

日本医療研究開発機構
次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
事後報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名： (日本語) 体液中マイクロRNA測定技術基盤開発
(英語) Development of Diagnostic Technology for Detection of miRNA in Body Fluids

研究開発実施期間：2015年4月1日～2019年3月31日

研究開発代表者 氏名：(日本語) 落谷孝広
(英語) Takahiro Ochiya

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：
(日本語) 国立研究開発法人国立がん研究センター 研究所 分子細胞治療研究分野 プロジェクトリーダー
(英語) Project Leader, National Cancer Center Research Institute, Division of Molecular and Cellular Medicine

II 研究開発の概要

<研究開発課題を取り巻く国内外の外部環境>

血中 miRNA を含む、体液中バイオマーカーを検出するリキッドバイオプシー世界市場は、2018 年から 2030 年にかけて 13.4% の CAGR で推移し、2030 年までに 59 億 6,000 万米ドル規模に成長することが予測されている (グローバルインフォメーション 2018 年度調査)。従来のがん検診は、画像診断、便潜血検査や婦人科細胞診などが実施されているが、受診の手間、侵襲性の高さや偽陽性率の高さが受診を敬遠させている可能性がある。また、有効ながん検診の手段が存在しないがん種もいまだ多い。近年、任意型検診として PET-CT (positron emission tomography-computed tomography) の普及が進んでいる。この技術は一度に全身をスクリーニングでき、しかも侵襲性や不快感が少ないというメリットがあるため、高額な検査にも関わらず受診者数は増加している。しかし大型の設備が必要であり、放射線被曝が生じるため継続的なモニタリングは難しい。

これらの問題点を解決するために、唾液・血液・尿など容易に採取可能な検体を利用した、感度 (病気の人を病気と診断できる確率)、特異度 (病気でない人を病気でないとして診断できる確率) に優れた体液

診断（リキッドバイオプシー）への期待が高まっている。体液診断技術を用いたがん早期診断の市場は、体液中の細胞検出、蛋白質検出、核酸(DNA、RNA)検出、揮発性有機化合物などその他の技術に大別できる。

<本課題の立ち位置や課題自体の必要性>

体液中のマーカー検出による診断については、上述のように複数の技術が開発されているが、細胞を検出することで早期診断となりうるがん種は、口腔内がんや膀胱がんなど、採取しうる体液が病巣と直接しているものに限定される。末梢血循環腫瘍細胞（CTCs: circulating tumor cells）は、がんが血流に現れる程度まで進行しないと検出できないため、予後評価や治療方針決定などには威力を発揮するが早期診断には有用性が乏しい。蛋白質や糖鎖抗原を用いたバイオマーカーは、CEA、PSAなどいわゆる「腫瘍マーカー」としてよく知られているが、現在本邦で普及している腫瘍マーカーは主にモニタリング用途で用いられており、早期診断には不向きである。

いま体液診断領域で最も注目されるのが核酸マーカーである。末梢血循環腫瘍 DNA（ctDNA: circulating tumor DNA）は、腫瘍細胞に高頻度に見られる遺伝子変異やエピジェネティック変異(DNAメチル化やヒストンアセチル化等)を、血液中に浮遊する DNA の中から検出するものであり、腫瘍細胞が血中に浮遊するほど進行せずとも、手術で根治可能な進行段階から ctDNA が検出できることがわかってきた。しかしながら、ctDNA は腫瘍が由来する臓器への特異性が低く、腫瘍の部位診断の精度は十分でない。一方、末梢血循環 miRNA は腫瘍部位の情報を含む早期診断マーカーの有効な候補である。本課題では、この末梢血循環 miRNA を網羅的に各種がん・アルツハイマー病等の認知症患者の血清から検出し、早期疾患マーカーを同定、検証することで、体液診断技術を用いたがん早期診断の市場の創出を目指す。

<本課題で達成した成果>

実施課題① 患者体液中 miRNA の網羅的解析

国立がん研究センター（NCC）、国立長寿医療研究センター（NCGG）のバイオバンクに保存されている血清、および連携 8 大学等で収集した検体について高感度 DNA チップを用いた網羅的な miRNA 解析を完了した。具体的には、15 種のがん（胃がん、大腸がん、食道がん、膵臓がん、肝がん、胆道がん、肺がん、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、膀胱がん、神経膠腫、肉腫、および眼腫瘍、子宮肉腫を期中追加）、アルツハイマー病等の認知症患者検体等を計 53,463 検体解析した。またこれらの検体に対応する臨床情報を取得した。なお、これらの検体には早期がん検出用マーカーの選定用の評価に加えて、薬効予測、予後予測などの臨床上有用な評価を実施するためのマーカー選定のための検体を含む。

さらに NCC においてがんマーカーの検証を実施するための前向き研究を実行し、13 種のがん患者由来血清、1908 症例分を収集し解析を行った。一方、これらの検体の臨床情報については、がん検体については「院内がん登録情報」「診療科データベース」、認知症検体については NCGG バイオバンクの情報に基づいて収集した。解析数は約 5,300 例に上った。

また、miRNA プロファイル測定に際し、結果の相互比較、測定系の精度、再現性の評価のため、共同研究体制内での内部標準の選定、miRNA 標準物質の開発、マイクロアレイを用いた精度管理手法開発、短鎖核酸の定量的評価技術開発、標準血清の選定と配布を行った。

実施課題② 疾患横断的に解析可能な miRNA 発現データベースの構築

本プロジェクトのデータベース運用については、事業参加機関による「データベース開発進捗会議」において、医薬品の開発データを保管するためのデータベースの要件および国際標準の動向を考慮し、生データの保全を最も重要な要件とすることを開発の方針とし

た。この方針に基づき、データベース要件定義書を調べ、開発したデータベースにNCC、NCGGはじめ本プロジェクトに提供された検体のmiRNA発現プロファイル、および臨床情報を登録し、データ格納・解析用フロントエンドのユーザー・インターフェースにより必要なデータを登録、取得できるシステムを構築、運用した。なお、本システムはNCC内にスタンドアローンの系として構築し、情報の機密性を保持した。

このシステムには、実施課題①で収集した臨床情報および高感度DNAチップによるマイクロRNA解析データを統合的に収容した。また、臨床情報や実験の設定に対応した横断的検索システムを設計し、実施課題③で実施したマーカー選定・検証に必要な情報を提供した。

また本事業ではユーザーフォーラムを設置した。会員を募集し、ユーザーフォーラム報告会を平成27年度より各年2回開催し、プロジェクト開発の進捗状況、前向き臨床研究の実施概要、miRNAを用いた診断法の開発や新規診断マーカーの開発、及び統計解析手法についてフォーラム会員向けの報告を行った。

実施課題③ miRNA診断マーカーとmiRNA検査／診断技術の開発

乳がん、大腸がん、胃がん、食道がん、肝臓がん、膵臓がん、胆道がん、肺がん、卵巣がん、神経膠腫、膀胱がん、前立腺がん、骨軟部腫瘍について診断マーカーの同定を行い、それぞれ感度・特異度が90%を超える結果を得た。また、アルツハイマー病、血管性認知症、レビー小体型認知症について、それぞれ健康人と判別する結果を得た。さらに deep learning の手法により、13 種のがんを同時に判別する手法を考案し、各種がんの判別を得た。これらの結果に基づき、新規に採取する検体による前向き検証評価を実施した。

さらに各がんのサブタイプ分類や薬剤感受性などの治療方針決定に寄与する形質等との関連性を臨床医のニーズに応じて解析し、乳がんにおいて臨床的に有用な形質を判別するアルゴリズムを開発した。

実施課題④ 臨床現場での使用に向けた検査システムの開発

東レ、東芝、アークレイ/京都工繊大、プレジジョンシステムサイエンス/JBIC の各社において、それぞれの目標を達成する開発を行った。

<成果の公開>

本事業の成果について、乳がん、卵巣がん、前立腺がん、膀胱がん、骨軟部腫瘍、認知症のマーカーの同定に関する論文を含めた論文 83 件、学会等の公表 204 件で公開するとともに、1 回の国際シンポジウム、3 回の国内シンポジウムを主催して公表した。また、13 種のがん、認知症のマーカー等について国内外の特許 51 件を出願した。

<今後の予定>

臨床有用性を確認するために実施中のがんを対象とした前向き臨床研究の成果を活用し、薬事申請を目指す。

<External environment around the project>

The liquid biopsy global market detecting circulating biomarkers is predicted that it will grow up in a 5,960 million U.S. dollars scale by 2030 (global information 2018). As for the conventional cancer screening, they are somewhat invasive and its false-positive rate may let people give consultation a wide berth. In addition, there are still many cancers which there is not means of the

effective screening. The expectation to the liquid biopsy superior in sensitivity/specificity using the specimen got easily including blood to involve the problems.

<Needs for the project>

It is a nucleic acid marker now to attract attention most in the liquid biopsy. Circulating miRNA is an influential candidate of the early checkup marker including the information of the tumor part. By this project, we detect circulating miRNA from all over the serum of patients with various cancers or dementia including Alzheimer's disease and identify a disease marker in an early stage and, in what we inspect, we aim at the creation of the market of the early checkup using the liquid biopsy.

<Result>

Task 1 Comprehensive analysis of circulating miRNA

We completed circulating miRNA analysis using the highly sensitive DNA chip of about 53,000 serums collected and stored in National Cancer center (NCC), and National Geriatrics and Gerontology Center (NCGG) and cooperative 8 University. Furthermore, we carried out a prospective study to carry out the inspection of the cancer marker in NCC and we collected serum derived from patients with 13 kinds of cancers, for 1908 cases and analyzed them.

Task 2 Construction of database

Based on the negotiated policy, we prepared a database definition of requirements and developed database system and registered project data (clinical/comprehensive miRNA data). We have built this system as a stand-alone system in NCC and maintained secrecy of the information. In addition, We designed the cross-sectional search system and carried out it in enforcement task 3. Also we set and run the user forum for this project.

Task 3 Circulating miRNA marker finding and validation

We identified the diagnosis marker about breast, colon, stomach, esophagus, liver, pancreatic, biliary, lung, ovarian, glioma, bladder, prostate, sarcoma, and a specific degree got the result more than 90% sensitivity each. In addition, about Alzheimer's disease, vascular dementia, Levy corpuscle type dementia, we obtained a result to distinguish from a healthy person each. Furthermore, we devised technique to distinguish 13 kinds of cancers by technique of deep learning and got the distinction of various cancers. Based on these results, we carried out the prospective validation with the serum collected newly.

Task 4 Technical development of bio-tool

We have performed development of each bio-tool in four participating companies Toray, TOSHIBA, ARKRAY/Kyoto Inst. of Tech., PSS/JBIC.