

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「早期診断マルチバイオマーカー開発」（エクソソーム解析によるがんの血中・唾液中マイクロ RNA バイオマーカーの開発）

2. 研究開発代表者：落谷孝広（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）

3. 研究開発の成果

（研究開発の概要）

がんの病態やステージ等、ヒトの生理状態によってその発現量や種類が大きく変化し、エクソソームに包まれて分泌されるマイクロ RNA を対象に、エクソソーム解析を実施した上でデータベース化することにより、骨肉腫、肝細胞がん、肝硬変、乳がんを標的とした、血液、唾液等の体液を利用した非侵襲的な診断用バイオマーカーを開発する。具体的には肝臓の繊維化の血中マイクロ RNA 診断、乳がんの診断となる血中マイクロ RNA 診断、及び大腸がんの早期診断のためのエクソソーム診断法の3つの事業の実用化の開始を到達点とし、それぞれを主導する企業への技術導入、開発のステップの明確化、診断システムの決定と構築によって、その達成度を判断する。

（研究成果）

①血液中マイクロ RNA 及びエクソソームのデータベース化

1) 骨肉腫：肺転移無し10症例、肺転移あり15症例を収集した。これらの血清からエクソソームを回収し、RNA分画を精製、アレイ解析を終了し、RT-PCRによるvalidationを実施した。miR-133aなどの複数の予後予測マーカー候補を選抜した。2) 乳がん：国立がん研究センターの包括的同意に基づき、乳腺腫瘍内科に新鮮血清の確保を依頼、IRBの承認を経て、追加93症例の別コホートの乳がん患者血清及び健常人血清97例のセットでvalidation作業を実施し、いずれのコホートでも良好な再現性と高い感度、特異度を得た。国内ベンチャー企業が特許を出願し、診断事業部を有する企業へのライセンスングを済ませ、事業化を図っている。3) 肝細胞がん、肝硬変：連携研究者の村上らの協力により、肝細胞がん、肝硬変の血液試料を収集し、すでにC型慢性肝炎100症例、健常人100症例の血清（正常肝の血清40例も追加）からエクソソームを回収、そのマイクロRNA解析を終了した。肝発がん予測血液マーカーとなる肝硬変診断用マイクロRNAを解析した結果、9種類のマイクロRNAによって、肝臓の線維化のごく初期に当たるF0のステージに匹敵する患者群を同定する事が出来るようになった。本件は既に特許出願を済ませた上で、国内の企業が実用化に向けた検討に着手しており、feasibility studyを無事に終了した。

②体液中のマイクロRNA、がん特異的エクソソーム解析

1) 唾液中のマイクロ RNA 解析の基盤技術確立した。唾液の前処理過程を実施することにより、混入する不純物除去が奏功して、純度の高いマイクロ RNA の精製が可能となった。この方法をもとに、ストレス関連のマイクロ RNA を絞り込む作業に着手し、アレイの一次データを取得し、解析した結果、12種類のマイクロ RNA によって、ストレス群と非ストレス群を分別する事が可能であった。

2) 体液中のエクソソームを解析するためのプラットフォームの開発を進めた。具体的にはフォトセンシタイザーを含むビーズ法に基づき、エクソソームの汎用マーカーとがん特異的エピトープの2種の抗体を利用した新規検出法である。大腸がんの細胞株を用いた解析を行ない、検出条件の最適化を実現した。この方法を血液（血清）でのエクソソーム同定のための ExoScreen 法と命名し、論文化した（吉岡ら、*Nature Commun*, 2014）。大腸がんの CD147 エクソソーム特異的マーカーについては、特異抗体の作成、診断事業化に関して、国内製薬企業への導出を実施した。

3) エクソソームのがん特異的エピトープの解析を継続した。これまでに、ヒト乳がん細胞、肝細胞がん細胞、前立腺がん細胞、骨肉腫細胞、大腸がん細胞、膵臓がん細胞のプロテオーム解析を終了し、複数のマーカー候補分子を同定した。これらは論文化した後に、データベース化、あるいはエクソソームのデータバンク (ExoCarta) への登録の準備を行うべく、患者血清での予備的解析を実施した。