

論文内容の要旨

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

日本医科大学医学研究科 消化器外科分野

大学院生 香中伸太郎

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

大腸癌は世界的に罹患率および死亡率の高い悪性腫瘍であり、術後再発の早期発見と適切な補助療法の選択は予後改善に重要である。近年、血中循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA : ctDNA) を用いたリキッドバイオプシーが微小残存病変 (minimal residual disease : MRD) の評価法として注目されているが、採血を必要とすることや検出感度の限界などの課題が残されている。一方、細胞外小胞 (extracellular vesicles : EVs) は細胞から分泌される脂質二重膜構造を有する小胞であり、内部に DNA、RNA およびタンパク質を含有する。EV 内の核酸は膜構造によって保護されるため安定性が高く、新たなリキッドバイオプシー基盤として期待されている。しかし、大腸癌における尿中 EV の特性や臨床的有用性については十分に検討されていない。本研究では、尿中 EV の品質および DNA 特性を血液由来検体と比較するとともに、術後 MRD 評価における有用性を検証した。

対象は 2023 年 4 月から 2024 年 12 月までに当院で手術を施行した大腸癌患者である。解析精度評価コホート 97 例を対象として、尿中 EV-DNA、尿中 ctDNA、血漿 EV-DNA および血漿 ctDNA を比較し、EV の品質、DNA 濃度、DNA 断片長および RAS/BRAF 変異検出能を評価した。また、予後解析コホート 63 例を対象として、術後 1 か月時点の尿中 EV-DNA における RAS/BRAF 変異の有無を MRD 評価に用い、無再発生存期間 (recurrence-free survival : RFS) および全生存期間 (overall survival : OS) との関連を検討した。

まず、電子顕微鏡観察により尿中から典型的な EV 構造が確認され、Western blot 解析では EV マーカーである CD63、CD81 および CD9 の発現を認めた。ナノ粒子追跡解析では、尿中 EV の粒子径中央値は 175.6 nm であり、血漿 EV の 98.9 nm と比較して有意に大きかった ($p < 0.001$)。一方、粒子数は尿中 EV で有意に少なかった (7.3

particles/pL vs. 98.9 particles/pL, $p < 0.001$)。さらにプロテオーム解析では、尿中 EV から平均 4674 種類のタンパク質が検出され、血漿 EV の 476 種類を大きく上回った。アルブミンや免疫グロブリンなどの夾雑タンパク質に差は認めなかったが、EV 特異的マーカーである CD63、CD81 および CD9 は尿中 EV で有意に高発現していた。これらの結果から、尿中 EV は血漿 EV と比較して夾雑物の少ない高純度な EV 集団であることが示された。

DNA 解析では、4 種類の検体間で DNA 濃度および DNA 品質を比較した。DNA 濃度は尿中 EV-DNA および尿中 ctDNA で高値を示し、特に血漿 EV-DNA は他の検体と比較して有意に低値であった (いずれも $p < 0.001$)。また DNA 断片長解析では、DNA 品質の指標である Long/Short ratio が尿中 EV-DNA で最も高値を示した。尿中 EV-DNA の中央値は 0.97 であり、血漿 EV-DNA (0.31) および血漿 ctDNA (0.35) より有意に高値であった (それぞれ $p = 0.001$ および $p = 0.002$)。尿中 ctDNA も血液由来検体より高値を示したが、尿中 EV-DNA が最も良好な DNA 保存状態を示した。これは EV 膜による核酸保護作用を反映していると考えられた。

次に RAS/BRAF 変異検出能を比較したところ、変異検出率は尿中 EV-DNA で 34.0%、尿中 ctDNA で 21.6%、血漿 EV-DNA で 29.9%、血漿 ctDNA で 39.2%であった。統計学的有意差は認めなかったものの、尿中 EV-DNA は血漿 ctDNA に次ぐ高い検出率を示し、尿中 ctDNA を上回る感度を有していた。また術前尿中 EV-DNA にのみ変異が検出され、腫瘍組織では検出されなかった症例を 38.1%に認めた。これは単一部位の組織検査では捉えられない腫瘍内不均一性を反映している可能性が示唆された。

予後解析では、63 例中 20 例が術後 1 か月時点で MRD 陽性と判定された。MRD 陽性群

では 20 例中 9 例に再発を認め、再発部位は肝転移、肺転移、腹膜播種およびリンパ節再発であった。MRD 陽性群の RFS は MRD 陰性群と比較して有意に不良であり、ハザード比は 5.25 (95%信頼区間 1.74-15.80、 $p=0.001$) であった。また OS についても MRD 陽性群で有意な低下を認めた ($p<0.001$)。さらに Stage IV および再発症例を除外した解析においても、MRD 陽性群では RFS および OS ともに有意な予後不良を示し、術後尿中 EV-DNA による MRD 評価の有用性が裏付けられた。

以上より、尿中 EV は高純度で良好な DNA 品質を有する新たなリキッドバイオプシー検体であり、尿中 EV-DNA を用いた MRD 評価は大腸癌術後再発および生命予後を予測する有力なバイオマーカーとなる可能性が示された。本研究成果は、完全非侵襲的な術後モニタリング法の開発と個別化治療戦略の確立に寄与するものと考えられる。