

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(英語) Project focused on developing key technology for discovering and manufacturing drugs for next-generation treatment and diagnosis

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 program of microRNA measurement technology foundation in body fluid.

研究開発担当者 (日本語) 落谷孝広
所属 役職 氏名： (英語) Takahiro Ochiya

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

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

研究開発分担者 (日本語) 落谷孝広
所属 役職 氏名： (英語) Takahiro Ochiya

II. 成果の概要（総括研究報告）

<日本語>

我々は、検査診断薬会社、検査用ツール会社、製薬会社等からなるユーザーフォーラムと協同して、世界最先端の早期発見・早期治療が可能な医療を実現するため、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、肉腫等のがんおよびアルツハイマー病等の認知症患者等の早期発見マーカーの探索、および実用化を実施する。

すなわち、国立がん研究センター(NCC)および国立長寿医療研究センター(NCGG)のバイオバンクにて保存されている膨大な患者血清等の検体から、網羅的な血中 miRNA の発現状態を検出し、このデータを臨床情報と紐付けて一括した状態で登録したデータベースを構築し、データを複合的に解析することによって、重篤な疾患の早期発見マーカーを見出し、これを用いて臨床現場で使用可能な検査システムの開発を行う。

具体的には、上記を目的に、以下の①から④の研究開発項目を実施している。本研究開発は、実用化まで長期間を要するハイリスクな「基盤的技術」に対して、個々の事業者が互いのノウハウ等を持ちより協調して実施する。

① 患者体液中 miRNA の網羅的解析

NCC、NCGG のバイオバンクに保存されている血清、および連携 8 大学や本プロジェクト内で新たに収集した検体について、プロジェクト通算で約 41,000 個の血清検体について、解析対象としての登録を完了し、うち、39,078 個の血清検体の DNA チップを用いた網羅的な miRNA 解析を完了した。この結果、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、肉腫、認知症については早期がんマーカーの探索のためのデータを得ることができた。更に臨床上の課題である抗がん剤薬効予測マーカー等の探索のために、早期がん発見マーカー探索用検体と同一症例の検体の評価等、複合的な解析を開始した。

② 疾患横断的に解析可能な miRNA 発現データベースの構築

プロジェクト開始 2 年で整備した網羅的 miRNA 解析データ収容用データベースに加え、臨床情報データベースを構築した。臨床情報については、NCC の院内がん登録情報を基本としている。さらに両 DB を連携して必要なデータを検索するシステムを作製し、実際にデータの収容と抽出を実行した。この作業と並行してデータベース開発進捗会議を2回にわたり開催し、データのプロジェクト内共有の方法について協議を行った。なお miRNA および臨床情報のデータベースへの入力は逐次実行している。

③ miRNA 診断マーカーと miRNA 検査／診断技術の開発

昨年度論文、学会等で報告した乳がんを引き続き、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、肉腫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。これらの結果を受けて、NCC において前向きに患者をリクルートする検証用の研究を計画し、さらに体外診断用医薬品の開発につなげるための PMDA 戦略相談の事前面談を実施した。

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、PSS/JBIC の各社において、それぞれの間目標を達成する開発を行った。4 社はそれぞれの基盤技術に準拠し、①～③の研究開発によって得られた成果である血中 miRNA マーカーを自社で開発するツールと組み合わせ、体外診断用医薬品として申請することが可能なキットの作製を目指している。

<英語>

In cooperation with a user forum composed of companies such as laboratory diagnostic companies, laboratory instrument companies, and pharmaceutical companies, we explore and determine the practical applications of early detection markers for cancers, such as stomach, colon, esophageal, pancreatic, liver, biliary, lung, breast, ovarian, prostate, and bladder cancers, gliomas, and sarcomas; those for dementia including Alzheimer's disease; and those for other diseases to provide medical care systems using the world's most advanced early detection/early treatment technologies.

In other words, we detect the comprehensive miRNA expression level in blood using an enormous number of samples including patient serum sample stored in biobanks of the National Cancer Center Japan (NCC) and National Center for Geriatrics and Gerontology (NCGG) and construct a database in which the data connected to clinical data are collectively entered. In addition, by analyzing the data in a combined manner, we discover early detection markers for serious diseases for using them in the development of a diagnostic system practicable in clinical sites.

Specifically, we conduct research and development (R&D) described in (1) to (4) below for the aforementioned purposes. This cooperative R&D is conducted with individual companies, each bringing their own know-how and other expertise for high-risk "basic technology," which requires a long time for its practical application.

(1) Comprehensive analysis of miRNA in patient body fluids

A total of approximately 41,000 serum samples in the project (serum samples stored in biobanks of the NCC and NCGG and samples newly collected in eight cooperative universities and in the project) have been registered for analysis, and comprehensive miRNA analysis has been completed using DNA chips for 39078 of these serum samples. As a result, we could obtain data for the exploration of early detection markers for breast, colon, stomach, esophageal, liver, pancreatic, biliary, lung, and ovarian cancers, gliomas, sarcomas, and dementia. Furthermore, for the exploration of predictive markers for the anticancer drug response, which is a clinical issue, we initiated combined analysis including the assessment of samples of the same patients whose samples were used for the exploration of early cancer detection markers.

(2) Construction of an miRNA expression database that is cross-sectionally analyzable for the disease

We constructed a database for clinical data, in addition to a database for storing data obtained from comprehensive miRNA analysis, which was organized in 2 years after the initiation of the project. The clinical data are based on the hospital cancer registration data of the NCC. Furthermore, we created a system that connects both databases to search for necessary data and stored and extracted data. In parallel with this operation, we held a database development progress meeting twice to discuss data-sharing methods in the project. Entry of miRNA data and clinical data into the databases is sequentially performed.

(3) Development of miRNA diagnostic markers and miRNA testing/diagnostic technique

After identifying diagnostic markers for breast cancer that we reported in medical journals and conferences in the last fiscal year, we identified diagnostic markers for colon, stomach, esophageal, liver, pancreatic, biliary, lung, and ovarian cancers, gliomas, and sarcomas, with the sensitivity/specificity for each exceeding 90% in this fiscal year. Based on these results, we planned a verification study that prospectively recruited patients in the NCC, and to link it to the development of in-vitro diagnostics, we held a preliminary meeting of the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) pharmaceutical affairs consultation on R&D strategy.

(4) Diagnostic system development for use in clinical sites

In Toray Industries, Inc.; TOSHIBA CORPORATION; ARKRAY, Inc./Kyoto Inst. of Technology; and Precision System Science Co., Ltd./Japan Biological Informatics Consortium, development was performed to achieve the respective interim goals. The four organizations that combine blood miRNA markers, results from the R&D mentioned in (1) to (3), with tools that they will develop on their own on the basis of each basic technology aim to produce a kit that can lead to application for in-vitro diagnostics.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 14件)

1. Fujita Y, Yoshioka Y, Ochiya T. Extracellular vesicle transfer of cancer pathogenic components. *Cancer Sci*. 2016 Apr;107(4):385-90.
2. Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Invest*. 2016 Apr 01;126(4):1163-72.
3. Ueno M, Asada K, Toda M, Nagata K, Sotozono C, Kosaka N, Ochiya T, Kinoshita S, Hamuro J. Concomitant Evaluation of a Panel of Exosome Proteins and MiRs for Qualification of Cultured Human Corneal Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Aug 01;57(10):4393-402.
4. Yoshimura A, Kawamata M, Yoshioka Y, Katsuda T, Kikuchi H, Nagai Y, Adachi N, Numakawa T, Kunugi H, Ochiya T, Tamai Y. Generation of a novel transgenic rat model for tracing extracellular vesicles in body fluids. *Sci Rep*. 2016 Aug 19;6:31172.
5. Naito Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ochiya T. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2017, 74(4):697-713.
6. Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular Vesicles in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Mol Sci*. 2016 Oct 27;17(11).
7. Sasaki H, Yoshiike M, Nozawa S, Usuba W, Katsuoka Y, Aida K, Kitajima K, Kudo H, Hoshikawa M, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Chikaraishi T. Expression Level of Urinary MicroRNA-146a-5p Is Increased in Patients With Bladder Cancer and Decreased in Those After Transurethral Resection. *Clin Genitourin Cancer*. 2016 Oct;14(5):e493-e9.
8. Nezu Y, Hagiwara K, Yamamoto Y, Fujiwara T, Matsuo K, Yoshida A, Kawai A, Saito T, Ochiya T. miR-135b, a key regulator of malignancy, is linked to poor prognosis in human myxoid liposarcoma. *Oncogene*. 2016 Dec 01;35(48):6177-88.
9. Ogama N, Sakurai T, Nakai T, Niida S, Saji N, Toba K, Umegaki H, Kuzuya M. Impact of frontal white matter hyperintensity on instrumental activities of daily living in elderly women with Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment. *PLOS ONE*. 2017, 2, 12, e0172484.
10. Sugimoto T, Yoshida M, Ono R, Murata S, Saji N, Niida S, Toba K, Sakurai T. Frontal Lobe Function Correlates with One-Year Incidence of Urinary Incontinence in Elderly with Alzheimer Disease. *Journals Of Alzheimer's Disease*. 2017, 56,2,567-574.
11. Kayano M, Higaki S, Sato J, Matsumoto K, Takikawa O, Niida S. Plasma microRNA biomarker detection for mild cognitive impairment using differential correlation analysis. *Biomarker Research*. 2016, 12,4, doi: 10.1186/s40364-016-0076-1.
12. Mori T, Murasawa Y, Ikai R, Hayakawa T, Nakamura H, Ogiso N, Niida S, Watanabe K. Generation of a transgenic mouse line for conditional expression of human IL-6. *Experimental Animals*. 2016, 1, 65, 455-463.
13. Moriwaki S, Into T, Suzuki K, Miyauchi M, Takata T, Shibayama K, Niida S. γ -

Glutamyltranspeptidase is an endogenous activator of Toll-like receptor 4-mediated osteoclastogenesis. *Scientific Reports*. 2016, 24, 6, 35930.

14. Sugimoto T, Ono R, Murata S, Saji N, Matsui Y, Niida S, Toba K, Sakurai T. Prevalence and associated factors of sarcopenia in elderly subjects with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. *Current Alzheimer Research*. 2016, 13, 6, 718-726.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 血清中 microRNA による新規乳がん診断および治療効果予測マーカーの開発, 口頭, 下村昭彦, 椎野翔, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 松崎潤太郎, 清水千佳子, 竹下文隆, 新飯田俊平, 木下貴之, 田村研治, 落谷孝広, 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2016/7/30, 国内.
2. 心理的ストレスマーカーとなる血中 microRNA の同定と胸焼け症状との関連の検討, ポスター, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 18 回神経消化器病学会等合同学術集会, 2016/9/9~2016/9/10, 国内.
3. 血清マイクロ RNA での大腸癌におけるリキッドバイオプシーの検証, ポスター, 高丸博之, 斉藤豊, 加藤健, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 小島基宏, 落合淳志, 落谷孝広, 松田尚久, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6~2016/10/8, 国内.
4. 血清マイクロ RNA での大腸癌におけるリキッドバイオプシーの検証, ポスター, 高丸博之, 斉藤豊, 加藤健, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 小島基宏, 落合淳志, 落谷孝広, 松田尚久, JDDW2016, 2016/11/3~2016/11/6, 国内.
5. 脳卒中リスクマーカーとなる血中 microRNA の同定, ポスター, 園田匠, 松崎潤太郎, 新飯田俊平, 落谷孝広, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30~2016/12/2, 国内.
6. Novel combinations of circulating microRNAs for detecting esophageal and gastric cancers, ポスター, Matsuzaki J, Abe S, Katai H, Tachimori Y, Kato K, Kawauchi J, Takizawa S, Sakamoto H, Takeshita F, Niida S, Oda I, Ochiya T, The 10th International Gastrointestinal Consensus Symposium (IGICS), 2017/2/18, 国外.
7. エクソソームの単離と体液中からの miRNA の全自動検出システムの構築, ポスター, 安井大輔, 鈴木めぐみ, 櫻井友里, 鈴木武尊, 宮下雪子, 上田哲也, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, 国内
8. Development of a miRNA diagnostic system with LNA-conjugated solid supports and PMU₂ probes, ポスター, Sugawara U, Nakajima A, Watari Y, Ariyoshi Jm Ymayoshi A, Murakami A, Kobori A, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2016/9/27~2016/9/29, 国内
9. ピレンプローブを用いたサンドイッチ型 microRNA 検出法, ポスター, 中嶋康介, 渡優有, 杉原悠太, 有吉純平, 山吉麻子, 村上章, 小堀哲生, 第 2 回日本核酸医薬学会年会, 2016/11/15~17, 国内
10. Circulating microRNA associated with visceral obesity: a possible biomarker of digestive cancers, ポスター, Matsuzaki J, Shimizu-Hirota R, Tadokoro H, Iwao Y, Ochiya T, United European Gastroenterology Week 2016, 2016/10/15~2016/10/19 国外

11. 内臓脂肪と関連する血中 microRNA の消化器がんバイオマーカーとしての可能性, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6~2016/10/8, 国内.
12. 血清中 microRNA の精神的ストレスバイオマーカーへの応用, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 8 回日本 RNAi 研究会, 2016/8/31~2016/9/2, 国内
13. 「ExoScreen as a Novel Liquid Biopsy Platform for Detecting Cancer-Specific Exosomes」 口頭, Ochiya T, Exosomes and Liquid Biopsies ASIA, 2016.4.6-9, 海外
14. 「Extracellular Vesicles in Lung Microenvironment and Pathogenesis」 口頭, Ochiya T, 2nd International Lung Cancer Symposium, 016.4.15-18, 海外
15. 「EVs and Implications to Cancer Therapy」 口頭, Ochiya T, INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES. 2016.5.2-9, 海外
16. 「Exosome as a novel diagnostic and therapeutic target for cancer」 口頭, Ochiya T, The Korean Society of Molecular Imaging, 2016.8.26-27, 海外
17. 「Extracellular vesicles as a novel diagnostic and therapeutic target for cancer」 口頭, Ochiya T, Cold Spring Harbor Asia, 2016.12.12-16, 海外
18. 「個別化治療、先制医療実現に向けたがんの新規診断・治療戦略」第 49 回東北脳腫瘍研究会, 口頭, 落谷孝広, 2016.4.2, 国内
19. 「疾患エクソソームの解明によって生まれる新規がん診断・治療戦略」第 89 回日本整形外科学会学術総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.13, 国内
20. 「聞きたくてもなかなか聞けない最近の話題 病理医が知っておくべき病理学の最近の進歩 「Liquid biopsy と病理診断」」 第 105 回日本病理学会総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.14, 国内
21. 「最先端のがん診断とがん治療」第 13 回東レ先端融合研究シンポジウム, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.18, 国内
22. 「1 滴の血液でがんが分かる時代」星薬科大学大学院講義連携セミナー, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.28, 国内
23. 「体液マイクロ RNA 診断の現状と課題」第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.31, 国内
24. 「乳がん研究とエクソソーム」第 24 回日本乳癌学会学術総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.16, 国内
25. 「がん早期診断の進歩」第 65 回最新臨床医学を学ぶ会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.23, 国内
26. 「細胞外小細胞による肺疾患の理解」第 44 回箱根呼吸器討論会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.24, 国内
27. 「Non-codingRNA の多様な機能：がん研究において新しい展開」第 43 回日本毒性学会学術年会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.29, 国内
28. 「Extracellular vesicles in lung microenvironment and pathogenesis」第 41 回内藤コンファレンス, 口頭, 落谷孝広, 2016.7.5-8, 国内
29. 「マイクロ RNA によるがん診断」第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2016.7.30, 国内
30. 「血液によるがん検査の実現にむけて～体液マイクロ RNA 測定技術基盤開発プロジェクトの

- 現状～」 がん検診推進研修会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.8.21, 国内
31. 「細胞外に分泌される情報伝達物質に個別化医療の原点を探る」 第 8 回日本 RNAi 研究会, 第 3 回日本細胞外小胞学会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.8.31-9.2, 国内
 32. 「がんの早期発見の切り札であるマイクロ RNA/エクソソームとは」 第 65 回日本医学検査学会・第 63 回日本臨床検査医学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.3, 国内
 33. 「体液中マイクロ RNA 測定技術規範開発事業」 第 14 回医療機器フォーラム, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.5, 国内
 34. 「エクソソームによる細胞間のコミュニケーションの実態解明とがん治療への応用」 千里ライフサイエンスセミナーK3 「エクソソームの研究の最前線：疾患メカニズム解明からの診断・治療まで」, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.16, 国内
 35. 「体液マイクロ RNA によるがん診断」 第 24 回日本がん検診・診断学会総会 共催セミナー2, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.17, 国内
 36. 「体液マイクロ RNA によるがんの早期診断」 臨床検査自動化会第 48 回大会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.23, 国内
 37. 「エクソソーム研究が解き明かす乳がんの進展メカニズム診断・治療への応用」 第 40 回神戸乳癌セミナー, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.24, 国内
 38. 「マイクロ RNA による診断と治療」 第 46 回日本腎臓学会東部学術大会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.8, 国内
 39. 「血液中を循環するエクソソームの正体を探る」 第 78 回日本血液学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.14, 国内
 40. 「エクソソームを測定する基盤技術開発の必要性」 再生医療サポートビジネス懇話会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.17, 国内
 41. 「血液で 13 種類のがんを診断～がん検診の新技术～」 NHK ジャーナル, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.19, 国内ラジオ
 42. 「がん診断と治療方針決定のための最新アプローチ」 第 54 回日本癌治療学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 2016.10.22, 国内
 43. 「エクソソーム研究に関する現状・今後の進展について」 エクソソーム 2016 セミナー, 口頭, 落谷孝広 2016.10.26, 国内
 44. 「エクソソームもよる疾患の新規診断・治療」 平成 28 年度先端技術研修「エクソソームによる疾患の新規診断・治療」, 口頭, 落谷孝広 2016.10.27, 国内
 45. 「細胞外微粒子(細胞外小胞)について」 日本医薬研究開発機構 ワークショップ 「細胞外微粒子により惹起される生体応答の機序解明と制御」, 口頭, 落谷孝広 2016.10.31, 国内
 46. 「体液マイクロ RNA とがん検診」 第 25 回日本婦人科がん検診学会総会・学術講演会, 口頭, 落谷孝広 2016.11.6, 国内
 47. 「血液 1 滴でがんや認知症がわかる時代 最新の体液マイクロ RNA 診断とは」 ヘルシーパス講演会「先制医療の最前線」, 口頭, 落谷孝広 2016.11.27, 国内
 48. 「エクソソーム研究がもたらす細胞間情報伝達機構の解明」 第 39 回日本分子生物学会 ランチオンセミナー, 口頭, 落谷孝広 2016.12.1, 国内
 49. 「リキッドバイオプシーが拓く新規がん診断の現状と展望」 第 56 回日本臨床化学学会年次学術集会, 口頭, 落谷孝広 2016.12.2, 国内

50. 「血液1滴でがんを知る：体液マイクロRNA測定技術 未病社会の診断技術研究会：第24回講演会，口頭，落谷孝広 2016.12.7，国内
51. 「婦人科がん検診の新たなる潮流：疾患エクソソームによる体液診断」 第5回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会，口頭，落谷孝広 2017.2.25，国内
52. Comprehensive MicroRNA-array Analysis of Exploration for Dementia Biomarkers, Asanomi Y, Niida S, International Symposium on miRNA Cancer Biomarker Research 2016, 2016/11/9～2016/11/10 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. プロジェクト主催シンポジウム，Takahiro Ochiya, et. al. International Symposium on miRNA Cancer Biomarker Research 2016, 2016/11/9～10，国内
2. 第3回 マイクロRNAユーザーフォーラム報告会，2016/9/13
3. 第4回 マイクロRNAユーザーフォーラム報告会，2017/3/15

(4) 特許出願

2016年度中 8件出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(英語) Project focused on developing key technology for discovering and manufacturing drugs for next-generation treatment and diagnosis

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 program of microRNA measurement technology foundation in body fluid.

研究開発担当者 (日本語) メディカルゲノムセンター センター長 新飯田 俊平
所属 役職 氏名： (英語) Shumpei Niida, Director, Medical Genome Center, NCGG

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

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

研究開発分担者 (日本語) メディカルゲノムセンター センター長 新飯田 俊平
所属 役職 氏名： (英語) Shumpei Niida, Director, Medical Genome Center, NCGG

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者： 国立がん研究センター研究所 分子細胞治療研究分野主任分野長 落谷孝広
総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0件、国際誌 14件）

1. Fujita Y, Yoshioka Y, Ochiya T. Extracellular vesicle transfer of cancer pathogenic components. *Cancer Sci*. 2016, 107:385-90.
2. Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Invest*. 2016, 126:1163-72.
3. Ueno M, Asada K, Toda M, Nagata K, Sotozono C, Kosaka N, Ochiya T, Kinoshita S, Hamuro J. Concomitant Evaluation of a Panel of Exosome Proteins and MiRs for Qualification of Cultured Human Corneal Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Aug 01;57(10):4393-402.
4. Yoshimura A, Kawamata M, Yoshioka Y, Katsuda T, Kikuchi H, Nagai Y, Adachi N, Numakawa T, Kunugi H, Ochiya T, Tamai Y. Generation of a novel transgenic rat model for tracing extracellular vesicles in body fluids. *Sci Rep*. 2016 Aug 19;6:31172.
5. Naito Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ochiya T. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2017, 74(4):697-713.
6. Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular Vesicles in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Mol Sci*. 2016 Oct 27;17(11).
7. Sasaki H, Yoshiike M, Nozawa S, Usuba W, Katsuoka Y, Aida K, Kitajima K, Kudo H, Hoshikawa M, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Chikaraishi T. Expression Level of Urinary MicroRNA-146a-5p Is Increased in Patients With Bladder Cancer and Decreased in Those After Transurethral Resection. *Clin Genitourin Cancer*. 2016, 14:e493-e9.
8. Nezu Y, Hagiwara K, Yamamoto Y, Fujiwara T, Matsuo K, Yoshida A, Kawai A, Saito T, Ochiya T. miR-135b, a key regulator of malignancy, is linked to poor prognosis in human myxoid liposarcoma. *Oncogene*. 2016 Dec 01;35(48):6177-88.
9. Ogama N, Sakurai T, Nakai T, Niida S, Saji N, Toba K, Umegaki H, Kuzuya M. Impact of frontal white matter hyperintensity on instrumental activities of daily living in elderly women with Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment. *PLOS ONE*. 2017, 2, 12, e0172484.
10. Sugimoto T, Yoshida M, Ono R, Murata S, Saji N, Niida S, Toba K, Sakurai T. Frontal Lobe Function Correlates with One-Year Incidence of Urinary Incontinence in Elderly with Alzheimer Disease. *Journals Of Alzheimer's Disease*. 2017, 56,2,567-574.
11. Kayano M, Higaki S, Sato J, Matsumoto K, Takikawa O, Niida S. Plasma microRNA

- biomarker detection for mild cognitive impairment using differential correlation analysis. Biomarker Research. 2016, 12,4, doi: 10.1186/s40364-016-0076-1.
12. Mori T, Murasawa Y, Ikai R, Hayakawa T, Nakamura H, Ogiso N, Niida S, Watanabe K. Generation of a transgenic mouse line for conditional expression of human IL-6. Experimental Animals. 2016, 1, 65, 455-463.
 13. Moriwaki S, Into T, Suzuki K, Miyauchi M, Takata T, Shibayama K, Niida S. γ -Glutamyltranspeptidase is an endogenous activator of Toll-like receptor 4-mediated osteoclastogenesis. Scientific Reports. 2016, 24, 6, 35930.
 14. Sugimoto T, Ono R, Murata S, Saji N, Matsui Y, Niida S, Toba K, Sakurai T. Prevalence and associated factors of sarcopenia in elderly subjects with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. Current Alzheimer Research. 2016, 13, 6, 718-726.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 血清中 microRNA による新規乳がん診断および治療効果予測マーカーの開発, 口頭, 下村昭彦, 椎野翔, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 松崎潤太郎, 清水千佳子, 竹下文隆, 新飯田俊平, 木下貴之, 田村研治, 落谷孝広, 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2016/7/30, 国内.
2. 心理的ストレスマーカーとなる血中 microRNA の同定と胸焼け症状との関連の検討, ポスター, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 18 回神経消化器病学会等合同学術集会, 2016/9/9~2016/9/10, 国内.
3. 血清マイクロ RNA での大腸癌におけるリキッドバイオプシーの検証, ポスター, 高丸博之, 斉藤豊, 加藤健, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 小島基宏, 落合淳志, 落谷孝広, 松田尚久, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6~2016/10/8, 国内.
4. 血清マイクロ RNA での大腸癌におけるリキッドバイオプシーの検証, ポスター, 高丸博之, 斉藤豊, 加藤健, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 小島基宏, 落合淳志, 落谷孝広, 松田尚久, JDDW2016, 2016/11/3~2016/11/6, 国内.
5. 脳卒中リスクマーカーとなる血中 microRNA の同定, ポスター, 園田匠, 松崎潤太郎, 新飯田俊平, 落谷孝広, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30~2016/12/2, 国内.
6. Novel combinations of circulating microRNAs for detecting esophageal and gastric cancers, ポスター, Matsuzaki J, Abe S, Katai H, Tachimori Y, Kato K, Kawauchi J, Takizawa S, Sakamoto H, Takeshita F, Niida S, Oda I, Ochiya T, The 10th International Gastrointestinal Consensus Symposium (IGICS), 2017/2/18, 国外.
7. エクソソームの単離と体液中からの miRNA の全自動検出システムの構築, ポスター, 安井大輔, 鈴木めぐみ, 櫻井友里, 鈴木武尊, 宮下雪子, 上田哲也, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, 国内
8. Development of a miRNA diagnostic system with LNA-conjugated solid supports and PMU₂ probes, ポスター, Sugawara U, Nakajima A, Watari Y, Ariyoshi Jm Ymayoshi A, Murakami A, Kobori A, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2016/9/27~2016/9/29, 国内

9. ピレンプローブを用いたサンドイッチ型 microRNA 検出法, ポスター, 中嶋康介, 渡優有, 杉原悠太, 有吉純平, 山吉麻子, 村上章, 小堀哲生, 第 2 回日本核酸医薬学会年会, 2016/11/15~17, 国内
10. Circulating microRNA associated with visceral obesity: a possible biomarker of digestive cancers, ポスター, Matsuzaki J, Shimizu-Hirota R, Tadokoro H, Iwao Y, Ochiya T, United European Gastroenterology Week 2016, 2016/10/15~2016/10/19 国外
11. 内臓脂肪と相関する血中 microRNA の消化器がんバイオマーカーとしての可能性, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6~2016/10/8, 国内.
12. 血清中 microRNA の精神的ストレスバイオマーカーへの応用, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 8 回日本 RNAi 研究会, 2016/8/31~2016/9/2, 国内
13. 「ExoScreen as a Novel Liquid Biopsy Platform for Detecting Cancer-Specific Exosomes」 口頭, Ochiya T, Exosomes and Liquid Biopsies ASIA, 2016.4.6-9, 海外
14. 「Extracellular Vesicles in Lung Microenvironment and Pathogenesis」 口頭, Ochiya T, 2nd International Lung Cancer Symposium, 2016.4.15-18, 海外
15. 「EVs and Implications to Cancer Therapy」 口頭, Ochiya T, INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES. 2016.5.2-9, 海外
16. 「Exosome as a novel diagnostic and therapeutic target for cancer」 口頭, Ochiya T, The Korean Society of Molecular Imaging, 2016.8.26-27, 海外
17. 「Extracellular vesicles as a novel diagnostic and therapeutic target for cancer」 口頭, Ochiya T, Cold Spring Harbor Asia, 2016.12.12-16, 海外
18. 「個別化治療、先制医療実現に向けたがんの新規診断・治療戦略」第 49 回東北脳腫瘍研究会, 口頭, 落谷孝広, 2016.4.2, 国内
19. 「疾患エクソソームの解明によって生まれる新規がん診断・治療戦略」第 89 回日本整形外科学会学術総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.13, 国内
20. 「聞きたくてもなかなか聞けない最近の話題 病理医が知っておくべき病理学の最近の進歩 「Liquid biopsy と病理診断」 第 105 回日本病理学会総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.14, 国内
21. 「最先端のがん診断とがん治療」第 13 回東レ先端融合研究シンポジウム, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.18, 国内
22. 「1 滴の血液でがんが分かる時代」星薬科大学大学院講義連携セミナー, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.28, 国内
23. 「体液マイクロ RNA 診断の現状と課題」第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.31, 国内
24. 「乳がん研究とエクソソーム」第 24 回日本乳癌学会学術総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.16, 国内
25. 「がん早期診断の進歩」第 65 回最新臨床医学を学ぶ会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.23, 国内
26. 「細胞外小細胞による肺疾患の理解」第 44 回箱根呼吸器討論会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.24, 国内
27. 「Non-codingRNA の多様な機能：がん研究において新しい展開」第 43 回日本毒性学会学術年会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.29, 国内
28. 「Extracellular vesicles in lung microenvironment and pathogenesis」第 41 回内藤コンファ

- レンス, 口頭, 落谷孝広, 2016.7.5-8, 国内
29. 「マイクロ RNA によるがん診断」第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2016.7.30, 国内
 30. 「血液によるがん検査の実現にむけて～体液マイクロ RNA 測定技術基盤開発プロジェクトの現状～」がん検診推進研修会, 口頭, 落谷孝広, 2016.8.21, 国内
 31. 「細胞外に分泌される情報伝達物質に個別化医療の原点を探る」第 8 回日本 RNAi 研究会, 第 3 回日本細胞外小胞学会, 口頭, 落谷孝広, 2016.8.31-9.2, 国内
 32. 「がんの早期発見の切り札であるマイクロ RNA/エクソソームとは」第 65 回日本医学検査学会・第 63 回日本臨床検査医学会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2016.9.3, 国内
 33. 「体液中マイクロ RNA 測定技術規範開発事業」第 14 回医療機器フォーラム, 口頭, 落谷孝広, 2016.9.5, 国内
 34. 「エクソソームによる細胞間のコミュニケーションの実態解明とがん治療への応用」千里ライフサイエンスセミナーK3 「エクソソームの研究の最前線: 疾患メカニズム解明からの診断・治療まで」, 口頭, 落谷孝広, 2016.9.16, 国内
 35. 「体液マイクロ RNA によるがん診断」第 24 回日本がん検診・診断学会総会 共催セミナー2, 口頭, 落谷孝広, 2016.9.17, 国内
 36. 「体液マイクロ RNA によるがんの早期診断」臨床検査自動化会第 48 回大会, 口頭, 落谷孝広, 2016.9.23, 国内
 37. 「エクソソーム研究が解き明かす乳がんの進展メカニズム診断・治療への応用」第 40 回神戸乳癌セミナー, 口頭, 落谷孝広, 2016.9.24, 国内
 38. 「マイクロ RNA による診断と治療」第 46 回日本腎臓学会東部学術大会, 口頭, 落谷孝広, 2016.10.8, 国内
 39. 「血液中を循環するエクソソームの正体を探る」第 78 回日本血液学会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2016.10.14, 国内
 40. 「エクソソームを測定する基盤技術開発の必要性」再生医療サポートビジネス懇話会, 口頭, 落谷孝広, 2016.10.17, 国内
 41. 「血液で 13 種類のがんを診断～がん検診の新技術～」NHK ジャーナル, 口頭, 落谷孝広, 2016.10.19, 国内ラジオ
 42. 「がん診断と治療方針決定のための最新アプローチ」第 54 回日本癌治療学会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2016.10.22, 国内
 43. 「エクソソーム研究に関する現状・今後の進展について」エクソソーム 2016 セミナー, 口頭, 落谷孝広, 2016.10.26, 国内
 44. 「エクソソームもよる疾患の新規診断・治療」平成 28 年度先端技術研修「エクソソームによる疾患の新規診断・治療」, 口頭, 落谷孝広, 2016.10.27, 国内
 45. 「細胞外微粒子(細胞外小胞)について」日本医薬研究開発機構 ワークショップ 「細胞外微粒子により惹起される生体応答の機序解明と制御」, 口頭, 落谷孝広, 2016.10.31, 国内
 46. 「体液マイクロ RNA とがん検診」第 25 回日本婦人科がん検診学会総会・学術講演会, 口頭, 落谷孝広, 2016.11.6, 国内
 47. 「血液 1 滴でがんや認知症がわかる時代 最新の体液マイクロ RNA 診断とは」ヘルシーパス講演会「先制医療の最前線」, 口頭, 落谷孝広, 2016.11.27, 国内

48. 「エクソソーム研究がもたらす細胞間情報伝達機構の解明」第 39 回日本分子生物学会 ランチ
ョンセミナー, 口頭, 落谷孝広, 2016.12.1, 国内
49. 「リキッドバイオプシーが拓く新規がん診断の現状と展望」第 56 回日本臨床化学会年次学術集
会, 口頭, 落谷孝広, 2016.12.2, 国内
50. 「血液 1 滴でがんを知る: 体液マイクロ RNA 測定技術 未病社会の診断技術研究会: 第 24 回
講演会, 口頭, 落谷孝広, 2016.12.7, 国内
51. 「婦人科がん検診の新たなる潮流: 疾患エクソソームによる体液診断」第 5 回婦人科がんバイ
オマーカー研究会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2017.2.25, 国内
52. Comprehensive MicroRNA-array Analysis of Exploration for Dementia Biomarkers,
Asanomi Y, Niida S, International Symposium on miRNA Cancer Biomarker Research 2016,
2016/11/9~2016/11/10 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. プロジェクト主催シンポジウム, Takahiro Ochiya, et. al. International Symposium on miRNA
Cancer Biomarker Research 2016, 2016/11/9~10, 国内
2. 第 3 回 マイクロ RNA ユーザーフォーラム報告会, 2016/9/13
3. 第 4 回 マイクロ RNA ユーザーフォーラム報告会, 2017/3/15

(4) 特許出願

2016 年度中 8 件出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(英語) Project focused on developing key technology for discovering and manufacturing drugs for next-generation treatment and diagnosis

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 program of microRNA measurement technology foundation in body fluid.

研究開発担当者 (日本語) 米原 徹
所属 役職 氏名： (英語) Tetsu Yonehara

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

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

研究開発分担者 (日本語) 米原 徹
所属 役職 氏名： (英語) Tetsu Yonehara

II. 成果の概要（総括研究報告）

<日本語>

我々は、検査診断薬会社、検査用ツール会社、製薬会社等からなるユーザーフォーラムと協同して、世界最先端の早期発見・早期治療が可能な医療を実現するため、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、肉腫等のがんおよびアルツハイマー病等の認知症患者等の早期発見マーカーの探索、および実用化を実施する。

すなわち、国立がん研究センター(NCC)および国立長寿医療研究センター(NCGG)のバイオバンクにて保存されている膨大な患者血清等の検体から、網羅的な血中 miRNA の発現状態を検出し、このデータを臨床情報と紐付けて一括した状態で登録したデータベースを構築し、データを複合的に解析することによって、重篤な疾患の早期発見マーカーを見出し、これを用いて臨床現場で使用可能な検査システムの開発を行う。

具体的には、上記を目的に、以下の①から④の研究開発項目を実施している。本研究開発は、実用化まで長期間を要するハイリスクな「基盤的技術」に対して、個々の事業者が互いのノウハウ等を持ちより協調して実施する。

① 患者体液中 miRNA の網羅的解析

NCC、NCGG のバイオバンクに保存されている血清、および連携 8 大学や本プロジェクト内で新たに収集した検体について、プロジェクト通算で約 41,000 個の血清検体について、解析対象としての登録を完了し、うち、39,078 個の血清検体の DNA チップを用いた網羅的な miRNA 解析を完了した。この結果、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、肉腫、認知症については早期がんマーカーの探索のためのデータを得ることができた。更に臨床上の課題である抗がん剤薬効予測マーカー等の探索のために、早期がん発見マーカー探索用検体と同一症例の検体の評価等、複合的な解析を開始した。

② 疾患横断的に解析可能な miRNA 発現データベースの構築

プロジェクト開始 2 年で整備した網羅的 miRNA 解析データ収容用データベースに加え、臨床情報データベースを構築した。臨床情報については、NCC の院内がん登録情報を基本としている。さらに両 DB を連携して必要なデータを検索するシステムを作製し、実際にデータの収容と抽出を実行した。この作業と並行してデータベース開発進捗会議を2回にわたり開催し、データのプロジェクト内共有の方法について協議を行った。なお miRNA および臨床情報のデータベースへの入力は逐次実行している。

③ miRNA 診断マーカーと miRNA 検査／診断技術の開発

昨年度論文、学会等で報告した乳がんを引き続き、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、肉腫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。これらの結果を受けて、NCC において前向きに患者をリクルートする検証用の研究を計画し、さらに体外診断用医薬品の開発につなげるための PMDA 戦略相談の事前面談を実施した。

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、PSS/JBIC の各社において、それぞれの中間目標を達成する開発を行った。4 社はそれぞれの基盤技術に準拠し、①～③の研究開発によって得られた成果である血中 miRNA マーカーを自社で開発するツールと組み合わせ、体外診断用医薬品として申請することが可能なキットの作製を目指している。

<英語>

In cooperation with a user forum composed of companies such as laboratory diagnostic companies, laboratory instrument companies, and pharmaceutical companies, we explore and determine the practical applications of early detection markers for cancers, such as stomach, colon, esophageal, pancreatic, liver, biliary, lung, breast, ovarian, prostate, and bladder cancers, gliomas, and sarcomas; those for dementia including Alzheimer's disease; and those for other diseases to provide medical care systems using the world's most advanced early detection/early treatment technologies.

In other words, we detect the comprehensive miRNA expression level in blood using an enormous number of samples including patient serum sample stored in biobanks of the National Cancer Center Japan (NCC) and National Center for Geriatrics and Gerontology (NCGG) and construct a database in which the data connected to clinical data are collectively entered. In addition, by analyzing the data in a combined manner, we discover early detection markers for serious diseases for using them in the development of a diagnostic system practicable in clinical sites.

Specifically, we conduct research and development (R&D) described in (1) to (4) below for the aforementioned purposes. This cooperative R&D is conducted with individual companies, each bringing their own know-how and other expertise for high-risk "basic technology," which requires a long time for its practical application.

(1) Comprehensive analysis of miRNA in patient body fluids

A total of approximately 41,000 serum samples in the project (serum samples stored in biobanks of the NCC and NCGG and samples newly collected in eight cooperative universities and in the project) have been registered for analysis, and comprehensive miRNA analysis has been completed using DNA chips for 39078 of these serum samples. As a result, we could obtain data for the exploration of early detection markers for breast, colon, stomach, esophageal, liver, pancreatic, biliary, lung, and ovarian cancers, gliomas, sarcomas, and dementia. Furthermore, for the exploration of predictive markers for the anticancer drug response, which is a clinical issue, we initiated combined analysis including the assessment of samples of the same patients whose samples were used for the exploration of early cancer detection markers.

(2) Construction of an miRNA expression database that is cross-sectionally analyzable for the disease

We constructed a database for clinical data, in addition to a database for storing data obtained from comprehensive miRNA analysis, which was organized in 2 years after the initiation of the project. The clinical data are based on the hospital cancer registration data of the NCC. Furthermore, we created a system that connects both databases to search for necessary data and stored and extracted data. In parallel with this operation, we held a database development progress meeting twice to discuss data-sharing methods in the project. Entry of miRNA data and clinical data into the databases is sequentially performed.

(3) Development of miRNA diagnostic markers and miRNA testing/diagnostic technique

After identifying diagnostic markers for breast cancer that we reported in medical journals and conferences in the last fiscal year, we identified diagnostic markers for colon, stomach, esophageal, liver, pancreatic, biliary, lung, and ovarian cancers, gliomas, and sarcomas, with the sensitivity/specificity for each exceeding 90% in this fiscal year. Based on these results, we planned a verification study that prospectively recruited patients in the NCC, and to link it to the development of in-vitro diagnostics, we held a preliminary meeting of the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) pharmaceutical affairs consultation on R&D strategy.

(4) Diagnostic system development for use in clinical sites

In Toray Industries, Inc.; TOSHIBA CORPORATION; ARKRAY, Inc./Kyoto Inst. of Technology; and Precision System Science Co., Ltd./Japan Biological Informatics Consortium, development was performed to achieve the respective interim goals. The four organizations that combine blood miRNA markers, results from the R&D mentioned in (1) to (3), with tools that they will develop on their own on the basis of each basic technology aim to produce a kit that can lead to application for in-vitro diagnostics.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 14件)

1. Fujita Y, Yoshioka Y, Ochiya T. Extracellular vesicle transfer of cancer pathogenic components. *Cancer Sci*. 2016 Apr;107(4):385-90.
2. Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Invest*. 2016 Apr 01;126(4):1163-72.
3. Ueno M, Asada K, Toda M, Nagata K, Sotozono C, Kosaka N, Ochiya T, Kinoshita S, Hamuro J. Concomitant Evaluation of a Panel of Exosome Proteins and MiRs for Qualification of Cultured Human Corneal Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Aug 01;57(10):4393-402.
4. Yoshimura A, Kawamata M, Yoshioka Y, Katsuda T, Kikuchi H, Nagai Y, Adachi N, Numakawa T, Kunugi H, Ochiya T, Tamai Y. Generation of a novel transgenic rat model for tracing extracellular vesicles in body fluids. *Sci Rep*. 2016 Aug 19;6:31172.
5. Naito Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ochiya T. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2017, 74(4):697-713.
6. Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular Vesicles in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Mol Sci*. 2016 Oct 27;17(11).
7. Sasaki H, Yoshiike M, Nozawa S, Usuba W, Katsuoka Y, Aida K, Kitajima K, Kudo H, Hoshikawa M, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Chikaraishi T. Expression Level of Urinary MicroRNA-146a-5p Is Increased in Patients With Bladder Cancer and Decreased in Those After Transurethral Resection. *Clin Genitourin Cancer*. 2016 Oct;14(5):e493-e9.
8. Nezu Y, Hagiwara K, Yamamoto Y, Fujiwara T, Matsuo K, Yoshida A, Kawai A, Saito T, Ochiya T. miR-135b, a key regulator of malignancy, is linked to poor prognosis in human myxoid liposarcoma. *Oncogene*. 2016 Dec 01;35(48):6177-88.
9. Ogama N, Sakurai T, Nakai T, Niida S, Saji N, Toba K, Umegaki H, Kuzuya M. Impact of frontal white matter hyperintensity on instrumental activities of daily living in elderly women with Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment. *PLOS ONE*. 2017, 2, 12, e0172484.
10. Sugimoto T, Yoshida M, Ono R, Murata S, Saji N, Niida S, Toba K, Sakurai T. Frontal Lobe Function Correlates with One-Year Incidence of Urinary Incontinence in Elderly with Alzheimer Disease. *Journals Of Alzheimer's Disease*. 2017, 56,2,567-574.
11. Kayano M, Higaki S, Sato J, Matsumoto K, Takikawa O, Niida S. Plasma microRNA biomarker detection for mild cognitive impairment using differential correlation analysis. *Biomarker Research*. 2016, 12,4, doi: 10.1186/s40364-016-0076-1.
12. Mori T, Murasawa Y, Ikai R, Hayakawa T, Nakamura H, Ogiso N, Niida S, Watanabe K. Generation of a transgenic mouse line for conditional expression of human IL-6. *Experimental Animals*. 2016, 1, 65, 455-463.
13. Moriwaki S, Into T, Suzuki K, Miyauchi M, Takata T, Shibayama K, Niida S. γ -

Glutamyltranspeptidase is an endogenous activator of Toll-like receptor 4-mediated osteoclastogenesis. *Scientific Reports*. 2016, 24, 6, 35930.

14. Sugimoto T, Ono R, Murata S, Saji N, Matsui Y, Niida S, Toba K, Sakurai T. Prevalence and associated factors of sarcopenia in elderly subjects with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. *Current Alzheimer Research*. 2016, 13, 6, 718-726.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 血清中 microRNA による新規乳がん診断および治療効果予測マーカーの開発, 口頭, 下村昭彦, 椎野翔, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 松崎潤太郎, 清水千佳子, 竹下文隆, 新飯田俊平, 木下貴之, 田村研治, 落谷孝広, 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2016/7/30, 国内.
2. 心理的ストレスマーカーとなる血中 microRNA の同定と胸焼け症状との関連の検討, ポスター, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 18 回神経消化器病学会等合同学術集会, 2016/9/9~2016/9/10, 国内.
3. 血清マイクロ RNA での大腸癌におけるリキッドバイオプシーの検証, ポスター, 高丸博之, 斉藤豊, 加藤健, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 小島基宏, 落合淳志, 落谷孝広, 松田尚久, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6~2016/10/8, 国内.
4. 血清マイクロ RNA での大腸癌におけるリキッドバイオプシーの検証, ポスター, 高丸博之, 斉藤豊, 加藤健, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 小島基宏, 落合淳志, 落谷孝広, 松田尚久, JDDW2016, 2016/11/3~2016/11/6, 国内.
5. 脳卒中リスクマーカーとなる血中 microRNA の同定, ポスター, 園田匠, 松崎潤太郎, 新飯田俊平, 落谷孝広, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30~2016/12/2, 国内.
6. Novel combinations of circulating microRNAs for detecting esophageal and gastric cancers, ポスター, Matsuzaki J, Abe S, Katai H, Tachimori Y, Kato K, Kawauchi J, Takizawa S, Sakamoto H, Takeshita F, Niida S, Oda I, Ochiya T, The 10th International Gastrointestinal Consensus Symposium (IGICS), 2017/2/18, 国外.
7. エクソソームの単離と体液中からの miRNA の全自動検出システムの構築, ポスター, 安井大輔, 鈴木めぐみ, 櫻井友里, 鈴木武尊, 宮下雪子, 上田哲也, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, 国内
8. Development of a miRNA diagnostic system with LNA-conjugated solid supports and PMU₂ probes, ポスター, Sugawara U, Nakajima A, Watari Y, Ariyoshi Jm Ymayoshi A, Murakami A, Kobori A, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2016/9/27~2016/9/29, 国内
9. ピレンプローブを用いたサンドイッチ型 microRNA 検出法, ポスター, 中嶋康介, 渡優有, 杉原悠太, 有吉純平, 山吉麻子, 村上章, 小堀哲生, 第 2 回日本核酸医薬学会年会, 2016/11/15~17, 国内
10. Circulating microRNA associated with visceral obesity: a possible biomarker of digestive cancers, ポスター, Matsuzaki J, Shimizu-Hirota R, Tadokoro H, Iwao Y, Ochiya T, United European Gastroenterology Week 2016, 2016/10/15~2016/10/19 国外

11. 内臓脂肪と関連する血中 microRNA の消化器がんバイオマーカーとしての可能性, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6~2016/10/8, 国内.
12. 血清中 microRNA の精神的ストレスバイオマーカーへの応用, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 8 回日本 RNAi 研究会, 2016/8/31~2016/9/2, 国内
13. 「ExoScreen as a Novel Liquid Biopsy Platform for Detecting Cancer-Specific Exosomes」 口頭, Ochiya T, Exosomes and Liquid Biopsies ASIA, 2016.4.6-9, 海外
14. 「Extracellular Vesicles in Lung Microenvironment and Pathogenesis」 口頭, Ochiya T, 2nd International Lung Cancer Symposium, 016.4.15-18, 海外
15. 「EVs and Implications to Cancer Therapy」 口頭, Ochiya T, INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES. 2016.5.2-9, 海外
16. 「Exosome as a novel diagnostic and therapeutic target for cancer」 口頭, Ochiya T, The Korean Society of Molecular Imaging, 2016.8.26-27, 海外
17. 「Extracellular vesicles as a novel diagnostic and therapeutic target for cancer」 口頭, Ochiya T, Cold Spring Harbor Asia, 2016.12.12-16, 海外
18. 「個別化治療、先制医療実現に向けたがんの新規診断・治療戦略」第 49 回東北脳腫瘍研究会, 口頭, 落谷孝広, 2016.4.2, 国内
19. 「疾患エクソソームの解明によって生まれる新規がん診断・治療戦略」第 89 回日本整形外科学会学術総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.13, 国内
20. 「聞きたくてもなかなか聞けない最近の話題 病理医が知っておくべき病理学の最近の進歩 「Liquid biopsy と病理診断」」 第 105 回日本病理学会総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.14, 国内
21. 「最先端のがん診断とがん治療」第 13 回東レ先端融合研究シンポジウム, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.18, 国内
22. 「1 滴の血液でがんが分かる時代」星薬科大学大学院講義連携セミナー, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.28, 国内
23. 「体液マイクロ RNA 診断の現状と課題」第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.31, 国内
24. 「乳がん研究とエクソソーム」第 24 回日本乳癌学会学術総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.16, 国内
25. 「がん早期診断の進歩」第 65 回最新臨床医学を学ぶ会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.23, 国内
26. 「細胞外小細胞による肺疾患の理解」第 44 回箱根呼吸器討論会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.24, 国内
27. 「Non-codingRNA の多様な機能：がん研究において新しい展開」第 43 回日本毒性学会学術年会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.29, 国内
28. 「Extracellular vesicles in lung microenvironment and pathogenesis」第 41 回内藤コンファレンス, 口頭, 落谷孝広, 2016.7.5-8, 国内
29. 「マイクロ RNA によるがん診断」第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2016.7.30, 国内

30. 「血液によるがん検査の実現にむけて～体液マイクロ RNA 測定技術基盤開発プロジェクトの現状～」 がん検診推進研修会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.8.21, 国内
31. 「細胞外に分泌される情報伝達物質に個別化医療の原点を探る」 第 8 回日本 RNAi 研究会, 第 3 回日本細胞外小胞学会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.8.31-9.2, 国内
32. 「がんの早期発見の切り札であるマイクロ RNA/エクソソームとは」 第 65 回日本医学検査学会・第 63 回日本臨床検査医学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.3, 国内
33. 「体液中マイクロ RNA 測定技術規範開発事業」 第 14 回医療機器フォーラム, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.5, 国内
34. 「エクソソームによる細胞間のコミュニケーションの実態解明とがん治療への応用」 千里ライフサイエンスセミナーK3 「エクソソームの研究の最前線：疾患メカニズム解明からの診断・治療まで」, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.16, 国内
35. 「体液マイクロ RNA によるがん診断」 第 24 回日本がん検診・診断学会総会 共催セミナー2, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.17, 国内
36. 「体液マイクロ RNA によるがんの早期診断」 臨床検査自動化会第 48 回大会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.23, 国内
37. 「エクソソーム研究が解き明かす乳がんの進展メカニズム診断・治療への応用」 第 40 回神戸乳癌セミナー, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.24, 国内
38. 「マイクロ RNA による診断と治療」 第 46 回日本腎臓学会東部学術大会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.8, 国内
39. 「血液中を循環するエクソソームの正体を探る」 第 78 回日本血液学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.14, 国内
40. 「エクソソームを測定する基盤技術開発の必要性」 再生医療サポートビジネス懇話会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.17, 国内
41. 「血液で 13 種類のがんを診断～がん検診の新技术～」 NHK ジャーナル, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.19, 国内ラジオ
42. 「がん診断と治療方針決定のための最新アプローチ」 第 54 回日本癌治療学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 2016.10.22, 国内
43. 「エクソソーム研究に関する現状・今後の進展について」 エクソソーム 2016 セミナー, 口頭, 落谷孝広 2016.10.26, 国内
44. 「エクソソームもよる疾患の新規診断・治療」 平成 28 年度先端技術研修「エクソソームによる疾患の新規診断・治療」, 口頭, 落谷孝広 2016.10.27, 国内
45. 「細胞外微粒子(細胞外小胞)について」 日本医薬研究開発機構 ワークショップ 「細胞外微粒子により惹起される生体応答の機序解明と制御」, 口頭, 落谷孝広 2016.10.31, 国内
46. 「体液マイクロ RNA とがん検診」 第 25 回日本婦人科がん検診学会総会・学術講演会, 口頭, 落谷孝広 2016.11.6, 国内
47. 「血液 1 滴でがんや認知症がわかる時代 最新の体液マイクロ RNA 診断とは」 ヘルシーパス講演会「先制医療の最前線」, 口頭, 落谷孝広 2016.11.27, 国内
48. 「エクソソーム研究がもたらす細胞間情報伝達機構の解明」 第 39 回日本分子生物学会 ランチオンセミナー, 口頭, 落谷孝広 2016.12.1, 国内

49. 「リキッドバイオプシーが拓く新規がん診断の現状と展望」第 56 回日本臨床化学会年次学術集会, 口頭, 落谷孝広 2016.12.2, 国内
50. 「血液 1 滴でがんを知る: 体液マイクロ RNA 測定技術」 未病社会の診断技術研究会: 第 24 回講演会, 口頭, 落谷孝広 2016.12.7, 国内
51. 「婦人科がん検診の新たなる潮流: 疾患エクソソームによる体液診断」 第 5 回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会, 口頭, 落谷孝広 2017.2.25, 国内
52. Comprehensive MicroRNA-array Analysis of Exploration for Dementia Biomarkers, Asanomi Y, Niida S, International Symposium on miRNA Cancer Biomarker Research 2016, 2016/11/9~2016/11/10 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. プロジェクト主催シンポジウム, Takahiro Ochiya, et. al. International Symposium on miRNA Cancer Biomarker Research 2016, 2016/11/9~10, 国内
2. 第 3 回 マイクロ RNA ユーザーフォーラム報告会, 2016/9/13
3. 第 4 回 マイクロ RNA ユーザーフォーラム報告会, 2017/3/15

(4) 特許出願

2016 年度中 8 件出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
Project focused on developing key technology for discovering and manufacturing drugs for next-generation treatment and diagnosis

研究開発課題名： 体液中マイクロ RNA 測定技術基盤開発
Development program of microRNA measurement technology foundation in body fluid

研究開発担当者 株式会社東芝 研究開発センターフロンティアリサーチラボラトリー
所属 役職 氏名： 研究主幹 橋本幸二
Frontier research laboratory, Corporate research & development center, Toshiba Corporation; Chief research scientist; Koji Hashimoto

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 臨床現場での使用に向けた検査システムの開発
開発課題名： Development of miRNA detection system for clinical use at medical field

研究開発分担者 株式会社東芝 研究開発センターフロンティアリサーチラボラトリー
所属 役職 氏名： 研究主幹 橋本幸二
Frontier research laboratory, Corporate research & development center, Toshiba Corporation; Chief research scientist; Koji Hashimoto

II. 成果の概要 (総括研究報告)

研究開発代表者：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・落谷孝広
総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧

該当なし

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

該当なし

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

・マイクロ RNA 検出用 DNA チップ技術について，橋本幸二，第 4 回マイクロ RNA ユーザーフォーラム報告会，2017/3/15，国内

(4) 特許出願

国内出願：2 件

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(英語) Project Focused on Developing Key Technology for Discovering and
Manufacturing Drugs for Next-Generation Treatment and Diagnosis

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 Program of microRNA Measurement Technology Foundation
in Body Fluid

研究開発担当者 (日本語) 一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム 部長 高嶋 秀昭
所属 役職 氏名： (英語) Japan Biological Informatics Consortium Strategic Planning Department
General Manager Hideaki Takashima

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 体液中マイクロ RNA 測定技術基盤開発
開発課題名： (英語) Development Program of microRNA Measurement Technology Foundation
in Body Fluid

16ae0101016h0003

研究開発分担者 (日本語) 一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム 部長 高嶋 秀昭
所属 役職 氏名： (英語) Japan Biological Informatics Consortium Strategic Planning Department
General Manager Hideaki Takashima

16ae0101016s0103

研究開発分担者 (日本語) 国立研究開発法人産業技術総合研究所 研究チーム長 五島 直樹
研究グループ長 野田 尚宏
所属 役職 氏名： (英語) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology
Team Leader Naoki Goshima
Group Leader Naohiro Noda

16ae0101016s0203

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人九州大学 教授 三森 功士
所属 役職 氏名： (英語) Kyushu University Professor Koshi Mimori

16ae0101016s0303

研究開発分担者 (日本語) 群馬大学生体調節研究所・教授・畑田出穂

所属 役職 氏名: (英語) Gunma University Professor Izuho Hatada

16ae0101016s0403

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京医科歯科大学 教授 横田 隆徳

所属 役職 氏名: (英語) Tokyo Medical and Dental University Chairman and Professor
Takanori Yokota

16ae0101016s0503

研究開発分担者 (日本語) 公立大学法人大阪市立大学 准教授 村上 善基

所属 役職 氏名: (英語) Osaka City University Associate Professor Yoshiki Murakami

16ae0101016s0603

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人 名古屋大学 教授 馬場 嘉信

所属 役職 氏名: (英語) Nagoya University Professor Yoshinobu BABA

16ae0101016s0703

研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人広島大学 教授 田原 栄俊

所属 役職 氏名: (英語) Hiroshima University Professor Hidetoshi Tahara

16ae0101016s0903

研究開発担当者 (日本語) 学校法人東京医科大学 主任教授 黒田 雅彦

所属 役職 氏名: (英語) Tokyo Medical University Professor and chair Masahiko Kuroda

II. 成果の概要（総括研究報告）

- ・ 研究開発代表者による報告の場合
- ・ 研究開発分担者による報告の場合

研究開発代表者：国立研究開発法人国立がん研究センター・主任分野長・落谷孝広
総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

- (1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 0 件）

該当なし

- (2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. エクソソームの単離と体液中からの miRNA の全自動検出システムの構築、ポスター、
安井大輔¹、鈴木めぐみ²、櫻井友里²、鈴木武尊²、宮下雪子²、上田哲也²

¹一般社団法人バイオ産業情報化コンソーシアム、²プレジジョン・システム・サイエンス社、
第 39 回日本分子生物学会年会、2016/11/30、国内

- (3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

該当なし

- (4) 特許出願

該当なし

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(英語) Project focused on developing key technology for discovering and manufacturing drugs for next-generation treatment and diagnosis

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 program of microRNA measurement technology foundation in body fluid.

研究開発担当者 (日本語) 落谷孝広
所属 役職 氏名： (英語) Takahiro Ochiya

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

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

研究開発分担者 (日本語) 中江 裕樹
所属 役職 氏名： (英語) Hiroki Nakae

II. 成果の概要（総括研究報告）

<日本語>

我々は、検査診断薬会社、検査用ツール会社、製薬会社等からなるユーザーフォーラムと協同して、世界最先端の早期発見・早期治療が可能な医療を実現するため、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、肉腫等のがんおよびアルツハイマー病等の認知症患者等の早期発見マーカーの探索、および実用化を実施する。

すなわち、国立がん研究センター(NCC)および国立長寿医療研究センター(NCGG)のバイオバンクにて保存されている膨大な患者血清等の検体から、網羅的な血中 miRNA の発現状態を検出し、このデータを臨床情報と紐付けて一括した状態で登録したデータベースを構築し、データを複合的に解析することによって、重篤な疾患の早期発見マーカーを見出し、これを用いて臨床現場で使用可能な検査システムの開発を行う。

具体的には、上記を目的に、以下の①から④の研究開発項目を実施している。本研究開発は、実用化まで長期間を要するハイリスクな「基盤的技術」に対して、個々の事業者が互いのノウハウ等を持ちより協調して実施する。

① 患者体液中 miRNA の網羅的解析

NCC、NCGG のバイオバンクに保存されている血清、および連携 8 大学や本プロジェクト内で新たに収集した検体について、プロジェクト通算で約 41,000 個の血清検体について、解析対象としての登録を完了し、うち、39,078 個の血清検体の DNA チップを用いた網羅的な miRNA 解析を完了した。この結果、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、肉腫、認知症については早期がんマーカーの探索のためのデータを得ることができた。更に臨床上の課題である抗がん剤薬効予測マーカー等の探索のために、早期がん発見マーカー探索用検体と同一症例の検体の評価等、複合的な解析を開始した。

② 疾患横断的に解析可能な miRNA 発現データベースの構築

プロジェクト開始 2 年で整備した網羅的 miRNA 解析データ収容用データベースに加え、臨床情報データベースを構築した。臨床情報については、NCC の院内がん登録情報を基本としている。さらに両 DB を連携して必要なデータを検索するシステムを作製し、実際にデータの収容と抽出を実行した。この作業と並行してデータベース開発進捗会議を2回にわたり開催し、データのプロジェクト内共有の方法について協議を行った。なお miRNA および臨床情報のデータベースへの入力は逐次実行している。

③ miRNA 診断マーカーと miRNA 検査／診断技術の開発

昨年度論文、学会等で報告した乳がんを引き続き、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、肉腫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。これらの結果を受けて、NCC において前向きに患者をリクルートする検証用の研究を計画し、さらに体外診断用医薬品の開発につなげるための PMDA 戦略相談の事前面談を実施した。

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、PSS/JBIC の各社において、それぞれの中間目標を達成する開発を行った。4 社はそれぞれの基盤技術に準拠し、①～③の研究開発によって得られた成果である血中 miRNA マーカーを自社で開発するツールと組み合わせ、体外診断用医薬品として申請することが可能なキットの作製を目指している。

<英語>

In cooperation with a user forum composed of companies such as laboratory diagnostic companies, laboratory instrument companies, and pharmaceutical companies, we explore and determine the practical applications of early detection markers for cancers, such as stomach, colon, esophageal, pancreatic, liver, biliary, lung, breast, ovarian, prostate, and bladder cancers, gliomas, and sarcomas; those for dementia including Alzheimer's disease; and those for other diseases to provide medical care systems using the world's most advanced early detection/early treatment technologies.

In other words, we detect the comprehensive miRNA expression level in blood using an enormous number of samples including patient serum sample stored in biobanks of the National Cancer Center Japan (NCC) and National Center for Geriatrics and Gerontology (NCGG) and construct a database in which the data connected to clinical data are collectively entered. In addition, by analyzing the data in a combined manner, we discover early detection markers for serious diseases for using them in the development of a diagnostic system practicable in clinical sites.

Specifically, we conduct research and development (R&D) described in (1) to (4) below for the aforementioned purposes. This cooperative R&D is conducted with individual companies, each bringing their own know-how and other expertise for high-risk "basic technology," which requires a long time for its practical application.

(1) Comprehensive analysis of miRNA in patient body fluids

A total of approximately 41,000 serum samples in the project (serum samples stored in biobanks of the NCC and NCGG and samples newly collected in eight cooperative universities and in the project) have been registered for analysis, and comprehensive miRNA analysis has been completed using DNA chips for 39078 of these serum samples. As a result, we could obtain data for the exploration of early detection markers for breast, colon, stomach, esophageal, liver, pancreatic, biliary, lung, and ovarian cancers, gliomas, sarcomas, and dementia. Furthermore, for the exploration of predictive markers for the anticancer drug response, which is a clinical issue, we initiated combined analysis including the assessment of samples of the same patients whose samples were used for the exploration of early cancer detection markers.

(2) Construction of an miRNA expression database that is cross-sectionally analyzable for the disease

We constructed a database for clinical data, in addition to a database for storing data obtained from comprehensive miRNA analysis, which was organized in 2 years after the initiation of the project. The clinical data are based on the hospital cancer registration data of the NCC. Furthermore, we created a system that connects both databases to search for necessary data and stored and extracted data. In parallel with this operation, we held a database development progress meeting twice to discuss data-sharing methods in the project. Entry of miRNA data and clinical data into the databases is sequentially performed.

(3) Development of miRNA diagnostic markers and miRNA testing/diagnostic technique

After identifying diagnostic markers for breast cancer that we reported in medical journals and conferences in the last fiscal year, we identified diagnostic markers for colon, stomach, esophageal, liver, pancreatic, biliary, lung, and ovarian cancers, gliomas, and sarcomas, with the sensitivity/specificity for each exceeding 90% in this fiscal year. Based on these results, we planned a verification study that prospectively recruited patients in the NCC, and to link it to the development of in-vitro diagnostics, we held a preliminary meeting of the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) pharmaceutical affairs consultation on R&D strategy.

(4) Diagnostic system development for use in clinical sites

In Toray Industries, Inc.; TOSHIBA CORPORATION; ARKRAY, Inc./Kyoto Inst. of Technology; and Precision System Science Co., Ltd./Japan Biological Informatics Consortium, development was performed to achieve the respective interim goals. The four organizations that combine blood miRNA markers, results from the R&D mentioned in (1) to (3), with tools that they will develop on their own on the basis of each basic technology aim to produce a kit that can lead to application for in-vitro diagnostics.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 14件)

1. Fujita Y, Yoshioka Y, Ochiya T. Extracellular vesicle transfer of cancer pathogenic components. *Cancer Sci*. 2016 Apr;107(4):385-90.
2. Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Invest*. 2016 Apr 01;126(4):1163-72.
3. Ueno M, Asada K, Toda M, Nagata K, Sotozono C, Kosaka N, Ochiya T, Kinoshita S, Hamuro J. Concomitant Evaluation of a Panel of Exosome Proteins and MiRs for Qualification of Cultured Human Corneal Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Aug 01;57(10):4393-402.
4. Yoshimura A, Kawamata M, Yoshioka Y, Katsuda T, Kikuchi H, Nagai Y, Adachi N, Numakawa T, Kunugi H, Ochiya T, Tamai Y. Generation of a novel transgenic rat model for tracing extracellular vesicles in body fluids. *Sci Rep*. 2016 Aug 19;6:31172.
5. Naito Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ochiya T. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2017, 74(4):697-713.
6. Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular Vesicles in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Mol Sci*. 2016 Oct 27;17(11).
7. Sasaki H, Yoshiike M, Nozawa S, Usuba W, Katsuoka Y, Aida K, Kitajima K, Kudo H, Hoshikawa M, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Chikaraishi T. Expression Level of Urinary MicroRNA-146a-5p Is Increased in Patients With Bladder Cancer and Decreased in Those After Transurethral Resection. *Clin Genitourin Cancer*. 2016 Oct;14(5):e493-e9.
8. Nezu Y, Hagiwara K, Yamamoto Y, Fujiwara T, Matsuo K, Yoshida A, Kawai A, Saito T, Ochiya T. miR-135b, a key regulator of malignancy, is linked to poor prognosis in human myxoid liposarcoma. *Oncogene*. 2016 Dec 01;35(48):6177-88.
9. Ogama N, Sakurai T, Nakai T, Niida S, Saji N, Toba K, Umegaki H, Kuzuya M. Impact of frontal white matter hyperintensity on instrumental activities of daily living in elderly women with Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment. *PLOS ONE*. 2017, 2, 12, e0172484.
10. Sugimoto T, Yoshida M, Ono R, Murata S, Saji N, Niida S, Toba K, Sakurai T. Frontal Lobe Function Correlates with One-Year Incidence of Urinary Incontinence in Elderly with Alzheimer Disease. *Journals Of Alzheimer's Disease*. 2017, 56,2,567-574.
11. Kayano M, Higaki S, Sato J, Matsumoto K, Takikawa O, Niida S. Plasma microRNA biomarker detection for mild cognitive impairment using differential correlation analysis. *Biomarker Research*. 2016, 12,4, doi: 10.1186/s40364-016-0076-1.
12. Mori T, Murasawa Y, Ikai R, Hayakawa T, Nakamura H, Ogiso N, Niida S, Watanabe K. Generation of a transgenic mouse line for conditional expression of human IL-6. *Experimental Animals*. 2016, 1, 65, 455-463.
13. Moriwaki S, Into T, Suzuki K, Miyauchi M, Takata T, Shibayama K, Niida S. γ -

Glutamyltranspeptidase is an endogenous activator of Toll-like receptor 4-mediated osteoclastogenesis. *Scientific Reports*. 2016, 24, 6, 35930.

14. Sugimoto T, Ono R, Murata S, Saji N, Matsui Y, Niida S, Toba K, Sakurai T. Prevalence and associated factors of sarcopenia in elderly subjects with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. *Current Alzheimer Research*. 2016, 13, 6, 718-726.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 血清中 microRNA による新規乳がん診断および治療効果予測マーカーの開発, 口頭, 下村昭彦, 椎野翔, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 松崎潤太郎, 清水千佳子, 竹下文隆, 新飯田俊平, 木下貴之, 田村研治, 落谷孝広, 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2016/7/30, 国内.
2. 心理的ストレスマーカーとなる血中 microRNA の同定と胸焼け症状との関連の検討, ポスター, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 18 回神経消化器病学会等合同学術集会, 2016/9/9~2016/9/10, 国内.
3. 血清マイクロ RNA での大腸癌におけるリキッドバイオプシーの検証, ポスター, 高丸博之, 斉藤豊, 加藤健, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 小島基宏, 落合淳志, 落谷孝広, 松田尚久, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6~2016/10/8, 国内.
4. 血清マイクロ RNA での大腸癌におけるリキッドバイオプシーの検証, ポスター, 高丸博之, 斉藤豊, 加藤健, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 小島基宏, 落合淳志, 落谷孝広, 松田尚久, JDDW2016, 2016/11/3~2016/11/6, 国内.
5. 脳卒中リスクマーカーとなる血中 microRNA の同定, ポスター, 園田匠, 松崎潤太郎, 新飯田俊平, 落谷孝広, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30~2016/12/2, 国内.
6. Novel combinations of circulating microRNAs for detecting esophageal and gastric cancers, ポスター, Matsuzaki J, Abe S, Katai H, Tachimori Y, Kato K, Kawauchi J, Takizawa S, Sakamoto H, Takeshita F, Niida S, Oda I, Ochiya T, The 10th International Gastrointestinal Consensus Symposium (IGICS), 2017/2/18, 国外.
7. エクソソームの単離と体液中からの miRNA の全自動検出システムの構築, ポスター, 安井大輔, 鈴木めぐみ, 櫻井友里, 鈴木武尊, 宮下雪子, 上田哲也, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, 国内
8. Development of a miRNA diagnostic system with LNA-conjugated solid supports and PMU_{py}2 probes, ポスター, Sugawara U, Nakajima A, Watari Y, Ariyoshi Jm Ymayoshi A, Murakami A, Kobori A, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2016/9/27~2016/9/29, 国内
9. ピレンプローブを用いたサンドイッチ型 microRNA 検出法, ポスター, 中嶋康介, 渡優有, 杉原悠太, 有吉純平, 山吉麻子, 村上章, 小堀哲生, 第 2 回日本核酸医薬学会年会, 2016/11/15~17, 国内
10. Circulating microRNA associated with visceral obesity: a possible biomarker of digestive cancers, ポスター, Matsuzaki J, Shimizu-Hirota R, Tadokoro H, Iwao Y, Ochiya T, United European Gastroenterology Week 2016, 2016/10/15~2016/10/19 国外

11. 内臓脂肪と関連する血中 microRNA の消化器がんバイオマーカーとしての可能性, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6~2016/10/8, 国内.
12. 血清中 microRNA の精神的ストレスバイオマーカーへの応用, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 8 回日本 RNAi 研究会, 2016/8/31~2016/9/2, 国内
13. 「ExoScreen as a Novel Liquid Biopsy Platform for Detecting Cancer-Specific Exosomes」 口頭, Ochiya T, Exosomes and Liquid Biopsies ASIA, 2016.4.6-9, 海外
14. 「Extracellular Vesicles in Lung Microenvironment and Pathogenesis」 口頭, Ochiya T, 2nd International Lung Cancer Symposium, 016.4.15-18, 海外
15. 「EVs and Implications to Cancer Therapy」 口頭, Ochiya T, INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES. 2016.5.2-9, 海外
16. 「Exosome as a novel diagnostic and therapeutic target for cancer」 口頭, Ochiya T, The Korean Society of Molecular Imaging, 2016.8.26-27, 海外
17. 「Extracellular vesicles as a novel diagnostic and therapeutic target for cancer」 口頭, Ochiya T, Cold Spring Harbor Asia, 2016.12.12-16, 海外
18. 「個別化治療、先制医療実現に向けたがんの新規診断・治療戦略」第 49 回東北脳腫瘍研究会, 口頭, 落谷孝広, 2016.4.2, 国内
19. 「疾患エクソソームの解明によって生まれる新規がん診断・治療戦略」第 89 回日本整形外科学会学術総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.13, 国内
20. 「聞きたくてもなかなか聞けない最近の話題 病理医が知っておくべき病理学の最近の進歩 「Liquid biopsy と病理診断」」 第 105 回日本病理学会総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.14, 国内
21. 「最先端のがん診断とがん治療」第 13 回東レ先端融合研究シンポジウム, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.18, 国内
22. 「1 滴の血液でがんが分かる時代」星薬科大学大学院講義連携セミナー, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.28, 国内
23. 「体液マイクロ RNA 診断の現状と課題」第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.31, 国内
24. 「乳がん研究とエクソソーム」第 24 回日本乳癌学会学術総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.16, 国内
25. 「がん早期診断の進歩」第 65 回最新臨床医学を学ぶ会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.23, 国内
26. 「細胞外小細胞による肺疾患の理解」第 44 回箱根呼吸器討論会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.24, 国内
27. 「Non-codingRNA の多様な機能：がん研究において新しい展開」第 43 回日本毒性学会学術年会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.29, 国内
28. 「Extracellular vesicles in lung microenvironment and pathogenesis」第 41 回内藤コンファレンス, 口頭, 落谷孝広, 2016.7.5-8, 国内
29. 「マイクロ RNA によるがん診断」第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2016.7.30, 国内

30. 「血液によるがん検査の実現にむけて～体液マイクロ RNA 測定技術基盤開発プロジェクトの現状～」 がん検診推進研修会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.8.21, 国内
31. 「細胞外に分泌される情報伝達物質に個別化医療の原点を探る」 第 8 回日本 RNAi 研究会, 第 3 回日本細胞外小胞学会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.8.31-9.2, 国内
32. 「がんの早期発見の切り札であるマイクロ RNA/エクソソームとは」 第 65 回日本医学検査学会・第 63 回日本臨床検査医学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.3, 国内
33. 「体液中マイクロ RNA 測定技術規範開発事業」 第 14 回医療機器フォーラム, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.5, 国内
34. 「エクソソームによる細胞間のコミュニケーションの実態解明とがん治療への応用」 千里ライフサイエンスセミナーK3 「エクソソームの研究の最前線：疾患メカニズム解明からの診断・治療まで」, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.16, 国内
35. 「体液マイクロ RNA によるがん診断」 第 24 回日本がん検診・診断学会総会 共催セミナー2, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.17, 国内
36. 「体液マイクロ RNA によるがんの早期診断」 臨床検査自動化会第 48 回大会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.23, 国内
37. 「エクソソーム研究が解き明かす乳がんの進展メカニズム診断・治療への応用」 第 40 回神戸乳癌セミナー, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.24, 国内
38. 「マイクロ RNA による診断と治療」 第 46 回日本腎臓学会東部学術大会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.8, 国内
39. 「血液中を循環するエクソソームの正体を探る」 第 78 回日本血液学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.14, 国内
40. 「エクソソームを測定する基盤技術開発の必要性」 再生医療サポートビジネス懇話会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.17, 国内
41. 「血液で 13 種類のがんを診断～がん検診の新技术～」 NHK ジャーナル, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.19, 国内ラジオ
42. 「がん診断と治療方針決定のための最新アプローチ」 第 54 回日本癌治療学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 2016.10.22, 国内
43. 「エクソソーム研究に関する現状・今後の進展について」 エクソソーム 2016 セミナー, 口頭, 落谷孝広 2016.10.26, 国内
44. 「エクソソームもよる疾患の新規診断・治療」 平成 28 年度先端技術研修「エクソソームによる疾患の新規診断・治療」, 口頭, 落谷孝広 2016.10.27, 国内
45. 「細胞外微粒子(細胞外小胞)について」 日本医薬研究開発機構 ワークショップ 「細胞外微粒子により惹起される生体応答の機序解明と制御」, 口頭, 落谷孝広 2016.10.31, 国内
46. 「体液マイクロ RNA とがん検診」 第 25 回日本婦人科がん検診学会総会・学術講演会, 口頭, 落谷孝広 2016.11.6, 国内
47. 「血液 1 滴でがんや認知症がわかる時代 最新の体液マイクロ RNA 診断とは」 ヘルシーパス講演会「先制医療の最前線」, 口頭, 落谷孝広 2016.11.27, 国内
48. 「エクソソーム研究がもたらす細胞間情報伝達機構の解明」 第 39 回日本分子生物学会 ランチオンセミナー, 口頭, 落谷孝広 2016.12.1, 国内

49. 「リキッドバイオプシーが拓く新規がん診断の現状と展望」第 56 回日本臨床化学会年次学術集会, 口頭, 落谷孝広 2016.12.2, 国内
50. 「血液 1 滴でがんを知る: 体液マイクロ RNA 測定技術 未病社会の診断技術研究会: 第 24 回講演会, 口頭, 落谷孝広 2016.12.7, 国内
51. 「婦人科がん検診の新たなる潮流: 疾患エクソソームによる体液診断」第 5 回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会, 口頭, 落谷孝広 2017.2.25, 国内
52. Comprehensive MicroRNA-array Analysis of Exploration for Dementia Biomarkers, Asanomi Y, Niida S, International Symposium on miRNA Cancer Biomarker Research 2016, 2016/11/9~2016/11/10 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. プロジェクト主催シンポジウム, Takahiro Ochiya, et. al. International Symposium on miRNA Cancer Biomarker Research 2016, 2016/11/9~10, 国内
2. 第 3 回 マイクロ RNA ユーザーフォーラム報告会, 2016/9/13
3. 第 4 回 マイクロ RNA ユーザーフォーラム報告会, 2017/3/15

(4) 特許出願

2016 年度中 8 件出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(英語) Project focused on developing key technology for discovering and manufacturing drugs for next-generation treatment and diagnosis

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 program of microRNA measurement technology foundation in body fluid.

研究開発担当者 (日本語) 上田 哲也
所属 役職 氏名： (英語) Tetsuya Ueda

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

分担研究 (日本語) 臨床現場での使用に向けた検査システムの開発
開発課題名： (英語) Development of IVD system for miRNA biomarker analysis at clinical laboratory

研究開発分担者 (日本語) 上田 哲也
所属 役職 氏名： (英語) Tetsuya Ueda

II. 成果の概要 (総括研究報告)

<日本語>

我々は、検査診断薬会社、検査用ツール会社、製薬会社等からなるユーザーフォーラムと協同して、世界最先端の早期発見・早期治療が可能な医療を実現するため、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、肉腫等のがんおよびアルツハイマー病等の認知症患者等の早期発見マーカーの探索、および実用化を実施する。

すなわち、国立がん研究センター(NCC)および国立長寿医療研究センター(NCGG)のバイオバンクにて保存されている膨大な患者血清等の検体から、網羅的な血中 miRNA の発現状態を検出し、このデータを臨

床情報と紐付けて一括した状態で登録したデータベースを構築し、データを複合的に解析することによって、重篤な疾患の早期発見マーカーを見出し、これを用いて臨床現場で使用可能な検査システムの開発を行う。

具体的には、上記を目的に、以下の①から④の研究開発項目を実施している。本研究開発は、実用化まで長期間を要するハイリスクな「基盤的技術」に対して、個々の事業者が互いのノウハウ等を持ちより協調して実施する。

① 患者体液中 miRNA の網羅的解析

NCC、NCGG のバイオバンクに保存されている血清、および連携 8 大学や本プロジェクト内で新たに収集した検体について、プロジェクト通算で約 41,000 個の血清検体について、解析対象としての登録を完了し、うち、39,078 個の血清検体の DNA チップを用いた網羅的な miRNA 解析を完了した。この結果、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、肉腫、認知症については早期がんマーカーの探索のためのデータを得ることができた。更に臨床上の課題である抗がん剤薬効予測マーカー等の探索のために、早期がん発見マーカー探索用検体と同一症例の検体の評価等、複合的な解析を開始した。

② 疾患横断的に解析可能な miRNA 発現データベースの構築

プロジェクト開始 2 年で整備した網羅的 miRNA 解析データ収容用データベースに加え、臨床情報データベースを構築した。臨床情報については、NCC の院内がん登録情報を基本としている。さらに両 DB を連携して必要なデータを検索するシステムを作製し、実際にデータの収容と抽出を実行した。この作業と並行してデータベース開発進捗会議を2回にわたり開催し、データのプロジェクト内共有の方法について協議を行った。なお miRNA および臨床情報のデータベースへの入力には逐次実行している。

③ miRNA 診断マーカーと miRNA 検査／診断技術の開発

昨年度論文、学会等で報告した乳がんを引き続き、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、肉腫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。これらの結果を受けて、NCC において前向きに患者をリクルートする検証用の研究を計画し、さらに体外診断用医薬品の開発につなげるための PMDA 戦略相談の事前面談を実施した。

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、PSS/JBIC の各社において、それぞれの中間目標を達成する開発を行った。4 社はそれぞれの基盤技術に準拠し、①～③の研究開発によって得られた成果である血中 miRNA マーカーを自社で開発するツールと組み合わせ、体外診断用医薬品として申請することが可能なキットの作製を目指している。

<英語>

In cooperation with a user forum composed of companies such as laboratory diagnostic companies, laboratory instrument companies, and pharmaceutical companies, we explore and determine the practical applications of early detection markers for cancers, such as stomach, colon, esophageal, pancreatic, liver, biliary, lung, breast, ovarian, prostate, and bladder cancers, gliomas, and sarcomas; those for dementia including Alzheimer's disease; and those for other diseases to provide medical care systems using the world's most advanced early detection/early treatment technologies.

In other words, we detect the comprehensive miRNA expression level in blood using an enormous number of samples including patient serum sample stored in biobanks of the National Cancer Center Japan (NCC) and National Center for Geriatrics and Gerontology (NCGG) and construct a database in which the data connected to clinical data are collectively entered. In addition, by analyzing the data in a combined manner, we discover early detection markers for serious diseases for using them in the development of a diagnostic system practicable in clinical sites.

Specifically, we conduct research and development (R&D) described in (1) to (4) below for the aforementioned purposes. This cooperative R&D is conducted with individual companies, each bringing their own know-how and other expertise for high-risk "basic technology," which requires a long time for its practical application.

(1) Comprehensive analysis of miRNA in patient body fluids

A total of approximately 41,000 serum samples in the project (serum samples stored in biobanks of the NCC and NCGG and samples newly collected in eight cooperative universities and in the project) have been registered for analysis, and comprehensive miRNA analysis has been completed using DNA chips for 39078 of these serum samples. As a result, we could obtain data for the exploration of early detection markers for breast, colon, stomach, esophageal, liver, pancreatic, biliary, lung, and ovarian cancers, gliomas, sarcomas, and dementia. Furthermore, for the exploration of predictive markers for the anticancer drug response, which is a clinical issue, we initiated combined analysis including the assessment of samples of the same patients whose samples were used for the exploration of early cancer detection markers.

(2) Construction of an miRNA expression database that is cross-sectionally analyzable for the disease

We constructed a database for clinical data, in addition to a database for storing data obtained from comprehensive miRNA analysis, which was organized in 2 years after the initiation of the project. The clinical data are based on the hospital cancer registration data of the NCC. Furthermore, we created a system that connects both databases to search for necessary data and stored and extracted data. In parallel with this operation, we held a database development progress meeting twice to discuss data-sharing methods in the project. Entry of miRNA data and clinical data into the databases is sequentially performed.

(3) Development of miRNA diagnostic markers and miRNA testing/diagnostic technique

After identifying diagnostic markers for breast cancer that we reported in medical journals and conferences in the last fiscal year, we identified diagnostic markers for colon, stomach, esophageal, liver, pancreatic, biliary, lung, and ovarian cancers, gliomas, and sarcomas, with the sensitivity/specificity for each exceeding 90% in this fiscal year. Based on these results, we planned a verification study that prospectively recruited patients in the NCC, and to link it to the development of in-vitro diagnostics, we held a preliminary meeting of the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) pharmaceutical affairs consultation on R&D strategy.

(4) Diagnostic system development for use in clinical sites

In Toray Industries, Inc.; TOSHIBA CORPORATION; ARKRAY, Inc./Kyoto Inst. of Technology; and Precision System Science Co., Ltd./Japan Biological Informatics Consortium, development was performed to achieve the respective interim goals. The four organizations that combine blood miRNA markers, results from the R&D mentioned in (1) to (3), with tools that they will develop on their own on the basis of each basic technology aim to produce a kit that can lead to application for in-vitro diagnostics.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 14件)

1. Fujita Y, Yoshioka Y, Ochiya T. Extracellular vesicle transfer of cancer pathogenic components. *Cancer Sci*. 2016 Apr;107(4):385-90.
2. Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Invest*. 2016 Apr 01;126(4):1163-72.
3. Ueno M, Asada K, Toda M, Nagata K, Sotozono C, Kosaka N, Ochiya T, Kinoshita S, Hamuro J. Concomitant Evaluation of a Panel of Exosome Proteins and MiRs for Qualification of Cultured Human Corneal Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Aug 01;57(10):4393-402.
4. Yoshimura A, Kawamata M, Yoshioka Y, Katsuda T, Kikuchi H, Nagai Y, Adachi N, Numakawa T, Kunugi H, Ochiya T, Tamai Y. Generation of a novel transgenic rat model for tracing extracellular vesicles in body fluids. *Sci Rep*. 2016 Aug 19;6:31172.
5. Naito Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ochiya T. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2017, 74(4):697-713.
6. Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular Vesicles in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Mol Sci*. 2016 Oct 27;17(11).
7. Sasaki H, Yoshiike M, Nozawa S, Usuba W, Katsuoka Y, Aida K, Kitajima K, Kudo H, Hoshikawa M, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Chikaraishi T. Expression Level of Urinary MicroRNA-146a-5p Is Increased in Patients With Bladder Cancer and Decreased in Those After Transurethral Resection. *Clin Genitourin Cancer*. 2016 Oct;14(5):e493-e9.
8. Nezu Y, Hagiwara K, Yamamoto Y, Fujiwara T, Matsuo K, Yoshida A, Kawai A, Saito T, Ochiya T. miR-135b, a key regulator of malignancy, is linked to poor prognosis in human myxoid liposarcoma. *Oncogene*. 2016 Dec 01;35(48):6177-88.
9. Ogama N, Sakurai T, Nakai T, Niida S, Saji N, Toba K, Umegaki H, Kuzuya M. Impact of frontal white matter hyperintensity on instrumental activities of daily living in elderly women with Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment. *PLOS ONE*. 2017, 2, 12, e0172484.
10. Sugimoto T, Yoshida M, Ono R, Murata S, Saji N, Niida S, Toba K, Sakurai T. Frontal Lobe Function Correlates with One-Year Incidence of Urinary Incontinence in Elderly with Alzheimer Disease. *Journals Of Alzheimer's Disease*. 2017, 56,2,567-574.
11. Kayano M, Higaki S, Sato J, Matsumoto K, Takikawa O, Niida S. Plasma microRNA biomarker detection for mild cognitive impairment using differential correlation analysis. *Biomarker Research*. 2016, 12,4, doi: 10.1186/s40364-016-0076-1.
12. Mori T, Murasawa Y, Ikai R, Hayakawa T, Nakamura H, Ogiso N, Niida S, Watanabe K. Generation of a transgenic mouse line for conditional expression of human IL-6. *Experimental Animals*. 2016, 1, 65, 455-463.
13. Moriwaki S, Into T, Suzuki K, Miyauchi M, Takata T, Shibayama K, Niida S. γ -

Glutamyltranspeptidase is an endogenous activator of Toll-like receptor 4-mediated osteoclastogenesis. *Scientific Reports*. 2016, 24, 6, 35930.

14. Sugimoto T, Ono R, Murata S, Saji N, Matsui Y, Niida S, Toba K, Sakurai T. Prevalence and associated factors of sarcopenia in elderly subjects with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. *Current Alzheimer Research*. 2016, 13, 6, 718-726.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 血清中 microRNA による新規乳がん診断および治療効果予測マーカーの開発, 口頭, 下村昭彦, 椎野翔, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 松崎潤太郎, 清水千佳子, 竹下文隆, 新飯田俊平, 木下貴之, 田村研治, 落谷孝広, 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2016/7/30, 国内.
2. 心理的ストレスマーカーとなる血中 microRNA の同定と胸焼け症状との関連の検討, ポスター, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 18 回神経消化器病学会等合同学術集会, 2016/9/9~2016/9/10, 国内.
3. 血清マイクロ RNA での大腸癌におけるリキッドバイオプシーの検証, ポスター, 高丸博之, 斉藤豊, 加藤健, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 小島基宏, 落合淳志, 落谷孝広, 松田尚久, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6~2016/10/8, 国内.
4. 血清マイクロ RNA での大腸癌におけるリキッドバイオプシーの検証, ポスター, 高丸博之, 斉藤豊, 加藤健, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 小島基宏, 落合淳志, 落谷孝広, 松田尚久, JDDW2016, 2016/11/3~2016/11/6, 国内.
5. 脳卒中リスクマーカーとなる血中 microRNA の同定, ポスター, 園田匠, 松崎潤太郎, 新飯田俊平, 落谷孝広, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30~2016/12/2, 国内.
6. Novel combinations of circulating microRNAs for detecting esophageal and gastric cancers, ポスター, Matsuzaki J, Abe S, Katai H, Tachimori Y, Kato K, Kawauchi J, Takizawa S, Sakamoto H, Takeshita F, Niida S, Oda I, Ochiya T, The 10th International Gastrointestinal Consensus Symposium (IGICS), 2017/2/18, 国外.
7. エクソソームの単離と体液中からの miRNA の全自動検出システムの構築, ポスター, 安井大輔, 鈴木めぐみ, 櫻井友里, 鈴木武尊, 宮下雪子, 上田哲也, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, 国内
8. Development of a miRNA diagnostic system with LNA-conjugated solid supports and PMU₂ probes, ポスター, Sugawara U, Nakajima A, Watari Y, Ariyoshi Jm Ymayoshi A, Murakami A, Kobori A, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2016/9/27~2016/9/29, 国内
9. ピレンプローブを用いたサンドイッチ型 microRNA 検出法, ポスター, 中嶋康介, 渡優有, 杉原悠太, 有吉純平, 山吉麻子, 村上章, 小堀哲生, 第 2 回日本核酸医薬学会年会, 2016/11/15~17, 国内
10. Circulating microRNA associated with visceral obesity: a possible biomarker of digestive cancers, ポスター, Matsuzaki J, Shimizu-Hirota R, Tadokoro H, Iwao Y, Ochiya T, United European Gastroenterology Week 2016, 2016/10/15~2016/10/19 国外

11. 内臓脂肪と関連する血中 microRNA の消化器がんバイオマーカーとしての可能性, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6~2016/10/8, 国内.
12. 血清中 microRNA の精神的ストレスバイオマーカーへの応用, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 8 回日本 RNAi 研究会, 2016/8/31~2016/9/2, 国内
13. 「ExoScreen as a Novel Liquid Biopsy Platform for Detecting Cancer-Specific Exosomes」 口頭, Ochiya T, Exosomes and Liquid Biopsies ASIA, 2016.4.6-9, 海外
14. 「Extracellular Vesicles in Lung Microenvironment and Pathogenesis」 口頭, Ochiya T, 2nd International Lung Cancer Symposium, 016.4.15-18, 海外
15. 「EVs and Implications to Cancer Therapy」 口頭, Ochiya T, INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES. 2016.5.2-9, 海外
16. 「Exosome as a novel diagnostic and therapeutic target for cancer」 口頭, Ochiya T, The Korean Society of Molecular Imaging, 2016.8.26-27, 海外
17. 「Extracellular vesicles as a novel diagnostic and therapeutic target for cancer」 口頭, Ochiya T, Cold Spring Harbor Asia, 2016.12.12-16, 海外
18. 「個別化治療、先制医療実現に向けたがんの新規診断・治療戦略」第 49 回東北脳腫瘍研究会, 口頭, 落谷孝広, 2016.4.2, 国内
19. 「疾患エクソソームの解明によって生まれる新規がん診断・治療戦略」第 89 回日本整形外科学会学術総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.13, 国内
20. 「聞きたくてもなかなか聞けない最近の話題 病理医が知っておくべき病理学の最近の進歩 「Liquid biopsy と病理診断」」 第 105 回日本病理学会総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.14, 国内
21. 「最先端のがん診断とがん治療」第 13 回東レ先端融合研究シンポジウム, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.18, 国内
22. 「1 滴の血液でがんが分かる時代」星薬科大学大学院講義連携セミナー, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.28, 国内
23. 「体液マイクロ RNA 診断の現状と課題」第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.31, 国内
24. 「乳がん研究とエクソソーム」第 24 回日本乳癌学会学術総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.16, 国内
25. 「がん早期診断の進歩」第 65 回最新臨床医学を学ぶ会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.23, 国内
26. 「細胞外小細胞による肺疾患の理解」第 44 回箱根呼吸器討論会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.24, 国内
27. 「Non-codingRNA の多様な機能：がん研究において新しい展開」第 43 回日本毒性学会学術年会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.29, 国内
28. 「Extracellular vesicles in lung microenvironment and pathogenesis」第 41 回内藤コンファレンス, 口頭, 落谷孝広, 2016.7.5-8, 国内
29. 「マイクロ RNA によるがん診断」第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2016.7.30, 国内
30. 「血液によるがん検査の実現にむけて～体液マイクロ RNA 測定技術基盤開発プロジェクトの

- 現状～」 がん検診推進研修会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.8.21, 国内
31. 「細胞外に分泌される情報伝達物質に個別化医療の原点を探る」 第 8 回日本 RNAi 研究会, 第 3 回日本細胞外小胞学会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.8.31-9.2, 国内
 32. 「がんの早期発見の切り札であるマイクロ RNA/エクソソームとは」 第 65 回日本医学検査学会・第 63 回日本臨床検査医学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.3, 国内
 33. 「体液中マイクロ RNA 測定技術規範開発事業」 第 14 回医療機器フォーラム, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.5, 国内
 34. 「エクソソームによる細胞間のコミュニケーションの実態解明とがん治療への応用」 千里ライフサイエンスセミナーK3 「エクソソームの研究の最前線: 疾患メカニズム解明からの診断・治療まで」, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.16, 国内
 35. 「体液マイクロ RNA によるがん診断」 第 24 回日本がん検診・診断学会総会 共催セミナー2, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.17, 国内
 36. 「体液マイクロ RNA によるがんの早期診断」 臨床検査自動化会第 48 回大会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.23, 国内
 37. 「エクソソーム研究が解き明かす乳がんの進展メカニズム診断・治療への応用」 第 40 回神戸乳癌セミナー, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.24, 国内
 38. 「マイクロ RNA による診断と治療」 第 46 回日本腎臓学会東部学術大会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.8, 国内
 39. 「血液中を循環するエクソソームの正体を探る」 第 78 回日本血液学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.14, 国内
 40. 「エクソソームを測定する基盤技術開発の必要性」 再生医療サポートビジネス懇話会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.17, 国内
 41. 「血液で 13 種類のがんを診断～がん検診の新技术～」 NHK ジャーナル, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.19, 国内ラジオ
 42. 「がん診断と治療方針決定のための最新アプローチ」 第 54 回日本癌治療学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 2016.10.22, 国内
 43. 「エクソソーム研究に関する現状・今後の進展について」 エクソソーム 2016 セミナー, 口頭, 落谷孝広 2016.10.26, 国内
 44. 「エクソソームもよる疾患の新規診断・治療」 平成 28 年度先端技術研修「エクソソームによる疾患の新規診断・治療」, 口頭, 落谷孝広 2016.10.27, 国内
 45. 「細胞外微粒子(細胞外小胞)について」 日本医薬研究開発機構 ワークショップ 「細胞外微粒子により惹起される生体応答の機序解明と制御」, 口頭, 落谷孝広 2016.10.31, 国内
 46. 「体液マイクロ RNA とがん検診」 第 25 回日本婦人科がん検診学会総会・学術講演会, 口頭, 落谷孝広 2016.11.6, 国内
 47. 「血液 1 滴でがんや認知症がわかる時代 最新の体液マイクロ RNA 診断とは」 ヘルシーパス講演会「先制医療の最前線」, 口頭, 落谷孝広 2016.11.27, 国内
 48. 「エクソソーム研究がもたらす細胞間情報伝達機構の解明」 第 39 回日本分子生物学会 ランチオンセミナー, 口頭, 落谷孝広 2016.12.1, 国内
 49. 「リキッドバイオプシーが拓く新規がん診断の現状と展望」 第 56 回日本臨床化学学会年次学術集会, 口頭, 落谷孝広 2016.12.2, 国内

50. 「血液1滴でがんを知る：体液マイクロRNA測定技術」 未病社会の診断技術研究会：第24回講演会，口頭，落谷孝広 2016.12.7，国内
51. 「婦人科がん検診の新たなる潮流：疾患エクソソームによる体液診断」 第5回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会，口頭，落谷孝広 2017.2.25，国内
52. Comprehensive MicroRNA-array Analysis of Exploration for Dementia Biomarkers, Asanomi Y, Niida S, International Symposium on miRNA Cancer Biomarker Research 2016, 2016/11/9～2016/11/10 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. プロジェクト主催シンポジウム，Takahiro Ochiya, et. al. International Symposium on miRNA Cancer Biomarker Research 2016, 2016/11/9～10，国内
2. 第3回 マイクロRNAユーザーフォーラム報告会，2016/9/13
3. 第4回 マイクロRNAユーザーフォーラム報告会，2017/3/15

(4) 特許出願

2016年度中 8件出願

平成 28年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(英語) Project focused on developing key technology for discovering and manufacturing drugs for next-generation treatment and diagnosis

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 program of microRNA measurement technology foundation in body fluid.

研究開発担当者 (日本語) 落谷孝広
所属 役職 氏名： (英語) Takahiro Ochiya

実施期間： 平成 28年 4月 1日 ～ 平成 29年 3月 31日

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

研究開発分担者 (日本語) 村上 淳
所属 役職 氏名： (英語) Atsushi Murakami

II. 成果の概要 (総括研究報告)

<日本語>

我々は、検査診断薬会社、検査用ツール会社、製薬会社等からなるユーザーフォーラムと協同して、世界最先端の早期発見・早期治療が可能な医療を実現するため、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、肉腫等のがんおよびアルツハイマー病等の認知症患者等の早期発見マーカーの探索、および実用化を実施する。

すなわち、国立がん研究センター(NCC)および国立長寿医療研究センター(NCGG)のバイオバンクにて保存されている膨大な患者血清等の検体から、網羅的な血中 miRNA の発現状態を検出し、このデータを臨

床情報と紐付けて一括した状態で登録したデータベースを構築し、データを複合的に解析することによって、重篤な疾患の早期発見マーカーを見出し、これを用いて臨床現場で使用可能な検査システムの開発を行う。

具体的には、上記を目的に、以下の①から④の研究開発項目を実施している。本研究開発は、実用化まで長期間を要するハイリスクな「基盤的技術」に対して、個々の事業者が互いのノウハウ等を持ちより協調して実施する。

① 患者体液中 miRNA の網羅的解析

NCC、NCGG のバイオバンクに保存されている血清、および連携 8 大学や本プロジェクト内で新たに収集した検体について、プロジェクト通算で約 41,000 個の血清検体について、解析対象としての登録を完了し、うち、39,078 個の血清検体の DNA チップを用いた網羅的な miRNA 解析を完了した。この結果、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、肉腫、認知症については早期がんマーカーの探索のためのデータを得ることができた。更に臨床上の課題である抗がん剤薬効予測マーカー等の探索のために、早期がん発見マーカー探索用検体と同一症例の検体の評価等、複合的な解析を開始した。

② 疾患横断的に解析可能な miRNA 発現データベースの構築

プロジェクト開始 2 年で整備した網羅的 miRNA 解析データ収容用データベースに加え、臨床情報データベースを構築した。臨床情報については、NCC の院内がん登録情報を基本としている。さらに両 DB を連携して必要なデータを検索するシステムを作製し、実際にデータの収容と抽出を実行した。この作業と並行してデータベース開発進捗会議を2回にわたり開催し、データのプロジェクト内共有の方法について協議を行った。なお miRNA および臨床情報のデータベースへの入力は逐次実行している。

③ miRNA 診断マーカーと miRNA 検査／診断技術の開発

昨年度論文、学会等で報告した乳がんを引き続き、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、肉腫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。これらの結果を受けて、NCC において前向きに患者をリクルートする検証用の研究を計画し、さらに体外診断用医薬品の開発につなげるための PMDA 戦略相談の事前面談を実施した。

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、PSS/JBIC の各社において、それぞれの中間目標を達成する開発を行った。4 社はそれぞれの基盤技術に準拠し、①～③の研究開発によって得られた成果である血中 miRNA マーカーを自社で開発するツールと組み合わせ、体外診断用医薬品として申請することが可能なキットの作製を目指している。

<英語>

In cooperation with a user forum composed of companies such as laboratory diagnostic companies, laboratory instrument companies, and pharmaceutical companies, we explore and determine the practical applications of early detection markers for cancers, such as stomach, colon, esophageal, pancreatic, liver, biliary, lung, breast, ovarian, prostate, and bladder cancers, gliomas, and sarcomas; those for dementia including Alzheimer's disease; and those for other diseases to provide medical care systems using the world's most advanced early detection/early treatment technologies.

In other words, we detect the comprehensive miRNA expression level in blood using an enormous number of samples including patient serum sample stored in biobanks of the National Cancer Center Japan (NCC) and National Center for Geriatrics and Gerontology (NCGG) and construct a database in which the data connected to clinical data are collectively entered. In addition, by analyzing the data in a combined manner, we discover early detection markers for serious diseases for using them in the development of a diagnostic system practicable in clinical sites.

Specifically, we conduct research and development (R&D) described in (1) to (4) below for the aforementioned purposes. This cooperative R&D is conducted with individual companies, each bringing their own know-how and other expertise for high-risk "basic technology," which requires a long time for its practical application.

(1) Comprehensive analysis of miRNA in patient body fluids

A total of approximately 41,000 serum samples in the project (serum samples stored in biobanks of the NCC and NCGG and samples newly collected in eight cooperative universities and in the project) have been registered for analysis, and comprehensive miRNA analysis has been completed using DNA chips for 39078 of these serum samples. As a result, we could obtain data for the exploration of early detection markers for breast, colon, stomach, esophageal, liver, pancreatic, biliary, lung, and ovarian cancers, gliomas, sarcomas, and dementia. Furthermore, for the exploration of predictive markers for the anticancer drug response, which is a clinical issue, we initiated combined analysis including the assessment of samples of the same patients whose samples were used for the exploration of early cancer detection markers.

(2) Construction of an miRNA expression database that is cross-sectionally analyzable for the disease

We constructed a database for clinical data, in addition to a database for storing data obtained from comprehensive miRNA analysis, which was organized in 2 years after the initiation of the project. The clinical data are based on the hospital cancer registration data of the NCC. Furthermore, we created a system that connects both databases to search for necessary data and stored and extracted data. In parallel with this operation, we held a database development progress meeting twice to discuss data-sharing methods in the project. Entry of miRNA data and clinical data into the databases is sequentially performed.

(3) Development of miRNA diagnostic markers and miRNA testing/diagnostic technique

After identifying diagnostic markers for breast cancer that we reported in medical journals and conferences in the last fiscal year, we identified diagnostic markers for colon, stomach, esophageal, liver, pancreatic, biliary, lung, and ovarian cancers, gliomas, and sarcomas, with the sensitivity/specificity for each exceeding 90% in this fiscal year. Based on these results, we planned a verification study that prospectively recruited patients in the NCC, and to link it to the development of in-vitro diagnostics, we held a preliminary meeting of the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) pharmaceutical affairs consultation on R&D strategy.

(4) Diagnostic system development for use in clinical sites

In Toray Industries, Inc.; TOSHIBA CORPORATION; ARKRAY, Inc./Kyoto Inst. of Technology; and Precision System Science Co., Ltd./Japan Biological Informatics Consortium, development was performed to achieve the respective interim goals. The four organizations that combine blood miRNA markers, results from the R&D mentioned in (1) to (3), with tools that they will develop on their own on the basis of each basic technology aim to produce a kit that can lead to application for in-vitro diagnostics.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 14件)

1. Fujita Y, Yoshioka Y, Ochiya T. Extracellular vesicle transfer of cancer pathogenic components. *Cancer Sci*. 2016 Apr;107(4):385-90.
2. Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Invest*. 2016 Apr 01;126(4):1163-72.
3. Ueno M, Asada K, Toda M, Nagata K, Sotozono C, Kosaka N, Ochiya T, Kinoshita S, Hamuro J. Concomitant Evaluation of a Panel of Exosome Proteins and MiRs for Qualification of Cultured Human Corneal Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Aug 01;57(10):4393-402.
4. Yoshimura A, Kawamata M, Yoshioka Y, Katsuda T, Kikuchi H, Nagai Y, Adachi N, Numakawa T, Kunugi H, Ochiya T, Tamai Y. Generation of a novel transgenic rat model for tracing extracellular vesicles in body fluids. *Sci Rep*. 2016 Aug 19;6:31172.
5. Naito Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ochiya T. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2017, 74(4):697-713.
6. Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular Vesicles in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Mol Sci*. 2016 Oct 27;17(11).
7. Sasaki H, Yoshiike M, Nozawa S, Usuba W, Katsuoka Y, Aida K, Kitajima K, Kudo H, Hoshikawa M, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Chikaraishi T. Expression Level of Urinary MicroRNA-146a-5p Is Increased in Patients With Bladder Cancer and Decreased in Those After Transurethral Resection. *Clin Genitourin Cancer*. 2016 Oct;14(5):e493-e9.
8. Nezu Y, Hagiwara K, Yamamoto Y, Fujiwara T, Matsuo K, Yoshida A, Kawai A, Saito T, Ochiya T. miR-135b, a key regulator of malignancy, is linked to poor prognosis in human myxoid liposarcoma. *Oncogene*. 2016 Dec 01;35(48):6177-88.
9. Ogama N, Sakurai T, Nakai T, Niida S, Saji N, Toba K, Umegaki H, Kuzuya M. Impact of frontal white matter hyperintensity on instrumental activities of daily living in elderly women with Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment. *PLOS ONE*. 2017, 2, 12, e0172484.
10. Sugimoto T, Yoshida M, Ono R, Murata S, Saji N, Niida S, Toba K, Sakurai T. Frontal Lobe Function Correlates with One-Year Incidence of Urinary Incontinence in Elderly with Alzheimer Disease. *Journals Of Alzheimer's Disease*. 2017, 56,2,567-574.
11. Kayano M, Higaki S, Sato J, Matsumoto K, Takikawa O, Niida S. Plasma microRNA biomarker detection for mild cognitive impairment using differential correlation analysis. *Biomarker Research*. 2016, 12,4, doi: 10.1186/s40364-016-0076-1.
12. Mori T, Murasawa Y, Ikai R, Hayakawa T, Nakamura H, Ogiso N, Niida S, Watanabe K. Generation of a transgenic mouse line for conditional expression of human IL-6. *Experimental Animals*. 2016, 1, 65, 455-463.
13. Moriwaki S, Into T, Suzuki K, Miyauchi M, Takata T, Shibayama K, Niida S. γ -

Glutamyltranspeptidase is an endogenous activator of Toll-like receptor 4-mediated osteoclastogenesis. *Scientific Reports*. 2016, 24, 6, 35930.

14. Sugimoto T, Ono R, Murata S, Saji N, Matsui Y, Niida S, Toba K, Sakurai T. Prevalence and associated factors of sarcopenia in elderly subjects with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. *Current Alzheimer Research*. 2016, 13, 6, 718-726.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 血清中 microRNA による新規乳がん診断および治療効果予測マーカーの開発, 口頭, 下村昭彦, 椎野翔, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 松崎潤太郎, 清水千佳子, 竹下文隆, 新飯田俊平, 木下貴之, 田村研治, 落谷孝広, 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2016/7/30, 国内.
2. 心理的ストレスマーカーとなる血中 microRNA の同定と胸焼け症状との関連の検討, ポスター, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 18 回神経消化器病学会等合同学術集会, 2016/9/9~2016/9/10, 国内.
3. 血清マイクロ RNA での大腸癌におけるリキッドバイオプシーの検証, ポスター, 高丸博之, 斉藤豊, 加藤健, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 小島基宏, 落合淳志, 落谷孝広, 松田尚久, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6~2016/10/8, 国内.
4. 血清マイクロ RNA での大腸癌におけるリキッドバイオプシーの検証, ポスター, 高丸博之, 斉藤豊, 加藤健, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 小島基宏, 落合淳志, 落谷孝広, 松田尚久, JDDW2016, 2016/11/3~2016/11/6, 国内.
5. 脳卒中リスクマーカーとなる血中 microRNA の同定, ポスター, 園田匠, 松崎潤太郎, 新飯田俊平, 落谷孝広, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30~2016/12/2, 国内.
6. Novel combinations of circulating microRNAs for detecting esophageal and gastric cancers, ポスター, Matsuzaki J, Abe S, Katai H, Tachimori Y, Kato K, Kawauchi J, Takizawa S, Sakamoto H, Takeshita F, Niida S, Oda I, Ochiya T, The 10th International Gastrointestinal Consensus Symposium (IGICS), 2017/2/18, 国外.
7. エクソソームの単離と体液中からの miRNA の全自動検出システムの構築, ポスター, 安井大輔, 鈴木めぐみ, 櫻井友里, 鈴木武尊, 宮下雪子, 上田哲也, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, 国内
8. Development of a miRNA diagnostic system with LNA-conjugated solid supports and PMU₂ probes, ポスター, Sugawara U, Nakajima A, Watari Y, Ariyoshi Jm Ymayoshi A, Murakami A, Kobori A, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2016/9/27~2016/9/29, 国内
9. ピレンプローブを用いたサンドイッチ型 microRNA 検出法, ポスター, 中嶋康介, 渡優有, 杉原悠太, 有吉純平, 山吉麻子, 村上章, 小堀哲生, 第 2 回日本核酸医薬学会年会, 2016/11/15~17, 国内
10. Circulating microRNA associated with visceral obesity: a possible biomarker of digestive cancers, ポスター, Matsuzaki J, Shimizu-Hirota R, Tadokoro H, Iwao Y, Ochiya T, United European Gastroenterology Week 2016, 2016/10/15~2016/10/19 国外

11. 内臓脂肪と関連する血中 microRNA の消化器がんバイオマーカーとしての可能性, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6~2016/10/8, 国内.
12. 血清中 microRNA の精神的ストレスバイオマーカーへの応用, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 8 回日本 RNAi 研究会, 2016/8/31~2016/9/2, 国内
13. 「ExoScreen as a Novel Liquid Biopsy Platform for Detecting Cancer-Specific Exosomes」 口頭, Ochiya T, Exosomes and Liquid Biopsies ASIA, 2016.4.6-9, 海外
14. 「Extracellular Vesicles in Lung Microenvironment and Pathogenesis」 口頭, Ochiya T, 2nd International Lung Cancer Symposium, 016.4.15-18, 海外
15. 「EVs and Implications to Cancer Therapy」 口頭, Ochiya T, INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES. 2016.5.2-9, 海外
16. 「Exosome as a novel diagnostic and therapeutic target for cancer」 口頭, Ochiya T, The Korean Society of Molecular Imaging, 2016.8.26-27, 海外
17. 「Extracellular vesicles as a novel diagnostic and therapeutic target for cancer」 口頭, Ochiya T, Cold Spring Harbor Asia, 2016.12.12-16, 海外
18. 「個別化治療、先制医療実現に向けたがんの新規診断・治療戦略」第 49 回東北脳腫瘍研究会, 口頭, 落谷孝広, 2016.4.2, 国内
19. 「疾患エクソソームの解明によって生まれる新規がん診断・治療戦略」第 89 回日本整形外科学会学術総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.13, 国内
20. 「聞きたくてもなかなか聞けない最近の話題 病理医が知っておくべき病理学の最近の進歩 「Liquid biopsy と病理診断」」 第 105 回日本病理学会総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.14, 国内
21. 「最先端のがん診断とがん治療」第 13 回東レ先端融合研究シンポジウム, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.18, 国内
22. 「1 滴の血液でがんが分かる時代」星薬科大学大学院講義連携セミナー, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.28, 国内
23. 「体液マイクロ RNA 診断の現状と課題」第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.31, 国内
24. 「乳がん研究とエクソソーム」第 24 回日本乳癌学会学術総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.16, 国内
25. 「がん早期診断の進歩」第 65 回最新臨床医学を学ぶ会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.23, 国内
26. 「細胞外小細胞による肺疾患の理解」第 44 回箱根呼吸器討論会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.24, 国内
27. 「Non-codingRNA の多様な機能：がん研究において新しい展開」第 43 回日本毒性学会学術年会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.29, 国内
28. 「Extracellular vesicles in lung microenvironment and pathogenesis」第 41 回内藤コンファレンス, 口頭, 落谷孝広, 2016.7.5-8, 国内
29. 「マイクロ RNA によるがん診断」第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2016.7.30, 国内
30. 「血液によるがん検査の実現にむけて～体液マイクロ RNA 測定技術基盤開発プロジェクトの

- 現状～」 がん検診推進研修会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.8.21, 国内
31. 「細胞外に分泌される情報伝達物質に個別化医療の原点を探る」 第 8 回日本 RNAi 研究会, 第 3 回日本細胞外小胞学会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.8.31-9.2, 国内
 32. 「がんの早期発見の切り札であるマイクロ RNA/エクソソームとは」 第 65 回日本医学検査学会・第 63 回日本臨床検査医学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.3, 国内
 33. 「体液中マイクロ RNA 測定技術規範開発事業」 第 14 回医療機器フォーラム, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.5, 国内
 34. 「エクソソームによる細胞間のコミュニケーションの実態解明とがん治療への応用」 千里ライフサイエンスセミナーK3 「エクソソームの研究の最前線: 疾患メカニズム解明からの診断・治療まで」, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.16, 国内
 35. 「体液マイクロ RNA によるがん診断」 第 24 回日本がん検診・診断学会総会 共催セミナー2, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.17, 国内
 36. 「体液マイクロ RNA によるがんの早期診断」 臨床検査自動化会第 48 回大会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.23, 国内
 37. 「エクソソーム研究が解き明かす乳がんの進展メカニズム診断・治療への応用」 第 40 回神戸乳癌セミナー, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.24, 国内
 38. 「マイクロ RNA による診断と治療」 第 46 回日本腎臓学会東部学術大会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.8, 国内
 39. 「血液中を循環するエクソソームの正体を探る」 第 78 回日本血液学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.14, 国内
 40. 「エクソソームを測定する基盤技術開発の必要性」 再生医療サポートビジネス懇話会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.17, 国内
 41. 「血液で 13 種類のがんを診断～がん検診の新技术～」 NHK ジャーナル, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.19, 国内ラジオ
 42. 「がん診断と治療方針決定のための最新アプローチ」 第 54 回日本癌治療学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 2016.10.22, 国内
 43. 「エクソソーム研究に関する現状・今後の進展について」 エクソソーム 2016 セミナー, 口頭, 落谷孝広 2016.10.26, 国内
 44. 「エクソソームもよる疾患の新規診断・治療」 平成 28 年度先端技術研修「エクソソームによる疾患の新規診断・治療」, 口頭, 落谷孝広 2016.10.27, 国内
 45. 「細胞外微粒子(細胞外小胞)について」 日本医薬研究開発機構 ワークショップ 「細胞外微粒子により惹起される生体応答の機序解明と制御」, 口頭, 落谷孝広 2016.10.31, 国内
 46. 「体液マイクロ RNA とがん検診」 第 25 回日本婦人科がん検診学会総会・学術講演会, 口頭, 落谷孝広 2016.11.6, 国内
 47. 「血液 1 滴でがんや認知症がわかる時代 最新の体液マイクロ RNA 診断とは」 ヘルシーパス講演会「先制医療の最前線」, 口頭, 落谷孝広 2016.11.27, 国内
 48. 「エクソソーム研究がもたらす細胞間情報伝達機構の解明」 第 39 回日本分子生物学会 ランチオンセミナー, 口頭, 落谷孝広 2016.12.1, 国内
 49. 「リキッドバイオプシーが拓く新規がん診断の現状と展望」 第 56 回日本臨床化学学会年次学術集会, 口頭, 落谷孝広 2016.12.2, 国内

50. 「血液1滴でがんを知る：体液マイクロRNA測定技術 未病社会の診断技術研究会：第24回講演会，口頭，落谷孝広 2016.12.7，国内
51. 「婦人科がん検診の新たなる潮流：疾患エクソソームによる体液診断」 第5回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会，口頭，落谷孝広 2017.2.25，国内
52. Comprehensive MicroRNA-array Analysis of Exploration for Dementia Biomarkers, Asanomi Y, Niida S, International Symposium on miRNA Cancer Biomarker Research 2016, 2016/11/9～2016/11/10 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. プロジェクト主催シンポジウム，Takahiro Ochiya, et. al. International Symposium on miRNA Cancer Biomarker Research 2016, 2016/11/9～10，国内
2. 第3回 マイクロRNAユーザーフォーラム報告会，2016/9/13
3. 第4回 マイクロRNAユーザーフォーラム報告会，2017/3/15

(4) 特許出願

2016年度中 8件出願

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

事業名： (日本語) 次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業
(英語) Project focused on developing key technology for discovering and manufacturing drugs for next-generation treatment and diagnosis

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 program of microRNA measurement technology foundation in body fluid.

研究開発担当者 (日本語) 材料化学系 准教授 小堀 哲生
所属 役職 氏名： (英語) Faculty of Materials Science and Engineering , Associate Professor, Kobori Akio

実施期間： 平成 28 年 4 月 1 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日

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

研究開発分担者 (日本語) なし
所属 役職 氏名： (英語)

II. 成果の概要 (総括研究報告)

<日本語>

我々は、検査診断薬会社、検査用ツール会社、製薬会社等からなるユーザーフォーラムと協同して、世界最先端の早期発見・早期治療が可能な医療を実現するため、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、肉腫等のがんおよびアルツハイマー病等の認知症患者等の早期発見マーカーの探索、および実用化を実施する。

すなわち、国立がん研究センター(NCC)および国立長寿医療研究センター(NCGG)のバイオバンクにて保存されている膨大な患者血清等の検体から、網羅的な血中 miRNA の発現状態を検出し、このデータを臨

床情報と紐付けて一括した状態で登録したデータベースを構築し、データを複合的に解析することによって、重篤な疾患の早期発見マーカーを見出し、これを用いて臨床現場で使用可能な検査システムの開発を行う。

具体的には、上記を目的に、以下の①から④の研究開発項目を実施している。本研究開発は、実用化まで長期間を要するハイリスクな「基盤的技術」に対して、個々の事業者が互いのノウハウ等を持ちより協調して実施する。

① 患者体液中 miRNA の網羅的解析

NCC、NCGG のバイオバンクに保存されている血清、および連携 8 大学や本プロジェクト内で新たに収集した検体について、プロジェクト通算で約 41,000 個の血清検体について、解析対象としての登録を完了し、うち、39,078 個の血清検体の DNA チップを用いた網羅的な miRNA 解析を完了した。この結果、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、肉腫、認知症については早期がんマーカーの探索のためのデータを得ることができた。更に臨床上の課題である抗がん剤薬効予測マーカー等の探索のために、早期がん発見マーカー探索用検体と同一症例の検体の評価等、複合的な解析を開始した。

② 疾患横断的に解析可能な miRNA 発現データベースの構築

プロジェクト開始 2 年で整備した網羅的 miRNA 解析データ収容用データベースに加え、臨床情報データベースを構築した。臨床情報については、NCC の院内がん登録情報を基本としている。さらに両 DB を連携して必要なデータを検索するシステムを作製し、実際にデータの収容と抽出を実行した。この作業と並行してデータベース開発進捗会議を 2 回にわたり開催し、データのプロジェクト内共有の方法について協議を行った。なお miRNA および臨床情報のデータベースへの入力 は 逐次実行している。

③ miRNA 診断マーカーと miRNA 検査／診断技術の開発

昨年度論文、学会等で報告した乳がんを引き続き、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、肉腫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。これらの結果を受けて、NCC において前向きに患者をリクルートする検証用の研究を計画し、さらに体外診断用医薬品の開発につなげるための PMDA 戦略相談の事前面談を実施した。

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、PSS/JBIC の各社において、それぞれの中間目標を達成する開発を行った。4 社はそれぞれの基盤技術に準拠し、①～③の研究開発によって得られた成果である血中 miRNA マーカーを自社で開発するツールと組み合わせ、体外診断用医薬品として申請することが可能なキットの作製を目指している。

<英語>

In cooperation with a user forum composed of companies such as laboratory diagnostic companies, laboratory instrument companies, and pharmaceutical companies, we explore and determine the practical applications of early detection markers for cancers, such as stomach, colon, esophageal, pancreatic, liver, biliary, lung, breast, ovarian, prostate, and bladder cancers, gliomas, and sarcomas; those for dementia including Alzheimer's disease; and those for other diseases to provide medical care systems using the world's most advanced early detection/early treatment technologies.

In other words, we detect the comprehensive miRNA expression level in blood using an enormous number of samples including patient serum sample stored in biobanks of the National Cancer Center Japan (NCC) and National Center for Geriatrics and Gerontology (NCGG) and construct a database in which the data connected to clinical data are collectively entered. In addition, by analyzing the data in a combined manner, we discover early detection markers for serious diseases for using them in the development of a diagnostic system practicable in clinical sites.

Specifically, we conduct research and development (R&D) described in (1) to (4) below for the aforementioned purposes. This cooperative R&D is conducted with individual companies, each bringing their own know-how and other expertise for high-risk "basic technology," which requires a long time for its practical application.

(1) Comprehensive analysis of miRNA in patient body fluids

A total of approximately 41,000 serum samples in the project (serum samples stored in biobanks of the NCC and NCGG and samples newly collected in eight cooperative universities and in the project) have been registered for analysis, and comprehensive miRNA analysis has been completed using DNA chips for 39078 of these serum samples. As a result, we could obtain data for the exploration of early detection markers for breast, colon, stomach, esophageal, liver, pancreatic, biliary, lung, and ovarian cancers, gliomas, sarcomas, and dementia. Furthermore, for the exploration of predictive markers for the anticancer drug response, which is a clinical issue, we initiated combined analysis including the assessment of samples of the same patients whose samples were used for the exploration of early cancer detection markers.

(2) Construction of an miRNA expression database that is cross-sectionally analyzable for the disease

We constructed a database for clinical data, in addition to a database for storing data obtained from comprehensive miRNA analysis, which was organized in 2 years after the initiation of the project. The clinical data are based on the hospital cancer registration data of the NCC. Furthermore, we created a system that connects both databases to search for necessary data and stored and extracted data. In parallel with this operation, we held a database development progress meeting twice to discuss data-sharing methods in the project. Entry of miRNA data and clinical data into the databases is sequentially performed.

(3) Development of miRNA diagnostic markers and miRNA testing/diagnostic technique

After identifying diagnostic markers for breast cancer that we reported in medical journals and conferences in the last fiscal year, we identified diagnostic markers for colon, stomach, esophageal, liver, pancreatic, biliary, lung, and ovarian cancers, gliomas, and sarcomas, with the sensitivity/specificity for each exceeding 90% in this fiscal year. Based on these results, we planned a verification study that prospectively recruited patients in the NCC, and to link it to the development of in-vitro diagnostics, we held a preliminary meeting of the Pharmaceuticals and Medical Devices Agency (PMDA) pharmaceutical affairs consultation on R&D strategy.

(4) Diagnostic system development for use in clinical sites

In Toray Industries, Inc.; TOSHIBA CORPORATION; ARKRAY, Inc./Kyoto Inst. of Technology; and Precision System Science Co., Ltd./Japan Biological Informatics Consortium, development was performed to achieve the respective interim goals. The four organizations that combine blood miRNA markers, results from the R&D mentioned in (1) to (3), with tools that they will develop on their own on the basis of each basic technology aim to produce a kit that can lead to application for in-vitro diagnostics.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧 (国内誌 0件、国際誌 14件)

1. Fujita Y, Yoshioka Y, Ochiya T. Extracellular vesicle transfer of cancer pathogenic components. *Cancer Sci*. 2016 Apr;107(4):385-90.
2. Kosaka N, Yoshioka Y, Fujita Y, Ochiya T. Versatile roles of extracellular vesicles in cancer. *J Clin Invest*. 2016 Apr 01;126(4):1163-72.
3. Ueno M, Asada K, Toda M, Nagata K, Sotozono C, Kosaka N, Ochiya T, Kinoshita S, Hamuro J. Concomitant Evaluation of a Panel of Exosome Proteins and MiRs for Qualification of Cultured Human Corneal Endothelial Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016 Aug 01;57(10):4393-402.
4. Yoshimura A, Kawamata M, Yoshioka Y, Katsuda T, Kikuchi H, Nagai Y, Adachi N, Numakawa T, Kunugi H, Ochiya T, Tamai Y. Generation of a novel transgenic rat model for tracing extracellular vesicles in body fluids. *Sci Rep*. 2016 Aug 19;6:31172.
5. Naito Y, Yoshioka Y, Yamamoto Y, Ochiya T. How cancer cells dictate their microenvironment: present roles of extracellular vesicles. *Cell Mol Life Sci*. 2017, 74(4):697-713.
6. Kadota T, Fujita Y, Yoshioka Y, Araya J, Kuwano K, Ochiya T. Extracellular Vesicles in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Int J Mol Sci*. 2016 Oct 27;17(11).
7. Sasaki H, Yoshiike M, Nozawa S, Usuba W, Katsuoka Y, Aida K, Kitajima K, Kudo H, Hoshikawa M, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Chikaraishi T. Expression Level of Urinary MicroRNA-146a-5p Is Increased in Patients With Bladder Cancer and Decreased in Those After Transurethral Resection. *Clin Genitourin Cancer*. 2016 Oct;14(5):e493-e9.
8. Nezu Y, Hagiwara K, Yamamoto Y, Fujiwara T, Matsuo K, Yoshida A, Kawai A, Saito T, Ochiya T. miR-135b, a key regulator of malignancy, is linked to poor prognosis in human myxoid liposarcoma. *Oncogene*. 2016 Dec 01;35(48):6177-88.
9. Ogama N, Sakurai T, Nakai T, Niida S, Saji N, Toba K, Umegaki H, Kuzuya M. Impact of frontal white matter hyperintensity on instrumental activities of daily living in elderly women with Alzheimer disease and amnesic mild cognitive impairment. *PLOS ONE*. 2017, 2, 12, e0172484.
10. Sugimoto T, Yoshida M, Ono R, Murata S, Saji N, Niida S, Toba K, Sakurai T. Frontal Lobe Function Correlates with One-Year Incidence of Urinary Incontinence in Elderly with Alzheimer Disease. *Journals Of Alzheimer's Disease*. 2017, 56,2,567-574.
11. Kayano M, Higaki S, Sato J, Matsumoto K, Takikawa O, Niida S. Plasma microRNA biomarker detection for mild cognitive impairment using differential correlation analysis. *Biomarker Research*. 2016, 12,4, doi: 10.1186/s40364-016-0076-1.
12. Mori T, Murasawa Y, Ikai R, Hayakawa T, Nakamura H, Ogiso N, Niida S, Watanabe K. Generation of a transgenic mouse line for conditional expression of human IL-6. *Experimental Animals*. 2016, 1, 65, 455-463.
13. Moriwaki S, Into T, Suzuki K, Miyauchi M, Takata T, Shibayama K, Niida S. γ -

Glutamyltranspeptidase is an endogenous activator of Toll-like receptor 4-mediated osteoclastogenesis. *Scientific Reports*. 2016, 24, 6, 35930.

14. Sugimoto T, Ono R, Murata S, Saji N, Matsui Y, Niida S, Toba K, Sakurai T. Prevalence and associated factors of sarcopenia in elderly subjects with amnesic mild cognitive impairment or Alzheimer disease. *Current Alzheimer Research*. 2016, 13, 6, 718-726.

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. 血清中 microRNA による新規乳がん診断および治療効果予測マーカーの開発, 口頭, 下村昭彦, 椎野翔, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 松崎潤太郎, 清水千佳子, 竹下文隆, 新飯田俊平, 木下貴之, 田村研治, 落谷孝広, 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 2016/7/30, 国内.
2. 心理的ストレスマーカーとなる血中 microRNA の同定と胸焼け症状との関連の検討, ポスター, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 18 回神経消化器病学会等合同学術集会, 2016/9/9~2016/9/10, 国内.
3. 血清マイクロ RNA での大腸癌におけるリキッドバイオプシーの検証, ポスター, 高丸博之, 斉藤豊, 加藤健, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 小島基宏, 落合淳志, 落谷孝広, 松田尚久, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6~2016/10/8, 国内.
4. 血清マイクロ RNA での大腸癌におけるリキッドバイオプシーの検証, ポスター, 高丸博之, 斉藤豊, 加藤健, 河内淳平, 滝澤聡子, 坂本裕美, 小島基宏, 落合淳志, 落谷孝広, 松田尚久, JDDW2016, 2016/11/3~2016/11/6, 国内.
5. 脳卒中リスクマーカーとなる血中 microRNA の同定, ポスター, 園田匠, 松崎潤太郎, 新飯田俊平, 落谷孝広, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30~2016/12/2, 国内.
6. Novel combinations of circulating microRNAs for detecting esophageal and gastric cancers, ポスター, Matsuzaki J, Abe S, Katai H, Tachimori Y, Kato K, Kawauchi J, Takizawa S, Sakamoto H, Takeshita F, Niida S, Oda I, Ochiya T, The 10th International Gastrointestinal Consensus Symposium (IGICS), 2017/2/18, 国外.
7. エクソソームの単離と体液中からの miRNA の全自動検出システムの構築, ポスター, 安井大輔, 鈴木めぐみ, 櫻井友里, 鈴木武尊, 宮下雪子, 上田哲也, 第 39 回日本分子生物学会年会, 2016/11/30-12/2, 国内
8. Development of a miRNA diagnostic system with LNA-conjugated solid supports and PMU₂ probes, ポスター, Sugawara U, Nakajima A, Watari Y, Ariyoshi Jm Ymayoshi A, Murakami A, Kobori A, The 43rd International Symposium on Nucleic Acids Chemistry, 2016/9/27~2016/9/29, 国内
9. ピレンプローブを用いたサンドイッチ型 microRNA 検出法, ポスター, 中嶋康介, 渡優有, 杉原悠太, 有吉純平, 山吉麻子, 村上章, 小堀哲生, 第 2 回日本核酸医薬学会年会, 2016/11/15~17, 国内
10. Circulating microRNA associated with visceral obesity: a possible biomarker of digestive cancers, ポスター, Matsuzaki J, Shimizu-Hirota R, Tadokoro H, Iwao Y, Ochiya T, United European Gastroenterology Week 2016, 2016/10/15~2016/10/19 国外

11. 内臓脂肪と関連する血中 microRNA の消化器がんバイオマーカーとしての可能性, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 75 回日本癌学会学術総会, 2016/10/6~2016/10/8, 国内.
12. 血清中 microRNA の精神的ストレスバイオマーカーへの応用, 松崎潤太郎, 清水良子, 田所弘子, 岩男泰, 落谷孝広, 第 8 回日本 RNAi 研究会, 2016/8/31~2016/9/2, 国内
13. 「ExoScreen as a Novel Liquid Biopsy Platform for Detecting Cancer-Specific Exosomes」 口頭, Ochiya T, Exosomes and Liquid Biopsies ASIA, 2016.4.6-9, 海外
14. 「Extracellular Vesicles in Lung Microenvironment and Pathogenesis」 口頭, Ochiya T, 2nd International Lung Cancer Symposium, 016.4.15-18, 海外
15. 「EVs and Implications to Cancer Therapy」 口頭, Ochiya T, INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXTRACELLULAR VESICLES. 2016.5.2-9, 海外
16. 「Exosome as a novel diagnostic and therapeutic target for cancer」 口頭, Ochiya T, The Korean Society of Molecular Imaging, 2016.8.26-27, 海外
17. 「Extracellular vesicles as a novel diagnostic and therapeutic target for cancer」 口頭, Ochiya T, Cold Spring Harbor Asia, 2016.12.12-16, 海外
18. 「個別化治療、先制医療実現に向けたがんの新規診断・治療戦略」 第 49 回東北脳腫瘍研究会, 口頭, 落谷孝広, 2016.4.2, 国内
19. 「疾患エクソソームの解明によって生まれる新規がん診断・治療戦略」 第 89 回日本整形外科学会学術総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.13, 国内
20. 「聞きたくてもなかなか聞けない最近の話題 病理医が知っておくべき病理学の最近の進歩 「Liquid biopsy と病理診断」」 第 105 回日本病理学会総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.14, 国内
21. 「最先端のがん診断とがん治療」 第 13 回東レ先端融合研究シンポジウム, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.18, 国内
22. 「1 滴の血液でがんが分かる時代」 星薬科大学大学院講義連携セミナー, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.28, 国内
23. 「体液マイクロ RNA 診断の現状と課題」 第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2016.5.31, 国内
24. 「乳がん研究とエクソソーム」 第 24 回日本乳癌学会学術総会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.16, 国内
25. 「がん早期診断の進歩」 第 65 回最新臨床医学を学ぶ会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.23, 国内
26. 「細胞外小細胞による肺疾患の理解」 第 44 回箱根呼吸器討論会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.24, 国内
27. 「Non-codingRNA の多様な機能：がん研究において新しい展開」 第 43 回日本毒性学会学術年会, 口頭, 落谷孝広, 2016.6.29, 国内
28. 「Extracellular vesicles in lung microenvironment and pathogenesis」 第 41 回内藤コンファレンス, 口頭, 落谷孝広, 2016.7.5-8, 国内
29. 「マイクロ RNA によるがん診断」 第 14 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 口頭, 落谷孝広, 2016.7.30, 国内

30. 「血液によるがん検査の実現にむけて～体液マイクロ RNA 測定技術基盤開発プロジェクトの現状～」 がん検診推進研修会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.8.21, 国内
31. 「細胞外に分泌される情報伝達物質に個別化医療の原点を探る」 第 8 回日本 RNAi 研究会, 第 3 回日本細胞外小胞学会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.8.31-9.2, 国内
32. 「がんの早期発見の切り札であるマイクロ RNA/エクソソームとは」 第 65 回日本医学検査学会・第 63 回日本臨床検査医学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.3, 国内
33. 「体液中マイクロ RNA 測定技術規範開発事業」 第 14 回医療機器フォーラム, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.5, 国内
34. 「エクソソームによる細胞間のコミュニケーションの実態解明とがん治療への応用」 千里ライフサイエンスセミナーK3 「エクソソームの研究の最前線：疾患メカニズム解明からの診断・治療まで」, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.16, 国内
35. 「体液マイクロ RNA によるがん診断」 第 24 回日本がん検診・診断学会総会 共催セミナー2, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.17, 国内
36. 「体液マイクロ RNA によるがんの早期診断」 臨床検査自動化会第 48 回大会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.23, 国内
37. 「エクソソーム研究が解き明かす乳がんの進展メカニズム診断・治療への応用」 第 40 回神戸乳癌セミナー, 口頭, 落谷孝広 ,2016.9.24, 国内
38. 「マイクロ RNA による診断と治療」 第 46 回日本腎臓学会東部学術大会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.8, 国内
39. 「血液中を循環するエクソソームの正体を探る」 第 78 回日本血液学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.14, 国内
40. 「エクソソームを測定する基盤技術開発の必要性」 再生医療サポートビジネス懇話会, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.17, 国内
41. 「血液で 13 種類のがんを診断～がん検診の新技术～」 NHK ジャーナル, 口頭, 落谷孝広 ,2016.10.19, 国内ラジオ
42. 「がん診断と治療方針決定のための最新アプローチ」 第 54 回日本癌治療学会学術集会, 口頭, 落谷孝広 2016.10.22, 国内
43. 「エクソソーム研究に関する現状・今後の進展について」 エクソソーム 2016 セミナー, 口頭, 落谷孝広 2016.10.26, 国内
44. 「エクソソームもよる疾患の新規診断・治療」 平成 28 年度先端技術研修「エクソソームによる疾患の新規診断・治療」, 口頭, 落谷孝広 2016.10.27, 国内
45. 「細胞外微粒子(細胞外小胞)について」 日本医薬研究開発機構 ワークショップ 「細胞外微粒子により惹起される生体応答の機序解明と制御」, 口頭, 落谷孝広 2016.10.31, 国内
46. 「体液マイクロ RNA とがん検診」 第 25 回日本婦人科がん検診学会総会・学術講演会, 口頭, 落谷孝広 2016.11.6, 国内
47. 「血液 1 滴でがんや認知症がわかる時代 最新の体液マイクロ RNA 診断とは」 ヘルシーパス講演会「先制医療の最前線」, 口頭, 落谷孝広 2016.11.27, 国内
48. 「エクソソーム研究がもたらす細胞間情報伝達機構の解明」 第 39 回日本分子生物学会 ランチオンセミナー, 口頭, 落谷孝広 2016.12.1, 国内

49. 「リキッドバイオプシーが拓く新規がん診断の現状と展望」第 56 回日本臨床化学学会年次学術集会, 口頭, 落谷孝広 2016.12.2, 国内
50. 「血液 1 滴でがんを知る: 体液マイクロ RNA 測定技術」 未病社会の診断技術研究会: 第 24 回講演会, 口頭, 落谷孝広 2016.12.7, 国内
51. 「婦人科がん検診の新たなる潮流: 疾患エクソソームによる体液診断」 第 5 回婦人科がんバイオマーカー研究会学術集会, 口頭, 落谷孝広 2017.2.25, 国内
52. Comprehensive MicroRNA-array Analysis of Exploration for Dementia Biomarkers, Asanomi Y, Niida S, International Symposium on miRNA Cancer Biomarker Research 2016, 2016/11/9~2016/11/10 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. プロジェクト主催シンポジウム, Takahiro Ochiya, et. al. International Symposium on miRNA Cancer Biomarker Research 2016, 2016/11/9~10, 国内
2. 第 3 回 マイクロ RNA ユーザーフォーラム報告会, 2016/9/13
3. 第 4 回 マイクロ RNA ユーザーフォーラム報告会, 2017/3/15

(4) 特許出願

2016 年度中 8 件出願