

## 公益財団法人 東京医科大学がん研究事業団 がん研究助成金研究報告書

令和 5 年 6 月 30 日

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者 (職名)	氏名	所属施設					
	平澤 陽介 ⑩ 講師	施設名 東京医科大学	所在地 東京都新宿区西新宿6-7-1	電話 03-3342-6111			
研究課題	ナノワイヤテクノロジーを用いた尿中miRNAによる膀胱がん早期診断法の確立						
研究目的	転移を有する進行性膀胱がんの予後は不良であり、5年生存率はわずか5%である。そのため、早期発見・診断により、進行性・転移性に至る前に治療介入することが重要となる。現在使用される尿細胞診は、特異度が94%と優れている一方で、感度が35%と低く、特に低悪性度の膀胱がんの検出は困難である。膀胱がんの除外のために、外来にて膀胱内視鏡検査を施行するが、痛みを伴い侵襲の大きな検査であることが問題である。また膀胱内視鏡の設備を有しないクリニックでは施行することができず、大きな病院へ紹介せざるを得ないのが現状である。そのため、早期膀胱がんを検出する新規バイオマーカーの開発は急務である。本研究では、膀胱がん患者と健常者の尿サンプルを用いて、尿中miRNAを共同研究機関であるCraif社のナノワイヤテクノロジーを用いて抽出し、尿中miRNAのプロファイリングを比較検討することにより、膀胱がんを予測する新規バイオマーカーの開発を目的とする。						
研究方法	当院の医学倫理審査委員会の承認を得たうえで、前向きに30名分の膀胱がん患者の尿サンプルを収集した。比較対象としてCraif社の共同研究機関である大宮シティクリニックの30名分の健常者の尿サンプルを使用した。-80℃で冷凍保存していた尿検体を解凍し、Craif社のナノワイヤデバイスを用いて、尿中エクソソーム由来miRNA及びFree miRNAを回収し、さらにカラムによりmiRNAの精製を行った。(miRNA 試料の作成)。miRNA 試料から、miRNAプロファイルをRT-qPCR, NGS いずれかにて網羅的に解析し、膀胱がん患者群と健常者群で比較し評価した。RT-qPCRを用いて、各群のmiRNAの発現をさらに詳細に分析した。						
研究成果	患者背景は膀胱がん患者群/健常者群の平均年齢、性別、喫煙歴はそれぞれ72.7歳/63.3歳、男性86.6%/86.6%、喫煙歴あり43.3%/53.3%、現在も喫煙中が13.3%/20%であった。膀胱がん患者群の病期stage 0a or 0is/ I / II / III / IVがそれぞれ40%/20%/33.3%/3.3%/3.3%であった。膀胱がん、健常者群のいずれにおいても尿中miRNA総発現量が極端に少ないサンプルは一つもなく、全て解析に適していた。膀胱がん患者群のサンプルでは尿定性において尿潜血1+/2+/3+がそれぞれ2人/2人/10人の計14人が該当した。一方で健常者群では全て尿潜血陰性であった。血尿により血球由来のmiRNAが検出されることが予想され、解析では膀胱がん患者群の尿潜血陽性の14人分は除外し、16人分で健常者群と比較検討とした。						

<p>研 究 成 果</p>	<p>NGSを行い網羅的に尿中miRNAを検出し、33種類のmiRNAが膀胱がん患者群の尿中にUp regulateし、14種類のmiRNAが逆にDown regulateしていた。</p> <p>膀胱がん患者でUp regulateしていたmiRNAはmiR-196b-5p（以下、miR-は省略）、192-5p/215-5p、194-5p、508-3p、514a-3p、142-3p、27-a-3p/27b-3p、146a-5p、191-3p、126-5p、95-3p、16-5p、140-5p、126-3p、21-3p、3074-5p、148a-3p、1269a-3p、218-5p、223-3p、24-3p、324-5p、15a-5p、194-3p、378a-3p/378c/378d/378e、378a-5p、629-5p、130b-3p、1246、151a-3p、26b-3p、210-3p、34a-5pの33種類であった。逆にDown regulateしていたmiRNAは、103b、204-5p、10a-5p、204-3p、10a-3p、9-5p、1296-5p、92b-5p、9-3p、551b-3p、125b-2-3p、548am-5p/548au-5p/548c-5p/548o-5p、331-3p、4728-3pの14種類であった。また血尿の尿中miRNAの影響を調べたところ、例えばmiR-451a、miR-486-5p、miR-15b-3p、miR-16-5pでは血尿0/1+/2+/3+と程度が強くなるに比例して、尿中miRNAの発現量が増加していた。逆に、血尿の程度に反比例していたmiRNAも存在した。尿サンプルは血球を除去した上で解析に用いているが、どうしても尿サンプル採取時もしくは血球除去処理時に一部の血球の細胞膜の破綻から血球由来のmiRNAが試料中に漏出している可能性が考えられた。そのため、今後は血尿の程度による補正が必要なことが示唆された。</p>
<p>今 後 の 予 定</p>	<p>今回のpilot studyにより、膀胱がん患者群で有意にUp regulateもしくはDown regulateしている尿中miRNAの候補を同定することができた。その一方で、血尿による尿中miRNA発現量の影響があることが判明し、血尿の程度に応じた解析数を今後も繰り返し行い、その影響力を補正することが将来的に必要なとといった課題も同時に見出すことができた。引き続き膀胱がん患者の尿サンプルを集め続け、より対象患者数を多くした研究を予定している。候補のUp regulateもしくはDown regulateしたmiRNAの候補ごとに血尿の影響を調査し、補正することも試みる。最終的には得られた最終候補の尿中miRNAを用いたバイオマーカーを複数個決定し、血尿の程度もデータとしてインプットし、人工知能(AI)を用いて膀胱がん予測のためのアルゴリズムを作成し、簡易キットの開発を目指す。得られた結果は学会や論文にて発表していく予定である。</p>

様式第3号

公益財団法人 東京医科大学がん研究事業団 がん研究助成金収支決算報告書

令和 5 年 6 月 30 日

公益財団法人

がん研究事業団理事長 殿

研究者所属施設名 東京医科大学 泌尿器科学分野

氏 名 平澤 陽介 (印)

収 支 決 算 書

(単位 円)

交付を受けた助成金額		金		円
支 出 内 訳	費 目	明 細	単 価 及 金 額	計 額
	設備、備品費	別添収支簿の通り	別添収支簿の通り	521,350
	消耗品費	別添収支簿の通り	別添収支簿の通り	485,100
	計			1,006,450
過 △ 不足額				△6,450
備 考	貴財団より交付を受けました助成金は全て本研究課題に必要な「エキソソーム抽出試薬」の消耗品購入費、および設備・備品購入費として適正に使用致しました。			
	不足額6,450円は申請者本人の自己支出としております。			

## 支 出 費 内 訳

区 分	金 額	根 拠
設備、備品費	306800	MacBook Pro
	37800	Microsoft Office Home and Business (Mac用)
	75770	PCモニター UltraWide 34WQ75C-B
	13800	Mac用 Mouse
	70800	iPad mini
	16380	MagSafe充電パッド
消耗品費	485100	Total Exosome Isolation Reagent (from urine) 50mL ThermoFisher 29400円(税抜き) ×15個

※注意：旅費（出張費、宿泊費、交通費）は研究経費に入りません。