi, Tomonari Kunihisa, Jun Yamamoto, Yoshihiko Tashiro, Norihiko Sugisawa, Sachiko Mizumoto, Shotaro Inoue, Mayuko Miki, Hirokazu Tanino, Robert M Hoffman
2. 発表標題 Methionine restriction results in an increase in extracellular vesicles (EVs) secretion and altered packaging of EVs markers in cancer cells
3. 学会等名 ISEV (招待講演)
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	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	國久 智成  (Kunihisa Tomonari)  (50839800)	神戸大学・医学部附属病院・特命講師   (14501)	
研究分担者	馬場 基  (Baba Motoi)  (90724980)	神戸大学・医学研究科・医学研究員   (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
---------	---------