

犬のがん早期診断のための リキッドバイオプシー —いまとこれから—

Liquid biopsy for early detection for canine cancers
— Present and Future —

池田 凡子^[1] Namiko Ikeda / 落谷 孝広^[1,2] / 伊藤 博^[1]

[1] 株式会社 メディカル・アーク

[2] 東京医科大学 医学総合研究所 分子細胞治療研究部門

小動物腫瘍臨床 Joncol

第 19 巻第 1 号 通巻第 33 号

ファームプレス

犬のがん早期診断のための リキッドバイオプシー —いまとこれから—

Liquid biopsy for early detection for canine cancers —Present and Future—

池田 凡子^[1]

Namiko Ikeda / 落谷 孝広^[1,2] / 伊藤 博^[1]

^[1] 株式会社 メディカル・アーク

^[2] 東京医科大学 医学総合研究所 分子細胞治療研究部門

Key
words

早期診断、リキッドバイオプシー、バイオマーカー

はじめに

伴侶動物における獣医療の発展に伴い、犬の高齢化が進み、がんが犬の死亡原因の上位を占めて久しい。外科療法・化学療法・放射線療法の三大療法に加え、近年は免疫療法の適応も広がり、本邦では、世界初の犬腫瘍に対する抗PD-1抗体・抗PD-L1抗体が開発され、臨床試験が進められている。日進月歩のがんと闘いにおいて、新たな治療法と同様に、がんの早期発見が、予後を改善するであろうことは長らく明文化されてきたものの、現在、確立された犬のがん早期診断法は存在せず、その開発と臨床実装は喫緊の課題である。特に、ヒトの言葉を話さない伴侶動物において、がんを初期段階で発見することは、極めて困難である。

早期診断の難しさの要因は、悪性腫瘍のみを検出するための高い感度・特異度を有し、簡便にアクセス可能な診断バイオマーカーの欠如にある¹⁾。ヒトの腫瘍においても、このようなバイオマーカーの探索とそれを用いた新規早期診断法の開発を目指し、積極的な研究が行われてきたものの、候補分子は少なく、実用化に至るものは長らく現れなかった。しかし、2010年、「リキッド（液体）バイオプシー（生検）」（後述）という概念が誕生して以降、停滞感のあった早期診断バイオマーカー探索研究の潮流が大きく変わ

り、リキッドバイオプシーで得られる多様な分子を早期診断バイオマーカー候補として、ヒト腫瘍を対象にした数多くの実証研究が行われるようになった。ここ10年ほどでは、獣医学領域においても同様の研究が散見されている。

本稿では、いまだ獣医学領域での研究が途上であるリキッドバイオプシーについて、がんマーカーの歴史から、リキッドバイオプシーの台頭と早期診断バイオマーカーへの応用に向けた研究、それらの実臨床への実装状況、そして、獣医療における現在の研究状況とその発展性について解説する。

がんマーカーについて

がんの診断ツールとしてまずあげられるのが、血中の「がんマーカー」である。がんマーカーとは「がんの存在を示す分子、あるいは、がんの将来の挙動（進行の可能性、治療への反応性など）に関する情報を提供する分子」と定義され²⁾、がんが産生する血清蛋白や抗原、酵素などを指す。

その歴史は、1848年に骨髄腫患者の尿中から Bence Jones 蛋白が発見されたこと³⁾ に始まる。1963年には Abelev らが移植肝癌マウスの血清中に⁴⁾、翌年には Tatarinov らがヒト原発性肝細胞癌患者の血清中に⁵⁾、それぞれ、胎児期の血漿蛋白質である Alpha-fetoprotein (AFP)

[1] 〒184-0012 東京都小金井市中町2丁目24-16 農工大・多摩小金井ベンチャーポート203号室

[2] 〒160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1 教育研究棟14階

犬のがん早期診断のためのリキッドバイオプシー —いまとこれから—

を見出した。1965年にはGoldらにより、ヒト大腸癌組織抽出液中において、癌胎児性糖蛋白質の Carcinoembryonic antigen (CEA) が発見された⁶⁾。この1960年代での発見を皮切りに、1979年には Prostate Specific Antigen (PSA)⁷⁾、80年代前半には CA125⁸⁾ や CA19.9⁹⁾ など、立て続けに複数のがんマーカーが同定された。さらに、1975年にモノクローナル抗体作製技術が開発され¹⁰⁾、がんマーカーの検出に応用されたことで、がんマーカー候補分子の探索は加速し、現在では、ヒト医療において、保険適用となっているものだけでも約40種類のがんマーカーが存在する。しかし、単一マーカーとして使用されてきたこれらのがんマーカーは、進行したがんの治療効果を判定するために使われているものがほとんどであり、がんの初期段階では発現量が少なく、早期診断における有用性が低いことが指摘されている¹¹⁾。

一方、獣医領域では、これらのがんマーカーのほとんどが、犬のがんにおける有用性を立証できておらず、獣医療独自のマーカーもごくわずかである。一部の研究は、ヒトのがんマーカーを複数組み合わせることで診断精度を向上させたコンビネーションマーカーの評価¹²⁾ や、胎児性蛋白質の survivin など、新規のがんマーカーの探索¹³⁾ を行っているものの、現時点において、実臨床で汎用されている犬腫瘍用のがんマーカーはほとんどなく¹⁴⁾、特に、“早期”でがん診断を可能にする血中バイオマーカーは、皆無である。

がんの不均一性とリキッドバイオプシーの登場

1982年にヒトのがん遺伝子として RAS 遺伝子が初めて同定されて¹⁵⁾以降、がんが遺伝子の病気(変異)によって起こることは広く認められていた¹⁶⁾が、2010年代前半、がんはその成長・進展に伴って刻々と遺伝子変異を蓄積することが明らかとなり¹⁷⁾、腫瘍塊全体のなかでも個々の細胞ごとに有する変異の組み合わせが異なるという現象、すなわち「腫瘍内不均一性」¹⁸⁾が認識されるに至った。そしてその不均一性が、治療反応性や予後に影響を与えることも報告された¹⁹⁾。つまり、腫瘍内不均一性が低い初期の小さな腫瘍塊の段階での早期発見は、治療奏功につながり²⁰⁾、また、治療時においては、「適切な治療標的の選定と予後の予測には、刻々と変化する腫瘍の分子生物学的情報を、定期的に観察することが必要である²¹⁾」という、新たな logic が誕生したが、それは、固形腫瘍の一部分を切り取ってくる“スナップショット”な組織生検では、実質的に

不可能であった。

そのような折、ほぼ同時期の2010年に、がん患者の血液中の循環腫瘍細胞 (circulating tumor cells : CTC) の分析 (当時は主に転移の分子機構の解明) を目的として、「リキッドバイオプシー」が新しい診断概念として導入された²²⁾。前述した従来のがんマーカーによるがん検診も、担がん患者の体液から検出される、がん由来物質を検出しているが、単に腫瘍の有無を示す従来のマーカーとは異なり、採取した検体から、がんの遺伝情報を解析可能であることが、リキッドバイオプシーの特徴である。そして、従来の組織生検に比べ、はるかに簡便かつ低侵襲に腫瘍の遺伝情報を取得できるこの生体検査法は、「がん患者の適切な治療選択・治療モニタリング・予後予測のためには、腫瘍の発生および進展とともに、がんのもつ遺伝情報の定期的な収集が必須である」という需要を満たしうる唯一の検査手法として、以降利用されるようになった。このリキッドバイオプシーの誕生は、「がんマーカー」の概念を、単に腫瘍の存在を指し示すだけの分子から、腫瘍の診断・治療選択および効果判定・予後予測と、いわゆる patient journey のあらゆるフェーズにおいて必要ながんの遺伝子情報提供源へと変革させる、パラダイムシフトとなった²³⁾。

現在のリキッドバイオプシーは、より広範な生体分子に対象を広げる形で利用されており、CTCのみならず、循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA : ctDNA)、循環無細胞 RNA (cell-free RNA : cfRNA)、腫瘍の影響を受けた血小板 (tumor-educated platelets : TEP)、細胞外小胞 (extracellular vesicles : EV)、その他、蛋白質や代謝産物など、症例の血液・尿・唾液・骨髄液などの液体サンプル中に含まれる、様々な腫瘍由来の循環分子の分析に拡張されている²⁴⁾ (図1)。

以降の項目では、特に早期診断法への応用が研究されているリキッドバイオプシーについて解説する。

リキッドバイオプシーによる早期診断バイオマーカー

循環腫瘍細胞

循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cells : CTC) とは、原発腫瘍および転移病巣から放出され、腫瘍患者の末梢血中に存在する腫瘍細胞のことであり、転移形成に重要な役割を果たすと考えられている。

CTCの歴史は古く、1869年に転移性癌患者で初めて観察されていた²⁵⁾が、血中の膨大な数の細胞集団 (赤血球: 約 5×10^9 個/mL、白血球: 約 5×10^6 個/mL) に比べて、

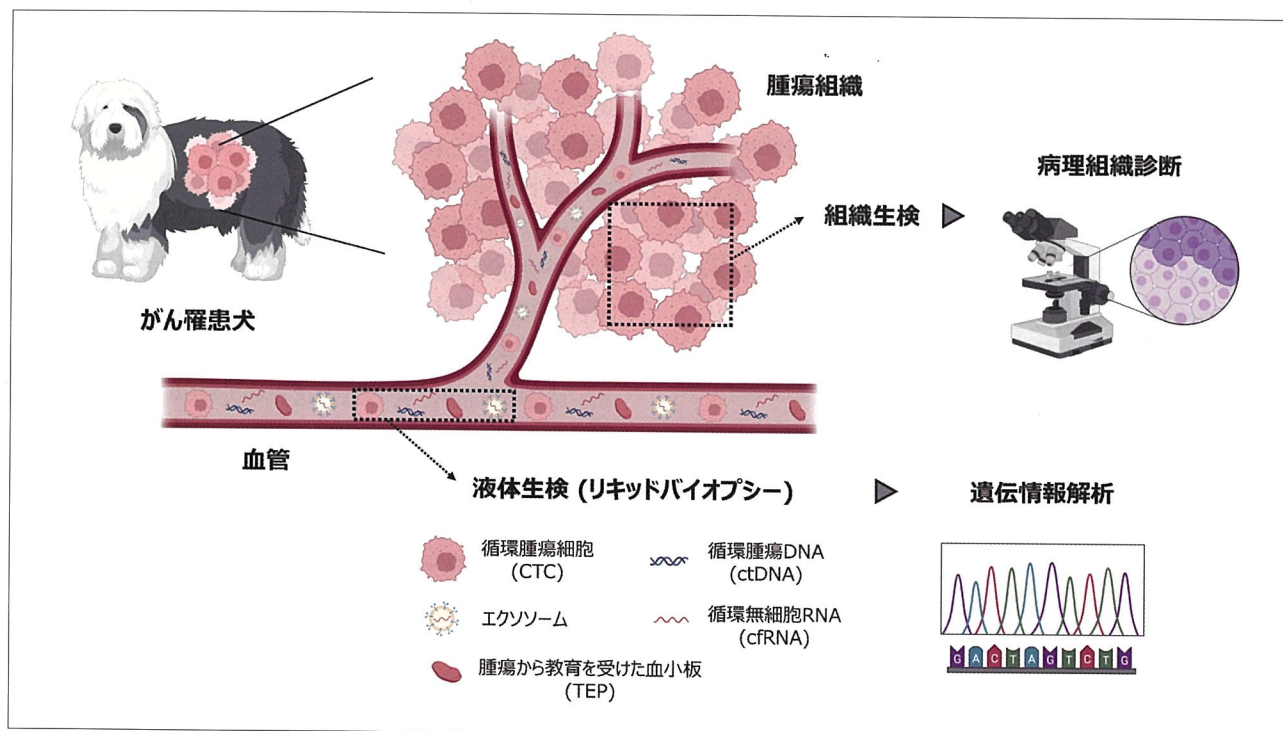


図1 組織生検と液体生検（リキッドバイオプシー）で回収する対象物とその後の検査の違い

組織生検は、腫瘍組織から、組織自体（腫瘍細胞の塊）を回収し病理組織診断を行うのに対し、リキッドバイオプシーは、血液などの液体の生体試料から、そこに含まれる CTC・エクソソーム・TEP・ctDNA・cfRNAなどを回収し、その遺伝情報を解析する生体検査法である。

CTCは血中の細胞100万個～1億個あたり1個と圧倒的に少なく、分離の困難さから、その補足技術が確立される1990年代中頃まで、長らく研究が進まなかった²⁶⁾。2000年以降、腫瘍マーカーの遺伝子発現をターゲットとしたRT-PCR法や、表面抗原 Epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) や細胞骨格構成蛋白質 Cytokeratins (CK) などの上皮マーカーに対する抗体が結合した抗体修飾磁性粒子による細胞分離などの技術が開発されると、CTC研究は一気に拡大した。

そのなかで、いくつかのマウスモデル²⁷⁻³⁰⁾、および、ヒトの臨床サンプル³¹⁻³³⁾を用いた研究によって、CTCは、腫瘍がある程度進行した段階、つまり一定の原発巣形成後の、転移巣形成の前段階だけでなく、原発巣形成の初期段階においても認められることが明らかとなった。これにより、CTCががんの早期診断ツールとして有用であることが示唆され、主に肺癌を中心に、臨床応用に向けた研究が進められている。一方で、CTCの血中での絶対細胞数の少なさは依然として課題であり、研究段階での検出感度は、臨床でのスクリーニングに耐えうるものではなく、実用化には大きな壁があるのが現状である^{34, 35)}。

犬の腫瘍における CTCは、転移能の高い骨肉腫および乳腺腫瘍などで、いくつか報告されている³⁶⁾。犬の四肢原

発骨肉腫では、2019年に、カナダの研究グループが犬骨肉腫の CTCの検出方法を新規に確立し、その検出方法を用いた検討により、犬症例血中ではヒト骨肉腫症例に比べて、はるかに多くの CTCが検出されること、またその数が手術による原発巣除去後に減少し、転移進行末期には増加することを明らかにした³⁷⁾。2022年には、同一グループによって、犬の四肢骨肉腫において、臨床的に転移巣を認める前に、血中 CTCの急激な増加（スパイク）が観察される症例が存在し、かつこのスパイク発生が、負の予後と有意に相関することを示した³⁸⁾。これらの研究成果は、ヒトの腫瘍同様に犬の CTCも、その数が病態を反映しており、治療効果判定や予後予測の有用なバイオマーカーとなることを示唆するものである。

犬の乳腺腫瘍では、PCRベースの犬乳腺腫瘍独自の CTC検出手法が報告されたが、当該方法での CTCの検出の程度と臨床での症例の転帰との相関が認められなかった^{39, 40)}。一方ヒトの乳癌の CTCを検出するためのシステム (CellSerch[®] system) を応用し、犬乳腺腫瘍の CTCを検出した別の研究では、治療前の CTCが一定数以上認められた症例は、それ以下の症例に比べ、有意に生存期間が短かった。また、乳腺腫瘍のなかでもより悪性度の強い炎症性乳癌の症例のほとんどで CTCが確認されたことが報告

され⁴¹⁾、犬の CTC がヒトの CTC と同様の細胞特性を有し、これによって、ヒトの CTC 検出技術が犬の CTC の捕捉にも有用である可能性が示された。

現在までの犬腫瘍における CTC 研究は、一部腫瘍種における、転移予測マーカーとしての有用性評価が主であるが、犬 CTC とヒト CTC の挙動や分子学的特性の類似性を示す研究成果が報告されていることから、早期診断バイオマーカーとしての有用性が実証される可能性は十分にある。

循環腫瘍 DNA

リキッドバイオプシーのなかで、最も研究が進んでいる分子が、循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA: ctDNA) である。血中には、ネクロシスやアポトーシスによって体細胞から放出され、断片化した DNA (cell-free DNA: cfDNA) が循環しており、特に腫瘍細胞から放出された cfDNA を ctDNA と呼ぶ⁴²⁾。

cfDNA の歴史は、Mande らによって 1948 年に初めて、血清および血漿中から、本来細胞内にあるはずの核酸が細胞から遊離した状態で検出・同定されたこと⁴³⁾ に始まる。腫瘍学においては、1977 年に複数のがん患者の血中における cfDNA が解析され、転移を有する症例の cfDNA レベルが、転移のない症例のレベルと比較して高く、治療介入後にその値が低下することが示された⁴⁴⁾。1989 年には、がん患者で高いレベルを示す cfDNA が、がん細胞特有のゲノム異常を有していることを根拠に、腫瘍細胞由来であることが証明された⁴⁵⁾。これら研究報告以降、腫瘍における cfDNA、のちに ctDNA と呼ばれる cfDNA 分画に注目が集まり、1994 年には、膵臓癌患者の血中 cfDNA に、がん遺伝子の 1 つである *KRAS* 遺伝子変異が⁴⁶⁾、急性骨髄性白血病の血中 cfDNA に、*NRAS* 遺伝子変異が⁴⁷⁾、それぞれ同定された。

同時期に、大量の DNA の塩基配列を高速で解読可能な次世代シーケンサー (next generation sequencing: NGS) が登場したことによって、がんの分子生物学研究が進み、犬肥満細胞腫における c-kit 変異のような、がん細胞の増殖を担う責任遺伝子 (ドライバー遺伝子) の異常が次々と同定された。さらに、このドライバー遺伝子異常によって恒常的に活性化されたがん細胞内の増殖シグナルを阻害する「分子標的治療薬」の開発が盛んとなり、獣医療においても、c-kit 変異を有する犬肥満細胞腫に対するイマチニブやトセラニブ (パラディア[®]錠) が、分子標的薬として、現在広く用いられている。

前述した腫瘍内不均一性を鑑みると、この分子標的薬の適応を判断するためには、腫瘍に蓄積する多数の遺伝子異

常を一挙に明らかにできる検査系が必要であり、NGS の普及により、このような検査、いわゆる「遺伝子パネル検査」が可能となった。ctDNA は、腫瘍を形成する複数のがん細胞からそれぞれ放出されるため、腫瘍内不均一性の総和であり⁴⁸⁾、異なる領域由来の異なる変異が同時に検出され得ること⁴⁹⁾ から、ctDNA を利用した遺伝子パネル検査の研究開発、臨床実装が一気に推し進められた⁵⁰⁾。実際、2021 年には、FoundationOne Liquid CDx が本邦初の包括的がんゲノムプロファイリング検査として承認されており、分子標的薬の適応患者選択のための ctDNA によるがん遺伝子パネル検査は、現時点において、保険償還され臨床使用されている唯一のリキッドバイオプシーツールである。

数多くの ctDNA 研究成果を受け、ctDNA のアプリケーションは、遺伝子パネル検査による個別化医療の他に、腫瘍の早期発見・治療効果判定・治療中および治療後のモニタリングなど、多岐に拡大されている一方で、がん早期発見への臨床応用には高い障壁がある。その要因として、まず 1 つに、特に初期病変から放出される ctDNA 量が少なく⁵¹⁾、がん細胞以外 (ほとんどが造血細胞) から放出された cfDNA のバックグラウンドのために、十分な感度と特異度を担保した安定的な検出方法が確立されていないことがあげられる。また、組織生検による確定診断後の治療モニタリング等とは異なり、早期診断時には、組織生検サンプルの解析で得られる腫瘍種や遺伝子変異の情報が全く存在せず、かつ、多くのがんが *KRAS* や *TP53* などの主要ながん遺伝子に共通の変異をもっていることが多い⁵²⁾ ため、ctDNA における変異の情報のみによって、発生初期のがんを特異的に同定し、早期診断することは困難であることも指摘されている。

これらの理由から、ctDNA を用いた早期がんの検出のため、ctDNA の変異検出だけでなく、追加のマーカーを組み合わせた様々なストラテジーが研究開発されている。Cohen らは、COSMIC (Catalog of Somatic Mutations in Cancer) データベースから、血中で高頻度に存在する 16 遺伝子 (*KRAS*, *TP53* など) の変異と、9 つの血清蛋白質腫瘍マーカー (CEA, AFP など) を選択・組み合わせた早期検出スクリーニング法を開発し、CancerSEEK[®] と名づけ、臨床的に検出可能な非転移性の癌 (Stage I ~ Stage III) 患者群 1005 人および健康な人の対照群 812 人の血液をスクリーニングした⁵³⁾。その結果、8 つの腫瘍種において、感度は 33 ~ 98 % (中央値 70 %) であり、対照群で陽性と判定された数は 812 人中 7 人のみで、特異度は 99 % 以上であった。

また、ctDNAのゲノム変異だけでなく、エピジェネティックな変化（DNA断片長、メチル化など）の解析を利用した早期発見法の開発も進んでいる。GRAIL社のGalleri[®]検査法は、Circulating Cell-free Genome Atlas (CCGA) という試験において、複数の癌種を対象に、ctDNAのCpG領域を含む特定領域についてのメチル化を解析し、がんの有無とその種類を判定する方法を開発したが、Stage Iのみの感度は16.8%と、早期診断法とするには厳しい結果にとどまった⁵⁴⁾。一方、大腸癌に限定されるが、Guardant Health社は、ゲノム変異・メチル化パターン・DNA断片パターンを組み合わせたmultimodalなLUNAR-2検査法による早期大腸癌の検出法を提唱し、その感度は90.3%（Stage I: 90%、Stage II: 88%、Stage III: 96%）、特異度は96.6%と高く⁵⁵⁾、現在は実用化に向けた臨床試験が進行中である。

獣医学におけるctDNA研究の数は、ヒトのそれと比べると規模や数はまだまだ小さく少ないものの、実臨床で利用可能なまでに研究開発が進められている。ここ15年ほどの間に、犬の複数の腫瘍種において、がん細胞特異的な遺伝子変異が存在すること（リンパ腫⁵⁶⁾・組織球肉腫⁵⁷⁾・口腔内悪性黒色腫⁵⁸⁾・尿路上皮癌⁵⁹⁾・肥満細胞腫⁶⁰⁾）、腫瘍罹患犬の血中にはcfDNAが観察され⁶¹⁾、そのcfDNAから検出される変異は、原発腫瘍組織が有する変異と同一であること⁶²⁾が明らかにされ、医学領域同様に、獣医学領域でも、ctDNAが、犬のがんの新規診断・治療モダリティに発展することが期待されている。

実際、アメリカにおいて、ctDNAによる犬のがんの早期診断法として商業化している検査法が、現在既に存在する。PetDX社のOncoK9[®]検査は、健康犬と種々の腫瘍に罹患した犬、計1155検体を対象にした研究において、NGSを用いて血中のctDNAにある遺伝子変異を検出した⁶³⁾。本検査では、30種類のがんからctDNAの変異が検出可能で、その感度は54.7%、特異度は98.5%であり、特に悪性度の高いリンパ腫・骨肉腫・血管肉腫に限定すると、85.4%と高い感度を示したと報告している。その一方、限局性／局所性の症例では、病変が5cm以下と5cm以上の場合、それぞれ感度が19.6%と51.3%、播種性／転移性症例では、病変が5cm以下と5cm以上の場合、それぞれ82.9%と87.5%であり、限局性の小さな初期病変での検出感度は低かった。しかし、偽陽性（TP53遺伝子とPIK3CA遺伝子に変異あり）と診断された7歳の健康な雑種犬1頭が、5ヵ月後に血管肉腫を発症したことから、早期診断法としての有効性が注目され、本検査は2021年5月から実用化されている。現在、この検査を導入する提携病

院は増えてきているものの、NGSベースの検査法であるため、判定まで最大1ヵ月を要し、価格も飼主負担額で\$500~1200とやや高額である。NGSの低価格化に伴う検査費用のコストダウンにより、本検査のさらなる普及が見込まれる。

循環 microRNA

MicroRNAは、長さが19~25塩基程度と短く、蛋白質に翻訳されない1本鎖のRNAである⁶⁴⁾。1993年に線虫（*Caenorhabditis elegans*）で初めてmicroRNAが発見され⁶⁵⁾、1998年には、1993年に同定されたmicroRNAが特定の相補的な配列をもつmessenger RNA (mRNA) に結合することで蛋白質合成を抑制する「RNA干渉」という現象が発見された⁶⁶⁾。この発見は、セントラルドグマ（遺伝情報は、DNA→RNA→蛋白質という不可逆な順で伝達されるという概念）を覆す大発見であり、2006年にノーベル賞をスピード受賞し、microRNAに関する研究が爆発的に増加した契機となった。2008年には、線虫のlet-7というmicroRNA（このmicroRNA自体は2000年に発見された）が、ヒトを含む他の生物でも保存され、さらに、腫瘍を抑制する働きがあること⁶⁷⁾が明らかになり、腫瘍におけるmicroRNAの発現とその機能についての関心が一気に高まった。

同時期に、microRNAは組織特異性が高く⁶⁸⁾、また、microRNAの発現パターン（profile）は腫瘍組織と正常組織で異なり、このprofileによって、腫瘍の発生臓器・組織型・分化度などを分類できること⁶⁹⁾、原発不明の転移病巣の起源を特定することができること⁷⁰⁾が報告され、腫瘍診断の補助ツールとしての腫瘍特異的なmicroRNAの有用性が示唆された。さらに、2008年に初めてびまん性大細胞型リンパ腫の患者血清中にmicroRNA-21が同定され、そのレベルが患者の無再発生存期間と相関すること⁷¹⁾が報告されると、その後続々と、あらゆる腫瘍種において、患者血清中に健康人とは異なるmicroRNA profileが同定されていった。当初、microRNAを含む循環血中の核酸は、ネクロシス細胞から漏出してくるものと考えられていたが、2007年に、エクソソーム（exosome）という100nm前後のサイズの細胞外小胞にmicroRNAが内包され、親細胞から分泌されていること、このエクソソームの脂質膜が酵素を通さないために、血中のRNA分解酵素（RNase）による分解を免れ、安定的に存在していることが示された⁷²⁾。以降、がん研究において、エクソソームの単離と内包されているmicroRNAの解析が広く行われるようになった。

犬のがん早期診断のためのリキッドバイオプシー —いまとこれから—

現在、例えば、乳癌患者血中の9つの microRNA のレベルが、Stage IV の患者群と比較して、Stage I / II / III の患者群で高いこと⁷³⁾や、いくつかの microRNA のレベルが、健常群と非小細胞癌の患者群 (Stage 0 および I) の患者の判別を可能とすること⁷⁴⁾などの研究報告によって、多くの腫瘍患者血中における microRNA profile、そして、stage におけるその profile の差異が明らかになっている。発生初期のがんの患者において、前述した CTC ならびに ctDNA は、濃度が非常に低い⁷⁵⁾のに対し、腫瘍の stage 進行に伴ってその profile が変化する microRNA は、病期判定に有用であり、それゆえに、リキッドバイオプシーによるがん早期診断法において大きなアドバンテージを有しているといわれている。

現在、シンガポールの MiRXES 社は、12種類の血中 microRNA の定量データを基にして⁷⁶⁾、早期のヒトの胃癌検出用検査法として GASTROClear[®]を開発、2019年に世界初の microRNA ベースの体外診断用医薬品としてシンガポール当局から承認を受けている。本邦でも、microRNA を用いた積極的な早期診断技術の開発研究が推し進められており、2014~2018年にかけて、13の癌種を対象にした「体液中マイクロ RNA 測定技術基盤開発」という大規模プロジェクトが遂行された。このプロジェクトにより、膵臓癌⁷⁷⁾、肺癌⁷⁸⁾、胃癌⁷⁹⁾などにおいて、各癌種の患者血清中の microRNA profile が明らかとなり、さらに、これらの microRNA を組み合わせることで、高精度な診断モデルが樹立され、論文化されている。

犬のがんにおいては、腫瘍組織における特異的な microRNA の発現傾向が徐々に明らかになりつつある⁸⁰⁾ものの、循環 microRNA に関する研究は少なく、特に、早期発見に向けた体系的な microRNA 研究は存在しない。しかしながら、ここ数年、種々の腫瘍細胞株 (悪性黒色腫・乳腺腫瘍・骨肉腫・リンパ腫・肥満細胞腫) の培養上清中に microRNA が存在することが証明され⁸¹⁾、さらに犬の乳腺腫瘍症例の血清から、RNA シークエンス (RNA-seq) によって452種類の microRNA が検出された。そのうち microRNA-19b および miR-125a は、健常犬群と比較して、患者群で有意に発現が高かったことが明らかにされたが、発現値と生存期間との相関は認められなかった⁸²⁾。一方、岐阜大学の研究チームは、様々な非上皮系腫瘍および上皮系腫瘍に罹患した犬患者血清から、microRNA-214 および microRNA-126 を同定した。さらに、これらの microRNA の発現値を用いて、健常犬群からの腫瘍群の判別能を評価したところ、microRNA-214 は肉腫 (血管肉腫、骨肉腫など) を、microRNA-126 はほとんどの腫瘍種を、そ

れぞれ高い精度で判別できることがわかった。さらに、microRNA-214 は2群 (腺癌、骨肉腫を除く非上皮系腫瘍) で、microRNA-126 は3群 (上皮系腫瘍、腺癌、悪性黒色腫) で予後と相関することも明らかにされた⁸³⁾。

現在、データベースに登録されているヒト microRNA の数は2600を超えるのに対し、犬では500程度と少なく (miRbase v22.1)、犬の microRNA については、まだまだ解明されていないことも多い。しかし、犬腫瘍における近年の精力的な microRNA 研究とその成果は、早期診断バイオマーカーとしての microRNA の有用性を期待させるものである。

今回の研究について

筆者らは、犬のがん早期発見ツールとして、診断バイオマーカーとなる microRNA の探索を行った。

前述のように、犬の腫瘍においても血中を循環する microRNA の profile が、健常時と異なることが報告されており⁸³⁻⁸⁵⁾、この profile の違いが、ヒトの腫瘍同様に、早期診断バイオマーカーとなることが期待されている (図2)。

そこで、犬において悪性度が高く、かつ、臨床的に遭遇する機会の多い5つの腫瘍種 (口腔内悪性黒色腫、尿路上皮癌、悪性リンパ腫、肝細胞癌、肥満細胞腫) を対象に、腫瘍と確定診断された各症例から血清を採取し、その中の microRNA 発現を、マイクロアレイ法にて解析した。その結果、いずれの腫瘍種においても、健常犬 (腫瘍の罹患がない犬) 群と比較し、複数の microRNA の発現が有意に上昇または低下していることが明らかになった。

マイクロアレイによって検出された各腫瘍種の microRNA profile から、特定の腫瘍に罹患しているかを判別するための、最適な microRNA の組み合わせ (モデル) を作成した。今回は、より少ない数の microRNA で、かつ、汎化性能 (未知のデータへの予測能) が高いモデルを構築するため、least absolute shrinkage and selection operator (LASSO) という機械学習の手法を用いて、モデルの性能を評価した。LASSO は、不要と判断される説明変数 (求めたいものに作用する変数、今回は個々の microRNA 量) の係数 (重み) を0とするため、これらの説明変数が完全に無視されるという特徴をもつ。「重み」とは、説明変数が目的変数に与える影響度のことであり、つまり LASSO は、重要な変数を選択することができる。LASSO により得られた回帰に対し、学習群および検証群で利用する検体の比率を8:2に設定し、10分割交差検定を20回繰り返し行

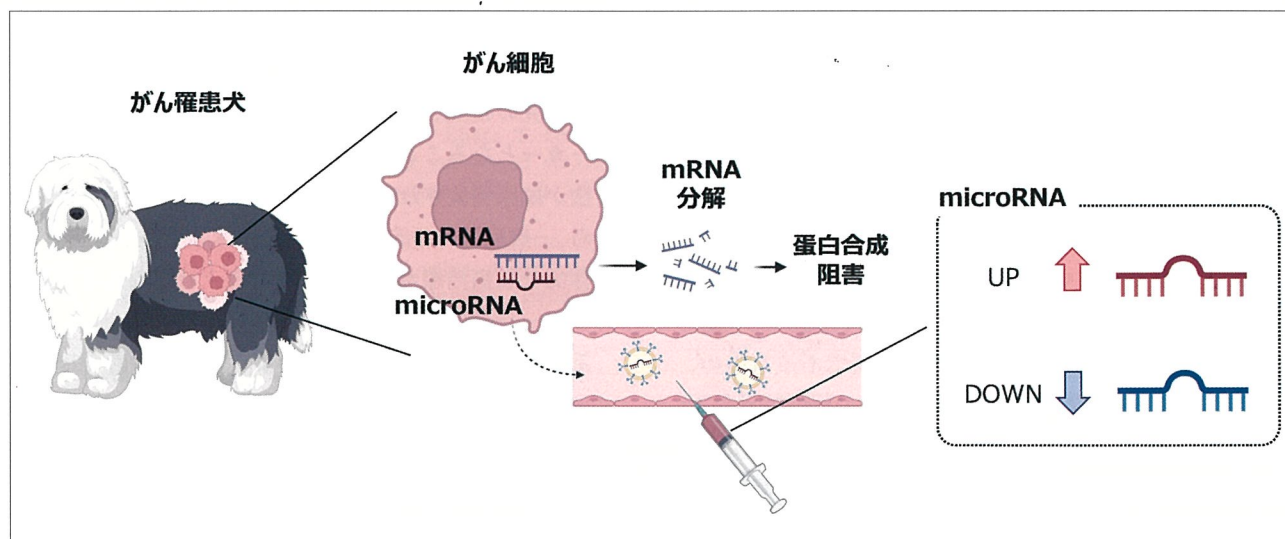


図2 がん罹患した犬の血中における microRNA の変化

犬のいくつかの腫瘍種において、血中を循環する複数の microRNA の発現値が健常時と異なり、上昇または低下していることが報告されている。この発現変動が、早期診断バイオマーカーとして有望視されている。

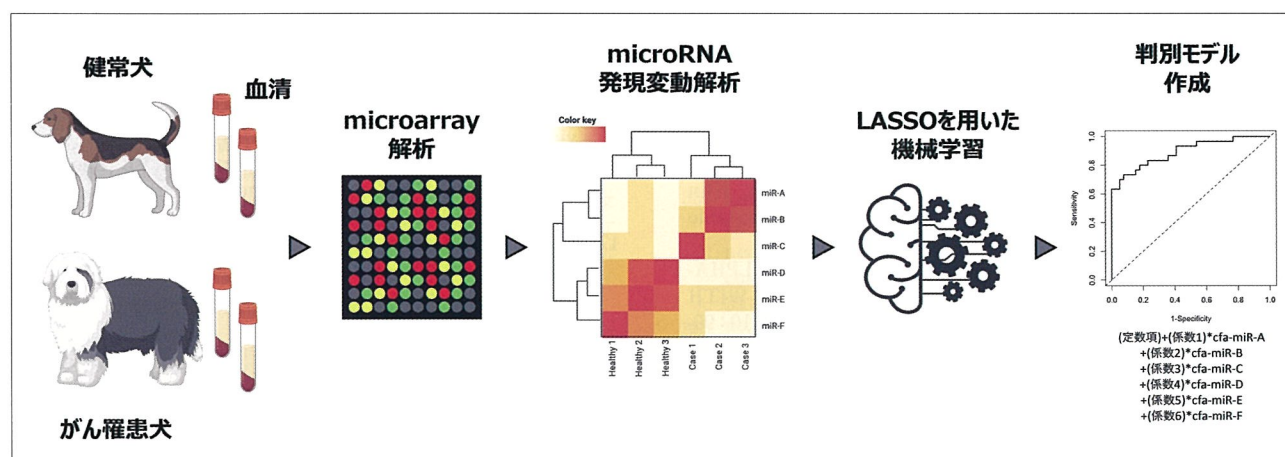


図3 犬の腫瘍種横断的な microRNA 発現の網羅解析スキーム

健常犬および5つの腫瘍種（口腔内悪性黒色腫・尿路上皮癌・悪性リンパ腫・肝細胞癌・肥満細胞腫）に罹患した症例犬より、血清を採取した。血清から microRNA を抽出し、マイクロアレイによって解析を行ったところ、いずれの腫瘍種においても、健常犬と比べて発現が変動した microRNA が複数同定された。さらに、LASSO という機械学習の手法によって、腫瘍の罹患を判別できるような microRNA の組み合わせ（モデル）を作成したところ、いずれの腫瘍種においても、健常犬群と各腫瘍群とを高精度に判別できるモデルが構築された。

って、その性能を評価した。その結果、いずれの腫瘍種においても10個前後の microRNA を組み合わせることで、健常犬群と各腫瘍群とを高精度に判別できるモデルを選択することができた（図3）。

現在、筆者らは、上記の5つの腫瘍以外の犬の腫瘍種についても、NGSを用いて同様の網羅解析を行っている。今後は猫の腫瘍や、既存の方法では診断に苦慮するような腫瘍以外の疾患についても、循環 microRNA による診断バイオマーカーの確立を目指している。

おわりに

伴侶動物たちが“がん”と診断されたときには、既に外科手術が不適応であったり、全身療法の効果が見込めなかったりする進行症例が多い。有効な治療法が提案されず、徐々にがんに蝕まれていく患者の姿と、物言わぬ小さな家族ががんを患っていたことに気づいてあげられなかったと自責の念に苛まれる飼い主の悲嘆に、日々対面する本誌読

犬のがん早期診断のためのリキッドバイオプシー —いまとこれから—

者の先生方こそ、早期発見を可能にするがん検診を切望されていることと料する。

冒頭でも触れた通り、現在、本邦の獣医臨床現場において、高い診断精度をもつがんマーカーは確立されておらず、もちろん、そのマーカーを用いたがん検診システムも存在しない。今回の研究サンプルには、既に病理診断によって腫瘍が確定診断されている症例の血清を用いているため、stageの低い腫瘍を発見できるか、つまり、真に“早期”診断に有用かどうかは、追加の研究が必要であるものの、ヒト腫瘍における同様の研究により、血中の腫瘍特異的な microRNA profile は、いくつかの腫瘍種において、Stage 0 の腫瘍の判別を可能とすると報告されており、本研究で

特定された microRNA も、犬腫瘍において同等の判別精度をもつ可能性は十分期待される。

本研究の microRNA が、腫瘍種特異的な早期診断バイオマーカーとなることが実証され、これによるがんの早期診断法が臨床実装された暁には、その簡便性と侵襲度の低さから、一般病院での定期的ながん検診の実施が現実となり、全体的な腫瘍治療奏功率の大きな底上げとなると確信している。

筆者らは、一刻も早く、そのような早期診断 microRNA マーカーを提供すべく研究に邁進し、そしてその成果を、最前線でがん闘う先生方へ引き続き発信していくという決意を新たに、本稿の結びとする。 □

参考文献

- Duffy MJ. Tumor markers in clinical practice: a review focusing on common solid cancers. *Med Princ Pract.* 2013; 22: 4-11.
- Duffy MJ. Clinical uses of tumor markers: a critical review. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2001; 38: 225-262.
- Jones HB. III. On a new substance occurring in the urine of a patient with mollities ossium. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Royal Society.* 1848; 138: 55-62.
- Abelev GI, Perova SD, Khramkova NI, Postnikova ZA, Irlin IS. Production of embryonal alpha-globulin by transplantable mouse hepatomas. *Transplantation.* 1963; 1: 174-180.
- Tatarinov IS. [DETECTION OF EMBRYO-SPECIFIC ALPHA-GLOBULIN IN THE BLOOD SERUM OF A PATIENT WITH PRIMARY LIVER CANCER]. *Vopr Med Khim.* 1964; 10: 90-91.
- Gold P, Freedman SO. DEMONSTRATION OF TUMOR-SPECIFIC ANTIGENS IN HUMAN COLONIC CARCINOMATA BY IMMUNOLOGICAL TOLERANCE AND ABSORPTION TECHNIQUES. *J Exp Med.* 1965; 121: 439-462.
- Wang MC, Valenzuela LA, Murphy GP, Chu TM. Purification of a human prostate specific antigen. *Invest Urol.* 1979; 17: 159-163.
- Kabawat SE, Bast RC, Welch WR, Knapp RC, Colvin RB. Immunopathologic characterization of a monoclonal antibody that recognizes common surface antigens of human ovarian tumors of serous, endometrioid, and clear cell types. *Am J Clin Pathol.* 1983; 79: 98-104.
- Magnani JL, Brockhaus M, Smith DF, Ginsburg V, Blaszczyk M, Mitchell KF, et al. A monosialoganglioside is a monoclonal antibody-defined antigen of colon carcinoma. *Science.* 1981; 212: 55-56.
- Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256: 495-497.
- Meany DL, Sokoll LJ, Chan DW. Early Detection of Cancer: Immunoassays for Plasma Tumor Markers. *Expert Opin Med Diagn.* 2009; 3: 597-605.
- Fan Y, Ren X, Liu X, Shi D, Xu E, Wang S, et al. Combined detection of CA15-3, CEA, and SF in serum and tissue of canine mammary gland tumor patients. *Sci Rep.* 2021; 11: 6651.
- Estaller A, Kessler M, Wehrend A, Gessler F, Hirschberger J, Neumann S. Investigation of serum survivin in dogs suffering from cancer: a multicenter study. *J Vet Sci.* 2021; 22: e79.
- Bilgili G, Alpaly M, Ceylanli D, Gençosman S, Gültekin Ç, Özer Şehirli A, et al. Current knowledge on tumour markers in veterinary oncology. *Acta Sci VetSci.* Acta Scientific Publications Pvt, Ltd. 2022; 4: 37-45.
- Parada LF, Tabin CJ, Shih C, Weinberg RA. Human EJ bladder carcinoma oncogene is homologue of Harvey sarcoma virus ras gene. *Nature.* 1982; 297: 474-478.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science.* 2013; 339: 1546-1558.
- Landau DA, Carter SL, Stojanov P, McKenna A, Stevenson K, Lawrence MS, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell.* 2013; 152: 714-726.
- Swanton C. Intratumor heterogeneity: evolution through space and time. *Cancer Res.* 2012; 72: 4875-4882.
- McGranahan N, Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. *Cancer Cell.* 2015; 27: 15-26.
- Aravanis AM, Lee M, Klausner RD. Next-Generation Sequencing of Circulating Tumor DNA for Early Cancer Detection. *Cell.* 2017; 168: 571-574.
- Campbell PJ, Yachida S, Mudie LJ, Stephens PJ, Pleasance ED, Stebbings LA, et al. The patterns and dynamics of genomic instability in metastatic pancreatic cancer. *Nature.* 2010; 467: 1109-1113.
- Pantel K, Alix-Panabières C. Circulating tumour cells in cancer patients: challenges and perspectives. *Trends Mol Med.* 2010; 16: 398-406.
- Perakis S, Speicher MR. Emerging concepts in liquid biopsies. *BMC Med.* 2017; 15: 75.
- Bardelli A, Pantel K. Liquid Biopsies, What We Do Not Know (Yet). *Cancer Cell.* 2017; 31: 172-179.
- Ashworth TR. A case of cancer in which cells similar to those in the tumours were seen in the blood after death. *Australas Med J.* 1869; 14: 146-149.
- Shen Z, Wu A, Chen X. Current detection technologies for circulating tumor cells. *Chem Soc Rev.* 2017; 46: 2038-2056.
- Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, et al. Systemic spread is an early step in breast cancer. *Cancer Cell.* 2008; 13: 58-68.
- Hosseini H, Obradović MMS, Hoffmann M, Harper KL, Sosa MS, Werner-Klein M, et al. Early dissemination seeds metastasis in breast cancer. *Nature.* 2016; 540: 552-558.

- 29) Rhim AD, Thege FI, Santana SM, Lannin TB, Saha TN, Tsai S, et al. Detection of circulating pancreas epithelial cells in patients with pancreatic cystic lesions. *Gastroenterology*. 2014; 146 : 647-651.
- 30) Yamaguchi J, Kokuryo T, Yokoyama Y, Ebata T, Ochiai Y, Nagino M. Premalignant pancreatic cells seed stealth metastasis in distant organs in mice. *Oncogene*. 2021 ; 40 : 2273-2284.
- 31) Gazzaniga P, Gradilone A, de Berardinis E, Busetto GM, Raimondi C, Gandini O, et al. Prognostic value of circulating tumor cells in nonmuscle invasive bladder cancer : a CellSearch analysis. *Ann Oncol*. 2012 ; 23 : 2352-2356.
- 32) Loh J, Jovanovic L, Lehman M, Capp A, Pryor D, Harris M, et al. Circulating tumor cell detection in high-risk non-metastatic prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014 ; 140 : 2157-2162.
- 33) Bork U, Rahbari NN, Schölch S, Reissfelder C, Kahlert C, Büchler MW, et al. Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer : a prospective study. *Br J Cancer*. 2015 ; 112 : 1306-1313.
- 34) Marquette C-H, Boutros J, Benzaquen J, Ferreira M, Pastre J, Pison C, et al. Circulating tumour cells as a potential biomarker for lung cancer screening : a prospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2020 ; 8 : 709-716.
- 35) Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, et al. Circulating tumor cells : biology and clinical significance. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 ; 6 : 404.
- 36) Chmielewska M, Losiewicz K, Socha P, Mecik-Kronenberg T, Wasowicz K. The application of circulating tumor cells detecting methods in veterinary oncology. *Pol J Vet Sci*. 2013 ; 16 : 141-151.
- 37) Wright T, Brisson BA, Wood GA, Oblak M, Mutsaers AJ, Sabine V, et al. Flow Cytometric Detection of Circulating Osteosarcoma Cells in Dogs. *Cytometry A*. 2019 ; 95 : 997-1007.
- 38) Wright T. Identification and enumeration of circulating tumour cells in dogs with naturally - occurring appendicular osteosarcoma using flow cytometry[Internet]. University of Guelph ; 2022[cited 2022 Nov 1]. Available from : <https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/26683>
- 39) da Costa A, Lenze D, Hummel M, Kohn B, Gruber AD, Klopffleisch R. Identification of six potential markers for the detection of circulating canine mammary tumour cells in the peripheral blood identified by microarray analysis. *J Comp Pathol*. 2012 ; 146 : 143-151.
- 40) da Costa A, Kohn B, Gruber AD, Klopffleisch R. Multiple RT-PCR markers for the detection of circulating tumour cells of metastatic canine mammary tumours. *Vet J*. 2013 ; 196 : 34-39.
- 41) Marconato L, Facchinetti A, Zanardello C, Rossi E, Vidotto R, Capello K, et al. Detection and Prognostic Relevance of Circulating and Disseminated Tumour Cell in Dogs with Metastatic Mammary Carcinoma : A Pilot Study. *Cancers* [Internet]. 2019 ; 11. Available from : <http://dx.doi.org/10.3390/cancers11020163>
- 42) Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients : quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001 ; 61 : 1659-1665.
- 43) Mandel P, Metais P. Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948 ; 142 : 241-243.
- 44) Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977 ; 37 : 646-650.
- 45) Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*. 1989 ; 46 : 318-322.
- 46) Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994 ; 3 : 67-71.
- 47) Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*. 1994 ; 86 : 774-779.
- 48) Chan KCA, Jiang P, Chan CWM, Sun K, Wong J, Hui EP, et al. Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013 ; 110 : 18761-18768.
- 49) Zhang J, Fujimoto J, Zhang J, Wedge DC, Song X, Zhang J, et al. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science*. 2014 ; 346 : 256-259.
- 50) Cheng DT, Prasad M, Chekaluk Y, Benayed R, Sadowska J, Zehir A, et al. Comprehensive detection of germline variants by MSK-IMPACT, a clinical diagnostic platform for solid tumor molecular oncology and concurrent cancer predisposition testing. *BMC Med Genomics*. 2017 ; 10 : 33.
- 51) Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014 ; 6 : 224ra24.
- 52) Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo E, Sengupta S, Bertrand D, Weerasinghe A, et al. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell*. 2018 ; 173 : 371-385. e18.
- 53) Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*. 2018 ; 359 : 926-930.
- 54) Klein EA, Richards D, Cohn A, Tummala M, Lapham R, Cosgrove D, et al. Clinical validation of a targeted methylation-based multi-cancer early detection test using an independent validation set. *Ann Oncol*. 2021 ; 32 : 1167-1177.
- 55) Lee J, Kim HC, Kim ST, He Y, Sample P, Nakamura Y, et al. Multimodal circulating tumor DNA (ctDNA) colorectal neoplasia detection assay for asymptomatic and early-stage colorectal cancer (CRC). *J Clin Orthod. Wolters Kluwer*. 2021 ; 39 : 3536-3536.
- 56) Elvers I, Turner-Maier J, Swofford R, Koltookian M, Johnson J, Stewart C, et al. Exome sequencing of lymphomas from three dog breeds reveals somatic mutation patterns reflecting genetic background. *Genome Res*. 2015 ; 25 : 1634-1645.
- 57) Takada M, Smyth LA, Thaiwong T, Richter M, Corner SM, Schall PZ, et al. Activating Mutations in PTPN11 and KRAS in Canine Histocytic Sarcomas. *Genes*[Internet]. 2019 ; 10. Available from : <http://dx.doi.org/10.3390/genes10070505>
- 58) Hendricks WPD, Zismann V, Sivaprakasam K, Legendre C, Poorman K, Tembe W, et al. Somatic inactivating PTPRJ mutations and dysregulated pathways identified in canine malignant melanoma by integrated comparative genomic analysis. *PLoS Genet*. 2018 ; 14 : e1007589.
- 59) Decker B, Parker HG, Dhawan D, Kwon EM, Karlins E, Davis BW, et al. Homologous Mutation to Human BRAF V600E Is Common in Naturally Occurring Canine Bladder Cancer- Evidence for a Relevant Model System and Urine-Based Diagnostic Test. *Mol Cancer Res*. 2015 ; 13 : 993-1002.
- 60) Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kaneene JB, Miller R, Resau JH, Kiupel M. The role of c-KIT in tumorigenesis : evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia*. 2006 ; 8 : 104-111.
- 61) Prouteau A, Denis JA, De Fornel P, Cadieu E, Derrien T, Kergal C, et al. Circulating tumor DNA is detectable in canine histiocytic sarcoma, oral malignant melanoma, and multicentric lymphoma. *Sci Rep*. 2021 ; 11 : 877.
- 62) Kruglyak KM, Chibuk J, McLennan L, Nakase P, Hernandez GE, Motalli-Pepio R, et al. Blood-Based Liquid Biopsy for Comprehensive Cancer Genomic Profiling Using Next-Generation Sequencing : An Emerging Paradigm for Non-

- 29) Rhim AD, Thege FI, Santana SM, Lannin TB, Saha TN, Tsai S, et al. Detection of circulating pancreas epithelial cells in patients with pancreatic cystic lesions. *Gastroenterology*. 2014; 146: 647-651.
- 30) Yamaguchi J, Kokuryo T, Yokoyama Y, Ebata T, Ochiai Y, Nagino M. Premalignant pancreatic cells seed stealth metastasis in distant organs in mice. *Oncogene*. 2021; 40: 2273-2284.
- 31) Gazzaniga P, Gradilone A, de Berardinis E, Busetto GM, Raimondi C, Gandini O, et al. Prognostic value of circulating tumor cells in nonmuscle invasive bladder cancer: a CellSearch analysis. *Ann Oncol*. 2012; 23: 2352-2356.
- 32) Loh J, Jovanovic L, Lehman M, Capp A, Pryor D, Harris M, et al. Circulating tumor cell detection in high-risk non-metastatic prostate cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014; 140: 2157-2162.
- 33) Bork U, Rahbari NN, Schölch S, Reissfelder C, Kahlert C, Büchler MW, et al. Circulating tumour cells and outcome in non-metastatic colorectal cancer: a prospective study. *Br J Cancer*. 2015; 112: 1306-1313.
- 34) Marquette C-H, Boutros J, Benzaquen J, Ferreira M, Pastre J, Pison C, et al. Circulating tumour cells as a potential biomarker for lung cancer screening: a prospective cohort study. *Lancet Respir Med*. 2020; 8: 709-716.
- 35) Lin D, Shen L, Luo M, Zhang K, Li J, Yang Q, et al. Circulating tumor cells: biology and clinical significance. *Signal Transduct Target Ther*. 2021; 6: 404.
- 36) Chmielewska M, Losiewicz K, Socha P, Mecik-Kronenberg T, Wasowicz K. The application of circulating tumor cells detecting methods in veterinary oncology. *Pol J Vet Sci*. 2013; 16: 141-151.
- 37) Wright T, Brisson BA, Wood GA, Oblak M, Mutsaers AJ, Sabine V, et al. Flow Cytometric Detection of Circulating Osteosarcoma Cells in Dogs. *Cytometry A*. 2019; 95: 997-1007.
- 38) Wright T. Identification and enumeration of circulating tumour cells in dogs with naturally - occurring appendicular osteosarcoma using flow cytometry[Internet]. University of Guelph; 2022[cited 2022 Nov 1]. Available from: <https://atrium.lib.uoguelph.ca/xmlui/handle/10214/26683>
- 39) da Costa A, Lenze D, Hummel M, Kohn B, Gruber AD, Klopffleisch R. Identification of six potential markers for the detection of circulating canine mammary tumour cells in the peripheral blood identified by microarray analysis. *J Comp Pathol*. 2012; 146: 143-151.
- 40) da Costa A, Kohn B, Gruber AD, Klopffleisch R. Multiple RT-PCR markers for the detection of circulating tumour cells of metastatic canine mammary tumours. *Vet J*. 2013; 196: 34-39.
- 41) Marconato L, Facchinetti A, Zanardello C, Rossi E, Vidotto R, Capello K, et al. Detection and Prognostic Relevance of Circulating and Disseminated Tumour Cell in Dogs with Metastatic Mammary Carcinoma: A Pilot Study. *Cancers* [Internet]. 2019; 11. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/cancers11020163>
- 42) Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, et al. DNA fragments in the blood plasma of cancer patients: quantitations and evidence for their origin from apoptotic and necrotic cells. *Cancer Res*. 2001; 61: 1659-1665.
- 43) Mandel P, Metais P. Nuclear Acids In Human Blood Plasma. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1948; 142: 241-243.
- 44) Leon SA, Shapiro B, Sklaroff DM, Yaros MJ. Free DNA in the serum of cancer patients and the effect of therapy. *Cancer Res*. 1977; 37: 646-650.
- 45) Stroun M, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Beljanski M. Neoplastic characteristics of the DNA found in the plasma of cancer patients. *Oncology*. 1989; 46: 318-322.
- 46) Sorenson GD, Pribish DM, Valone FH, Memoli VA, Bzik DJ, Yao SL. Soluble normal and mutated DNA sequences from single-copy genes in human blood. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994; 3: 67-71.
- 47) Vasioukhin V, Anker P, Maurice P, Lyautey J, Lederrey C, Stroun M. Point mutations of the N-ras gene in the blood plasma DNA of patients with myelodysplastic syndrome or acute myelogenous leukaemia. *Br J Haematol*. 1994; 86: 774-779.
- 48) Chan KCA, Jiang P, Chan CWM, Sun K, Wong J, Hui EP, et al. Noninvasive detection of cancer-associated genome-wide hypomethylation and copy number aberrations by plasma DNA bisulfite sequencing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013; 110: 18761-18768.
- 49) Zhang J, Fujimoto J, Zhang J, Wedge DC, Song X, Zhang J, et al. Intratumor heterogeneity in localized lung adenocarcinomas delineated by multiregion sequencing. *Science*. 2014; 346: 256-259.
- 50) Cheng DT, Prasad M, Chekaluk Y, Benayed R, Sadowska J, Zehir A, et al. Comprehensive detection of germline variants by MSK-IMPACT, a clinical diagnostic platform for solid tumor molecular oncology and concurrent cancer predisposition testing. *BMC Med Genomics*. 2017; 10: 33.
- 51) Bettgeowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I, Wang Y, Agrawal N, et al. Detection of circulating tumor DNA in early- and late-stage human malignancies. *Sci Transl Med*. 2014; 6: 224ra24.
- 52) Bailey MH, Tokheim C, Porta-Pardo E, Sengupta S, Bertrand D, Weerasinghe A, et al. Comprehensive Characterization of Cancer Driver Genes and Mutations. *Cell*. 2018; 173: 371-385. e18.
- 53) Cohen JD, Li L, Wang Y, Thoburn C, Afsari B, Danilova L, et al. Detection and localization of surgically resectable cancers with a multi-analyte blood test. *Science*. 2018; 359: 926-930.
- 54) Klein EA, Richards D, Cohn A, Tummala M, Lapham R, Cosgrove D, et al. Clinical validation of a targeted methylation-based multi-cancer early detection test using an independent validation set. *Ann Oncol*. 2021; 32: 1167-1177.
- 55) Lee J, Kim HC, Kim ST, He Y, Sample P, Nakamura Y, et al. Multimodal circulating tumor DNA (ctDNA) colorectal neoplasia detection assay for asymptomatic and early-stage colorectal cancer(CRC). *J Clin Orthod. Wolters Kluwer*. 2021; 39: 3536-3536.
- 56) Elvers I, Turner-Maier J, Swofford R, Koltoonian M, Johnson J, Stewart C, et al. Exome sequencing of lymphomas from three dog breeds reveals somatic mutation patterns reflecting genetic background. *Genome Res*. 2015; 25: 1634-1645.
- 57) Takada M, Smyth LA, Thaiwong T, Richter M, Corner SM, Schall PZ, et al. Activating Mutations in PTPN11 and KRAS in Canine Histiocytic Sarcomas. *Genes*[Internet]. 2019; 10. Available from: <http://dx.doi.org/10.3390/genes10070505>
- 58) Hendricks WPD, Zismann V, Sivaprakasam K, Legendre C, Poorman K, Tembe W, et al. Somatic inactivating PTPRJ mutations and dysregulated pathways identified in canine malignant melanoma by integrated comparative genomic analysis. *PLoS Genet*. 2018; 14: e1007589.
- 59) Decker B, Parker HG, Dhawan D, Kwon EM, Karlins E, Davis BW, et al. Homologous Mutation to Human BRAF V600E Is Common in Naturally Occurring Canine Bladder Cancer- Evidence for a Relevant Model System and Urine-Based Diagnostic Test. *Mol Cancer Res*. 2015; 13: 993-1002.
- 60) Webster JD, Yuzbasiyan-Gurkan V, Kaneene JB, Miller R, Resau JH, Kiupel M. The role of c-KIT in tumorigenesis: evaluation in canine cutaneous mast cell tumors. *Neoplasia*. 2006; 8: 104-111.
- 61) Prouteau A, Denis JA, De Fornel P, Cadieu E, Derrien T, Kergal C, et al. Circulating tumor DNA is detectable in canine histiocytic sarcoma, oral malignant melanoma, and multicentric lymphoma. *Sci Rep*. 2021; 11: 877.
- 62) Kruglyak KM, Chibuk J, McLennan L, Nakashe P, Hernandez GE, Motalli-Pepio R, et al. Blood-Based Liquid Biopsy for Comprehensive Cancer Genomic Profiling Using Next-Generation Sequencing: An Emerging Paradigm for Non-

犬のがん早期診断のためのリキッドバイオプシー —いまとこれから—

- invasive Cancer Detection and Management in Dogs. *Front Vet Sci.* 2021; 8: 704835.
- 63) Flory A, Kruglyak KM, Tynan JA, McLennan LM, Rafalko JM, Fiaux PC, et al. Clinical validation of a next-generation sequencing-based multi-cancer early detection “liquid biopsy” blood test in over 1,000 dogs using an independent testing set: The CANcer Detection in Dogs (CANDiD) study. *PLoS One.* 2022; 17: e0266623.
 - 64) Schwarzenbach H, Nishida N, Calin GA, Pantel K. Clinical relevance of circulating cell-free microRNAs in cancer. *Nat Rev Clin Oncol.* 2014; 11: 145-156.
 - 65) Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993; 75: 843-854.
 - 66) Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 1998; 391: 806-811.
 - 67) Roush S, Slack FJ. The *let-7* family of microRNAs. *Trends Cell Biol.* 2008; 18: 505-516.
 - 68) Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell.* 2007; 129: 1401-1414.
 - 69) Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 2005; 435: 834-838.
 - 70) Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol.* 2008; 26: 462-469.
 - 71) Lawrie CH, Gal S, Dunlop HM, Pushkaran B, Liggins AP, Pulford K, et al. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol.* 2008; 141: 672-625.
 - 72) Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjöstrand M, Lee JJ, Lötvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007; 9: 654-659.
 - 73) Hamam R, Ali AM, Alsaleh KA, Kassem M, Alfayez M, Aldahmash A, et al. microRNA expression profiling on individual breast cancer patients identifies novel panel of circulating microRNA for early detection. *Sci Rep.* 2016; 6: 25997.
 - 74) Zhu W, Zhou K, Zha Y, Chen D, He J, Ma H, et al. Diagnostic Value of Serum miR-182, miR-183, miR-210, and miR-126 Levels in Patients with Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *PLoS One.* 2016; 11: e0153046.
 - 75) Alix-Panabières C, Pantel K. Clinical Applications of Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA as Liquid Biopsy. *Cancer Discov.* 2016; 6: 479-491.
 - 76) So JBY, Kapoor R, Zhu F, Koh C, Zhou L, Zou R, et al. Development and validation of a serum microRNA biomarker panel for detecting gastric cancer in a high-risk population. *Gut.* 2021; 70: 829-837.
 - 77) Kojima M, Sudo H, Kawauchi J, Takizawa S, Kondou S, Nobumasa H, et al. MicroRNA markers for the diagnosis of pancreatic and biliary-tract cancers. *PLoS One.* 2015; 10: e0118220.
 - 78) Asakura K, Kadota T, Matsuzaki J, Yoshida Y, Yamamoto Y, Nakagawa K, et al. A miRNA-based diagnostic model predicts resectable lung cancer in humans with high accuracy. *Commun Biol.* 2020; 3: 134.
 - 79) Abe S, Matsuzaki J, Sudo K, Oda I, Katai H, Kato K, et al. A novel combination of serum microRNAs for the detection of early gastric cancer. *Gastric Cancer.* 2021; 24: 835-843.
 - 80) Sahabi K, Selvarajah GT, Abdullah R, Cheah YK, Tan GC. Comparative aspects of microRNA expression in canine and human cancers. *J Vet Sci.* 2018; 19: 162-171.
 - 81) Agarwal P, Crepps MP, Stahr NA, Kretzschmar WP, Harris HC, Prasad N, et al. Identification of canine circulating miRNAs as tumor biospecific markers using Next-Generation Sequencing and Q-RT-PCR. *Biochem Biophys Res.* 2021; 28: 101106.
 - 82) Fish EJ, Martinez-Romero EG, DeInnocentes P, Koehler JW, Prasad N, Smith AN, et al. Circulating microRNA as biomarkers of canine mammary carcinoma in dogs. *J Vet Intern Med.* 2020; 34: 1282-1290.
 - 83) Heishima K, Ichikawa Y, Yoshida K, Iwasaki R, Sakai H, Nakagawa T, et al. Circulating microRNA-214 and -126 as potential biomarkers for canine neoplastic disease. *Sci Rep.* 2017; 7: 2301.
 - 84) Fish EJ, Irizarry KJ, DeInnocentes P, Ellis CJ, Prasad N, Moss AG, et al. Malignant canine mammary epithelial cells shed exosomes containing differentially expressed microRNA that regulate oncogenic networks. *BMC Cancer.* 2018; 18: 832.
 - 85) Craig KKL, Wood GA, Keller SM, Mutsaers AJ, Wood RD. MicroRNA profiling in canine multicentric lymphoma. *PLoS One.* 2019; 14: e0226357.