

NEDO研究開発 PJ 「体液中マイクロRNA測定技術基盤開発」

国立がん研究センター：以下 NCC（研究開発責任者：落谷孝広）

国立長寿医療研究センター：以下 NCGG

東レ株式会社：以下 東レ

株式会社東芝：以下 東芝

プレシジョン・システムサイエンス株式会社：以下 PSS

アークレイ株式会社：以下 アークレイ

バイオチップコンソーシアム：以下 JMAC

バイオ産業情報化コンソーシアム：以下 JBIC

共同実施先のアカデミア諸機関（九州大学、群馬大学、大阪大学、
大阪市立大学、東京医科大学、東京医科歯科大学、広島大学、名古屋大学）

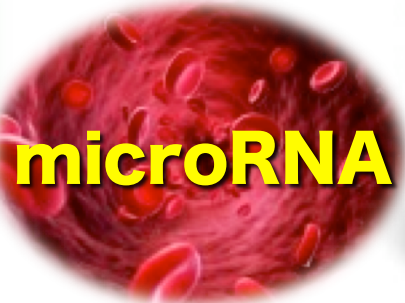
ユーザーフォーラム（検査診断薬会社、検査用ツール会社、製薬会社など）

NEDO研究開発プロジェクト
「体液中マイクロRNA測定技術基盤開発」

Our challenge

for the future

血液中の
マイクロRNA
の網羅的解析



Data Base 構築

13種類のがん

バイオバンク(臨床情報)
多層オミックス情報



診断装置開発

検査システム開発

Network

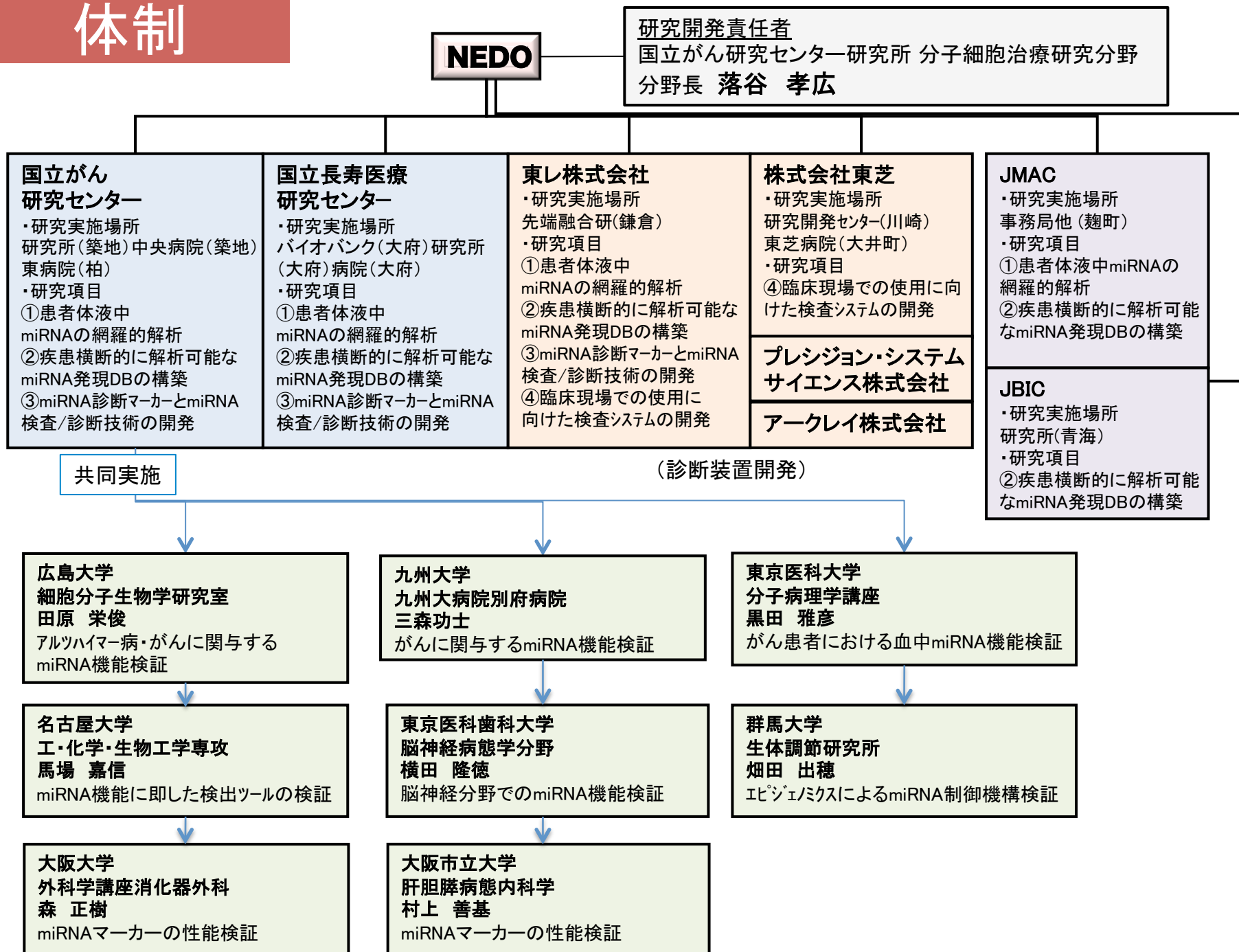
Health

Global



ユーザーフォーラムによるデータベース活用と創薬, 産業化

体制





マイクロRNAの「まとめ知識」その1

マイクロRNAとは……

- ・タンパク質をコードしていないRNA(ノンコーディングRNA)の一種
- ・塩基対の長さはおよそ22塩基(とても小さい)
- ・ヒトをはじめ、多くの生物種がもっている
- ・重要なマイクロRNAの配列の特徴は種を超えて保存されている
- ・RNAなのに特定の機能を有している！！

しかも……

その機能は小さいのにとってもパワフル

microRNA is a
Small but very influential.....



**Micro RNAs are small non-coding
RNA gene products with key roles
in regulating the translation and
degradation of mRNAs**

たとえば.....

マイクロRNAがいかにパワフルであるかを物語る事実



Cell Stem Cell
Article

Highly Efficient miRNA-Mediated Reprogramming of Mouse and Human Somatic Cells to Pluripotency

Frederick Anokye-Danso,¹ Chinmay M. Trivedi,² Denise Juhr,⁵ Mudit Gupta,² Zheng Cui,¹ Ying Tian,¹ Yuzhen Zhang,¹ Wenli Yang,^{1,4} Peter J. Gruber,^{3,4,5} Jonathan A. Epstein,^{1,2,3,4} and Edward E. Morrisey^{1,2,3,4,*}

¹Department of Medicine

²Department of Cell and Developmental Biology

³Cardiovascular Institute

⁴Institute for Regenerative Medicine

University of Pennsylvania, Philadelphia, PA 19104, USA

⁵The Cardiac Center, Children's Hospital of Philadelphia, 34th Street and Civic Center Boulevard, Philadelphia, PA 19104, USA

*Correspondence: emorris@mail.med.upenn.edu

DOI 10.1016/j.stem.2011.03.001

miR302という、たった1つのマイクロRNAが、
マウスおよびヒトの線維芽細胞をiPS細胞様の万能細胞
にリプログラミング(初期化)できる！！
マイクロRNAがあれば、山中因子は必要ない！？

Species	miRNA count
Homo sapiens	2578
Canis familiaris	289
Rattus norvegicus	723
Mus musculus	1908
Gallus gallus	791
Xenopus tropicalis	175
Danio rerio	247
Drosophila melanogaster	426
Caenorhabditis elegans	368
Epstein Barr virus	44
Human cytomegalovirus	17

我々ヒトは
2500種類以上もの
マイクロRNAをもっている



miRBase

<http://www.mirbase.org/>

Release 20: July 2013

マイクロRNAの「まめ知識」その2

- ・こうしたマイクロRNAの配列はゲノム上にコードされている
- ・つまり細胞の中にマイクロRNAはあって、機能を果たしている
- ・がん等の疾患では、マイクロRNAの機能に異常がおこるため、その疾患の原因となりうるということが次々と証明

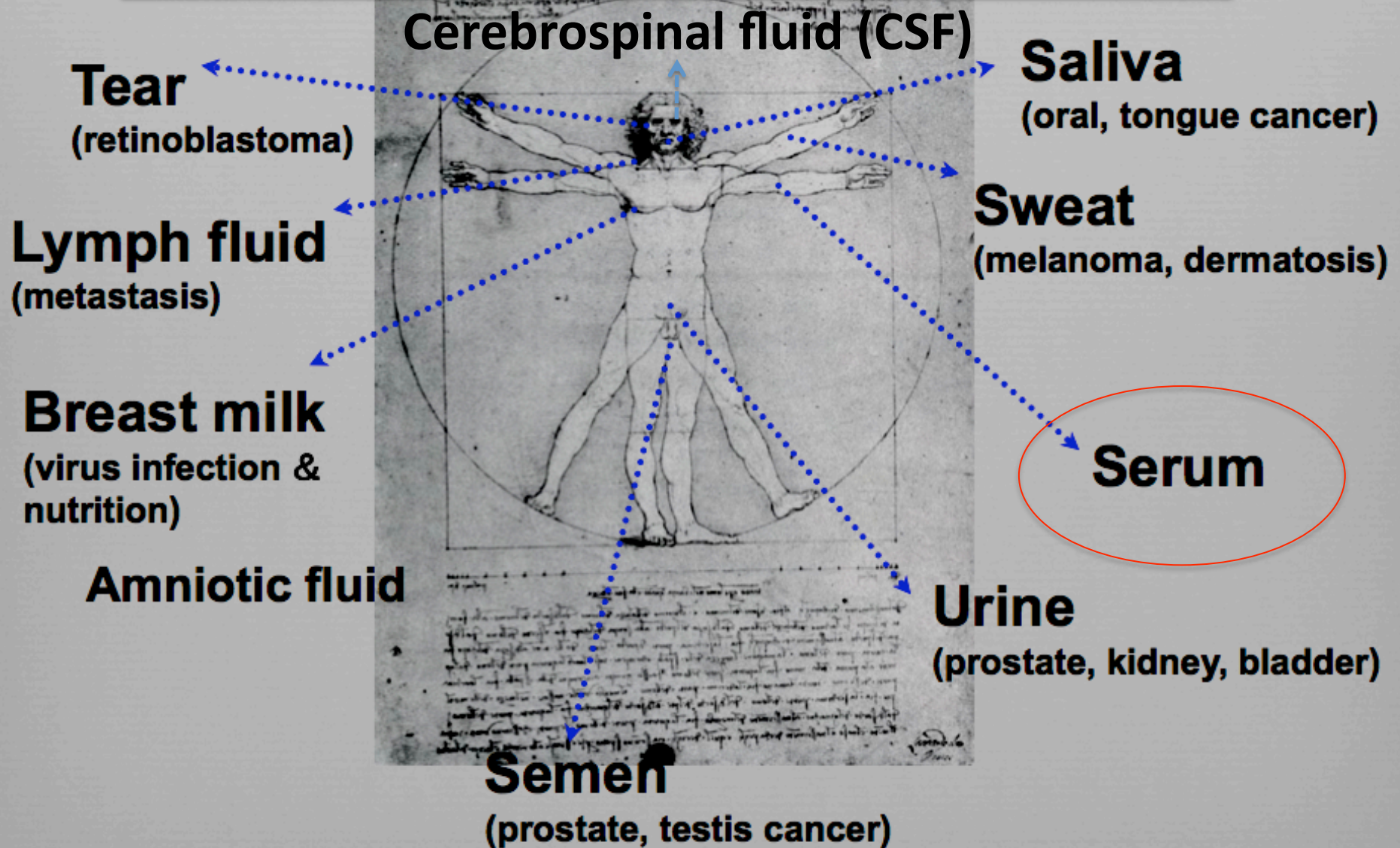
しかし、

- ・マイクロRNAは血液等の体液にも見つかる
- ・血清中ではおよそ40ng/mlのマイクロRNAが存在します、そして種類は健康な方でおよそ500~600種類も！！

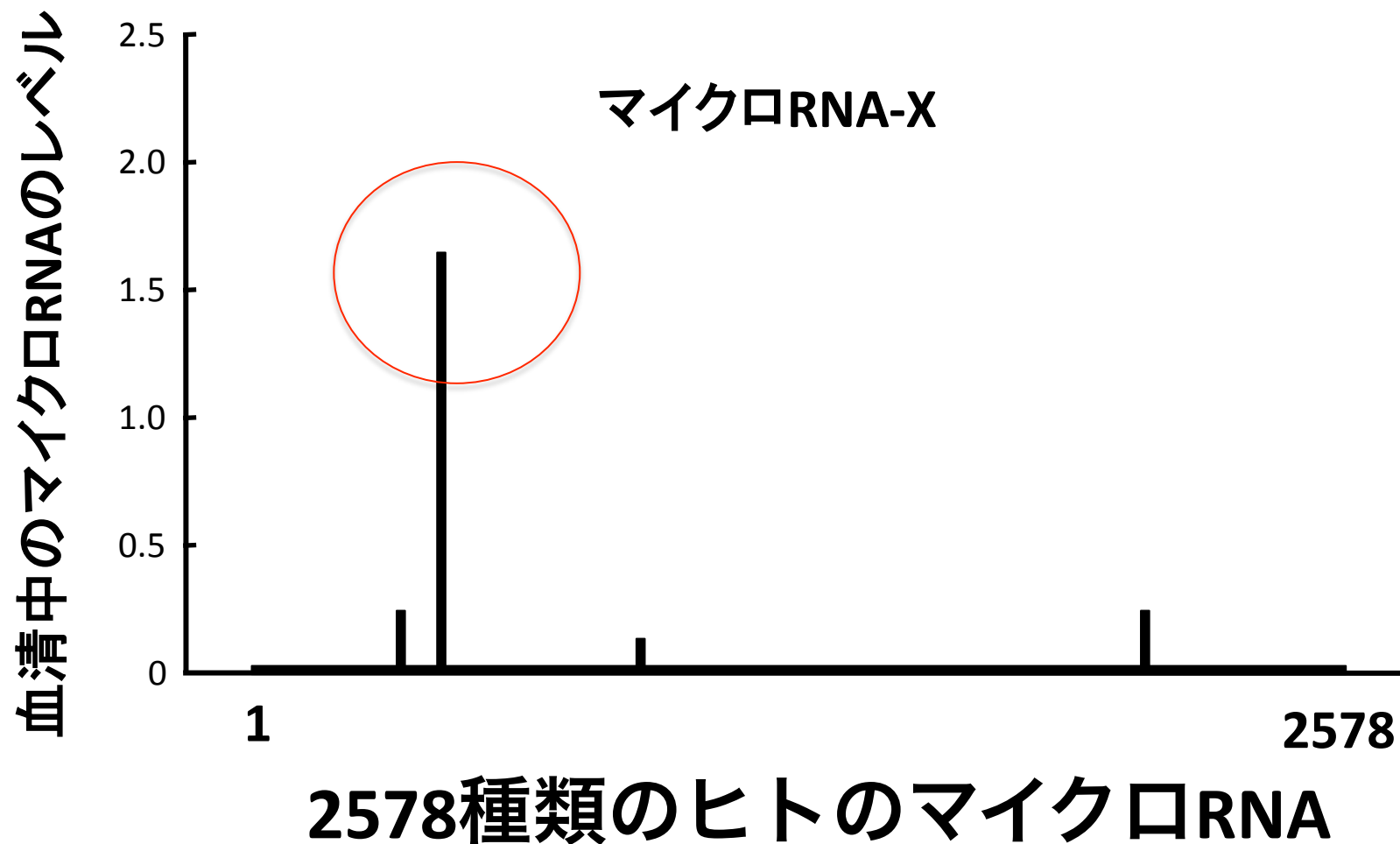


Body fluid and microRNAs

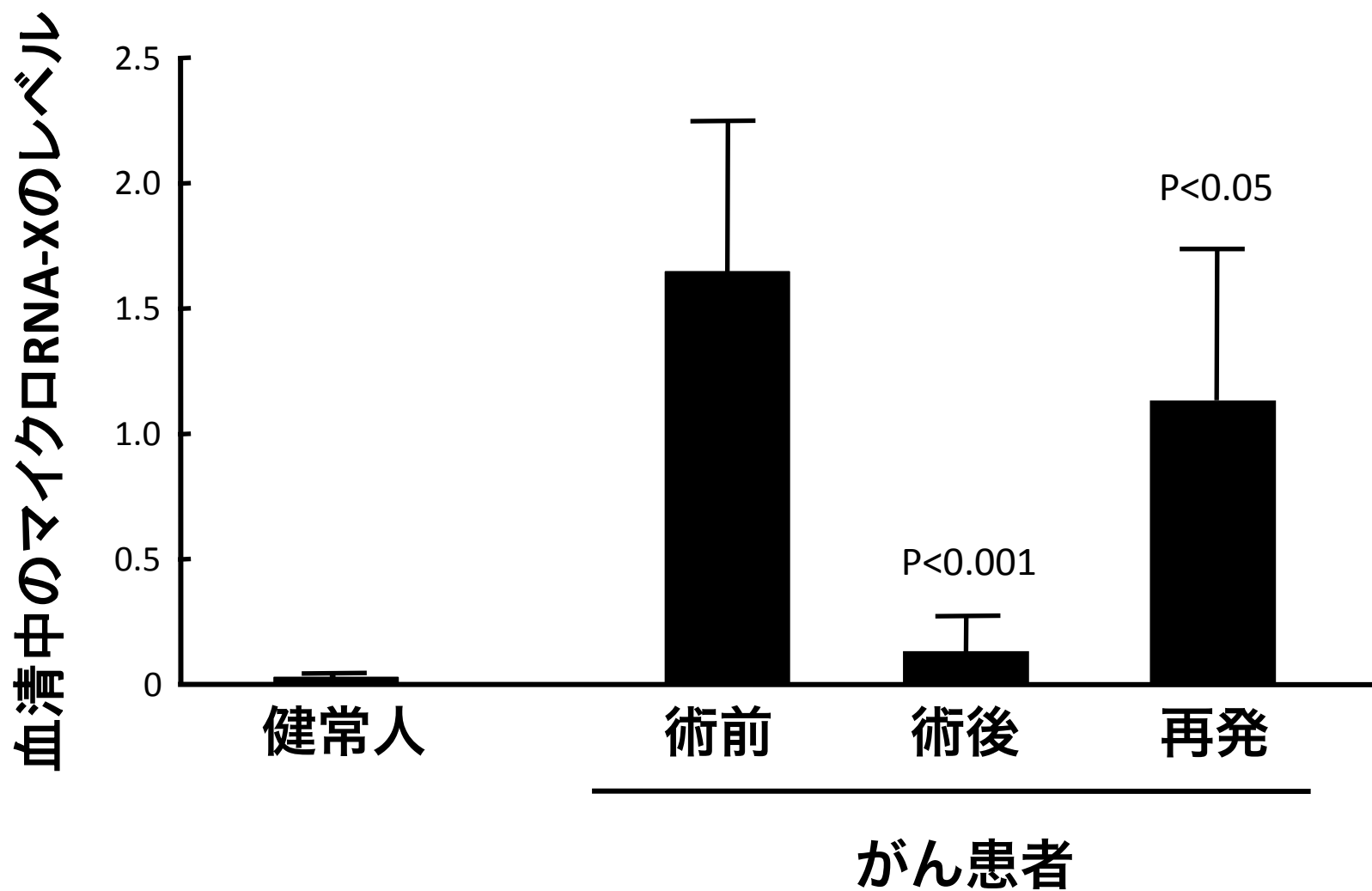
マイクロRNAは、血液等、あらゆる体液中に見つかる



血液中の特定のマイクロRNAが特定の「がん」で上昇



血液中のマイクロRNA-Xを見ることで 体内の「がん」の状態が一目瞭然



びまん性大細胞型リンパ腫は非ホジキンリンパ腫の30~40%を占める最も頻度の高い悪性リンパ腫、この患者の血清中に特定のマイクロRNAが2008年に発見、腫瘍マーカーとなりうることで世界で初めて示された

bjh short report

Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma

Charles H. Lawrie,¹ Shira Gal,¹ Heather M. Dunlop,¹ Beena Pushkaran,¹ Amanda P. Liggins,¹ Karen Pulford,¹ Alison H. Banham,¹ Francesco Pezzella,¹ Jacqueline Boulton,¹ James S. Wainscoat,¹ Christian S. R. Hatton² and Adrian L. Harris³

¹Nuffield Department of Clinical Laboratory Sciences, University of Oxford, John Radcliffe Hospital, ²Department of Haematology, John Radcliffe Hospital, and ³Cancer Research UK, Molecular Oncology Laboratories, Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford, Oxford, UK

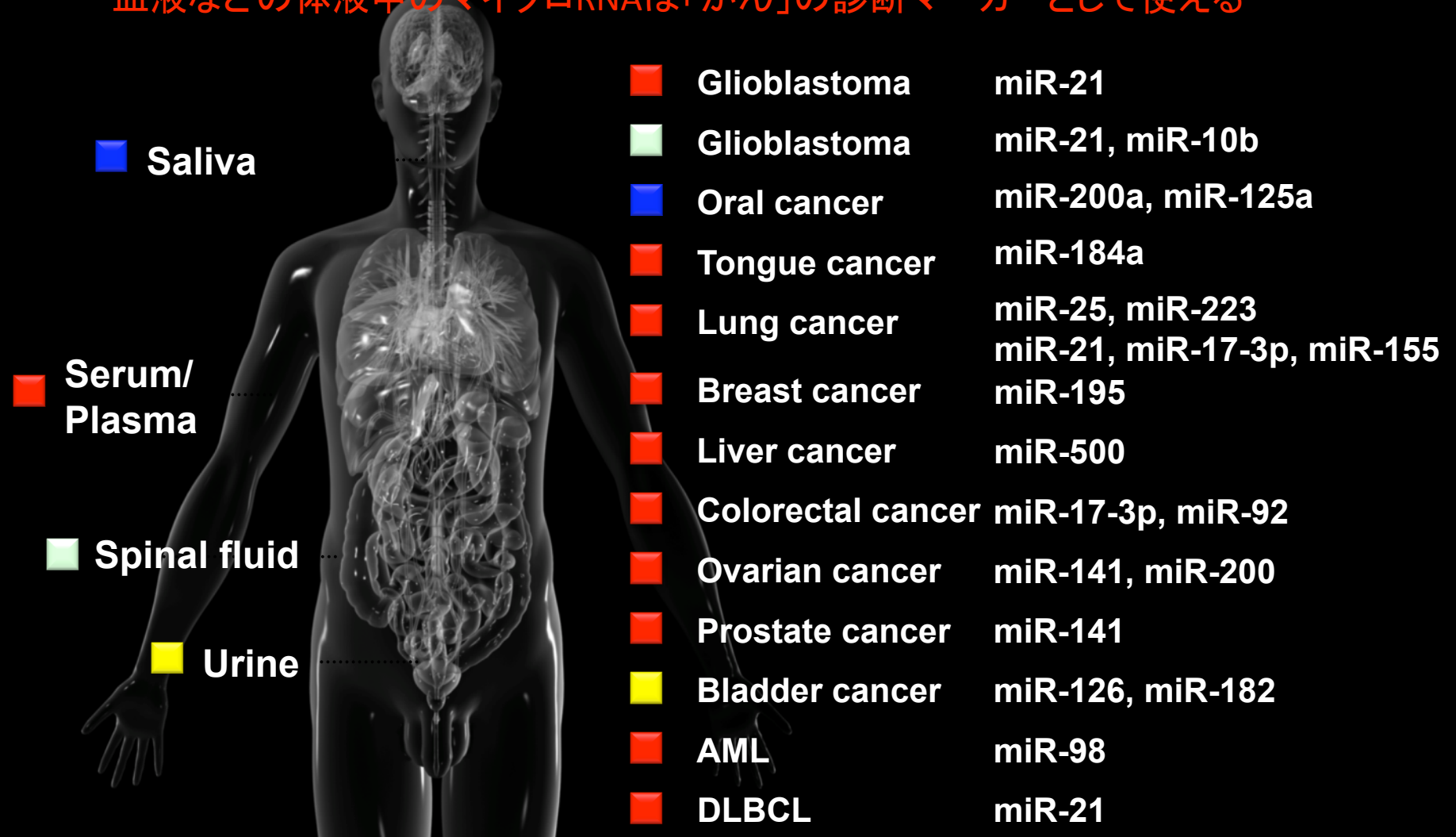
Summary

Circulating nucleic acids have been shown to have potential as non-invasive diagnostic markers in cancer. We therefore investigated whether microRNAs also have diagnostic utility by comparing levels of tumour-associated *MIRN155* (*miR-155*), *MIRN210* (*miR-210*) and *MIRN21* (*miR-21*) in serum from diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) patients ($n = 60$) with healthy controls ($n = 43$). Levels were higher in patient than control sera ($P = 0.009$, 0.02 and 0.04 respectively). Moreover, high *MIRN21* expression was associated with relapse-free survival ($P = 0.05$). This is the first description of circulating microRNAs and suggests that microRNAs have potential as non-invasive diagnostic markers for DLBCL and possibly other cancers.

Keywords: microRNA, diffuse large B-cell lymphoma, lymphoma, sera, plasma.

Circulating miRNAs in Human Body Fluids are Non-invasive Diagnostic Markers for Cancers.

血液などの体液中のマイクロRNAは「がん」の診断マーカーとして使える



世界中でマイクロRNAの体液診断は まだ実用化されていない！！

その理由は……………

- ・多くの報告は基礎研究レベルで、検討症例数も数十から100例程度にとどまっているため、不十分



マイクロRNAによる体液診断を実現するためには

- ・数千例を超える臨床検体を用いた十分な実証研究
 - ・多くのがんに関するデータベースの構築
 - ・専用の診断装置の開発
- が急務である

具体的研究開発内容

① 患者体液中miRNAの網羅的解析

- NCCおよびNCGGのバイオバンク検体から、日本人に多いがん種ごとに5,000検体以上の検体等についてmiRNA発現プロファイルを取得
- miRNAデータを患者臨床情報と紐付けすることで統合的な解析を実施

② 疾患横断的に解析可能なmiRNA発現データベースの構築

- miRNAデータと臨床情報を格納し、横断的な解析を可能にするデータベースを構築
- プロジェクトの成果を製薬企業、診断薬企業及び診断機器企業等に橋渡し、プロジェクト成果の実用化を推進するためにユーザーフォーラムを設立
- フォーラム参画企業がこのデータベースにアクセスできる環境を構築

③ miRNA診断マーカーとmiRNA検査／診断技術の開発

- 臨床情報とmiRNAデータを解析し、血中miRNA診断マーカーを探索
- 複数の疾患の間での特異性を得るため複数マーカーを組み合わせた診断用アルゴリズムを作成
- 診断用miRNAマーカーが疾患や病態と関連するメカニズムの解明を行い、診断マーカーとしての信頼度を高める

④ 臨床現場での使用に向けた検査システムの開発

- 臨床現場で、体液(血清)中のmiRNAの抽出から検出までを全自動で、簡便・短時間に行えるような自動検査システムを開発

① 患者体液中miRNAの網羅的解析

血中マイクロRNA解析を行う疾患候補

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、肉腫等およびアルツハイマー病等の認知症

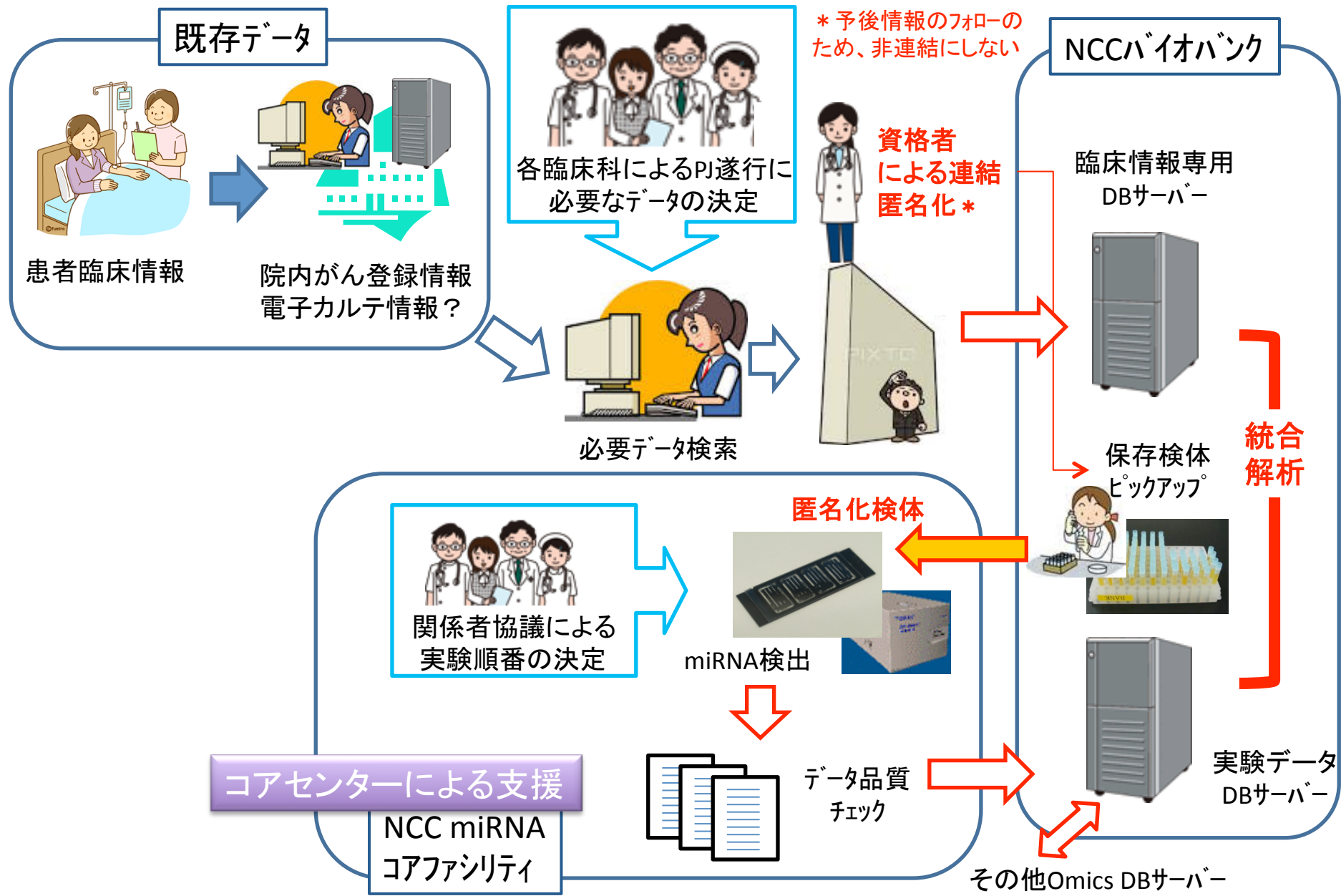
例として大腸がん・・・

独立行政法人
国立がん研究センター



対象疾患	大腸がん
研究開発の必要性	<p>大腸がんの治療は、手術・放射線療法・化学療法を主体とした集学的治療が日常診療で行われている。近年、切除不能・再発大腸がんにおける分子標的治療薬の開発により、切除不能大腸がんの予後は改善したが、最終的に大部分の患者が薬剤に耐性となり根治を期待することは難しい現状がある。そのため、根治が可能な段階で治療が可能となるような、手軽に検査を実施できる早期発見に重点をおいた診断バイオマーカーの開発が必要不可欠である。</p> <p>また、抗EGFR抗体の効果予測因子としてのRAS (KRAS, NRAS) の遺伝子変異が重要な役割を果たしており、患者ごとに最適な治療法を選択する個別化治療の実現のため、更なる薬剤感受性（治療効果）や治療効果モニタリング、予後予測因子としての血中バイオマーカーの開発が重要となっている。また現在は、再発時にも積極的に生検を行うことが推奨されている。その観点から、血中バイオマーカーによるサブタイプ診断も求められている。本検討では、多様な情報を持つ大腸がんに対する血中miRNA早期発見マーカーの探索を通して、各種大腸がんの性質をも検出できるmiRNAマーカーについても評価が可能である。</p>
具体的研究開発内容	<p>・大腸がん 5,000 例以上の臨床情報および血中 miRNA 発現プロファイルのデータベース化を実施する。</p> <p>・miRNA 発現プロファイルの項目としては下記を想定し、最低目標例数をおいた。それぞれの項目は重複して解析されうる。</p> <ol style="list-style-type: none">1) 早期診断（便潜血検査との比較、組合せ）：解析予定数 5,000 例2) 薬剤感受性（治療効果）：2,500 例3) 治療効果モニタリング：解析予定数 1,000 例4) 再発転移の予後予測因子：解析予定数 1,000 例5) サブタイプ分類：解析予定数 5,000 例 <p>の各々の血中 miRNA 診断マーカーの選定を目的とする。</p> <p>・大腸がんの一部の症例について、血中 miRNA プロファイルと、組織型をはじめ、生殖細胞系列多型・変異と、がん細胞（組織）の体細胞ゲノム・遺伝子変異等の分子生物学的情報との統合をはかる。</p>

NCC バイオバンク検体解析フロー案



ユーザーフォーラムの目的

- ・プロジェクトの研究成果を速やかにユーザーフォーラム参画企業（製薬企業、診断薬企業及び診断機器企業等）に橋渡しを行う。
- ・参画企業では、事業化を念頭に置いて、この研究成果の評価・検証を行い、その結果を開発側にフィードバックを行う。
- ・疾患対象領域、成果開示情報の形態（どのような情報を開示して欲しいか）等の参画企業のニーズを開発側にフィードバックを行う。
- ・プロジェクトで開発するmiRNA発現データベースの情報を参画企業がアクセスするプログラムに対する参画企業のニーズ（データ項目、操作性等）を吸い上げる。

本プロジェクトによって、



「がんの診断」にどのような革命が
もたらされるのか？

一般の人々にどのようなメリットがあるのか？

また、その事業開始はいつごろか？

乳がんのマイクロRNAを例に……

従来の腫瘍マーカーの問題点

- がんの早期から腫瘍マーカーが高値を示すことが少ない。

腫瘍がある程度大きくなないと高値にならなかつたり、場合によっては最後まで検出できない場合もある。

- がん以外の良性の疾患や加齢によっても高値を示す。

腫瘍マーカーが高値であっても必ずしもがんであるとは限らない。

腫瘍マーカーの感度と特異度の問題

- 感度とは、がんである人を正しくがんとして診断できる正確さのこと。感度が低いと、本当にがんである人を正常と診断し(偽陰性)、がんを見逃してしまう危険性が。
- 特異度が低いと、正常な人をがんとして診断してしまい(偽陽性)、不安を与え、さらに unnecessary な検査をする結果となり、大きな負担に。
- 現行の腫瘍マーカーの中には、この感度と特異度が、特にがんの初期での診断に欠如しているために、がんのスクリーニングには不適合なものが数多く存在。

腫瘍マーカーの臓器特異性の問題

- 腫瘍マーカーとがんが確実に対応していない。

ある腫瘍マーカーが陽性となった場合、そのマーカーの臓器特異性が劣るため、どの臓器にがんがあるかが判定できない。

さらに追加の検査が必要となり、患者への負担が増す結果となる。

CEA: 乳がんの腫瘍マーカー

ところが

大腸がん、胃がん、膵臓がんでも高値に！！



臓器特異性が低い

CA15-3:乳がんの発見に有用な腫瘍マーカー

乳がんなどに特異性があるとされ、乳がんのスクリーニング検査に用いられている。

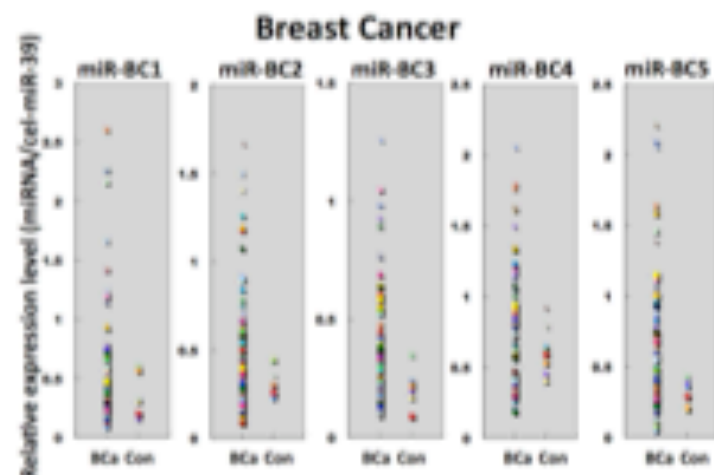
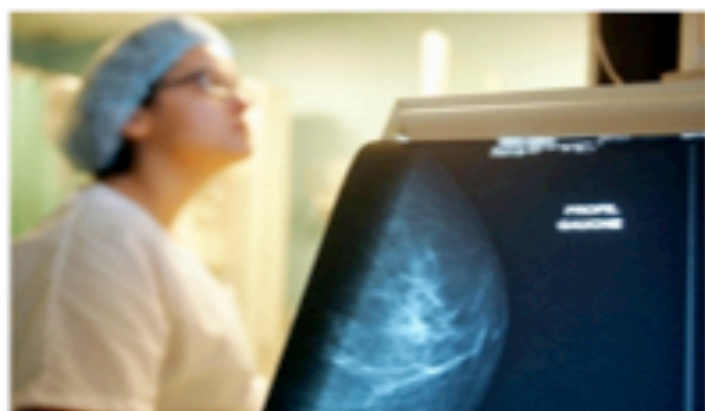
しかし、……

原発性乳がんの場合、がん初期の陽性率は2%程度、感度が低い。

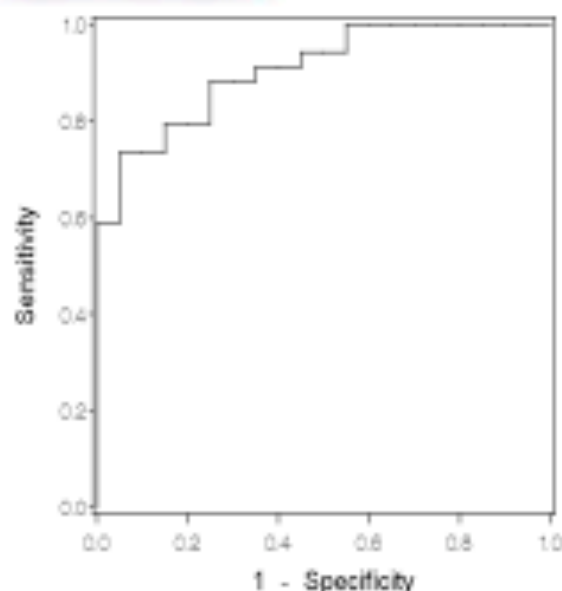
(しかし、進行がんになるとCA15-3の陽性率は10%以上となり、再発例では40%以上)

そのほか、卵巣がんや肺がん、前立腺がんでも測定値は上昇。がん以外の疾患では、子宮内膜症や骨盤炎症性疾患、肝炎でも高値を示す。特異度が低い。

乳がんの血清診断用マイクロRNA (NCC)



miR-BC1, miR-BC3, and miR-BC5



AUC=0.906

Sensitivity: 93%

Specificity: 82%

乳腺腫瘍内科
田村研治先生との共同

未発表データ

Breast Cancer Screening Tests

Convincing of
clinical utility

体液(血清)マイクロRNA診断

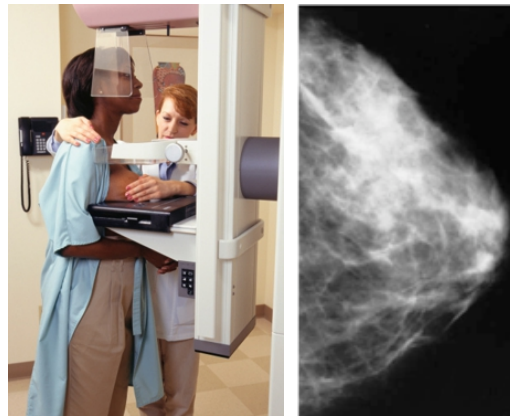
miR-BC1, miR-BC3, and miR-BC5



VS

Is it the Right Choice?

- マンモグラフィー



✓ use ionizing radiation
at a relatively high dose

✓ unacceptably high rate of
false positives

マンモグラフィーは重要な診断方法だが、
欠点もある。

体液(血清)マイクロRNA診断のメリットとしては・・・



- ・採血によるわずかな血液だけで感度、特異度の高い診断が受けられる可能性
- ・負担が少ない
- ・核酸なので、タンパクなどのバイオマーカー診断に比較して、抗体も要らず、大掛かりな分析装置も不要である
- ・本PIによって、安価で迅速、かつ正確なマイクロRNA解析装置が生まれ、集団検診などの健康診断で容易にがんのスクリーニング(早期診断)が可能となる

まとめ～臨床サイドから

1. 感度特異度の高い早期診断マーカーはがんの死亡率を改善する
2. 国立がん研究センターのバイオバンクの豊富な検体、臨床情報を効率的に活用することで迅速な開発が可能である
3. 早期診断のみならず、治療効果予測、新規薬剤の開発への応用も期待できる

(中央病院 加藤健先生による)

がん診断におけるLiquid Biopsyの新展開：
なにが、どこまでわかるのか？

Watching Cancers Evolve by Liquid Biopsy

New generation of Biopsy

Liquid Biopsy

Quick,
Simple,
Non-invasive

-
- Circulating Tumor Cell (CTC)
 - ✓ Circulating microRNA (cell-free)
 - Circulating DNA (cell-free)
 - Circulating Extracellular Vesicles (Exosome)
 - Cancer Metabolome