

第二次審査（論文公開審査）結果の要旨

Utility of urinary extracellular vesicles for colorectal cancer: comparison of DNA quality and MRD detection

大腸癌における尿中細胞外小胞由来 DNA の特性解析と微小残存病変への応用

日本医科大学大学院医学研究科 消化器外科学分野

大学院生 香中 伸太郎

Cancer Science, 2026 Jun;117(6):1667-1677.掲載

DOI: 10.1111/cas.70368

大腸癌術後の再発リスク評価における完全非侵襲的なリキッドバイオプシーの確立を目的として、尿中細胞外小胞（extracellular vesicles：EV）の特性と、尿中 EV-DNA を用いた minimal residual disease (MRD) 評価の有用性を検討した。大腸癌患者を対象に、尿中 EV-DNA、尿中 cell-free DNA (cfDNA)、血漿 EV-DNA、血漿 cfDNA の 4 種類を同一患者内で比較した。Quality-validation cohort 97 例では、電子顕微鏡および Western blotting により尿中 EV の分離を確認した。尿中 EV は血漿 EV より粒子径が大きく、粒子濃度は低値であった。プロテオーム解析では尿中 EV から 4,674 種類、血漿 EV から 476 種類のタンパクが同定され、albumin、immunoglobulin には差を認めなかった一方、EV 特異的マーカーである CD63、CD81、CD9 は尿中 EV で有意に高発現しており、尿中 EV の高い純度が示された。DNA 解析では、尿中 EV-DNA は良好な DNA 濃度を示し、DNA 断片化の指標である Long/Short ratio は 4 検体中で最も高く、血漿 EV-DNA および血漿 cfDNA と比較して有意に高値で、長鎖 DNA が良好に保持されていた。RAS/BRAF 変異の検出率は尿中 EV-DNA 34.0%、尿中 cfDNA 21.6%、血漿 EV-DNA 29.9%、血漿 cfDNA 39.2%であり、4 群間に有意差を認めなかった。Survival-analysis cohort 63 例では、根治切除 1 か月後の尿中 EV-DNA から RAS/BRAF 変異を検出した 20 例を MRD 陽性と定義した。MRD 陽性群では 9 例に再発を認め、MRD 陰性群と比較して無再発生存期間が有意に不良であった（HR 5.25、95% CI 1.74–15.80、 $p=0.001$ ）。全生存期間も MRD 陽性群で有意に不良であり、Stage IV・再発例を除外した解析でも同様の傾向が維持された。以上より、尿中 EV は高品質な DNA を保持する完全非侵襲的なリキッドバイオプシー源であり、尿中 EV-DNA による MRD 評価は、大腸癌術後の再発リスク層別化および反復可能な経時的モニタリングに有用である可能性が示された。

第二次審査では、EV の分離・抽出法および尿採取時期による EV 量の変動について質問があり、申請者は、臨床実装を見据え簡便かつ安価な抽出法を選択したこと、採取条件による変動については今後、尿中クレアチニンによる補正等を検討すると回答した。また、cfDNA や血漿 EV-DNA との予後予測能の比較については、本研究の主目的が quality-validation であり、生存解析は症例数・観察期間に限界があるため、症例集積と長期観察による検証が必要と回答した。さらに MRD 陰性例の再発について、リキッドバイオプシーには偽陰性等の課題があり、今後は EV 内タンパク解析を DNA 解析と組み合わせ、より精度の高い再発リスク層別化を目指すと述べた。

以上より、本研究は尿中 EV の分析学的特性と術後 MRD 評価の臨床的可能性を示した独創性の高い研究であり、申請者は研究計画の立案から解析・考察まで主体的に遂行し、自立した研究者として十分な資質を有すると判断された。よって、本論文は学位論文として価値あるものと認定した。