

平成21年 5 月 20 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006 ～ 2008
 課題番号：18390208
 研究課題名（和文）血清中 mRNA を用いた新規高感度病態診断法のプライマリーケアへの導入
 研究課題名（英文）Induction of novel sensitive disease diagnostic method using serum mRNA to primary care
 研究代表者
 三浦 典正（MIURA NORIMASA）
 鳥取大学・医学部・准教授
 研究者番号 30325005

研究成果の概要：

- 1) 癌細胞検出プロジェクトでは、共同研究施設からの肝がん検体が500例になり、臨床経過や現行の腫瘍マーカーとの比較でhTERT mRNAが新規の腫瘍マーカーとして応用可能であることを見出した。また6mm大の腫瘍を検出できることも見出し、Hepatologyに投稿中である。その他、甲状腺がん検体は伊藤病院から100検体を突破し、hTERT定量値は臨床応用可能とみて継続している。四国がんセンターと京都府立医科大学との共同研究により、膵がんにも応用可能か否か、PETによる画像診断との比較を検討した。100検体の検討では癌治療学会で有用性を発表した。
- 2) 炎症疾患早期診断プロジェクトでは、劇症肝炎とARDSに関して行った。劇症肝炎ではTGF- α mRNAが重症肝炎の時点で高値であれば回復でき、低値であれば肝移植になる可能性が高いことを学会発表した。ARDSでは、VWF、PBEF1、PDGFAが予後評価に有用であることを証明した。
- 3) 肺癌に対するNKT細胞免疫治療効果判定を、治療の前後で経時的に採血しhTERT mRNAとEGFR mRNAを測定している。理化学研究所及び千葉大学での倫理審査を受け承認後、100例以上の検体を検討した。現在NKT細胞の効果判定の解析を行っている。
- 4) 定量測定の最適化を図り、2つを過去の定量測定値と比較検討した。逆転写酵素反応の前に、高次構造をとる加熱過程を導入することで、定量測定が安定することを見出し、特許申請した。
 コニカミノルタテクノロジーセンターと共に、プライマリーケア導入が可能な試薬を完成させ、機器開発を開始している。機器開発費を得るため、機会がある毎に助成金申請を行っている。血液中のRNAの形態や安定なRNA抽出法の技術的向上を目指して継続している。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	10,800,000	3,240,000	14,040,000
2007年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・7201 内科学一般（含心身医学）

キーワード：医療・福祉、遺伝子、癌、核酸、内科

1. 研究開始当初の背景

蛋白発現検出系による臨床検査系における腫瘍マーカー領域での正診率向上及び限界を打解するために、血清中 RNA の高感度検出及び検査系の確立を目指した。従来の検査系は腫瘍マーカーは限界に来ていた 90% 近い検出率を目指してプライマリーケアレベルでの臨床導入を試みた。しかし血中 RNA は不安定であり、24 時間以内に変性・消失することから、質を維持できる方法を確立する必要があった。

2. 研究の目的

- 1) 血液中の細胞成分を除去して RNA を抽出すること
- 2) 抽出した RNA 発現量を SYBR Green I を用いたリアルタイム OneStep RT-PCR 法により定量検出すること
- 3) 1) と 2) を試薬レベルで完成させること
- 4) 1) と 2) を実施できる機器開発を手掛けること
- 5) 各疾患、各腫瘍、各炎症性疾患での目的遺伝子の RNA 発現量を測定し、有用なバイオマーカーを見出すこと。検体量を増やし、臨床的意義を明らかにすること

3. 研究の方法

- 1) 試薬開発：3 段階遠心分離法で RNA を含む血清を最適化した後、正電荷帯電カラムを用いて、DNase I による処理を行い、微量 RNA を精製した。緩衝液の組成検討を行い、最適化した。
- 2) 機器開発：共同研究企業を新技術説明会や JST 主催の産学連携研究会や発表会で募り、ユニカミノルタ社との共同研究契約の下、開発を開始した。臨床応用可能な安価な一体型機器開発を始めた。
- 3) 臨床データは、研究支援施設を募り、癌(肝癌、膵癌、胃癌、肺癌、大腸癌、卵巣癌、子宮癌、甲状腺癌、など)や炎症性疾患(劇症肝炎、呼吸促拍症候群(ARDS)、間質性肺炎

(SIRS)など)を検討した。肝癌は 500 例以上、肺癌は 200 例以上、膵癌は 100 例、肺癌は 150 例、卵巣癌は 120 例、子宮癌 50 例、甲状腺癌 100 例などを蓄積し、論文として公表した。劇症肝炎も 20 例以上得られ、論文化した。

4. 研究成果

1) 学術的成果：

検出法の開発：疾病に特異的な RNA を血清中から高感度に検出定量する方法として、①血液から細胞成分が除去された血清の分離、②血清から mRNA の抽出、③定量的 One-step RT-PCR による mRNA の増幅の 3 工程からなる方法を開発した。(Miura N, et al., Oncology, 2003)

従来法との比較：肝癌のマーカーである α フェト蛋白 (AFP) について、AFP 蛋白を検出する従来法と AFP 蛋白発現に係わる mRNA を検出する本方法の比較を行い、本方法が感度・特異度面ではるかに勝っていることを確認した。(Miura N, et al., Clinical Cancer Research, 2005; Nature Clinical Practice, 2005, abstract)

新規マーカーの発見：本方法を利用し、複数種の癌診断に有効な新規 RNA マーカーを見出した。その一つであるテロメラーゼ逆転写酵素遺伝子 (hTERT) は、肝癌 (感度 88.2%)、肺癌 (同 74.0%)、婦人科領域癌 (同 74.4%) に対して現行の腫瘍マーカーを凌駕する感度を示している。肺癌について

は、EGFR mRNA と併用での検出率が 89.2%と更に高い新規マーカーEGFR mRNA も見出している。(Miura N, et al, Cancer Sci, 2006)

また、研究支援者のデータによると胃癌の再発予測に有用との結果を得た (Tani N, et al, Anticancer Res, 2007)。甲状腺がんに関しては実施中である。

癌、炎症、生活習慣病、など多様な病態で検討可能である。 指標が少なく診断に苦勞する病態を選び、診断感度と特異度を高めることを目的とする。1年以内に検体収集を終え、2年間で解析する予定である。劇症肝炎 (Miura N, et al, Hepatology Int. 2008)、ARDS (論文準備中)、リウマチ関連疾患、インスリン抵抗性などを目標に検出系を開発している。

本診断技術のキーポイントは、血清からの微量なマーカーRNAの定量的検出を世界で最も高精度(高正診率)で可能にしたことにある。 今まで血清からRNAは検出されなかったか、検出されても検出感度が極めて低く臨床応用には程遠いものであった。この方法の確立により予想される結果と意義は、血液中のmiRNAを含むマーカーRNAの定量が可能となり、採血試料を用いる疾病診断精度の大幅な向上が期待できることである。本方法が、血清試料からRNA遺伝子を高感度で検出することを可能にした画期的な技術であることは、Nature Clinical Practice 2(8):431, 2005に紹介されたことから証明される。

定量検出の基本的診断技術は開発し、**原理実証的なレベルかつmRNAに関する臨床データは検討を基盤Bでほぼ終え**

ているが、実用化には、各種病態に関する検討を行い、診断工程の迅速化、簡易化、自動化、そして網羅性を実現する必要がある。

これらの成果を踏まえ、この手法を発展させるために、本申請では血液循環するmRNAに留まらず、**血液循環するマイクロRNA (miRNA) を定量測定する系を開発**することを新たな目的とする。なぜなら、アカデミックレベルではmiRNAの定量系は企業の受託利用などが経済的で、現状では臨床応用には向かない。簡易で廉価な検出系が完成すれば、医療、バイオ研究、癌研究等で多大な貢献ができると考える。

しかしmiRNAは、最近の報告によると、cell cycle arrest などの条件下で、miRNA 群が標的蛋白の翻訳を高めることが知られており、このように発癌における興味深くかつ驚くべきmiRNAの役割が潜んでいるにもかかわらず、最近のmiRNA研究者はそれを過小評価している。

- miRNAは細胞死の過程に限らず、分化、発生での役割を担っている。多くの発現形質のプランナーでもあり、stem cell biologyでの解明も待ち遠しい。Originが不明の未分化がんや低分化がんを組織特異的に同定することもmiRNAプロファイルから可能になると考える。このようにmiRNAを通して生体内で、病態に関する多岐に及ぶ影響力を及ぼしている。とりわけ癌促進miRNA (Onco-miR) と癌抑制miRNA (Suppressor-miR) のように癌制御メカニズムが明らかになってきたmiRNA群もあり、さらに低分化がん、未分化がん、テロメレー

ス逆転写酵素を制御し、正常組織より癌組織でより強く発現する miRNA 群も見出している (Miura N, et al, BMC Molecular Biology, 2009)。我々の mRNA 定量系で確立してきた技術を miRNA に応用し、開発する。

2) **試薬開発**：試薬レベルでの商業化に向けて、開発は終了した。JST の援助は得られなかったが、個人出資と共同研究企業の援助でアメリカでの特許取得も得られ、販売に向けて今後展開する段まで到達した。

3) **機器開発**は、PCR の特許の制限があり、2015 年で PCR を利用できるか否かがまだわからないため、共同研究企業が PCR ベースでの開発と、ハイブリダイゼーションベースでの開発の両面で行っており、公的開発資金が得られないため、企業独自で進めている。臨床的有用性を認めた遺伝子として、癌では hTERT, EGFR, 劇症肝炎では TGFA, ARDS や SIRS では、VWF, PDGFA, PBEF1 に注目して、開発を進める。タンパク発現の高い遺伝子での RNA の有用性が低いと想定されたが、同物質でのタンパク検出系と、RNA 検出系での比較検討により、RNA 系の方が凌駕していることを証明した。これを受けて、臨床検査で、プライマリーレベルでの導入が可能を判断し、癌に関して PET との比較検討を膵癌患者血清中 RNA で行い、RNA 診断の有用性を検討した。現在もまだ症例の蓄積をしているが、病態との相関を強く認めている。

4) 今後、機器開発の律速段階は共同研究企業の開発にかかっている。産学連携事業に依拠した共同出願による助成金など応募を毎年数多く続けてきたが、採用されなかったことや、基盤 A へのステップアップによるさらに学術的に深める試みも採用されなかったため、この課題に関して大学側からのアプローチは、断念せざるを得ない。多くの論文を出し、知的財産権も申請し、取得されたものもあるにもかかわらず、何の援助もない状況

が生じることは社会でいう不当なリストラに等しい。極めて残念であり、この体制こそ日本が海外に負けていく根源であると深く実感する。中央中心の補助金ではなく、自立しようとする地方にこそ補助金はあるべきと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Miura N, Sato R, Tsukamoto T, Shimizu M, Kabashima H, Takeda M, Takahashi S, Harada T, West JE, Drabkin H, Mejia JE, Shiota G, Murawaki Y, Virmani A, Gazdar AF, Oshimura M, and Hasegawa J.

A noncoding RNA Gene on 10p15.3 May Function Upstream of hTERT. BMC Mol. Biol., 2:10(1); 5, 2009.

2. Miura N, Hasegawa J, Shiota G. Serum messenger RNA as a biomarker and its clinical usefulness in malignancies. Clinical Medicine Oncology, 2: 511-527, 2008.

3. Miura N, Kabashima H, Shimizu M, Sato R, Tsukamoto T, Harada T, Takahashi S, Endo R, Nakayama N, Takikawa Y, Mochida S, Suzuki K, Hasegawa J, Shiota G.

Clinical impact of serum transforming growth factor-alpha mRNA as a predictive biomarker for the prognosis of fulminant hepatitis.

Hepatology International, 2(2): 213-221, 2008.

[学会発表] (計 5 件)

1. 三浦典正, 遠藤龍人, 滝川康裕, 鈴木一幸, 埼玉医科大学, 中山伸朗, 持田 智, 長谷川純一, 汐田剛史. 劇症肝炎診断における血液中 TGF- α mRNA の臨床的意義. 第 105 回 日本内科学会. 2008 年 4 月 12 日
2. 三浦典正, 長谷川純一, 大崎往夫, 永島美

樹、工藤正俊、河野通盛、萬憲明、大山賢治、丸山茂雄、堀江裕、神戸貴雅、岸本幸広、川崎寛中、汐田剛史. 肝細胞癌バイオマーカー血清TERT mRNAの臨床的有用性の多施設研究. 第44回 日本肝臓学会総会. 2008年6月5日

3. Miura N, Osaki Y, Shimizu M, Kabashima H, Shomori K, Kanbe T, Nagashima M, Kohno M, Oyama K, Mruyama S, Horie Y, Kishimoto Y, Kawasaki H, Kudoh M, Ito H, Hasegawa J, Shiota G. A novel biomarker TERT mRNA is applicable for an early detection of hepatoma. 第 67 回日本癌学会学術総会. 2008 年 10 月 29 日
4. Shimizu M, Miura N, Kabashima H, Shiota G, Hasegawa J. A study of a novel non-coding RNA gene that controls carcinogenesis in vivo. 第 67 回日本癌学会学術総会. 2008 年 10 月 29 日.
5. 浅木彰則、三浦典正、那須淳一郎、梶原猛史、仁科智裕、堀伸一郎、灘野成人、汐田剛史、井口東郎. 肝癌における血清中テロメラーゼ逆転写酵素(hTERT)mRNA の検討. 第 4 6 回癌治療学会. 2008 年 11 月 1 日.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 9 件)

1. 癌診断方法 (特願 2003-39875 号), 汐田剛史, 三浦 典正, 平成 15 年 11 月 21 日出願
2. 国際特許 癌診断方法 (PCT/JP/017542, Goshi Shiota, Norimasa Miura, 02 June 2005 出願
3. 癌診断方法及び肺癌診断方法 (特願 2005-179542 号) 汐田剛史、三浦典正, 平成 17 年 6 月 20 日出願
4. 癌診断方法及び肺癌診断方法 (特願 2005-179803 号) 汐田剛史、三浦典正, 平成 17 年 6 月 20 日
5. 癌診断方法及び肺癌診断方法 (PCT/JP2006/312671), Goshi Shiota, Norimasa Miura, 19 June 2006 国際出願
6. 癌診断方法及び肺癌診断方法

(PCT/JP2006/312672), Goshi Shiota, Norimasa Miura, 19 June 2006 国際出願

7. 肝炎の診断キット及び診断マーカー (特願 2006-193024 号), 汐田剛史, 三浦典正, 平成 18 年 7 月 13 日出願
8. hTERT 発現調節遺伝子 (特願 2007-521154) (PCT出願からの日本移行。PCT出願日 2006/3/28)
9. hTERT 遺伝子の cDNA の製造、それを用いた核酸増幅法、検出方法、それらに用いるプライマー、及びそれらを用いた腫瘍診断キット (特願 2007-227082)、汐田剛史、三浦典正、2007 年 8 月 31 日

○取得状況 (計 1 件)

1. 米国特許 CANCER DIAGNOSTIC METHOD (出願番号未付与) Goshi Shiota, Norimasa Miura, 22 May 2009 米国移行

[その他]

6. 研究組織
(1) 研究代表者

三浦 典正 (MIURA NORIMASA)
鳥取大学・医学部・准教授
研究者番号: 30325005

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

汐田 剛史 (SHIOTA GOSHI)
鳥取大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 70263457