

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20988

研究課題名（和文）尿中エクソソーム内の細菌遺伝情報を用いた新たな早期腎癌診断薬の開発

研究課題名（英文）Development of a novel diagnostic biomaker for renal cell carcinoma using bacterial DNA in urinary extracellular vesicles.

研究代表者

植村 俊彦 (Uemura, Toshihiro)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：60905941

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：探索コホートとして腎癌患者88人と健常者10名を登録し、様々なサンプルから細胞外小胞を回収し、16S rRNAメタゲノム解析を実施した。尿サンプルは健常者でも細菌尿の影響があり、診断に有効な細菌DNAを同定できなかったため、バイオマスの小さい血液に注目したところ、腎癌患者の血清細胞外小胞に豊富な細菌DNAを3種類同定した。これらを組み合わせて腎癌の診断を目的とした指標を作成したところ、AUC 0.88、感度89%、特異度40%であった。腎癌患者32人と健常者16人の検証コホートにおいて同様に解析したところ、作成した診断指標は感度90%と高く、スクリーニング検査としての有用性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

臨床応用された腎癌の診断マーカーはなく、画像検査以外の早期診断は困難である。診断時には転移を有することも少なくなく、簡便かつ高感度なスクリーニング検査の開発が求められている。循環細胞外小胞に含まれる細菌DNAを用いた診断指標は、早期腎癌（病理学的T分類 Stage ）においても有用であり、腫瘍量に依存しないバイオマーカーとして期待される。

研究成果の概要（英文）：Eighty-eight patients with renal cell carcinoma and 10 healthy donors were enrolled as a discovery cohort, and extracellular vesicles were collected from various samples and 16S rRNA metagenomic analysis was performed. Because urine samples were affected by bacteriuria even in healthy donors and we were unable to identify bacterial DNA that would be useful for diagnosis, we focused on blood, which has a smaller biomass, and identified three types of bacterial DNA that were abundant in serum extracellular vesicles of patients with RCC. These were combined to create an index for the diagnosis of RCC, which had an AUC of 0.88, sensitivity of 89%, and specificity of 40%. In a similar analysis in a validation cohort of 32 renal cancer patients and 16 healthy donors, the created diagnostic index had a high sensitivity of 90%, suggesting its usefulness as a screening test.

研究分野：泌尿器科

キーワード：腎細胞癌 細胞外小胞 細菌DNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

進行性腎癌の予後は不良であり早期診断が望ましいが、臨床応用されたバイオマーカーはなく、画像検査以外の診断は困難である。腎癌は超音波検査やCT等の画像検査で偶発的に発見される場合が多く、診断時には転移を有することも少なくない。そのため、簡便かつ正確な早期腎癌の診断につながるスクリーニング検査の開発が求められている。

近年、癌細胞内に細菌が存在し癌臓器特異的な細菌叢が形成されていること、癌患者の血液内に細菌DNAが存在することが報告された。また、我々は他研究で細胞外小胞内に細菌DNAが含まれていることを明らかにしており、細胞外小胞内の細菌DNAが腎癌の早期診断に有用となる可能性を考えた。

2. 研究の目的

腎癌患者特異的な細胞外小胞内の細菌DNAを同定し、腎癌の診断における有用性を明らかにすることが本研究の目標である。また、細菌叢は全身に存在しており、ヒトの生体内における細菌の影響を解明すれば他分野への応用も期待できると考えられる。

3. 研究の方法

簡便に採取できるサンプルとして、まず尿に注目した。腎癌患者に高発現する細菌DNAを同定するため、腎癌患者と健常者を比較した。根治的腎摘除術または腎部分切除術を受けた淡明細胞型腎細胞癌の患者(RCC)88人と、健常者として移植腎ドナー(healthy donor, HD)10人を登録した。サンプルは全身麻酔導入後かつ抗生剤投与前に採取した。尿サンプルから細胞外小胞を回収し、細胞外小胞から抽出したDNAに対して16S rRNAメタゲノムシーケンスを実施した。得られた細菌情報はLinear discriminant analysis effect size (LEfSe)を用いて解析した。

4. 研究成果

尿サンプルは健常者でも細菌尿の影響があり、診断に有用な細菌DNAを同定できなかったため、続いてバイオマスの小さい血液に注目した。同じ患者群を対象として、血清から細胞外小胞を回収し、抽出したDNAに対して16S rRNAメタゲノムシーケンスを実施した。その結果、Sphingomonadales, TM7-1, Bacteroidiaの3種が、健常者と比較して腎癌患者の血清細胞外小胞内で高い存在比率を示した(図1)。

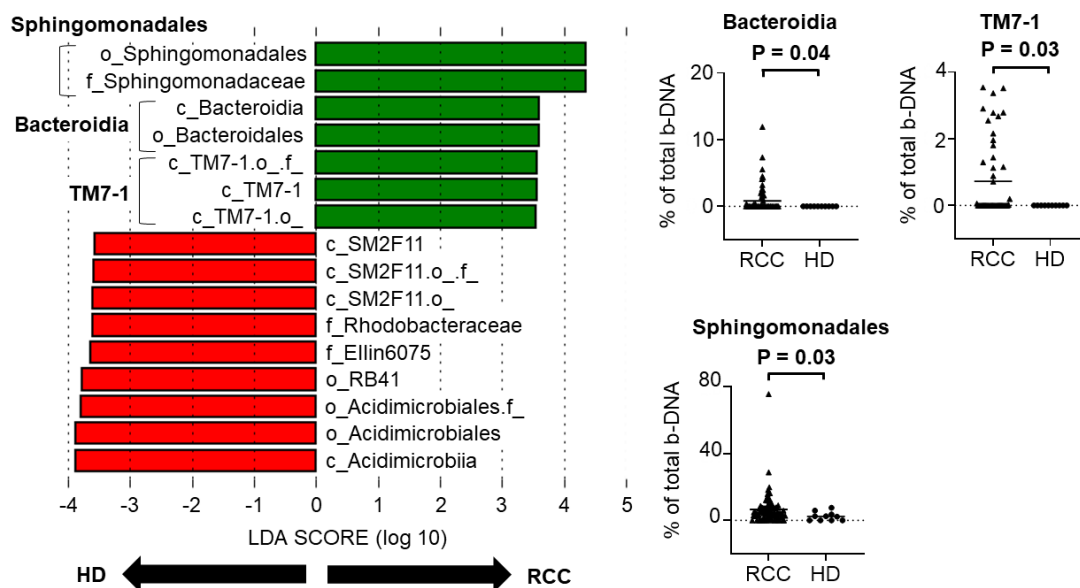
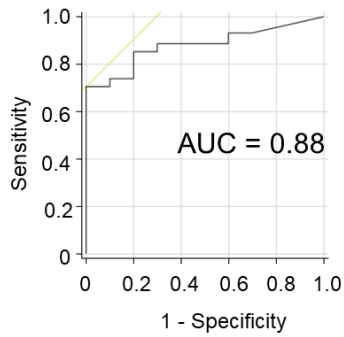


図1

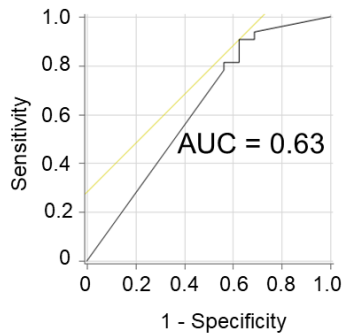
これらを組み合わせて腎癌の診断を目的としたBTS Index ($BTS\ index = 1/(1 + \text{Exp}(-X))$, $X = 0.498482378 + \text{Bacteroidia} * 259962.99858 + \text{TM7-1} * 64872.366873 + \text{Sphingomonadales} * 20.9933271$)を作成したところ、AUCは0.88、感度と特異度はそれぞれ89%、40%であった(図2)。また、ロジスティック回帰分析の結果、本指標は全患者において腎癌診断の独立因子であり(オッズ比5.92, 95% CI 1.34-26.12, $P = 0.02$)早期腎癌(病理学的T分類 Stage ,pT1)患者においても同様であった(オッズ比6.01, 95% CI 1.21-29.74, $P = 0.03$)。



	移植腎提供者 n=10	腎癌患者 n=88
陰性 BTS index < 0.7	4 特異度 40% 陰性的中率 29%	10
陽性 BTS index ≥ 0.7	6	78 感度 89% 陽性的中率 93%

図 2

検証コホートとして腎癌患者 32 人と健常者 16 人を登録した。同様の手法で血清内細胞外小胞に含まれる細菌 DNA を解析したところ、BTS Index の AUC は 0.63、感度と特異度はそれぞれ 90%、38%であった(図 3)。また、ロジスティック回帰分析の結果、本指標は全患者において腎癌診断の独立因子であり(オッズ比 5.95, 95% CI 1.23-28.77, P = 0.03)、早期腎癌(pT1)患者においても同様であった(オッズ比 7.54, 95% CI 1.25-45.47, P = 0.03)。さらに他の癌腫における有効性を調べるため、膀胱癌患者 50 人と健常者 20 人でも検証したところ、AUC は 0.52 であり、腎癌以外では有用ではなかった。



	移植腎提供者 n=16	腎癌患者 n=32
陰性 BTS index < 0.7	6 特異度 38% 陰性的中率 67%	3
陽性 BTS index ≥ 0.7	10	29 感度 91% 陽性的中率 74%

図 3

以上より、血清内細胞外小胞に含まれる細菌 DNA を用いた BTS Index は腎癌患者特異的に高感度を示し、腫瘍量に依存しないスクリーニング検査目的の診断バイオマーカーとしての有用性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 植村俊彦
2. 発表標題 Bacteria-derived DNA in serum extracellular vesicles could become a novel diagnostic biomarker for renal cell carcinoma
3. 学会等名 第110回日本泌尿器科学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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