

ミニシンポジウム



リキッドバイオプシーを用いた
がんゲノム医療の新しい展開

Advancements in Cancer Genomic Medicine
Using Liquid Biopsy

黒田 雅彦 梅津 知宏 大野 慎一郎
Masahiko KURODA, Tomohiro UMEZU, Shinichiro OHNO

東京医科大学分子病理学分野

Department of Molecular Pathology, Tokyo Medical University

1. はじめに

リキッドバイオプシー (Liquid Biopsy) とは、通常の生検とは異なり血液 (血漿) 中に含まれる DNA、miRNA あるいは細胞分泌小胞 (エクソソーム) を検出することで、病気の診断を行う技術である。また、最近では、血液だけでなく、唾液や尿などの体液全般に対してもリキッドバイオプシーという用語が用いられる。リキッドバイオプシーの利点は、組織を採取することなしに、非侵襲的に、がん細胞の存在や治療効果判定、また再発予測を評価することができることにある (図 1)。特に近年では、次世代シーケンサー (NGS) によって、個別化医療において重要な役割を果たす技術となっている。また、がん組織由来の DNA を標的とする場合には、遺伝子変異のパターンや epigenetic な変化などに対応した計測手法も必要であり (図 2)、さらなる正確性や診断の精度向上にむけた研究が行われている。今回のミニシンポジウムでは、miRNA、エクソソーム、DNA のリキッドバイオプシーにおける最近の動向について解説し、最後に我々の取り組みを紹介したい。

2. miRNA に対するリキッドバイオプシー

核酸には DNA と RNA があるが、この 2 つの核

酸は大きく性質が異なる。DNA は、安定な構造で質および量に変化しにくく静的である。一方で、RNA は、急速な合成と分解により動的な発現制御を受けている。したがって、患者から採取された検体中の RNA は速やかに分解されることから、RNA を何らかの検査の指標に用いることは難しいと考えられていた。microRNA (miRNA) は、22 塩基前後のノンコーディング RNA で、多くの遺伝子の発現を制御している¹⁾。ヒトで 2,500 種類以上発現しており、各種の疾病により大きく発現変動すること、また次世代シーケンサーおよびマイクロアレイなどを用いてその発現を網羅的に解析できるなど、バイオマーカーとして適した性質を有している。さらに近年 miRNA は、アルゴノートファミリー (AGO1~4) などと結合もしくはエクソソームなどの小胞体に包含される形で、血液などの体液中で比較的安定に存在することが明らかになり、理想的なリキッドバイオプシーのマーカーとして注目されている²⁾³⁾。世界中で多くの臨床試験が進行しているが、特に日本は、miRNA によるリキッドバイオプシーを世界に先駆けて推進しており、NEDO による「体液中マイクロ RNA 測定技術基盤開発」プロジェクト (代表者: 落谷孝広教授) では、13 種類のがんを一滴の血液から検出する技術が開発された⁴⁾。また、名古屋大学発のベンチャー企業による尿中 miRNA を

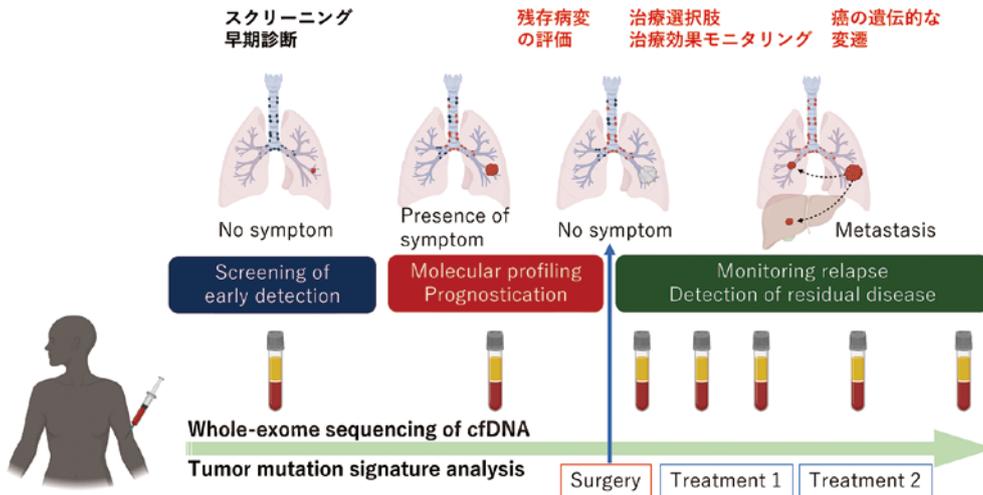


図1 リキッドバイオプシーの実際の運用
リキッドバイオプシーは、腫瘍のスクリーニングや術後の評価に幅広く用いることができる

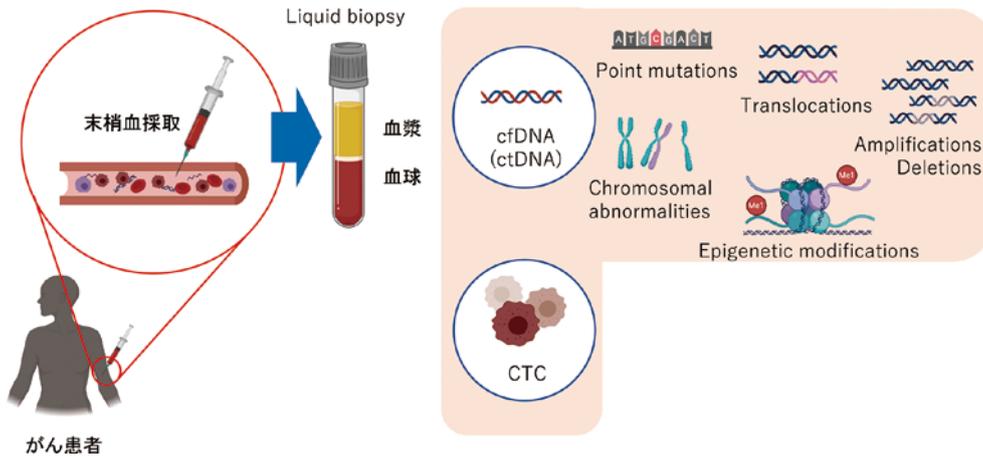


図2 血漿中に存在する CTC (Circulating tumor cell) および cfDNA (cell free DNA)

マーカーとした「miSignal[®]」など、一部はすでに商品化されている⁵⁾。がんだけでなく認知症の発症リスク予測においても応用できることが確認されており⁶⁾、広く臨床実装される日は目前である。

3. エクソソームに対するリキッドバイオプシー

エクソソームは、さまざまな細胞から放出される脂質二重膜でできた 30-120 nm の細胞外小胞である。この小胞には、miRNA をはじめとした核酸や、タンパク質、脂質などが内包されており、細胞外に放出されたあと他の細胞に取り込まれることで、細胞間のコミュニケーションに重要な役割を果たしている。近年、さまざまな細胞から放出されるエクソソームの機能が明らかとなってきた。例えば、間葉系幹細胞 (MSC) 由来エクソソームは抗炎症作用や抗酸化作用を有しており、再生医療分野において

その高い治療効果に期待が寄せられている⁷⁾。一方、がん細胞からもエクソソームが放出されており、がんの転移や腫瘍血管新生の促進に関与している⁸⁾⁹⁾。すなわち、がん細胞由来エクソソームにはがんの悪性化に影響を及ぼす因子が内包されており、それらを標的にした治療法や診断技術の開発が行われている。次世代シーケンサーなどの解析技術の進歩により、多種多様なエクソソーム内包因子を網羅的に解析できるようになり、各がん種における早期診断や治療効果予測に応用可能なバイオマーカーも多数発見されている (表1)。前述のように血液などの体液中に存在する circulating miRNA に対して、エクソソームに内包された miRNA (exosomal miRNA) は体液中でも安定的であり生物学的意義も高く、リキッドバイオプシーのリソースとして exosomal miRNA を用いたがんの早期診断の開発が盛んに行

表 1 エクソソームのがん治療への応用

がん種	エクソソーム内因子	エクソソーム膜因子	由来	臨床的意義	参考文献
NSCLC	miR-21 miR-200 miR-139 miR-378		Plasma	Early diagnosis	11)
		PD-L1	Serum	Early diagnosis	12)
CRC	circ0004771		Serum	Early diagnosis	13)
		EpCAM	Plasma	Early diagnosis	14)
PDAC	miR-10b		Plasma	Early diagnosis	15)
	MIF		Serum	Stage classification	16)
		GPC-1	Serum	Early diagnosis	17)
HCC	miR-92b		Serum	Early diagnosis	18)
	AFP		Plasma	Early diagnosis	19)
		GPC-3 and PD-L1	Serum	Progression monitoring	20)
Gastric cancer	lnc HOTTIP		Serum	Early diagnosis	21)
	miR-15b-3p		Serum	Early diagnosis	22)
Breast cancer	miR-21 miR-222 miR-200c		Serum	Classification of molecular subtypes	23)
		EpCAM ; HER2	Plasma	Early diagnosis	24)
Ovarian cancer	miR-4732-5p		Plasma	Early diagnosis	25)
		EpCAM ; CD24	Ascites	Early diagnosis	26)
Prostate cancer	miR-196a-5p miR-501-3p		Urine	Early diagnosis	27)
		EphrinA2	Serum	Early diagnosis	28)

われてきた。また、エクソソーム内包物だけでなく、エクソソーム膜上のタンパク質を利用してがん細胞由来のエクソソームを検出する診断法も開発され、ExoScreen 法¹⁰⁾をはじめとした ELISA ベースの検出法は、体液からエクソソーム分画を抽出することなくクルードな状態で解析が可能であり、簡便でスループット性が高い。最近の研究から、エクソソームを含む細胞外小胞の多様性が明らかとなり、測定結果の標準化や内在性コントロールの選択の難しさ、エクソソーム分画の抽出法の違いによる結果のばらつきなどまだいくつかの課題も存在し、これらを解決して臨床現場での実用化に向けた開発が進められている。

4. DNA に対するリキッドバイオプシー

リキッドバイオプシーによるがんの検出では、現時点では最も臨床応用が進んでいるのが、腫瘍由来 DNA (ctDNA, circulating tumor DNA) に対するリキッ

ドバイオプシーである。がん細胞には、がん特異的なドライバー変異が存在することから、この DNA 変異を検出することでがんの診断を行う。一方で、血漿中に含まれるほとんどの DNA は、正常細胞の細胞死に由来する DNA であり、血液中の酵素により DNA は断片化され、そのサイズはヌクレオソームの単位に起因し約 170 bp である (図 3)。また、血漿中の DNA の量は約 20 ng/ml 程度と考えられているが、前述したように、大部分は正常細胞由来の DNA であることから血漿中の ctDNA の検出には高感度の検出法が必要となる。現状では 2 種類の NGS を用いたがんパネル検査が FDA に承認されており、そのうち中外製薬 (ロシュ社) の「FoundationOne Liquid CDx がんゲノムプロファイル」が日本で 2021 年に薬事承認され保険適用されている。この遺伝子パネル検査は、343 遺伝子の検出が可能であるが、血液中の ctDNA が少量であるため、NGS の配列の深度は平均 30,000 リード/1 遺伝子である

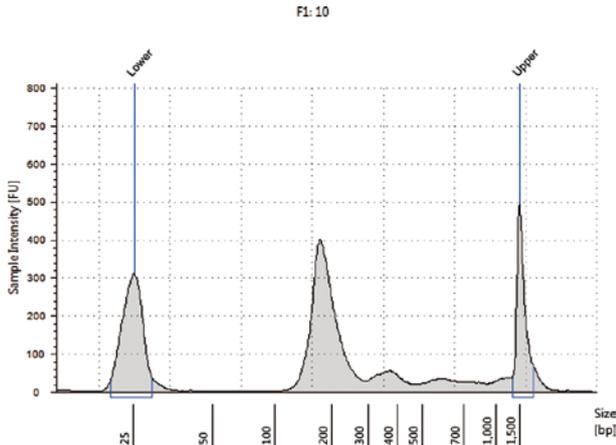


図3 血漿中に流れる cfDNA のサイズ
血漿 1 ml から cfDNA 分画を抽出し、TapeStation を用いて cfDNA のバンドパターンを計測した。170 bp にメインピークが見られる

ことが大きな特徴である。東京医科大学附属病院のエキスパートパネルでも最近では、本検査の適応症例があるが、ctDNA の検出ができなかった症例もあり、組織 (FFPE) を用いた検査にくらべて検出が難しい症例も存在することは確かである。ただし、生検ないし切除材料の検査ができなかった症例も遺伝子パネル検査ができることは大変大きな進歩である。また、この NGS を用いた ctDNA に対するリキッドバイオプシーの検査を、がんの早期診断に用いる試みも多く行われてきた。そこで、課題になるのは、血液中に含まれる ctDNA の量である。現実的ながんの TNM Stage が III 以上でないとい検出が難しいと考えられる。

5. cfDNA (cell-free DNA) からのがんの発生予測

これまでの研究から、リキッドバイオプシーを用いた早期診断は、理論上は ctDNA としてがん由来のドライバー変異を検出することで可能になる。しかし、上述したように早期がんのような小さながん胞巣から由来する DNA 断片を検出することは難しい。さらに、がん胞巣に由来する DNA 断片全てにドライバー変異があるとは限らない。また、最近の解析から、がん患者の非がん部の正常組織にもドライバー変異が見いだされている²⁹⁾。従ってこれらの事実から、ドライバー変異の検出を早期がんの診断に用いる事は難しいのではないかと考えている。そこで、現在我々は、腫瘍由来ではなく、正常組織 cfDNA の DNA の傷の様式 (mutational signature) から、がんの診断の可能性を検討している (図 4)。

6. 今後の展開

本発表においては、がんに関するリキッドバイオプシーの話題を中心にしたが、リキッドバイオプシーはがんだけでなく、他の疾患の診断や予後予測にも応用されており、医療の分野では大きな関心を集めている。一方、リキッドバイオプシーの検出感度やデータ解析技術はまだ進化の途中でもあり、さらなる技術開発が必要である。次世代の NGS の登場も期待され、将来的には生検材料と同等の情報を得る事ができる時代が来る可能性がある。

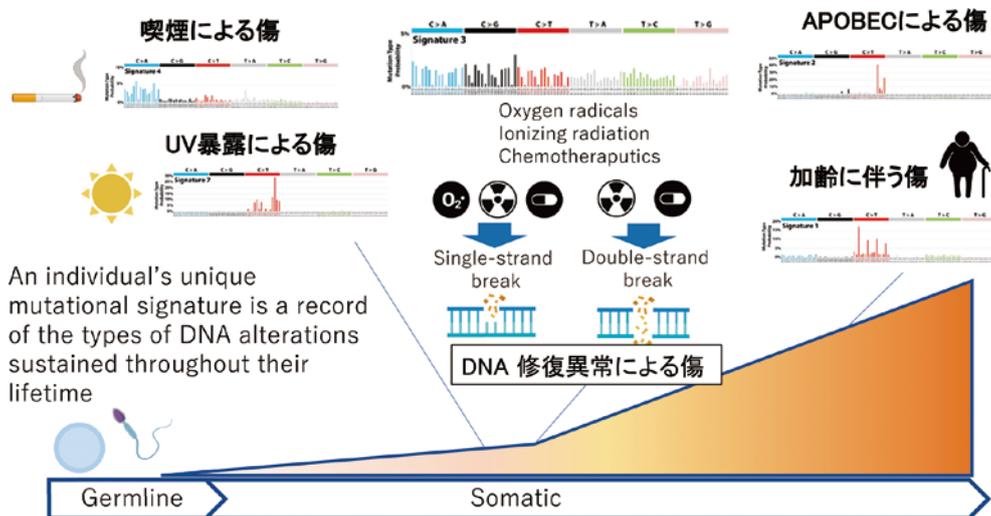


図4 加齢のともなっておこるゲノムの傷の様式 (mutational signature)

文 献

- 1) Bartel DP : MicroRNAs : target recognition and regulatory functions. *Cell* **136** : 215-233, 2009. 10.1016/j.cell.2009.01.002.
- 2) Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M : MicroRNA profiling : approaches and considerations. *Nat Rev Genet* **13** : 358-369, 2012. 10.1038/nrg3198.
- 3) Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA : MicroRNAs in body fluids — the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* **8** : 467-477, 2011. 10.1038/nrclinonc.2011.76.
- 4) Matsuzaki J, Kato K, Oono K, Tsuchiya N, Sudo K, Shimomura A, Tamura K, Shiino S, Kinoshita T, Daiko H, et al. : Prediction of tissue-of-origin of early stage cancers using serum miRNomes. *JNCI Cancer Spectr* **7**, 2023. 10.1093/jncics/pkac080.
- 5) Yasui T, Yanagida T, Ito S, Konakade Y, Takeshita D, Naganawa T, Nagashima K, Shimada T, Kaji N, Nakamura Y, et al. : Unveiling massive numbers of cancer-related urinary-microRNA candidates via nanowires. *Sci Adv* **3** : e1701133, 2017. 10.1126/sciadv.1701133.
- 6) Shigemizu D, Akiyama S, Asanomi Y, Boroevich KA, Sharma A, Tsunoda T, Matsukuma K, Ichikawa M, Sudo H, Takizawa S, et al. : Risk prediction models for dementia constructed by supervised principal component analysis using miRNA expression data. *Commun Biol* **2** : 77, 2019. 10.1038/s42003-019-0324-7.
- 7) Wei W, Ao Q, Wang X, Cao Y, Liu Y, Zheng A, Tian X : Mesenchymal stem cell-derived exosomes : a promising biological tool in nanomedicine. *Front Pharmacol* **11** : 590470, 2020. 10.3389/fphar.2020.590470.
- 8) Urabe F, Kosaka N, Yamamoto Y, Ito K, Otsuka K, Soekmadji C, Egawa S, Kimura T, Ochiya T : Metastatic prostate cancer-derived extracellular vesicles facilitate osteoclastogenesis by transferring the CDCP1 protein. *J Extracell Vesicles* **12** : e12312, 2023. 10.1002/jev2.12312.
- 9) Morimoto M, Maishi N, Tsumita T, Alam MT, Kikuchi H, Hida Y, Yoshioka Y, Ochiya T, Annan DA, Takeda R, Kitagawa Y, Hida K : miR-1246 in tumor extracellular vesicles promotes metastasis via increased tumor cell adhesion and endothelial cell barrier destruction. *Front Oncol* **13** : 973871, 2023. 10.3389/fonc.2023.973871/
- 10) Yoshioka Y, Kosaka N, Konishi Y, Ohta H, Okamoto H, Sonoda H, Nonaka R, Yamamoto H, Ishii H, Mori M : Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen. *Nat Commun* **5** : 3591, 2014. 10.1038/ncmms4591.
- 11) Wu W, Yu X, Wu J, Wu T, Fan Y, Chen W, et al. : Surface plasmon resonance imaging-based biosensor for multiplex and ultrasensitive detection of NSCLC-associated exosomal miRNAs using DNA programmed heterostructure of Au-on-Ag. *Biosens Bioelectron* **175** : 112835, 2021
- 12) Liu C, Zeng X, An Z, Yang Y, Eisenbaum M, Gu X, et al. : Sensitive detection of exosomal proteins via a compact surface plasmon resonance biosensor for cancer diagnosis. *ACS Sensors* **3** : 1471-1479, 2018
- 13) Pan B, Qin J, Liu X, He B, Wang X, Pan Y, et al. : Identification of serum exosomal hsa-circ 0004771 as a novel diagnostic biomarker of colorectal cancer. *Front Genet* **10** : 1096, 2019
- 14) Wei P, Wu F, Kang B, Sun X, Heskia F, Pachot A, et al. : Plasma extracellular vesicles detected by single molecule array technology as a liquid biopsy for colorectal cancer. *J Extracellular Vesicles* **9** : 1809765, 2020
- 15) Joshi GK, Deitz-McElyea S, Liyanage T, Lawrence K, Mali S, Sardar R, et al. : Label free Nanoplasmonic-based short noncoding RNA sensing at Attomolar concentrations allows for quantitative and highly specific assay of MicroRNA-10b in biological fluids and circulating exosomes. *ACS Nano* **9** : 11075-11089, 2015
- 16) Li T-D, Zhang R, Chen H, Huang Z-P, Ye X, Wang H, et al. : An ultrasensitive polydopamine bi-functionalized SERS immunoassay for exosomebased diagnosis and classification of pancreatic cancer. *Chem Sci* **9** : 5372-5382, 2018
- 17) Melo SA, Luecke LB, Kahlert C, Fernandez AF, Gammon ST, Kaye J, et al. : Glypican-1 identifies cancer exosomes and detects early pancreatic cancer. *Nature* **523** : 177-182, 2015
- 18) Nakano T, Chen IH, Wang C-C, Chen P-J, Tseng H-P, Huang K-T, et al. : Circulating exosomal miR-92b : its role for cancer immunoediting and clinical value for prediction of posttransplant hepatocellular carcinoma recurrence. *Am J Transplant Off J Am Soc Transplant Am Soc Transplant Surg* **19** : 3250-3262, 2019
- 19) Sun N, Lee Y-T, Zhang RY, Kao R, Teng P-C, Yang Y, et al. : Purification of HCC-specific extracellular vesicles on nanosubstrates for early HCC detection by digital scoring. *Nat Commun* **11** : 4489, 2020
- 20) Di H, Mi Z, Sun Y, Liu X, Liu X, Li A, et al. : Nanozyme-assisted sensitive profiling of exosomal proteins for rapid cancer diagnosis. *Theranostics* **10** : 9303-9314, 2020
- 21) Zhao R, Zhang Y, Zhang X, Yang Y, Zheng X, Li X, et al. : Exosomal long noncoding RNA HOTTIP as potential novel diagnostic and prognostic biomarker test for gastric cancer. *Mol Cancer* **17** : 68, 2018
- 22) Wei S, Peng L, Yang J, Sang H, Jin D, Li X, et al. : Exosomal transfer of miR-15b-3p enhances tumorigenesis and malignant transformation through the

- DYNLT1/Caspase-3/Caspase-9 signaling pathway in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* **39** : 32, 2020
- 23) Lee JU, Kim WH, Lee HS, Park KH, Sim SJ : Quantitative and specific detection of exosomal miRNAs for accurate diagnosis of breast cancer using a surface-enhanced Raman scattering sensor based on plasmonic head-flocked gold nanopillars. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* **15** : e1804968, 2019
- 24) Kwizera EA, O'Connor R, Vinduska V, Williams M, Butch ER, Snyder SE, et al. : Molecular detection and analysis of exosomes using surfaceenhanced Raman scattering gold nanorods and a miniaturized device. *Theranostics* **8** : 2722-2738, 2018
- 25) Liu J, Yoo J, Ho JY, Jung Y, Lee S, Hur SY, et al. : Plasma-derived exosomal miR-4732-5p is a promising noninvasive diagnostic biomarker for epithelial ovarian cancer. *J Ovarian Res* **14** : 59, 2021
- 26) Im H, Shao H, Park YI, Peterson VM, Castro CM, Weissleder R, et al. : Label-free detection and molecular profiling of exosomes with a nanoplasmonic sensor. *Nat Biotechnol* **32** : 490-495, 2014
- 27) Rodríguez M, Bajo-Santos C, Hessvik NP, Lorenz S, Fromm B, Berge V, et al. : Identification of non-invasive miRNAs biomarkers for prostate cancer by deep sequencing analysis of urinary exosomes. *Mol Cancer* **16** : 156, 2017
- 28) Li S, Zhao Y, Chen W, Yin L, Zhu J, Zhang H, et al. : Exosomal ephrinA2 derived from serum as a potential biomarker for prostate cancer. *J Cancer* **9** : 2659-2665, 2018
- 29) Hill W, Lim EL, Weeden CE, Lee C, Augustine M, Chen K, et al. : Lung Adenocarcinoma promotion by air pollutants. *Nature* **616** : 159-167, 2023