

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016年3月24日(24.03.2016)



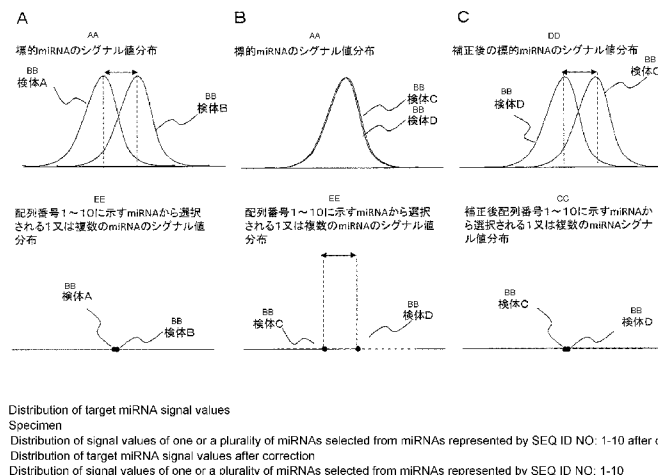
(10) 国際公開番号
WO 2016/043170 A1

- (51) 国際特許分類:
C12Q 1/68 (2006.01) *C12N 15/09* (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) *G01N 33/53* (2006.01)
C12M 1/34 (2006.01) *G01N 37/00* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/076085
- (22) 国際出願日: 2015年9月15日(15.09.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2014-187685 2014年9月16日(16.09.2014) JP
- (71) 出願人: 東レ株式会社(TORAY INDUSTRIES, INC.)
[JP/JP]; 〒1038666 東京都中央区日本橋室町2丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 小園 聡子(KOZONO, Satoko); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究センター内 Kanagawa (JP). 近藤 哲司(KONDOU, Satoshi); 〒2488555 神奈川県鎌倉市手広六丁目10番1号 東レ株式会社基礎研究センター内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人谷川国際特許事務所 (TANIGAWA AND PARTNERS, PATENT FIRM); 〒1020072 東京都千代田区飯田橋一丁目7番10号山京別館801 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[続葉有]

(54) Title: METHOD AND DEVICE FOR COMPARATIVE ANALYSIS OF miRNA EXPRESSION LEVEL

(54) 発明の名称: miRNA発現量の比較解析方法及び装置



(57) Abstract: Disclosed is a method for comparative analysis of miRNA expression levels among a plurality of body fluid specimens. In this comparative analysis method, the expression level of a target miRNA in a body fluid specimen is corrected using the expression level of an endogenous miRNA for correction measured at the same time as the expression level of the target miRNA in the specimen. One or a plurality of miRNAs selected from a specific ten types of endogenous mRNAs for correction is used as the endogenous miRNA for correction. Through the present invention, comparative analysis of a target miRNA among body fluid specimens can be performed more correctly than by the conventional method.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2016/043170 A1



添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

複数の体液検体間でmiRNAの発現量を比較解析する方法が開示されている。本発明の比較解析方法では、体液検体中の標的miRNAの発現量と同時に測定された補正用内因性miRNAの発現量を用いて、当該検体中の標的miRNAの発現量を補正する。補正用内因性miRNAとして、特定の10種の補正用内因性miRNAから選択される1又は複数のmiRNAを用いる。本発明によれば、体液検体間での標的miRNAの比較解析を従来よりも正確に実施できるようになる。

明 細 書

発明の名称 : m i R N A発現量の比較解析方法及び装置

技術分野

[0001] 本発明は、複数の体液検体に含まれるmiRNAの発現量を比較解析するための方法及び装置に関する。

背景技術

[0002] miRNA（マイクロRNA）は、ゲノムDNAからヘアピン様構造のRNA（前駆体）として転写されてくる。この前駆体は、特定の酵素RNase III切断活性を有するdsRNA切断酵素（Drosha、Dicer）により切断された後、二本鎖の形態へと変化し、その後一本鎖となる。そして、片方のアンチセンス鎖がRISCと称するタンパク質複合体に取り込まれ、mRNAの翻訳抑制に関与すると考えられている。このように、miRNAは、転写後、各段階においてその態様は異なるので、通常、miRNAをターゲット（検出対象）とする場合は、ヘアピン構造体、二本鎖構造体、一本鎖構造体等の各種形態を考慮する必要がある。miRNAは15～25塩基のRNAからなり、様々な生物でその存在が確認されている。

[0003] 近年、miRNAは細胞内のみならず、細胞を含まない検体である血清、血漿、尿、脊髄液等の体液にも多く存在し、その発現量が、がんをはじめとした様々な疾患のバイオマーカーとなる可能性が示唆されている。miRNAは2014年6月現在、ヒトで2500種以上が存在し（miRBase release 20）、高感度なDNAマイクロアレイ等の測定系を利用した場合、そのうちの1000種を超えるmiRNAが血清・血漿中で発現を同時に検出することが可能である。そこで、DNAマイクロアレイ法を用いて血清・血漿、尿、脊髄液等の体液を対象としたバイオマーカー探索研究が実施されている。

[0004] 一方、DNAマイクロアレイを用いて遺伝子発現解析を行う場合には、検体や実験者、実験条件により、得られるデータに誤差が生じる可能性があることが知られている。そのため、誤差を補正するためのデータ補正方法が考案されている。

- [0005] 補正には、複数の遺伝子の発現データを一塊とし遺伝子発現データ群としてとらえた場合、遺伝子発現データ群全体の発現量には、いかなる検体であっても差がないという原理を前提とした方法が用いられている。この方法にはグローバルノーマライゼーション法、quantile法、lowess法、75 percentile法などが含まれる。
- [0006] また、検体間で発現量が同一である特定の遺伝子（ベータアクチンやGAPDHなど）に着目し、その遺伝子の検出値が一定になるように、検体ごとにデータを補正する方法も行われている。
- [0007] 特定のmiRNAの発現量が一定になるように補正する方法として、検体で発現しているノンコーディングRNAのうち、さまざまな検体において発現量が一定であるとされる、ハウスキーピングRNA（U1 snoRNA、U2 snoRNA、U3 snoRNA、U4 snoRNA、U5 snoRNA、U6 snoRNA、5S rRNA、5.8S rRNA）を用いて補正する方法が提案されている（特許文献1、特許文献2）。すなわち、特許文献1、特許文献2では、miRNAを検出する際に同時に検出した5S rRNAの検出値が全ての検体で一定となるような操作を行って、miRNAの検出結果を補正している。
- [0008] 一方で、DNAマイクロアレイでは多数のmiRNAを同時に測定することから、限られた種類のハウスキーピングRNAのみを用いて補正する方法は正確性に欠けるとされ、miRNAと同時に複数のmRNAの発現量も測定し、これらの複数のmRNAの発現量を用いてmiRNAの補正を行うという方法が提言されている（特許文献3）。特許文献3では、miRNAを検出する際に同時に検出した複数のmRNAの検出値が全ての検体で一定となるような操作を行って、miRNAの検出結果を補正している。
- [0009] 非特許文献1では、マウス血清中のmiRNA発現量の測定において、内因性miRNAを発現量の補正に利用し、その有効性を評価している。なお、内因性miRNAとは、対象とする検体中（非特許文献1の場合はマウス血清）に自然に存在している、その検体を提供した生物に由来するmiRNAであることを示す。すなわち、非特許文献1では、補正用内因性miRNAの例としてmiR-16、miR-31、mi

R-223を用いて、マウス血清中のmiRNA発現量の補正を試みているが、これらのmiRNAの発現量は個体間で一定していなかったことから、内因性のmiRNAの発現量によって全体のデータ補正を行う方法は採用せず、外部から添加したRNAを基準物質としてデータ補正用に用いることを提案している。要するに、これらの内因性miRNAを用いてmiRNA発現量の補正をすることは適当ではないと結論している。

[0010] 非特許文献2では、ヒト血清中のmiRNAを定量RT-PCRやシーケンス法で検出するにあたり、let-7d、let-7g、let-7iを組み合わせて補正用内因性miRNAとして用いることを提唱している。すなわち、let-7d、let-7g、let-7iの発現量を検体間で一定にする操作を行うことで、測定対象とするmiRNAの発現量を補正している。

先行技術文献

特許文献

[0011] 特許文献1：特開2007-75095号公報

特許文献2：特開2007-97429号公報

特許文献3：特開2014-7995号公報

非特許文献

[0012] 非特許文献1：Roberts, T.C. ら、2014年、PLoS ONE、第9(2)巻、e89237

非特許文献2：Chen, X. ら、2013年、PLoS ONE、第8(11)巻、e79652

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 上記のように、遺伝子発現を検出する場合、検体間で発現量の変動が少ない「ハウスキーピング遺伝子」の発現量を利用して、検出対象とする遺伝子の発現量を補正する方法が一般に用いられている。特によく知られているハウスキーピング遺伝子としては、ACTB、GAPDHなどが挙げられる。しかし、これらの遺伝子は、miRNAとは核酸長や発現量の絶対値が大きく異なっており、miRNAの発現量を補正する目的で使用することは好ましくない。

[0014] そのため、従来、miRNAの発現量を検出する場合には、U1 snoRNA、U2 snoRNA、U3 snoRNA、U4 snoRNA、U5 snoRNA、U6 snoRNA、5S rRNA、5.8S rRNAといったハウスキーピングRNAが主に補正用に用いられてきた。しかしながら、体液中のmiRNAの発現量を測定し、そのデータを補正しようとした場合、U1 snoRNA、U2 snoRNA、U3 snoRNA、U4 snoRNA、U5 snoRNA、U6 snoRNA、5S rRNA、5.8S rRNAは、核内や細胞質内に存在するRNAであるため、細胞を含まない検体である血清、血漿、尿、脊髄液等の体液においてはほとんど発現量を検出することができず、これらを体液中のmiRNAの発現量の検出補正のための指標とすることができないとされている。

[0015] 定量RT-PCR法によるmiRNAの発現量検出においては、血清や血漿中に存在するmiRNAを個別に解析して、検体間での発現量差がない「体液中ハウスキーピングmiRNA」を見出そうとする試みが実施されている。上記のとおり、非特許文献2では、ヒト血清中のmiRNAを定量RT-PCRやシーケンス法で検出するにあたり、let-7d、let-7g、let-7iを組み合わせ用いることを提唱している。しかしながら、これらのmiRNAがDNAマイクロアレイ法においても補正用内因性miRNAとして機能するか否かは不明である。すなわち、DNAマイクロアレイを用いた体液中のmiRNA解析においては、特定の補正用内因性miRNAを用いた有効な補正方法がなかった。

[0016] 一方、DNAマイクロアレイにおいて測定値の補正を実施する場合には、DNAマイクロアレイで測定可能な多数（数百～数万）の遺伝子の全発現量（シグナル値）を用いて補正を行うことが一般に行われている。たとえば、グローバルノーマライゼーション法、クオンタイルノーマライゼーション法などが、その方法として挙げられる。

[0017] ところで、miRNAの発現量から得られる基準値を指標とする場合、基準値を構成するための元データとなるmiRNAがいくつあれば、普遍的な補正用基準値を形成しうるのかという課題がある。特に、測定するmiRNAの数が数個～数十個に限定された、特定用途向けのDNAマイクロアレイにおいては、グローバルノーマライゼーション法などを適用すると、不十分な補正結果をもたらす可

能性が大きい。また、検体中の多数のmRNAの発現量を測定して、これを補正のための基準値とする特許文献3の方法は、組織や細胞由来のRNAについては有効であるが、体液中のmRNAの発現量は極めて低く、これらをmiRNAの発現量補正のための指標とすることは難しい。

[0018] 以上のとおり、複数の体液検体に含まれるmiRNAの発現量を測定し、比較解析しようとする場合に、その測定値を補正する有効な方法は見出されていない。特にDNAマイクロアレイにより少数の補正用内因性miRNAを用いて有効な補正を行うことができる方法は存在していない。本発明は、以上のような課題を解決しようとするものであり、特に検査・診断用途などの比較的少数のmiRNA測定用DNAマイクロアレイの実用化にきわめて重要な課題を解決しようとするものである。

課題を解決するための手段

[0019] 本願発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意研究を重ねた結果、以下の発明を完成した。

(1) 複数の体液検体間で標的miRNAの発現量を比較解析する方法であって、
複数の体液検体について、標的miRNAの発現量の測定及び配列番号1～10に示す補正用内因性miRNAから選択される1又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定を同時に行なう、測定工程；

各体液検体について、配列番号1～10に示す補正用内因性miRNAから選択される1又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値から代表値を取得する、代表値取得工程；

補正用内因性miRNAの発現量に関して任意に設定された基準値と、代表値取得工程で取得された各体液検体の代表値との差又は比を、各体液検体のための標的miRNA発現量の補正係数としてそれぞれ取得する、補正係数取得工程；
及び

各体液検体に対して取得された補正係数をそれぞれ用いて、各体液検体において測定された標的miRNAの発現量を補正する、補正工程
を含む、前記方法。

(2) 前記補正工程では、

(a)前記補正係数取得工程において、前記代表値から前記基準値を減算した値を補正係数として取得する場合、標的miRNAの発現量の測定値から補正係数を減算すること、

(b)前記補正係数取得工程において、前記基準値から前記代表値を減算した値を補正係数として取得する場合、標的miRNAの発現量の測定値に補正係数を加算すること、

(c)前記補正係数取得工程において、前記代表値を前記基準値で除算した値を補正係数として取得する場合、標的miRNAの発現量の測定値を補正係数で除算すること、又は

(d)前記補正係数取得工程において、前記基準値を前記代表値で除算した値を補正係数として取得する場合、標的miRNAの発現量の測定値に補正係数を乗算すること、

により前記補正を行なう、(1)に記載の方法。

(3) 前記基準値は、補正用内因性miRNA発現量に関して任意に定められた固定数値、又は、前記複数の体液検体から任意に選択された第1の体液検体について取得された補正用内因性miRNA発現量の代表値である、(1)又は(2)に記載の方法。

(4) 前記測定工程が、支持体上に固定化された複数の標的miRNAを捕捉するための核酸プローブ及び配列番号1～10に示す補正用内因性miRNAから選択される1又は複数の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブと、標識物質で標識された体液検体由来の核酸試料とを接触させてハイブリダイゼーションを行ない、標的miRNA及び前記1又は複数の補正用内因性miRNAの発現量をそれぞれシグナル強度測定値として得ることを含む、(1)ないし(3)のいずれか1項に記載の方法。

(5) 前記体液検体が、血液、血清又は血漿である、(1)ないし(4)のいずれか1項に記載の方法。

(6) 前記代表値が、配列番号1～10に示す補正用内因性miRNAから選択さ

れる 1 又は複数の補正用内因性miRNA発現量の測定値から算出された、対数値で表された平均値又は中央値である、(1)ないし(5)のいずれか 1 項に記載の方法。

(7) 複数の体液検体における標的miRNAの発現量を比較解析するmiRNA発現解析装置であって、

複数の体液検体について測定された、標的miRNAの発現量の測定値及び配列番号 1 ～ 10 に示す補正用内因性miRNAから選択される 1 又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値を記憶する記憶手段；

各体液検体について、配列番号 1 ～ 10 に示す補正用内因性miRNAから選択される 1 又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値から代表値を取得する、代表値取得手段；

補正用内因性miRNAの発現量に関して任意に設定された基準値と、前記代表値取得手段によって取得された各体液検体の代表値との差又は比を、各体液検体のための標的miRNA発現量の補正係数としてそれぞれ取得する、補正係数取得手段；

各体液検体に対して取得された補正係数をそれぞれ用いて、各体液検体において測定された標的miRNAの発現量を補正する、補正手段；及び

補正済みの標的miRNA発現量により、少なくとも 2 つの体液検体の間で標的miRNA発現量を対比した結果を出力する出力手段を含む、前記装置。

(8) 前記補正手段は、

(a)前記補正係数取得手段において、前記代表値から前記基準値を減算した値を補正係数として取得する場合、標的miRNAの発現量の測定値から補正係数を減算すること、

(b)前記補正係数取得手段において、前記基準値から前記代表値を減算した値を補正係数として取得する場合、標的miRNAの発現量の測定値に補正係数を加算すること、

(c)前記補正係数取得手段において、前記代表値を前記基準値で除算した値を

補正係数として取得する場合、標的miRNAの発現量の測定値を補正係数で除算すること、又は

(d)前記補正係数取得手段において、前記基準値を前記代表値で除算した値を補正係数として取得する場合、標的miRNAの発現量の測定値に補正係数を乗算すること、

により前記補正を行う、(7)に記載の装置。

(9) 前記記憶手段に記憶される、複数の各体液検体に含まれる標的miRNAの発現量の測定値及び配列番号1～10に示す補正用内因性miRNAから選択される1又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値は、支持体上に固定化された複数の標的miRNAを捕捉するためのプローブ及び前記1又は複数の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブと、標識物質で標識された体液検体由来の核酸試料とを接触させてハイブリダイゼーションを行ない、標的miRNA及び前記1又は複数の補正用内因性miRNAの発現量をシグナル強度測定値としてそれぞれ測定された値である、(7)又は(8)に記載の装置。

(10) 複数の体液検体間で標的miRNAの発現量を比較解析するために、1又は複数のコンピューターに、

複数の各体液検体について、標的miRNAの発現量の測定及び配列番号1～10に示す補正用内因性miRNAから選択される1又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定を同時に行なう、測定工程；

各体液検体について、配列番号1～10に示す補正用内因性miRNAから選択される1又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の各測定値から代表値を取得する、代表値取得工程；

補正用内因性miRNAの発現量に関して任意に設定された基準値と、代表値取得工程で取得された各体液検体の代表値との差又は比を、各体液検体のための標的miRNA発現量の補正係数としてそれぞれ取得する、補正係数取得工程；及び

各体液検体に対して取得された補正係数をそれぞれ用いて、各体液検体において測定された標的miRNAの発現量を補正する、補正工程

を実行させるためのプログラム。

(11) 複数の体液検体間で標的miRNAの発現量を比較解析するために、1又は複数のコンピューターを、

複数の各体液検体に含まれる標的miRNAの発現量の測定値及び配列番号1～10に示す補正用内因性miRNAから選択される1又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値を記憶する記憶手段；

各体液検体について、配列番号1～10に示す補正用内因性miRNAから選択される1又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値から代表値を取得する、代表値取得手段；

補正用内因性miRNAの発現量に関して任意に設定された基準値と、前記代表値取得手段によって取得された各体液検体の代表値との差又は比を、各体液検体のための標的miRNA発現量の補正係数としてそれぞれ取得する、補正係数取得手段；

各体液検体に対して取得された補正係数をそれぞれ用いて、各体液検体において測定された標的miRNAの発現量を補正する、補正手段；及び

補正済みの標的miRNA発現量により、少なくとも2つの体液検体の間で標的miRNA発現量を対比した結果を出力する出力手段

として機能させるためのプログラム。

(12) (10)又は(11)に記載のプログラムを記録した、コンピューター読み取り可能な記録媒体。

(13) 複数の標的miRNAを捕捉するためのプローブ及び配列番号1～10に示す補正用内因性miRNAから選択される1又は複数の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブが固定化された支持体を含む、miRNA発現解析用チップ。

発明の効果

[0020] 本発明によれば、複数の体液検体に含まれる標的miRNAの発現量を比較解析する場合、特にマイクロアレイ等を用いて多数のmiRNAの発現量を測定し、検体間でmiRNA発現量を比較する場合に、従来よりも正確にmiRNA発現量を補正

することができる。本発明により、検体間での標的miRNAの比較解析がより正確に実施できるようになる。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]本発明の方法の概念図である。

[図2]本発明の解析装置の構成の概略を示すブロック図である。

[図3]本発明による標的miRNAの発現量の補正処理のフローチャートの一例である。

[図4-1]実施例2に示す方法で測定、補正されたDNAマイクロアレイ検出によるmiRNAシグナル値のヒストグラムを示す。A：補正前、B：hsa-miR-6085による補正、C：hsa-miR-1227-5pによる補正、D：hsa-miR-2861による補正、E：hsa-miR-149-3pによる補正、F：hsa-miR-4463による補正、G：hsa-miR-4508による補正

[図4-2]実施例2に示す方法で測定、補正されたDNAマイクロアレイ検出によるmiRNAシグナル値のヒストグラムを示す。A：補正前、H：hsa-miR-6090による補正、I：hsa-miR-6775-5pによる補正、J：hsa-miR-6803-5pによる補正、K：hsa-miR-5787による補正

[図5]実施例2に示す方法で測定、補正されたDNAマイクロアレイ検出によるmiRNAシグナル値のヒストグラムを示す。

[図6]比較例1に示す方法で測定、補正されたDNAマイクロアレイ検出によるmiRNAシグナル値のヒストグラムを示す。

[図7]比較例2に示す方法で測定、補正されたDNAマイクロアレイ検出によるmiRNAシグナル値のヒストグラムを示す。

[図8-1]実施例4に示す方法で測定、補正されたDNAマイクロアレイ検出によるmiRNAシグナル値のヒストグラムを示す。A：補正前、B：hsa-miR-149-3p、hsa-miR-1227-5p、hsa-miR-2861の組合せによる補正、C：hsa-miR-149-3p、hsa-miR-1227-5p、hsa-miR-4508の組合せによる補正、D：hsa-miR-149-3p、hsa-miR-1227-5p、hsa-miR-4463の組合せによる補正、E：hsa-miR-149-3p、hsa-miR-2861、hsa-miR-4508の組合せによる補正

[図8-2]実施例4に示す方法で測定、補正されたDNAマイクロアレイ検出によるmiRNAシグナル値のヒストグラムを示す。A：補正前、F：hsa-miR-149-3p、hsa-miR-2861、hsa-miR-4463の組合せによる補正、G：hsa-miR-1227-5p、hsa-miR-2861、hsa-miR-4508の組合せによる補正、H：hsa-miR-1227-5p、hsa-miR-2861、hsa-miR-4463の組合せによる補正、I：hsa-miR-1227-5p、hsa-miR-4508、hsa-miR-4463の組合せによる補正

発明を実施するための形態

[0022] まず、本発明で行なう標的miRNAの補正方法の概念について、図1に基づいて説明する。図1では、体液検体中のRNAを標識し、複数種類の標的miRNAを捕捉するためのプローブ（以下、「標的miRNA捕捉プローブ」ともいう。）及び配列番号1～10に示すmiRNAから選択される1又は複数のmiRNA（以下、「補正用内因性miRNA」ともいう。）を捕捉するためのプローブ（以下、「補正用内因性miRNA捕捉プローブ」ともいう。）が固定されたマイクロアレイで検出した結果を、各miRNAの発現量の測定値であるシグナル値のヒストグラムによって模式的に示している。以下、標的miRNAを捕捉するためのプローブ又は補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブを、総じて「miRNA捕捉プローブ」又は単に「プローブ」ともいう。

[0023] 図1Aでは、体液検体A及び体液検体Bから抽出した検体の標的miRNAを、それぞれDNAマイクロアレイを用いて解析した結果を、ヒストグラムで示している。マイクロアレイに搭載されている複数の標的miRNA捕捉プローブから得られたシグナル値、及び本発明の補正用内因性miRNA捕捉プローブから得られたシグナル値のヒストグラムをそれぞれ示している。体液検体Aと体液検体Bでは、miRNAのヒストグラムが大きくずれている。このことから、検体間でmiRNAの発現量に大きな差があると解釈できる。一方、実験誤差により差が生じているとも解釈できる。どちらが正しいか、miRNAのヒストグラムのみからは判断することができない。

[0024] ところで、ここに体液中の存在量が常に一定である補正用内因性miRNAが存在する場合、この補正用内因性miRNAのシグナル値の値は検体間で一致するは

ずである。

[0025] 図1Aで示した、補正用内因性miRNA捕捉プローブから得られたシグナル値のヒストグラムは、体液検体Aと体液検体Bではほぼ同じ分布を示している。すなわち、体液検体Aと体液検体Bは正しく実験に供せられ、実験誤差はないと判断することができる。この場合には、体液検体A B間でmiRNAの発現量に大きな差があるということになり、体液検体間での比較をするに当たってmiRNAのシグナル値の補正は不要である。

[0026] 図1Bでは、DNAマイクロアレイを用いて体液検体C及び体液検体Dを解析した結果を模式的に示している。標的miRNA捕捉プローブから得られたシグナル値、及び補正用内因性miRNA捕捉プローブから得られたシグナル値をそれぞれ示している。

[0027] 体液検体Cと体液検体Dでは、miRNAのヒストグラムが同じような分布を示している。一方、補正用内因性miRNA捕捉プローブから得られたシグナル値のヒストグラムは、体液検体Cと体液検体Dでは大きくずれている。このことから体液検体Cと体液検体Dの検出結果には、何らかの原因によって実験誤差が生じていることが分かる。このような場合には体液検体C D間での比較をするに当たり、miRNAのシグナル値を適切に補正する必要がある。

[0028] 本発明に従い、標的miRNAのシグナル値を補正した後のヒストグラムを図1Cに示した。補正の具体的な方法は後述の通りである。体液検体Cと体液検体Dの補正用内因性miRNA捕捉プローブから得られたシグナル値のヒストグラムが一致するよう、体液検体Cのデータを補正した。この補正により、補正用内因性miRNA捕捉プローブから得られたシグナル値のヒストグラムは体液検体Cと体液検体Dで一致するようになり、同じ補正係数を用いて補正された標的miRNA捕捉プローブのシグナル値のヒストグラムは、大きくずれてくる。つまり、検体C D間でも、標的miRNAの発現量には大きな差があるということになる。

[0029] ここでは2つの体液検体間でのmiRNAのシグナル値を補正する方法を示したが、比較する体液検体は2つに限らず、無限に比較することができる。3つ

以上の体液検体を比較する場合には、例えば、あらかじめ補正用内因性miRNA捕捉プローブから得られるシグナル値を、一定の数値（定数）と仮定しておき、この定数に対する、各体液検体の補正用内因性miRNA捕捉プローブから得られるシグナル値の差又は比を計算して、その差を体液検体中の標的miRNAのシグナル値に対して加算もしくは減算するか、比の逆数を体液検体中の標的miRNAのシグナル値に対して乗算もしくは除算することで、容易に多数の検体間の補正を行うことができる。

[0030] 本発明では、複数の検体間でmiRNAの発現量を比較解析する。検体数は2つでもよいし、3つ以上でもよい。

[0031] 「miRNA」とは、生体内で作られる鎖長15～25塩基程度の短鎖RNAを意味するノンコーディングRNA（ncRNA）の一種であり、mRNAの発現を調節する機能を有すると考えられている。miRNAは、ゲノムDNAからヘアピン様構造のRNA（前駆体）として転写されてくる。この前駆体は、特定の酵素RNase III切断活性を有するdsRNA切断酵素（Drosha、Dicer）により切断された後、二本鎖の形態へと変化し、その後一本鎖となる。そして、片方のアンチセンス鎖がRISCと称するタンパク質複合体に取り込まれ、mRNAの翻訳抑制に関与すると考えられている。このように、miRNAは、転写後、各段階においてその態様は異なるので、通常、miRNAをターゲット（検出対象）とする場合は、ヘアピン構造体、二本鎖構造体、一本鎖構造体等の各種形態を考慮する必要がある。miRNAは様々な生物でその存在が確認されている。

[0032] 本発明を適用できる検体は、生体から分離された体液検体であり、例えば、血液、血清、血漿、尿、髄液、唾液、ぬぐい液、各種組織液等の体液を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。比較解析する複数の検体は、異なる体液に由来する複数の検体でもよいし、異なる生体から分離された同一種類の体液に由来する複数の体液検体でもよい。

[0033] これらの検体からRNAを抽出し、このRNAを用いてmiRNAの発現量を測定する。そのようなRNAの抽出方法は公知であり（例えば、Favaloroらの方法（Favaloro et.al., Methods Enzymol.65: 718-749（1980））等）、そのためのキッ

トも各種市販されている（例えば、キアゲン社のmiRNeasy、東レ社の”3D-Gen e” RNA extraction reagent from liquid sample等）。

[0034] 本発明で「内因性」という場合、人工的に検体に添加されたものではなく、検体中に自然に存在することを意味する。たとえば「内因性miRNA」と言った場合、検体中に自然に存在している、その検体を提供した生物に由来するmiRNAを示す。

[0035] <測定工程>

本発明の比較解析方法では、検体中の複数種類の標的miRNAの発現量の測定と同時に、1又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定も行なう。補正用内因性miRNAの発現量は、後述する通り、標的miRNAの発現量を補正するための補正係数の算出に使用される。複数のmiRNAの発現量の同時測定は、例えば、対象のmiRNAに特異的に結合するプローブを支持体上に固定化した、マイクロアレイ等のアレイチップを用いたハイブリダイゼーションアッセイにより行なうことができる。本発明においては、複数の標的miRNA捕捉プローブと1又は複数の補正用内因性miRNA捕捉プローブとが固定化された支持体を含むアレイチップを用いればよい。

[0036] 「捕捉プローブ」又は「捕捉するためのプローブ」とは、捕捉対象のmiRNAと直接的又は間接的に、好ましくは直接的に、かつ選択的に結合し得る物質を意味し、代表的な例として、核酸、タンパク質、糖類及び他の抗原性化合物を挙げることができる。本発明においては、核酸プローブを好ましく用いることができる。核酸は、DNAやRNAのほか、PNA（ペプチド核酸）やLNA（Locked Nucleic Acid）などの核酸誘導体を用いることができる。ここで誘導体とは、核酸の場合、蛍光団などによるラベル化誘導体、修飾ヌクレオチド（例えば、ハロゲン、メチルなどのアルキル、メトキシなどのアルコキシ、チオ、カルボキシメチルなどの基を含むヌクレオチド、及び塩基の再構成、二重結合の飽和、脱アミノ化、酸素分子の硫黄分子への置換などを受けたヌクレオチドなど）を含む誘導体などの化学修飾誘導体を意味する。

[0037] 核酸プローブの鎖長は、ハイブリダイゼーションの安定性と特異性を確保

する観点から、検出対象とするmiRNAの長さ以上とすることが好ましい。通常、17～25塩基程度の鎖長とすれば、プローブが対象とするmiRNAへの選択的結合性を十分に発揮することができる。そのような鎖長の短いオリゴ核酸プローブは、周知の化学合成法等により容易に調製することができる。

[0038] 核酸プローブは、対象のmiRNAと完全に相補的な塩基配列とすることが好ましいが、一部に相違があっても、対象のmiRNAとストリンジेंटな条件でハイブリダイズできる程度に相同性の高い塩基配列であれば、捕捉プローブとして使用可能である。

[0039] ハイブリダイゼーション時のストリンジエンシーは、温度、塩濃度、プローブの鎖長、プローブのヌクレオチド配列のGC含量及びハイブリダイゼーション緩衝液中のカオトロピック剤の濃度の関数であることが知られている。ストリンジेंटな条件としては、例えば、Sambrook, J. et al. (1998) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, New Yorkに記載された条件などを用いることができる。ストリンジेंटな温度条件は、約30℃以上である。その他の条件としては、ハイブリダイゼーション時間、洗浄剤（例えば、SDS）の濃度、及びキャリアDNAの存否等であり、これらの条件を組み合わせることによって、様々なストリンジエンシーを設定することができる。当業者は、所望する検体RNAの検出のために用意した捕捉プローブとしての機能を得るための条件を適宜決定することができる。

[0040] miRNAの配列情報は、GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)等のデータベースから入手することができる。また、miRNAの配列情報は、例えばmiRBaseのウェブサイト (<http://www.mirbase.org/>) から入手することができる。補正用内因性miRNA捕捉プローブ、及び標的miRNA捕捉プローブは、これらのサイトから入手できる配列情報に基づいて設計することができる。

[0041] 支持体上に固定化されるmiRNA捕捉プローブの数は特に限定されない。例えば、配列が同定されている公知のmiRNAの全てを網羅する数のmiRNA捕捉プロ

ープを支持体上に固定化したものを用いて、miRNAの発現量を測定してもよいし、所望の数のmiRNA捕捉プローブを支持体上に固定化したものを用いてもよい。

[0042] 捕捉プローブが整列固定化される支持体としては、公知のマイクロアレイやマクロアレイ等で使用されている支持体と同様のものを用いることができ、例えばスライドガラスや膜、ビーズなどを用いることができる。特許第4244788号等に記載されている、表面に複数の凸部を有する形状の支持体を用いることもできる。支持体の材質は、特に限定されないが、ガラス、セラミック、シリコンなどの無機材料；ポリエチレンテレフタレート、酢酸セルロース、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレート、シリコーンゴム等のポリマーなどを挙げることができる。

[0043] 支持体に捕捉プローブを固定化する方法としては、支持体表面上でオリゴDNAを合成する方法と、あらかじめ合成しておいたオリゴDNAを支持体表面へ滴下し固定する方法が知られている。

[0044] 前者の方法としては、Ronaldらの方法（米国特許第5705610号明細書）、Michelらの方法（米国特許第6142266号明細書）、Francescoらの方法（米国特許第7037659号明細書）が挙げられる。これらの方法ではDNA合成反応時に有機溶媒を用いるため、支持体は有機溶媒に耐性のある材質であることが望ましい。また、Francescoらの方法では、支持体の裏面から光を照射してDNA合成を制御するため、支持体は透光性を有する材質であることが好ましい。

[0045] 後者の方法としては、廣田ら（特許第3922454号）の方法やスポッターを用いる方法を挙げることができる。スポットの方式としては、固相へのピン先端の機械的な接触によるピン方式、インクジェットプリンターの原理を利用したインクジェット方式、毛細管によるキャピラリー方式等が挙げられる。スポット処理した後は、必要に応じてUV照射によるクロスリンク、表面のブロッキング等の後処理が行なわれる。表面処理した支持体表面に共有結合でオリゴDNAを固定化させるため、オリゴDNAの末端にはアミノ

基やS H基等の官能基が導入される。支持体の表面修飾は、通常、アミノ基等を有するシランカップリング剤処理によって行なわれる。

[0046] 支持体上に固定化された各miRNA捕捉プローブとのハイブリダイゼーションは、体液検体から抽出したRNAから、標識物質で標識された核酸試料（体液検体由来の核酸試料）を調製し、この標識核酸試料をプローブと接触させることにより実施する。「体液検体由来の核酸試料」には、体液検体から抽出したRNAのほか、該RNAから逆転写反応により調製されたcDNA及びcRNAが包含される。標識された体液検体由来の核酸試料は、検体RNAを直接的又は間接的に標識物質で標識したものでもよいし、また、検体RNAから調製されたcDNAやcRNAを直接的又は間接的に標識物質で標識したものでもよい。

[0047] 体液検体由来の核酸試料に標識物質を結合させる方法としては、核酸試料の3'末端に標識物質を結合させる方法、5'末端に標識物質を結合させる方法、標識物質が結合したヌクレオチドを核酸に取り込ませる方法を挙げることができる。3'末端に標識物質を結合させる方法、5'末端に標識物質を結合させる方法では酵素反応を用いることができる。酵素反応には、T4 RNA LigaseやTerminal Deoxitidil Transferase、Poly A polymeraseなどを用いることができる。いずれの標識方法も「Shao-Yao Ying編、miRNA実験プロトコール、羊土社、2008年」に記載されている方法を参考にすることができる。また、RNAの末端に直接又は間接的に標識物質を結合させるためのキットが各種市販されている。例えば、3'末端に直接又は間接的に標識物質を結合させるキットとしては、“3D-Gene” miRNA labeling kit（東レ社）、miRCURY miRNA HyPower labeling kit（エキシコン社）、NCode miRNA Labeling system（ライフテクノロジーズ社）、FlashTag Biotin RNA Labeling Kit（ジェニスフィア社）等を例示することができる。

[0048] このほか、従来法と同様に、標識したデオキシリボヌクレオチド又は標識したリボヌクレオチドの存在下で検体RNAからcDNA又はcRNAを合成することにより、標識物質が取り込まれたcDNA又はcRNAを調製し、これをアレイ上のプローブとハイブリダイズさせる、という方法も可能である。

[0049] 本発明では、複数の検体を用いるが、いずれにも同一の標識物質を用いてよい。

[0050] 本発明において、使用できる標識物質としては、公知のマイクロアレイ解析においても使用されている各種の標識物質を挙げることができる。具体的には、蛍光色素、りん光色素、酵素、放射線同位体などが挙げられるが、これらに限定されない。好ましいのは、測定が簡便で、シグナルが検出しやすい蛍光色素である。具体的には、シアニン（シアニン2）、アミノメチルクマリン、フルオロセイン、インドカルボシアニン（シアニン3）、シアニン3.5、テトラメチルローダミン、ローダミンレッド、テキサスレッド、インドカルボシアニン（シアニン5）、シアニン5.5、シアニン7、オイスターなどの公知の蛍光色素が挙げられるが、これらに限定されない。

[0051] また、標識物質としては、発光性を有する半導体微粒子を用いてもよい。このような半導体微粒子としては、例えばカドミウムセレン（CdSe）、カドミウムテルル（CdTe）、インジウムガリウムリン（InGaP）、シルバーインジウム硫化亜鉛（AgInZnS）などが挙げられる。

[0052] 上記のようにして標識された体液検体由来の核酸試料を支持体上のmiRNA捕捉プローブと接触させ、核酸試料とプローブをハイブリダイズさせる。このハイブリダイゼーション工程は、従来と全く同様に行うことができる。反応温度及び時間は、ハイブリダイズさせる核酸の鎖長に応じて適宜選択されるが、核酸のハイブリダイゼーションの場合、通常、30℃～70℃程度で1分間～十数時間である。ハイブリダイゼーションを行ない、洗浄後、支持体上の個々のプローブ固定化領域における標識物質からのシグナル強度を検出する。シグナル強度の検出は、標識物質の種類に応じて適当なシグナル読取装置を用いて行なう。蛍光色素を標識物質として用いた場合には、蛍光顕微鏡や蛍光スキャナー等を用いればよい。

[0053] 検出されたシグナル値は、周辺ノイズと比較される。具体的には、プローブ固定化領域から得られたシグナル値と、それ以外の位置から得られたシグナル値を比較し、前者の数値が上回っている場合を検出された（有効判定陽

性)とする。

[0054] 検出されたシグナル値に、バックグラウンドノイズが含まれている場合には、バックグラウンドノイズを減算してもよい。周辺ノイズをバックグラウンドノイズとして、検出したシグナル値から減算することもできる。その他、「藤淵航、堀本勝久編、マイクロアレイデータ統計解析プロトコル、羊土社、2008年」に記載されている方法を用いても良い。

[0055] 上記の方法によると、補正用内因性miRNA及び標的miRNAの発現量の測定値が、シグナル強度の測定値として得られる。

[0056] <代表値取得工程>

本発明の解析方法では、次いで、各検体について、補正用内因性miRNAの発現量の測定値から代表値、好ましくは対数値で表された代表値を取得する（代表値取得工程）。本発明における「対数値」とは、底が2の対数に変換された値を意味する。

[0057] 複数の補正用内因性miRNAを使用する場合、代表値は、それら複数の補正用内因性miRNAの発現量の各測定値から算出された平均値又は中央値、好ましくは対数値で表された平均値又は中央値が採用される。補正用内因性miRNAを1つだけ使用する場合、当該補正用内因性miRNAの発現量の測定値、好ましくは該測定値の対数値がそのまま代表値として採用され得る。あるいは、後述する通り、1種類の補正用内因性miRNAに対して複数の捕捉プローブがスポットされているアレイチップを用いる場合には、それら複数のスポット（プローブ固定化領域）からのシグナル測定値より、平均値又は中央値、好ましくは対数値で表された平均値又は中央値を求め、代表値とすることができる。

[0058] 「対数値で表された平均値」とは、複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値（例えば、マイクロアレイを用いて得られたシグナル強度の測定値）を底が2の対数に変換した対数値で求めた平均値を意味する。代表値が中央値の場合、「対数値で表された中央値」とは、複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値（例えば、マイクロアレイを用いて得られたシグナル強度の測定値）を底が2の対数に変換した対数値の中央値、又は補正用内因性miRNA発現

量測定値の中央値を底が2の対数に変換した対数値を意味する。中央値の場合は、測定値の対数変換を先に行なっても後に行なっても同じ値が得られる。

[0059] 平均値及び中央値は、実際に測定対象とした複数の補正用内因性miRNAの全ての測定値を用いて求めたものであってもよいし、該複数の補正用内因性miRNAのうちから抽出された一部の測定値を用いて求めたものであってもよい。例えば、マイクロアレイに搭載されている補正用内因性miRNA捕捉プローブで得られた全ての補正用内因性miRNAの測定値を用いて求めてもよいし、全補正用内因性miRNA捕捉プローブのうちの一部（例えば、マイクロアレイに搭載されている補正用内因性miRNA捕捉プローブが10種であったとすると、そのうちの3種）を抽出して求めてもよい。また、1種の補正用内因性miRNAに対して複数スポットされている、補正用内因性miRNA捕捉プローブから得られる測定値であってもよい。例えば、比較解析すべき全ての検体に共通して有効判定陽性であった補正用内因性miRNA捕捉プローブ固定化領域のみを抽出して、補正用内因性miRNAの代表値を取得することができる。

[0060] 次いで、代表値取得工程で得られた各検体の補正用内因性miRNAの代表値と、補正用内因性miRNAの発現量に関して任意に設定された基準値とを用いて、標的miRNAの発現量の補正に用いる補正係数を取得する（補正係数取得工程）。この補正係数取得工程には、下記の補正係数取得工程－1又は補正係数取得工程－2の工程を適用しうる。

[0061] <補正係数取得工程－1>

補正係数取得工程－1は、補正用内因性miRNAの代表値と基準値との差を利用する方法である。本工程には、下記の1－1．基準検体取得法、又は1－2．固定数値補正法を適用し得る。

[0062] 1－1．基準検体取得法

miRNAの検出対象とする複数の体液検体の中から任意に1検体（第1の検体）を選択し、これを「基準検体」とする。残りの1又はそれ以上の検体（第2以降の検体）が、「補正される検体」となる。

[0063] なお、本明細書において、「第2以降の検体」という語には、第2の検体も包含される。例えば、比較すべき複数の検体が2つであれば、補正される検体は第2の検体のみであり、比較すべき複数の検体が3つであれば、補正される検体は第2の検体及び第3の検体の2つである。

[0064] この方法では、基準検体の補正用内因性miRNAの代表値を「基準値」とする。当該基準値と、第2以降の各検体（補正される検体）の補正用内因性miRNAの代表値との差を、当該第2以降の各検体のための補正係数として用いる。補正係数は、補正される検体の数だけ取得されることになる。

[0065] 具体的には、補正係数は、式1又は式1'で求められる。

[0066] c_{1-1} = (基準検体の補正用内因性miRNAの代表値 (基準値))
 - (補正される検体の補正用内因性miRNAの代表値) . . . 式1
 c_{1-1}' = (補正される検体の補正用内因性miRNAの代表値)
 - (基準検体の補正用内因性miRNAの代表値 (基準値)) . . .
 式1'

[0067] 例えば、マイクロアレイを用いて発現量の測定を実施し、補正用内因性miRNAの代表値として平均値を用いる場合、補正される検体のための補正係数は、式2又は式2'で求めることができる。

[0068] [数1]

$$c_{1-1} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 A_j - \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 X_j \quad \dots \text{式2}$$

[0069] [数2]

$$c_{1-1}' = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 X_j - \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 A_j \quad \dots \text{式2'}$$

[0070] ここで、式2、式2'中、

n は、支持体上の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域の総数、

A_j は、基準検体における、 j 番目 ($1 \leq j \leq n$) の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域からのシグナル測定値、

X_j は、第2の検体における、 j 番目 ($1 \leq j \leq n$) の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域からのシグナル測定値、である。

[0071] プローブが補正用内因性miRNAと1対1対応である場合、 n は、支持体上の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブがターゲットとする補正用内因性miRNAの数に等しい。

[0072] 式2及び式2'においては、 n に代えて、比較すべき全ての検体で共通して有効判定陽性であった補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域の総数 n' を用いることもできる。

[0073] 1-2. 固定数値補正法

補正用内因性miRNAの代表値について、すべての検体において一定の数値をとるものとあらかじめ仮定する方法である。すなわち、固定した数値と、各検体由来の補正用内因性miRNAの代表値との差を得て、この差を補正係数として利用する。当該方法では、この固定した数値を「基準値」として用いる。補正係数は、補正される検体の数だけ取得されることになる。なお、この場合、1-1. に示した「基準検体」は存在しないので、miRNAの検出対象とする複数の検体すべてが、「補正される検体」となる。

[0074] 具体的には、補正係数は、式3又は式3'で求められる。

[0075] $r_{1-2} = (\text{固定数値(基準値)})$

— (補正される検体の補正用内因性miRNAの代表値) . . . 式3

$r_{1-2}' = (\text{補正される検体の補正用内因性miRNAの代表値})$

— (固定数値(基準値)) . . . 式3'

[0076] 例えば、補正用内因性miRNAの代表値として平均値を用いる場合、補正される検体のための補正係数は、式4又は式4'で求めることができる。

[0077] [数3]

$$r_{1-2} = \alpha - \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 Y_j \quad \dots \text{式4}$$

[0078]

[数4]

$$r_{1-2}' = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 Y_j - \alpha \quad \dots \text{式4'}$$

[0079] ここで、式4、式4' 中、

α は基準値、

n は、支持体上の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域の総数、

Y_j は、検体における、 j 番目 ($1 \leq j \leq n$) の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域からのシグナル測定値、である。

[0080] プローブが補正用内因性miRNAと1対1対応である場合、 n は、支持体上の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブがターゲットとする補正用内因性miRNAの数に等しい。

[0081] 式2及び式2' においては、 n に代えて、比較すべき全ての検体で共通して有効判定陽性であった補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域の総数 n' を用いることもできる。

[0082] 固定数値補正法で基準値として用いる固定数値は、少なくとも1回の比較解析において、全ての検体に対して一貫して同一の数値を使用する限り、いかなる数値（ただし0以外）を用いてもよい。同一の発現測定システムを使用し、かつ、常に同一の数値を固定数値として使用することとすれば、別の日に発現量の測定を行なった体液検体の間でも比較解析が可能である。特に限定されないが、固定数値は、補正係数の取得に用いる1又は複数の補正用内因性miRNAが一般的にとり得る発現量の数値を採用し得る。発現量の測定に使用するシステムによってそのような一般的にとり得る数値は変動し得るため、使用するシステムに応じて固定数値は自由に選択できる。

[0083] 例えば、1種類の補正用内因性miRNAを用いる場合、比較解析対象の複数の体液検体における当該補正用内因性miRNAの発現量の平均値を求め、これを固定数値として利用してもよい。3種類の補正用内因性miRNAを用いる場合、複

数の体液検体におけるこれら3種のmiRNA全ての発現量の平均値を求め、これを固定数値として利用してもよい。また、多数の体液検体を用いて予め固定数値を定めておき、この固定数値をその後の解析に繰り返し使用してもよい。

[0084] <補正係数取得工程－2>

補正係数取得工程－2は、補正用内因性miRNAの代表値と基準値との比を利用する方法である。本工程には、下記の2－1．基準検体取得法、又は2－2．固定数値補正法を適用し得る。

[0085] 2－1．基準検体取得法

miRNAの検出対象とする複数の検体の中から任意に1検体（第1の検体）を選択し、これを「基準検体」とする。残りの第2以降の検体が、「補正される検体」となる。

[0086] この方法では、基準検体の補正用内因性miRNAの代表値を「基準値」とし、当該基準値と、第2以降の各検体（補正される検体）の補正用内因性miRNAの各代表値との比を、当該第2以降の各検体のための補正係数として用いる。補正係数は、補正される検体の数だけ取得されることになる。

[0087] 具体的には、補正係数は、式5又は式5'で求められる。

$$c_{2-1} = \left(\text{基準検体の補正用内因性miRNAの代表値 (基準値)} \right) / \left(\text{補正される検体の補正用内因性miRNAの代表値} \right) \quad \dots \text{式5}$$

$$c_{2-1}' = \left(\text{補正される検体の補正用内因性miRNAの代表値} \right) / \left(\text{基準検体の補正用内因性miRNAの代表値 (基準値)} \right) \quad \dots \text{式5'}$$

[0089] 例えば、マイクロアレイを用いて発現量の測定を実施し、補正用内因性miRNAの代表値として平均値を用いる場合、第2の検体のための補正係数は、式6又は式6'で求めることができる。

[0090] [数5]

$$c_{2-1} = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 A_j \div \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 X_j \quad \dots \text{式6}$$

[0091] [数6]

$$c_{2-1}' = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 X_j \div \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 A_j \quad \dots \text{式6'}$$

[0092] ここで、式6、式6' 中、

n は、支持体上の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域の総数、

A_j は、基準検体における、j 番目（1 ≤ j ≤ n）の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域からのシグナル測定値、

X_j は、第2の検体における、j 番目（1 ≤ j ≤ n）の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域からのシグナル測定値、である。

[0093] プローブが補正用内因性miRNAと1対1対応である場合、n は、支持体上の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブがターゲットとする補正用内因性miRNAの数に等しい。

[0094] 式6及び式6' においては、nに代えて、比較すべき全ての検体で共通して有効判定陽性であった補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域の総数n' を用いることもできる。

[0095] 2-2. 固定数値補正法

補正用内因性miRNAの代表値について、すべての検体において一定の数値をとるものとあらかじめ仮定する方法である。すなわち、固定した数値に対する、各検体由来の補正用内因性miRNAの代表値の比を得て、この比を補正係数として利用する。当該方法では、この固定した数値を「基準値」として用いる。補正係数は、補正される検体の数だけ取得されることになる。なお、この場合、2-1. に示した「基準検体」は存在しないので、miRNAの検出対象とする複数の検体すべてが、「補正される検体」となる。

[0096] 具体的には、補正係数は、式7又は式7' で求められる。

[0097] $r_{2-2} = (\text{固定数値 (基準値)})$

／ (補正される検体の補正用内因性miRNAの代表値) $\dots$ 式7

$r_{2-2}' =$ (補正される検体の補正用内因性miRNAの代表値)

／ (固定数値 (基準値)) . . . 式 7'

[0098] 例えば、補正用内因性miRNAの代表値として平均値を用いる場合、補正される検体のための補正係数は、式 8 又は式 8' で求めることができる。

[0099] [数7]

$$r_{2-2} = \alpha \div \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 Y_j \quad \dots \text{式 8}$$

[0100] [数8]

$$r_{2-2}' = \frac{1}{n} \sum_{j=1}^n \log_2 Y_j \div \alpha \quad \dots \text{式 8'}$$

[0101] ここで、式 8、式 8' 中、

α は固定数値、

n は、支持体上の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域の総数、

Y_j は、検体における、 j 番目 ($1 \leq j \leq n$) の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域からのシグナル測定値、である。

[0102] プローブが補正用内因性miRNAと 1 対 1 対応である場合、 n は、支持体上の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブがターゲットとする補正用内因性miRNAの数に等しい。

[0103] 式 8 及び式 8' においては、 n に代えて、比較すべき全ての検体で共通して有効判定陽性であった補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域の総数 n' を用いることもできる。

[0104] ここで基準値として用いる「固定数値」の詳細は、「1-2. 固定数値補正法」における固定数値と同様である。

[0105] 次いで、補正係数取得工程-1 又は補正係数取得工程-2 で得られた補正係数を用いて、補正工程-1 又は補正工程-2 の方法を利用して、補正される検体における標的miRNAの発現量の補正を行う。

[0106] <補正工程－１>

補正工程－１は、補正係数取得工程－１で得られた補正係数を用いて標的miRNAの発現量の補正を行なう方法であり、標的miRNAの発現量に補正係数を加算又は該発現量から補正係数を減算することによって補正を行なう。本工程には、補正係数取得工程－１の基準検体取得法と固定数値補正法にそれぞれ対応した２通りの補正方法がある。

[0107] １－１．基準検体取得法

第２以降の検体における標的miRNAの発現量の補正は、第２以降の検体のための補正係数をそれぞれ用いて実施する。つまり、第２の検体について標的miRNAの発現量を補正する場合には、第２の検体のための補正係数（ c_{2-1} 又は c_{2-1}' ）を使用し、第３の検体について標的miRNA発現量を補正する場合には、第３の検体のための補正係数（ c_{3-1} 又は c_{3-1}' ）を使用する。

[0108] 補正係数として、基準検体の補正用内因性miRNAの代表値から第２以降の検体の補正用内因性miRNAの代表値を減算した差を用いる場合、すなわち上記式１の場合には、第２以降の検体における各標的miRNA発現量の測定値の対数値に補正係数を加算することにより、第２以降の各検体についての標的miRNAの発現量の補正が実施される。この場合の補正を式で表すと、ある「補正される検体」における*i*番目のmiRNAの補正済み発現量 E_i は、下記式９によって求めることができる。

[0109] [数９]

$$E_i = \log_2 W_i + c_{i-1} \quad \dots \text{式 9}$$

[0110] ここで、 W_i は、*i*番目のmiRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域からのシグナル測定値である。

[0111] これとは逆に、補正係数として、第２以降の検体の補正用内因性miRNAの代表値から、基準検体の補正用内因性miRNAの代表値を減算した差を用いる場合、すなわち上記式１'の場合には、第２以降の検体における各標的miRNA発現量の測定値の対数値から補正係数を減算することにより、第２以降の各検体

についての標的miRNAの発現量の補正が実施される。この場合の補正を式で表すと、ある「補正される検体」における i 番目の標的miRNAの補正済み発現量 E_i は、下記式 9' によって求めることができる。

[0112] [数10]

$$E_i = \log_2 W_i - c_{1-1'} \quad \dots \text{式 9'}$$

[0113] ここで、 W_i の定義は上記式 9 に同じである。

[0114] 第 2 の検体において測定された標的miRNA発現量を補正するのであれば、当該第 2 の検体における各標的miRNA発現量の測定値の対数値に c_2 を加算するか、又は c_2' を減算すればよい。第 3 以降の検体についても同様である。なお、基準検体とした第 1 の検体の代表値と基準値との差は当然 0 であるが、プログラムの構成上、第 1 の検体の標的miRNA発現量に 0 を加算又は減算するという計算を実施しても差し支えない。

[0115] 1-2. 固定数値補正法

標的miRNA発現量の補正は、代表値と固定数値（基準値）との差によって得られた補正係数をそれぞれ用いて実施する。つまり、ある検体について標的miRNA発現量を補正する場合には、その検体のための補正係数（ r_{1-2} 又は r_{1-2}' ）を使用する。

[0116] 補正係数として、基準値から検体の補正用内因性miRNAの代表値を減算した差を用いる場合、すなわち上記式 3 の場合には、検体における各標的miRNAの発現量の測定値の対数値に補正係数を加算することにより、各検体についての標的miRNAの発現量の補正が実施される。この場合の補正を式で表すと、ある「補正される検体」における i 番目の標的miRNAの補正済み発現量 E_i は、下記式 10 によって求めることができる。

[0117] [数11]

$$E_i = \log_2 W_i + r_{1-2} \quad \dots \text{式 10}$$

[0118] ここで、 W_i は、 i 番目のmiRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域からのシグナル測定値である。

[0119] これとは逆に、補正係数として、検体の補正用内因性miRNAの代表値から固定数値を減算した差を用いる場合、すなわち上記式3'の場合には、検体における各標的miRNA発現量の測定値の対数値から補正係数を減算することにより、各検体についての標的miRNA発現量の補正が実施される。この場合の補正を式で表すと、ある「補正される検体」におけるi番目の標的miRNAの補正済み発現量 E_i は、下記式10'によって求めることができる。

[0120] [数12]

$$E_i = \log_2 W_i - r_{1-2'} \quad \dots \text{式10'}$$

[0121] W_i の定義は上記式10に同じである。

[0122] <補正工程－2>

補正工程－2は、補正係数取得工程－2で得られた補正係数を用いて標的miRNAの発現量の補正を行なう方法であり、標的miRNAの発現量を補正係数で除算、又は該発現量に補正係数を乗算することによって補正を行なう。本工程にも、補正係数取得工程－2の基準検体取得法と固定数値補正法にそれぞれ対応した2通りの補正方法がある。

[0123] 2－1．基準検体取得法

第2以降の検体における標的miRNAの発現量の補正は、第2以降の検体のための補正係数をそれぞれ用いて実施する。つまり、第2の検体について標的miRNAの発現量を補正する場合には、第2の検体のための補正係数（ c_{2-1} 又は c_{2-1}' ）を使用し、第3の検体について標的miRNA発現量を補正する場合には、第3の検体のための補正係数（ c_{3-1} 又は c_{3-1}' ）を使用する。

[0124] 補正係数として、補正される第2以降の検体の補正用内因性miRNAの代表値を分母とし、基準検体の補正用内因性miRNAの代表値を分子とした比を用いる場合、すなわち上記式5の場合には、第2以降の検体における各標的miRNA発現量の測定値の対数値に補正係数を乗算することにより、第2以降の各検体についての標的miRNAの発現量の補正が実施される。この場合の補正を式で表すと、ある「補正される検体」におけるi番目の標的miRNAの補正済み発現量

E_i は、下記式 11 によって求めることができる。

[0125] [数13]

$$E_i = \log_2 Wi \times c_{2-1} \quad \dots \text{式 11}$$

[0126] ここで、 W_i は、 i 番目のmiRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域からのシグナル測定値である。

[0127] これとは逆に、補正係数として、基準検体の補正用内因性miRNAの代表値を分母とし、第2以降の検体の補正用内因性miRNAの代表値を分子とした比を用いる場合、すなわち上記式 5' の場合には、第2以降の検体における各標的miRNA発現量の測定値の対数値を補正係数で除算することにより、第2以降の各検体についての標的miRNAの発現量の補正が実施される。この場合の補正を式で表すと、ある「補正される検体」における i 番目のmiRNAの補正済み発現量 E_i は、下記式 11' によって求めることができる。

[0128] [数14]

$$E_i = \log_2 Wi \div c_{2-1}' \quad \dots \text{式 11'}$$

[0129] ここで、 W_i の定義は上記式 11 に同じである。

[0130] 第2の検体において測定された標的miRNA発現量を補正するのであれば、当該第2の検体における各標的miRNA発現量の測定値の対数値に c_{2-1} を除算するか、又は c_{2-1}' を乗算すればよい。第3以降の検体についても同様である。式 5 及び式 11 の手順でも、式 5' 及び式 11' の手順でも、最終的に得られる補正済み標的miRNAの発現量 E_i の値は同じである。なお、基準検体とした第1の検体の代表値と本方法における固定数値（基準値）との比は当然1であるが、プログラムの構成上、第1の検体の標的miRNA発現量に1を乗算又は該標的miRNA発現量を1で除算するという計算を実施しても差し支えない。

[0131] 2-2. 固定数値補正法

標的miRNA発現量の補正は、固定数値（基準値）との比によって得られた補正係数をそれぞれ用いて実施する。つまり、ある検体について標的miRNA発現量を補正する場合には、その検体のための補正係数（ r_{2-2} 又は r_{2-2}' ）を使用

する。

[0132] 補正係数として、検体の補正用内因性miRNAの代表値を分母とし、基準値を分子とした比を用いる場合、すなわち上記式7の場合には、検体における各標的miRNAの発現量の測定値の対数値に補正係数を乗算することにより、各検体についての標的miRNAの発現量の補正が実施される。この場合の補正を式で表すと、ある「補正される検体」におけるi番目の標的miRNAの補正済み発現量 E_i は、下記式12によって求めることができる。

[0133] [数15]

$$E_i = \log_2 W_i \times r_{2-2} \quad \dots \text{式12}$$

[0134] ここで、 W_i は、i番目のmiRNAを捕捉するためのプローブ固定化領域からのシグナル測定値である。

[0135] これとは逆に、補正係数として、検体の補正用内因性miRNAの代表値を分母とし、基準値を分子とした比を用いる場合、すなわち上記式7'の場合には、検体における各標的miRNA発現量の測定値の対数値を補正係数で除算することにより、各検体についての標的miRNA発現量の補正が実施される。この場合の補正を式で表すと、ある「補正される検体」におけるi番目の標的miRNAの補正済み発現量 E_i は、下記式12'によって求めることができる。

[0136] [数16]

$$E_i = \log_2 W_i \div r_{2-2}' \quad \dots \text{式12'}$$

[0137] ここで、 W_i の定義は上記式12に同じである。

[0138] <比較解析工程>

補正済みの標的miRNA発現量により、複数の体液検体間で標的miRNA発現量を対比する。基準検体取得法により補正が実施される場合には、基準検体とした第1の検体の標的miRNA発現量は補正を受けていないため、例えば第1の検体と第2の検体との間の対比は、補正されていない第1の検体の標的miRNA発現量と、補正済みの第2の検体の標的miRNA発現量との間での対比となるが、対比する検体のうちの少なくとも1つは必ず補正された検体となる。従っ

て、「補正済みの標的miRNA発現量により、複数の体液検体間で標的miRNA発現量を対比する」という語には、補正されていない基準検体と補正された他の検体との間で対比する態様も包含される。

[0139] 比較解析工程自体は、従来法と同様に行なうことができる。例えば、スクATTERプロットと呼ばれる発現量データの散布図として比較解析結果を表すことができる。比較すべき検体が3つの場合、例えば、3つのうちのいずれか1つの検体と残りの各検体とを比較解析したスクATTERプロットを2つ（例えば、第1の検体－第2の検体間のスクATTERプロットと第1の検体－第3の検体間のスクATTERプロット）作成すればよく、必要に応じて、さらに残りの2つの検体間（前述の例の場合には、さらに第2の検体－第3の検体間）で比較解析したスクATTERプロットを作成してもよい。4つ以上の検体の比較解析も同様に行なうことができる。なお、3検体の比較解析であれば、3次的にスクATTERプロットを作成することもできる。基準検体取得法の場合であっても、必ずしも基準検体と他の2検体とをそれぞれ比較しなければならないわけではなく、例えば第2の検体－基準検体間の比較と第2の検体－第3の検体間の比較を行なうこととしてもよい。

[0140] また、補正済みの標的miRNA発現量により、いずれか1つの検体と残りの他の検体との間で標的miRNAの発現量の差を計算し、その差をもって対数化された変化倍率（fold-change）として比較解析結果を表してもよい。例えば、基準検体における標的miRNAの発現量（基準検体取得法の場合）又は第1の検体における補正済みの標的miRNAの発現量（固定数値補正法の場合）と、第2以降の検体における補正済みの標的miRNAの発現量との差を計算してよい。この場合も上述の場合と同様に、第1の検体と他の検体との差を計算することに限定されず、第2以降の検体のいずれか1つと他の検体との差を計算することとしてもよい。

[0141] 本発明のmiRNA発現解析装置は、上記本発明の比較解析法を実施する装置であって、

複数の体液検体について測定された、標的miRNAの発現量の測定値及び配列

番号 1 ～ 10 に示す補正用内因性miRNAから選択される 1 又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値を記憶する記憶手段；

各体液検体について、1 又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値から、代表値、好ましくは対数値で表された代表値を取得する、代表値取得手段；

補正用内因性miRNAの発現量に関して任意に設定された基準値と、前記代表値取得手段によって取得された各体液検体の代表値との差又は比を、各体液検体のための標的miRNA発現量の補正係数としてそれぞれ取得する、補正係数取得手段；

前記補正係数取得手段によって取得された各補正係数を用いて、当該各体液検体において測定された標的miRNAの発現量を補正する、補正手段；及び

補正済みの標的miRNA発現量により、少なくとも 2 つの体液検体の間で標的miRNA発現量を対比した結果を出力する出力手段を含む。

[0142] ある 1 つの態様において、基準値は、任意に選択された第 1 の検体（基準検体）の補正用内因性miRNAの代表値であり、第 2 以降の体液検体において測定された標的miRNAの発現量が補正される。すなわち、この態様において、本発明のmiRNA発現解析装置は、

複数の検体のそれぞれについて、同時に測定された複数の標的miRNAの発現量及び 1 又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値を記憶する記憶手段と；

各体液検体について、補正用内因性miRNAの発現量の測定値から、代表値、好ましくは対数値で表された代表値を取得する、代表値取得手段と；

任意に選択された第 1 の検体を基準検体とし、基準検体の補正用内因性miRNAの代表値を基準値として、当該基準値と残りの第 2 以降の検体の補正用内因性miRNA代表値との差又は比を、当該第 2 以降の検体のための補正係数としてそれぞれ取得する、補正係数取得手段と；

補正係数取得手段によって取得された第 2 以降の検体のための補正係数を

それぞれ用いて、第2以降の検体において測定された標的miRNAの発現量を補正する、補正手段と；

補正済みの標的miRNA発現量により、少なくとも2つの体液検体の間で標的miRNA発現量を対比した結果を出力する出力手段を含む。

[0143] 別の態様において、基準値は、補正用内因性miRNA発現量に関して任意に定められた固定数値であり、第1の検体を含む全ての検体について、標的miRNA発現量の補正が行われる。すなわち、この態様において、本発明のmiRNA発現解析装置は、

複数の体液検体のそれぞれについて、同時に測定された複数の標的miRNAの発現量及び1又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値を記憶する記憶手段と；

各検体について、補正用内因性miRNAの発現量の測定値から、代表値、好ましくは対数値で表された代表値を取得する、代表値取得手段と；

固定数値を基準値として、当該基準値と各検体の補正用内因性miRNAの代表値との差又は比を、当該検体のための補正係数としてそれぞれ取得する、補正係数取得手段と；

補正係数取得手段によって取得された各検体のための補正係数をそれぞれ用いて、各検体において測定された標的miRNAの発現量を補正する、補正手段と；

補正済みの標的miRNA発現量により、少なくとも2つの体液検体の間で標的miRNA発現量を対比した結果を出力する出力手段とを含む。

[0144] 本発明の解析装置の一例の構成の概略を示すブロック図を図2に示す。本発明の解析装置10は、入力部110、表示部120、出力部130、記憶部140、制御部150、変換部160、解析部170を具備する。また、図3には、本発明による標的miRNAの発現量の補正処理のフローチャートの一例を示す。

- [0145] 入力部 110 は、解析装置 10 の動作に関わる情報を入力する手段である。キーボード等の従来公知の入力手段を好ましく用いることができる。マイクロアレイを用いたハイブリダイゼーションアッセイにより得られる発現量データは、例えば、本発明の装置とは別のスキャナー等の読取手段で読み取られ、数値データに変換された後、入力部 110 から当該数値データを解析装置 10 に入力される。あるいは、スキャナー等の読取手段が、本発明の解析装置 10 に含まれていてもよい（図示せず）。
- [0146] 入力部 110 から入力された発現量データ、又は解析装置 10 に組み込まれた読取手段によって読み取られ数値化された発現量データは、記憶部 140 に記憶される。この時、記憶部 140 は、複数の検体のそれぞれについて、同時に測定された複数の標的miRNAの発現量及び 1 又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値を記憶する記憶手段として働く。
- [0147] 記憶部 140 に格納された各検体の標的miRNA及び補正用内因性miRNAの発現量の測定値データは、変換部 160 により、底が 2 の対数に変換される。次いで、解析部 170 により、各検体について、対数変換された補正用内因性miRNAの発現量の測定値の代表値が取得される。代表値は、比較解析法についての説明で述べた通り、例えば 1 若しくは複数の補正用内因性miRNA発現量の平均値若しくは中央値（1 種類の補正用内因性miRNAのみを補正に用いる場合でも、それを測定するためのプローブ固定化領域がアレイ上に複数個存在する場合には、代表値が平均値又は中央値となり得る）、又は特定の 1 種類の補正用内因性miRNAの測定値であり得る。
- [0148] 代表値が取得された後、解析部 170 により、基準検体の補正用内因性miRNAの代表値と第 2 以降の検体の補正用内因性miRNAの代表値との差又は比が算出され、当該第 2 以降の検体のための補正係数がそれぞれ取得される。補正係数の取得の詳細は、比較解析法の＜補正係数取得工程＞で述べた通りである。なお、プログラムの構成上、基準検体とされた第 1 の検体についても補正係数 0（差を算出する場合）又は補正係数 1（比を算出する場合）を取得する構成としても差し支えない。

- [0149] 装置 10 において、基準検体の選出は、装置 10 を操作する者が入力部 110 から任意の 1 検体を指定することにより行なわれてよい。あるいは、装置 10 が自動的に基準検体となる 1 検体を選出してもよい。例えば、入力部 110 からデータが入力され、記憶部 140 に最初にデータが記憶された検体が、装置 10 によって基準検体として選出され得る。この基準検体の選出又は入力の手続きは、図 3 では便宜的に代表値取得工程（S-3）の後に位置されているが、これに限定されず、より早いステップで、例えばデータの格納時に実行されてもよい。
- [0150] 次に、解析部 170 は、第 2 以降の検体のための補正係数をそれぞれ用いて、第 2 以降の検体で測定された標的 miRNA の発現量データを補正する。補正操作の詳細は、比較解析法の＜補正工程＞で述べた通りである。なお、プログラムの構成上、基準検体とされた第 1 の検体の標的 miRNA 発現量データについても、補正係数 0（差を算出する場合）又は補正係数 1（比を算出する場合）を用いた補正操作を実行することとしても差し支えない。
- [0151] 次に、解析部 170 により、基準検体の標的 miRNA 発現量と、第 2 以降の検体の補正済み標的 miRNA 発現量との対比が行なわれる。対比の結果は、出力部 130 によって、表示部 120 に出力され、表示される。さらに、プリンター等の出力装置や記録媒体等に対比結果が出力され得る。さらにまた、出力部 130 は、ネットワークを介して装置外部に存在するデータベース等の外部記憶装置に対比解析結果を出力するように構成することもできる。
- [0152] 記憶部 140 は、複数の標的 miRNA の発現量及び複数の補正用内因性 miRNA の発現量の測定値を記憶するほか、上記の各工程で生じる中間の解析結果も適宜記憶する。
- [0153] 装置 10 の上記した各種動作は、制御部 150 によって制御される。具体的には、図 2 の破線矢印で示されるように、入力部 110、表示部 120、出力部 130、記憶部 140、制御部 150、変換部 160、解析部 170 の各手段に対して、制御部 150 から制御情報が出力され、この制御情報に基づいて各手段が連携して動作し、装置 10 全体が動作する。

[0154] また、当該解析装置においては、基準検体の補正用内因性miRNA代表値を基準値として利用する代わりに、装置10において、あらかじめ指定した固定数値を変換部160等に登録しておき、基準検体における補正用内因性miRNAの発現量の代表値に代わる基準値として利用してもよい。この場合の方法の詳細は、比較解析法の＜補正係数取得工程＞、＜補正工程＞に述べたとおりである。

[0155] また、本発明は、コンピュータを上記した解析装置として機能させるためのプログラムを提供する。該プログラムは、具体的には、コンピュータを上記した各手段（すなわち、記憶手段、代表値取得手段、補正係数取得手段、補正手段、及び出力手段）として機能させるためのプログラムである。あるいはまた、本発明は、コンピュータに上記した本発明の比較解析方法の各工程を実行させるためのプログラムを提供する。比較解析方法には、上記した測定工程、代表値取得工程、補正係数取得工程、及び補正工程が含まれ、さらに、補正済みの標的miRNA発現量により、複数の体液検体間で標的miRNA発現量を対比する比較解析工程が含まれ得る。これらのプログラムは、マイクロアレイ等により標的miRNAの発現量と同時に測定された補正用内因性miRNAの発現量のデータを用いて、標的miRNAの発現量の補正をコンピュータに実行させるプログラムである。

[0156] さらにまた、本発明は、上記いずれかのプログラムを記録した、コンピュータ読み取り可能な記録媒体を提供する。

[0157] 「記録媒体」は、フレキシブルディスク、光磁気ディスク、ROM、EPROM、EEPROM、CD-ROM、MO、DVD等の任意の「可搬用の物理媒体」（非一過性の記録媒体）であり得る。あるいは、LAN、WAN、インターネットに代表される、ネットワークを介してプログラムを送信する場合の通信回線や搬送波のように、短期にプログラムを保持する「通信媒体」であり得る。

[0158] 「プログラム」とは、任意の言語や記述方法にて記述されたデータ処理方法であり、ソースコードやバイナリコード等の形式を問わない。なお、「プログラム」は必ずしも単一的に構成されるものに限られず、複数のモジュール

ルやライブラリとして分散構成されるものや、OS (Operating System) に代表される別個のプログラムと協働してその機能を達成するものをも含む。なお、実施の形態に示した各装置において記録媒体を読み取るための具体的な構成、読み取り手順、あるいは、読み取り後のインストール手順等については、周知の構成や手順を用いることができる。

[0159] 本発明は、複数の標的miRNAを捕捉するためのプローブと複数の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブが固定化された支持体を含む、miRNA発現解析用チップを提供する。当該チップについての好ましい条件は、本発明の比較解析方法において説明した通りである。

[0160] 本発明においては、以下に説明する配列番号1～10に示すmiRNAの少なくとも1つを、補正用内因性miRNAとして使用する。

[0161] 配列番号1は、miRBaseにAccession No. MIMAT0023710で登録されているhsa-miR-6085の塩基配列である。本明細書において、「miR-6085遺伝子」又は「miR-6085」という用語は、配列番号1に記載のhsa-miR-6085やその他生物種ホモログもしくはオーソログなどを包含する。hsa-miR-6085遺伝子は、Voellenkle Cら、2012年、RNA、18巻、p.472-484に記載される方法によって得ることができる。

[0162] 配列番号2は、miRBaseにAccession No. MIMAT0022941で登録されているhsa-miR-1227-5pの塩基配列である。本明細書において、「miR-1227-5p遺伝子」又は「miR-1227-5p」という用語は、配列番号2に記載のhsa-miR-1227-5pやその他生物種ホモログもしくはオーソログなどを包含する。hsa-miR-1227-5p遺伝子は、Berezikov Eら、2007年、Molecular Cell、28巻、p.328-336に記載される方法によって得ることができる。

[0163] 配列番号3は、miRBaseにAccession No. MIMAT0013802で登録されているhsa-miR-2861の塩基配列である。本明細書において、「miR-2861遺伝子」又は「miR-2861」という用語は、配列番号3に記載のhsa-miR-2861やその他生物種ホモログもしくはオーソログなどを包含する。hsa-miR-2861遺伝子は、Li Hら、2009年、Journal of Clinical Investigation、119巻、p.3666-3677に

記載される方法によって得ることができる。

[0164] 配列番号 4 は、miRBaseにAccession No. MIMAT0004609で登録されているhsa-miR-149-3pの塩基配列である。本明細書において、「miR-149-3p遺伝子」又は「miR-149-3p」という用語は、配列番号 4 に記載のhsa-miR-149-3pやその他生物種ホモログもしくはオーソログなどを包含する。hsa-miR-149-3p遺伝子は、Lagos-Quintana Mら、2002年、Current Biology、12巻、p.735-739に記載される方法によって得ることができる。

[0165] 配列番号 5 は、miRBaseにAccession No. MIMAT0018987で登録されているhsa-miR-4463の塩基配列である。本明細書において、「miR-4463遺伝子」又は「miR-4463」という用語は、配列番号 5 に記載のhsa-miR-4463やその他生物種ホモログもしくはオーソログなどを包含する。hsa-miR-4463遺伝子は、Jim a DDら、2010年、Blood、116巻、p.e118-e127に記載される方法によって得ることができる。

[0166] 配列番号 6 は、miRBaseにAccession No. MIMAT0019045で登録されているhsa-miR-4508の塩基配列である。本明細書において、「miR-4508遺伝子」又は「miR-4508」という用語は、配列番号 6 に記載のhsa-miR-4508やその他生物種ホモログもしくはオーソログなどを包含する。hsa-miR-4508遺伝子は、Jim a DDら、2010年、Blood、116巻、p.e118-e127に記載される方法によって得ることができる。

[0167] 配列番号 7 は、miRBaseにAccession No. MIMAT0023715で登録されているhsa-miR-6090の塩基配列である。本明細書において、「miR-6090遺伝子」又は「miR-6090」という用語は、配列番号 7 に記載のhsa-miR-6090やその他生物種ホモログもしくはオーソログなどを包含する。hsa-miR-6090遺伝子は、Yoo JKら、2012年、Stem Cells and Development、21巻、p.2049-2057に記載される方法によって得ることができる。

[0168] 配列番号 8 は、miRBaseにAccession No. MIMAT0027450で登録されているhsa-miR-6775-5pの塩基配列である。本明細書において、「miR-6775-5p遺伝子」又は「miR-6775-5p」という用語は、配列番号 8 に記載のhsa-miR-6775-5p

やその他生物種ホモログもしくはオーソログなどを包含する。hsa-miR-6775-5p遺伝子は、Ladewig Eら、2012年、Genome Research、22巻、p.1634-1645に記載される方法によって得ることができる。

[0169] 配列番号9は、miRBaseにAccession No. MIMAT0027506で登録されているhsa-miR-6803-5pの塩基配列である。本明細書において、「miR-6803-5p遺伝子」又は「miR-6803-5p」という用語は、配列番号9に記載のhsa-miR-6803-5pやその他生物種ホモログもしくはオーソログなどを包含する。hsa-miR-6803-5p遺伝子は、Ladewig Eら、2012年、Genome Research、22巻、p.1634-1645に記載される方法によって得ることができる。

[0170] 配列番号10は、miRBaseにAccession No. MIMAT0023252で登録されているhsa-miR-5787の塩基配列である。本明細書において、「miR-5787遺伝子」又は「miR-5787」という用語は、配列番号10に記載のhsa-miR-5787やその他生物種ホモログもしくはオーソログなどを包含する。hsa-miR-5787遺伝子は、Yoo Hら、2011年、Biochem Biophys Res Commun、415巻、p.567-572に記載される方法によって得ることができる。

実施例

[0171] 以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

[0172] <実施例1>

以下の過程により、本発明で用いる補正用内因性miRNAを選択した。

[0173] (DNAマイクロアレイ)

東レ株式会社製の"3D-Gene" human miRNA oligo chip (miRBase release 2.0対応) を用いて以下の実験を行なった。

[0174] (検体RNAの調製)

検体RNAとして、健常ヒト血清157検体より、"3D-Gene" RNA extraction reagent from liquid sample kitを用いて抽出したRNAを用いた。得られた検体RNAを、"3D-Gene" miRNA labeling kit (東レ社) を用いて標識した。標識した検体RNAは、"3D-Gene" miRNA chip (東レ社) の標準プロトコールに従

い、ハイブリダイゼーションと洗浄を行った。反応済みのDNAマイクロアレイは、マイクロアレイスキャナー（東レ社）を用いて蛍光シグナルを検出した。スキャナーの設定は、レーザー出力100%、フォトマルチプライヤーの電圧設定をAUTO設定にした。

[0175] (miRNAシグナル値の取得)

DNAマイクロアレイから得られたmiRNAのシグナル値を、底が2の対数に変換し、RNA抽出及び標識時に添加した外部標準核酸による実験誤差補正を行った。

[0176] (補正用内因性miRNAの取得)

得られた実験誤差補正済みの全157検体のmiRNAシグナル値について、geNorm法による検体間最少変動miRNAの抽出を行った。GeNorm法は、Vandesompeleらによって提唱された定量RT-PCR法における内因性ハウスキーピング遺伝子（リファレンス遺伝子）の探索法である（Genome Biology 2002, 3:research0034-research0034.11）。対象とする検体に特有の内因性ハウスキーピング遺伝子であるmRNAを選抜する方法として用いられる。具体的には同一の検体における、すべての検出対象の遺伝子のシグナル値について、2つの遺伝子のシグナル値の比を総当たりで計算する。次に、すべての遺伝子の組合せで得られた比の値（A）について検体間での標準誤差を計算する。次に、特定の遺伝子について、他の遺伝子との関係で得られた標準誤差（V）の総和（M）を計算する。このM値が小さい遺伝子が、すぐれた内因性ハウスキーピング遺伝子とされる。

[0177] 一方で、上述の計算法によって得られるA及びVは、シグナル値が小さいほど、小さな値となり、見かけ上すぐれた内因性ハウスキーピング遺伝子となるとされる。今回用いたDNAマイクロアレイは、miRBase release 20に登録された全miRNAを網羅的に検出するため、このデータを用いてgeNorm法を実施すると、シグナル値が小さいmiRNAを優先的に選択してしまう。このような現象から、これまでgeNorm法によってDNAマイクロアレイ検出における内因性ハウスキーピング遺伝子を選択することは避けられてきた。

[0178] 本実施例では、DNAマイクロアレイで検出されたmiRNAのうち、シグナル値が全検体の半数以上で64を超える、安定して検出されるmiRNAのみをgeNorm法の適用の対象として選択した。さらにgeNorm法の特長として、同一検体内での遺伝子発現量比に基づいて内因性ハウスキーピング遺伝子を選択していることから、大きく発現パターンが異なる検体間での安定的発現量を示す遺伝子選択が難しいことを踏まえ、前もって実験誤差補正済みの全157検体の各miRNAシグナル値についてCV（標準誤差／平均値）を得て、CVが0.1以下であるmiRNAのみをgeNorm法の対象として選択した。その結果、2555種のmiRNA検出用プローブから得られたシグナル値のうち、281種のmiRNAを検出するプローブのシグナル値をgeNorm法の対象とすることが適当と考えられた。

[0179] 実際にgeNorm法を適用した281種のmiRNAから、M値が小さい内因性ハウスキーピング遺伝子、すなわち補正用内因性miRNAとして利用可能である10種を選択した。この10種の補正用内因性miRNAの配列番号、miRNAの名前、miRBaseに登録されたMIMAT番号、geNormで計算したM値、塩基配列、及び配列中のグアニン・シトシンの割合（GC%）を表1に示す。

[0180] [表1]

配列番号	miRNA名	MIMAT ID	geNorm M値	塩基配列	GC%
1	hsa-miR-6085	MIMAT0023710	0.058	AAGGGGCUGGGGAGCACA	68
2	hsa-miR-1227-5p	MIMAT0022941	0.058	GUGGGGCCAGCGGUGG	82
3	hsa-miR-2861	MIMAT0013802	0.059	GGGGCCUGGCGGUGGGCGG	89
4	hsa-miR-149-3p	MIMAT0004609	0.059	AGGAGGGACGGGGCUGUGC	76
5	hsa-miR-4463	MIMAT0018987	0.060	GAGACUGGGGUGGGGCC	76
6	hsa-miR-4508	MIMAT0019045	0.060	GCGGGGCUGGGCGCGCG	94
7	hsa-miR-6090	MIMAT0023715	0.061	GGGAGCGAGGGCGGGGC	89
8	hsa-miR-6775-5p	MIMAT0027450	0.061	UCGGGGCAUGGGGAGGGAGGCU	76
9	hsa-miR-6803-5p	MIMAT0027506	0.062	CUGGGGUGGGGGCUGGGCGU	82
10	hsa-miR-5787	MIMAT0023252	0.063	GGGCUGGGGCGCGGGAGGU	85

[0181] DNAマイクロアレイによるmiRNAの検出は、標的のmiRNAとその標的miRNAを捕捉するためのプローブによる核酸二重鎖を形成するハイブリダイズ法によってなされるため、核酸二重鎖を安定化させるグアニン及びシトシンの含有

量が高い配列が、特に安定的にDNAマイクロアレイによって検出されることが予想される。すなわち、グアニン及びシトシンの含有量が高い配列が内因性ハウスキーピング遺伝子として優先的に選択されると一般に想定される。しかしながら、表1に示すように、必ずしもgeNorm法によって選択された内因性ハウスキーピング遺伝子（補正用内因性miRNA）は、グアニン及びシトシンの含有率が高いとは言えなかった。逆にグアニン及びシトシンの含有率が高いmiRNAが優先的に内因性ハウスキーピング遺伝子（補正用内因性miRNA）となるという現象も見られなかった。

[0182] <実施例2>

選択した補正用内因性miRNAをそれぞれ単独で用いて、複数の体液検体の標的RNAの発現量補正を行った。

[0183] RNAの物質的不安定さから、RNA発現量を測定する場合、その品質が違う、すなわちRNAの分解度が異なる検体間での、絶対的な発現量比較を要求される場合がしばしばある。検体が体液の場合は特に、長時間室温に置かれた検体中の標的miRNA発現量を測定することで何等かの結果を得ようとする場合が想定される。

[0184] この時、血清中に含まれる特定の補正用内因性miRNAの量を基準としてRNAの分解度に応じた補正を行うことで、RNA品質に関わらず、miRNAの発現プロファイル（相対的なmiRNAの発現量比）について、絶対的な検体間比較が可能になると考えられる。

[0185] 本実施例では、ヒトから採取した血清を各種条件で保存することによって、血清中に含まれるmiRNAの品質がさまざまなレベルにある血清を作成し、これらの血清由来の抽出RNA検体の測定値に対して本発明の補正方法を適用した。

[0186] (DNAマイクロアレイ)

東レ株式会社製の”3D-Gene” human miRNA oligo chip (miRBase release 2.0対応、東レ社) を用いて以下の実験を行なった。

[0187] (検体RNAの調製)

ヒト血清を採血、血清分離後に下記 2 種の条件に静置し、血清に含まれる RNA の品質を変化させた。2 種の条件を以下に示す。1 : 血清分離後 6 時間室温に静置し、RNA 抽出を行う。2 : 血清分離後 24 時間 25℃ に静置し、RNA 抽出を行う。それぞれの条件で作成された血清から "3D-Gene" RNA extraction reagent from liquid sample kit RNA を用いて全 RNA を抽出し、検体 RNA とした。

[0188] 得られた検体 RNA をそれぞれ、"3D-Gene" miRNA labeling kit (東レ社) を用いて標識した。標識した検体 RNA は、"3D-Gene" human miRNA oligo chip (東レ社) の標準プロトコールに従い、ハイブリダイゼーションと洗浄を行った。反応済みの DNA マイクロアレイは、マイクロアレイスキャナー (東レ社) を用いて蛍光シグナルを検出した。スキャナーの設定は、レーザー出力 100%、フォトマルチプライヤーの電圧設定を AUTO 設定にした。

[0189] (miRNA シグナル値の補正)

DNA マイクロアレイから得られた miRNA のシグナル値を、底が 2 の対数に変換したシグナル値の分布 (すなわち未補正の発現量シグナル値) を図 4 A に示す。これに対して、配列番号 1 ~ 10 に示す補正用内因性 miRNA のシグナル値と、あらかじめ別に設定した固定数値である基準値によって補正された、補正済みシグナル値の分布を図 4 B ~ K に示す。図中、Day-0 (破線) が条件 1 の検体 RNA であり、Day-1_25℃ (実線) が条件 2 の検体 RNA である。

[0190] ここで、配列番号 1 ~ 10 に示す補正用内因性 miRNA のシグナル値による補正は以下に示される方法によって行った。

[0191] 配列番号 1 ~ 10 に示す補正用内因性 miRNA について、それぞれ基準値として用いる固定数値を設定した。さらに、各検体について、配列番号 1 ~ 10 に示す補正用内因性 miRNA のシグナル値を底が 2 の対数に変換し、この変換後のシグナル値を代表値として基準値との比をとり (基準値 / 代表値)、補正係数とした。補正係数は、配列番号 1 ~ 10 の補正用内因性 miRNA それぞれについて設定されたことになる。これらの補正係数を、補正用内因性 miRNA ごとに、各検体のすべての miRNA シグナル値に乗算することによって補正を行った

。

[0192] その結果、図4B～Kに示される通り、配列番号1～10に示す補正用内因性miRNAのいずれを単独で用いても、条件を変えた2種の検体の発現プロファイルを同一化させることが可能であった。

[0193] <実施例3>

実施例2に示すように、配列番号1～10の補正用内因性miRNAは、それぞれ単独でも十分な標的miRNAの発現量の補正効果を持つが、さらにこれらを組み合わせることによって、実験の不備等による一部の補正用内因性miRNAデータの損失が起こった場合によっても、これを補完できることが想定される。そこで、複数の補正用内因性miRNAを組み合わせ用いて標的miRNAの発現量の補正を行ない、補正の効果を確認した。検体は実施例2と同様のものを用いた。

[0194] 配列番号2、4及び5の補正用内因性miRNAのシグナル値を底が2の対数に変換し、この変換後のシグナル値の平均値又は中央値を得て、代表値とした。基準値としては固定数値を用いた。実施例2で調製した2種の検体を含む複数の血清RNA検体における3種類の補正用内因性miRNAの全ての発現量（対数変換後シグナル値）の平均値を求め、この平均値を固定数値（基準値）として用いた。各検体について、補正用内因性miRNAの代表値と基準値の比をとり（基準値／代表値）、当該検体のための補正係数とした。この補正係数を、対応する各検体の全ての標的miRNAシグナル値に乗算することにより、標的miRNAシグナル値の補正を行った。

[0195] 図5は、補正用内因性miRNAの発現量の代表値として対数変換後シグナル値の平均値を用いた場合の、標的miRNAの補正済みシグナル値の分布である。配列番号1～10の補正用内因性miRNAをそれぞれ単独で用いて補正を行った実施例2と同様、複数の補正用内因性miRNAを組み合わせ用いて補正を行なった場合でも、各検体の標的miRNAの発現プロファイルを同一化させることが可能であった。

[0196] <実施例4>

実施例3に示すように、配列番号1～10の補正用内因性miRNAは、これらを組み合わせることによっても補正に有用である。この補正効果について、配列番号1～10のいずれを組み合わせても同様の効果を示すことを確認した。検体は実施例2と同様のものを用いた。

[0197] 配列番号2、3、4、5及び6の補正用内因性miRNAのシグナル値を底が2の対数に変換し、各検体について、任意の3種の補正用内因性miRNA変換後のシグナル値の平均値を得て、当該検体における代表値とした。基準値は固定数値とし、代表値取得に用いた3種の補正用内因性miRNAの対数変換後シグナル値の、実施例2で調製した2種の検体を含む複数の血清RNA検体での平均値を固定数値（基準値）として用いた。各検体について、代表値と基準値の比を取り（基準値／代表値）、当該検体のための補正係数とした。この補正係数を、対応する各検体の全ての標的miRNAシグナル値に乗算することによって、各検体のmiRNA発現量の補正を行った。

[0198] 補正済みシグナル値の分布を図8に示す。図8Aは未補正の発現量シグナル値の分布であり、図8B～Iが補正済み発現量シグナル値の分布である。配列番号1～10の補正用内因性miRNAをそれぞれ単独で用いて補正を行った実施例2と同様、各検体の標的miRNAの発現プロファイルを同一化させることが可能であった。

[0199] <比較例1>

実施例1の検討を行ったとき、血清RNAから得られた検体RNAをそれぞれ、“3D-Gene” miRNA labeling kit（東レ社）を用いて標識するステップにおいて、外部から添加する基準物質として2種の合成RNA配列（それぞれ20 mer、スパイクコントロール1及びスパイクコントロール2と称する）を添加した。これらの合成RNA配列は、血清由来のmiRNAと同様に蛍光標識され、“3D-Gene” human miRNA oligo chip（東レ社）によってシグナル量が検出された。そこで、スパイクコントロール1及びスパイクコントロール2のそれぞれ8点、計16点のスポットから得られたシグナル値を底が2の対数に変換し、その中央値を得て、代表値とした。この代表値と、あらかじめ設定した固定数値

(基準値)の比をとり(基準値／各検体の代表値)、各検体用の補正係数を得た。この補正係数を、各検体のすべてのmiRNAシグナル値に乗算することによって補正を行った。補正前のシグナル値の分布を図6Aに、補正後のシグナル値の分布を図6Bに示す。標識時に外部より添加されたスパイクコントロールによる補正では、検体中の標的miRNAのシグナル値は十分に補正されていないことが示された。

[0200] <比較例2>

これまで先行例によってmiRNAの発現量補正用として示されている、let-7d-5p、let-7g-5p、let-7i-5p、miR-16、miR-31、miR-223の、実施例2における発現量を表2に示す。has-miR-16-5p以外は、得られたシグナル値を底が2の対数に変換した場合、0～5の範囲のシグナルしか示さず、発現量が十分でないという理由で、全miRNAの発現量を補正するための基準には適していなかった。また、hsa-miR-16-5pで補正した場合の補正シグナル値の分布を図7に示す。hsa-miR-16-5pの発現量による補正では、検体中の標的miRNAのシグナル値は十分に補正されていないことが示された。

[0201] [表2]

miRNA名	ID	発現量 Day0-1	発現量 Day-1 25°C
hsa-let-7e-5p	MIMAT0000066	0.0	0.0
hsa-let-7e-3p	MIMAT0004485	4.7	4.1
hsa-let-7g-5p	MIMAT0000414	4.0	0.0
hsa-let-7g-3p	MIMAT0004584	4.0	0.0
hsa-let-7i-5p	MIMAT0000415	4.4	0.0
hsa-let-7i-3p	MIMAT0004585	3.9	0.0
hsa-miR-16-1-3p	MIMAT0004489	3.6	0.0
hsa-miR-16-2-3p	MIMAT0004518	3.8	4.5
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	7.1	7.5
hsa-miR-31-5p	MIMAT0000089	0.0	0.0
hsa-miR-31-3p	MIMAT0004504	3.7	4.8
hsa-miR-223-5p	MIMAT0004570	3.7	4.4
hsa-miR-223-3p	MIMAT0000280	6.0	0.0

符号の説明

[0202] 10 装置

1 1 0 入力部

1 2 0 表示部

1 3 0 出力部

1 4 0 記憶部

1 5 0 制御部

1 6 0 変換部

1 7 0 解析部

請求の範囲

[請求項1] 複数の体液検体間で標的miRNAの発現量を比較解析する方法であって、

複数の体液検体について、標的miRNAの発現量の測定及び配列番号1～10に示す補正用内因性miRNAから選択される1又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定を同時に行なう、測定工程；

各体液検体について、配列番号1～10に示す補正用内因性miRNAから選択される1又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値から代表値を取得する、代表値取得工程；

補正用内因性miRNAの発現量に関して任意に設定された基準値と、代表値取得工程で取得された各体液検体の代表値との差又は比を、各体液検体のための標的miRNA発現量の補正係数としてそれぞれ取得する、補正係数取得工程；及び

各体液検体に対して取得された補正係数をそれぞれ用いて、各体液検体において測定された標的miRNAの発現量を補正する、補正工程を含む、前記方法。

[請求項2] 前記補正工程では、

(a)前記補正係数取得工程において、前記代表値から前記基準値を減算した値を補正係数として取得する場合、標的miRNAの発現量の測定値から補正係数を減算すること、

(b)前記補正係数取得工程において、前記基準値から前記代表値を減算した値を補正係数として取得する場合、標的miRNAの発現量の測定値に補正係数を加算すること、

(c)前記補正係数取得工程において、前記代表値を前記基準値で除算した値を補正係数として取得する場合、標的miRNAの発現量の測定値を補正係数で除算すること、又は

(d)前記補正係数取得工程において、前記基準値を前記代表値で除算した値を補正係数として取得する場合、標的miRNAの発現量の測定値

に補正係数を乗算すること、

により前記補正を行なう、請求項 1 に記載の方法。

[請求項3] 前記基準値は、補正用内因性miRNA発現量に関して任意に定められた固定数値、又は、前記複数の体液検体から任意に選択された第 1 の体液検体について取得された補正用内因性miRNA発現量の代表値である、請求項 1 又は 2 に記載の方法。

[請求項4] 前記測定工程が、支持体上に固定化された複数の標的miRNAを捕捉するための核酸プローブ及び配列番号 1 ～ 10 に示す補正用内因性miRNAから選択される 1 又は複数の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブと、標識物質で標識された体液検体由来の核酸試料とを接触させてハイブリダイゼーションを行ない、標的miRNA及び前記 1 又は複数の補正用内因性miRNAの発現量をそれぞれシグナル強度測定値として得ることを含む、請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項5] 前記体液検体が、血液、血清又は血漿である、請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項6] 前記代表値が、配列番号 1 ～ 10 に示す補正用内因性miRNAから選択される 1 又は複数の補正用内因性miRNA発現量の測定値から算出された、対数値で表された平均値又は中央値である、請求項 1 ないし 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

[請求項7] 複数の体液検体における標的miRNAの発現量を比較解析するmiRNA発現解析装置であって、

複数の体液検体について測定された、標的miRNAの発現量の測定値及び配列番号 1 ～ 10 に示す補正用内因性miRNAから選択される 1 又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値を記憶する記憶手段；

各体液検体について、配列番号 1 ～ 10 に示す補正用内因性miRNAから選択される 1 又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値から代表値を取得する、代表値取得手段；

補正用内因性miRNAの発現量に関して任意に設定された基準値と、前記代表値取得手段によって取得された各体液検体の代表値との差又は比を、各体液検体のための標的miRNA発現量の補正係数としてそれぞれ取得する、補正係数取得手段；

各体液検体に対して取得された補正係数をそれぞれ用いて、各体液検体において測定された標的miRNAの発現量を補正する、補正手段；及び

補正済みの標的miRNA発現量により、少なくとも2つの体液検体の間で標的miRNA発現量を対比した結果を出力する出力手段を含む、前記装置。

[請求項8]

前記補正手段は、

(a)前記補正係数取得手段において、前記代表値から前記基準値を減算した値を補正係数として取得する場合、標的miRNAの発現量の測定値から補正係数を減算すること、

(b)前記補正係数取得手段において、前記基準値から前記代表値を減算した値を補正係数として取得する場合、標的miRNAの発現量の測定値に補正係数を加算すること、

(c)前記補正係数取得手段において、前記代表値を前記基準値で除算した値を補正係数として取得する場合、標的miRNAの発現量の測定値を補正係数で除算すること、又は

(d)前記補正係数取得手段において、前記基準値を前記代表値で除算した値を補正係数として取得する場合、標的miRNAの発現量の測定値に補正係数を乗算すること、

により前記補正を行う、請求項7に記載の装置。

[請求項9]

前記記憶手段に記憶される、複数の各体液検体に含まれる標的miRNAの発現量の測定値及び配列番号1～10に示す補正用内因性miRNAから選択される1又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値は、支持体上に固定化された複数の標的miRNAを捕捉するためのプローブ

及び前記 1 又は複数の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブと、標識物質で標識された体液検体由来の核酸試料とを接触させてハイブリダイゼーションを行ない、標的miRNA及び前記 1 又は複数の補正用内因性miRNAの発現量をシグナル強度測定値としてそれぞれ測定された値である、請求項 7 又は 8 に記載の装置。

[請求項10] 複数の体液検体間で標的miRNAの発現量を比較解析するために、1 又は複数のコンピューターに、

複数の各体液検体について、標的miRNAの発現量の測定及び配列番号 1 ～ 10 に示す補正用内因性miRNAから選択される 1 又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定を同時に行なう、測定工程；

各体液検体について、配列番号 1 ～ 10 に示す補正用内因性miRNAから選択される 1 又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の各測定値から代表値を取得する、代表値取得工程；

補正用内因性miRNAの発現量に関して任意に設定された基準値と、代表値取得工程で取得された各体液検体の代表値との差又は比を、各体液検体のための標的miRNA発現量の補正係数としてそれぞれ取得する、補正係数取得工程；及び

各体液検体に対して取得された補正係数をそれぞれ用いて、各体液検体において測定された標的miRNAの発現量を補正する、補正工程を実行させるためのプログラム。

[請求項11] 複数の体液検体間で標的miRNAの発現量を比較解析するために、1 又は複数のコンピューターを、

複数の各体液検体に含まれる標的miRNAの発現量の測定値及び配列番号 1 ～ 10 に示す補正用内因性miRNAから選択される 1 又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値を記憶する記憶手段；

各体液検体について、配列番号 1 ～ 10 に示す補正用内因性miRNAから選択される 1 又は複数の補正用内因性miRNAの発現量の測定値から代表値を取得する、代表値取得手段；

補正用内因性miRNAの発現量に関して任意に設定された基準値と、前記代表値取得手段によって取得された各体液検体の代表値との差又は比を、各体液検体のための標的miRNA発現量の補正係数としてそれぞれ取得する、補正係数取得手段；

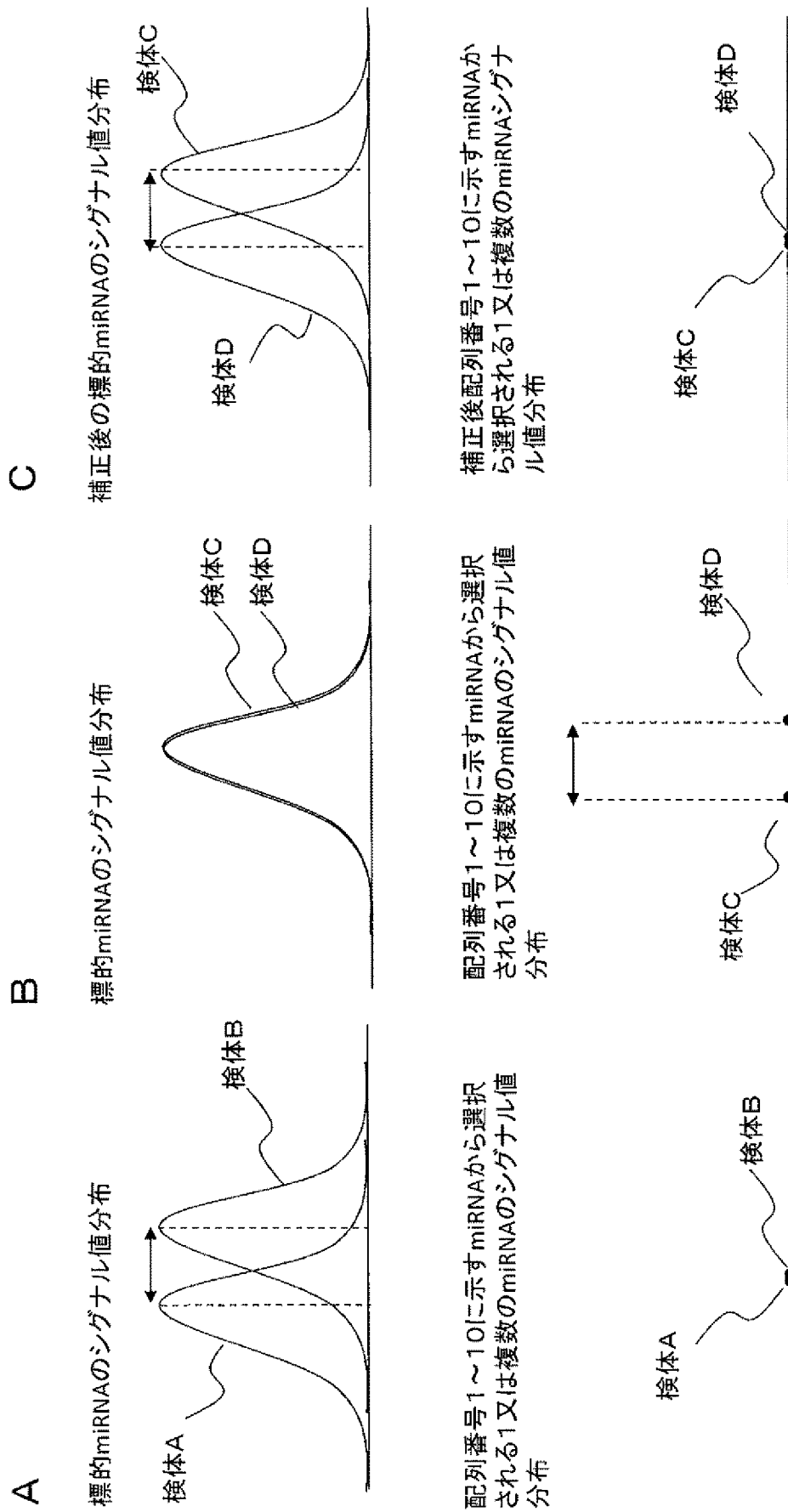
各体液検体に対して取得された補正係数をそれぞれ用いて、各体液検体において測定された標的miRNAの発現量を補正する、補正手段；及び

補正済みの標的miRNA発現量により、少なくとも2つの体液検体の間で標的miRNA発現量を対比した結果を出力する出力手段として機能させるためのプログラム。

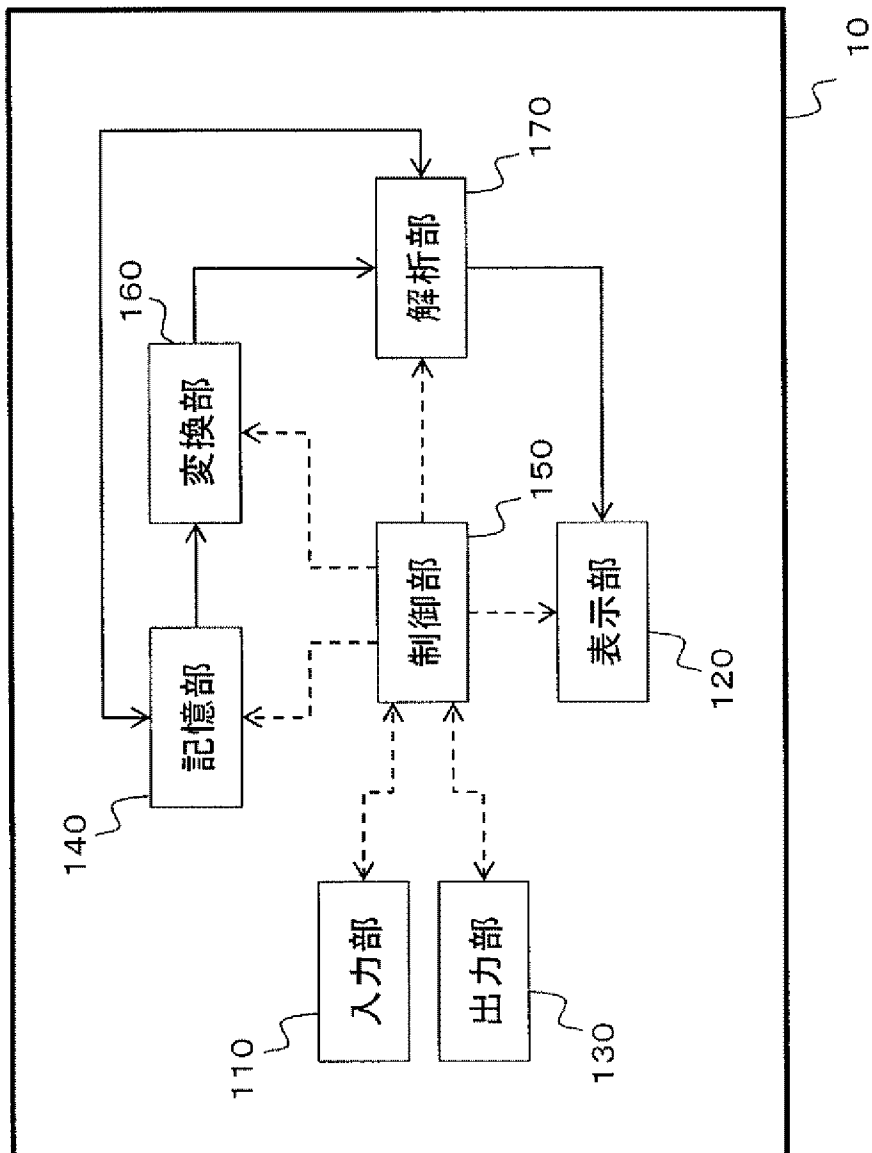
[請求項12] 請求項10又は11に記載のプログラムを記録した、コンピュータ読み取り可能な記録媒体。

[請求項13] 複数の標的miRNAを捕捉するためのプローブ及び配列番号1～10に示す補正用内因性miRNAから選択される1又は複数の補正用内因性miRNAを捕捉するためのプローブが固定化された支持体を含む、miRNA発現解析用チップ。

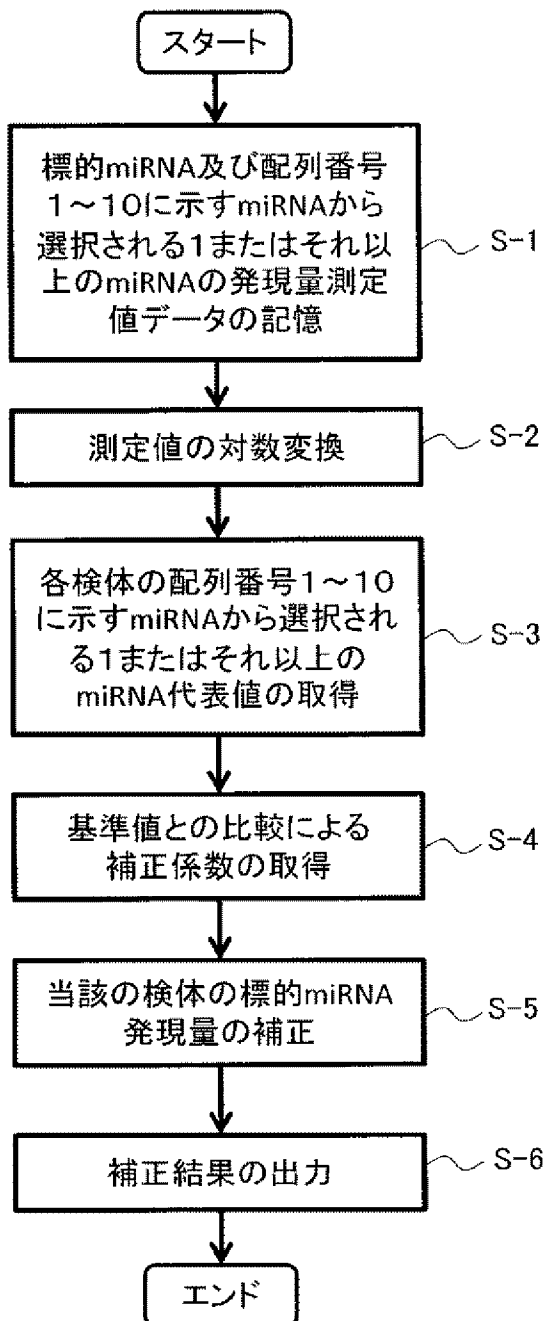
[図1]



[図2]

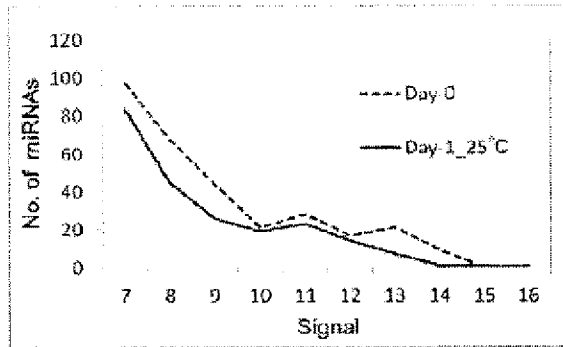


[図3]

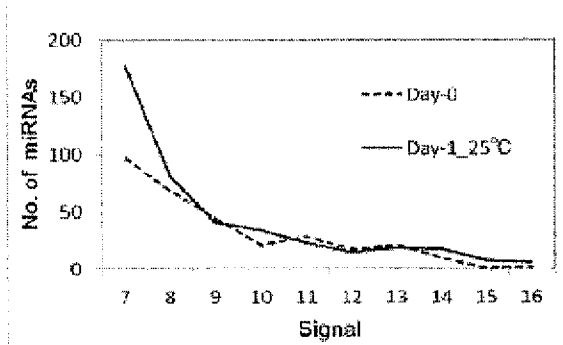


[図4-1]

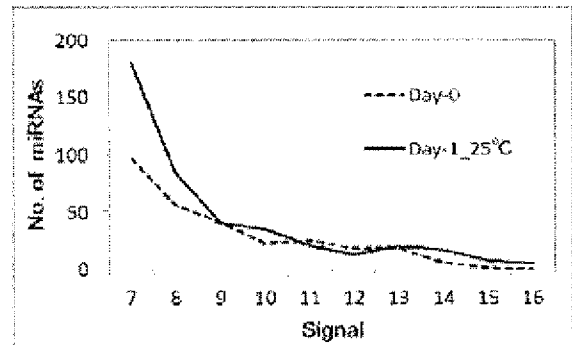
A



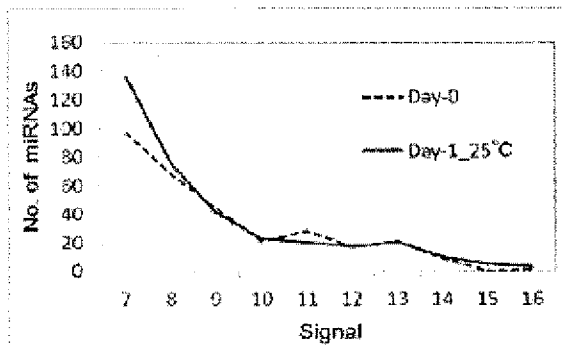
B



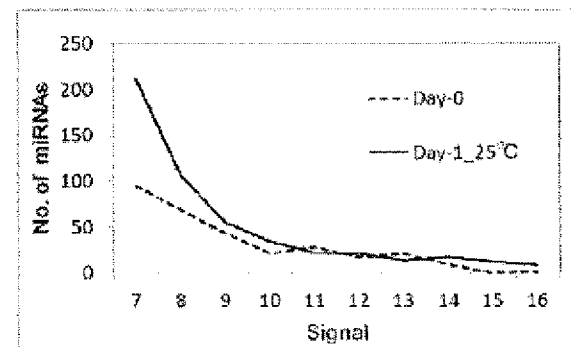
C



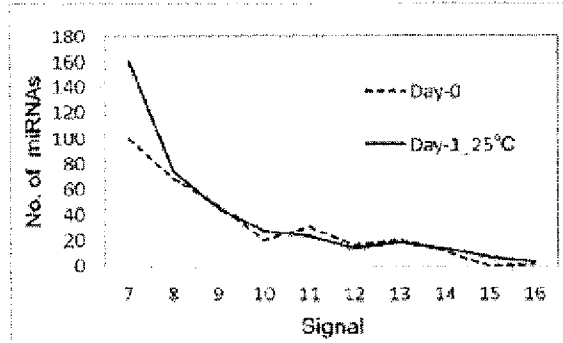
D



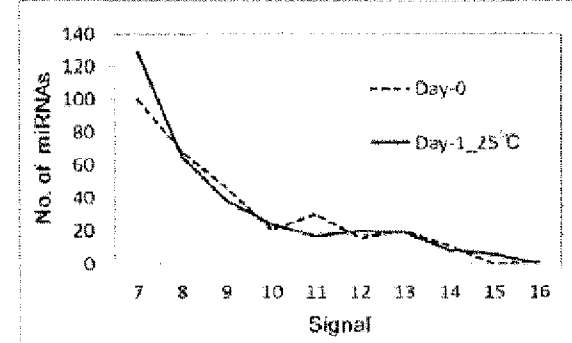
E



F

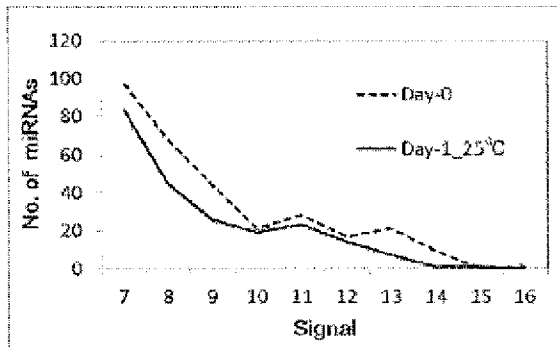


G

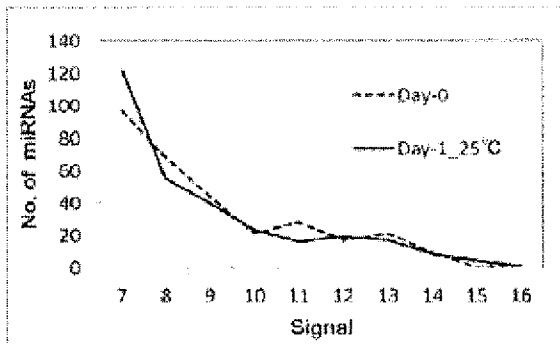


[図4-2]

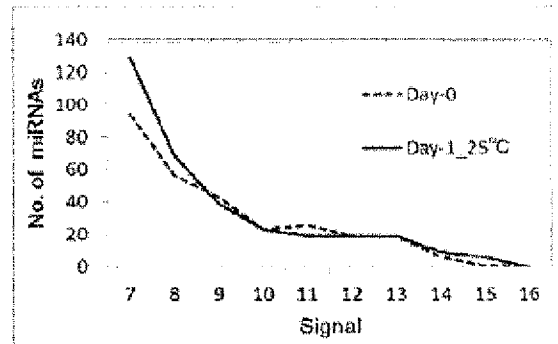
A



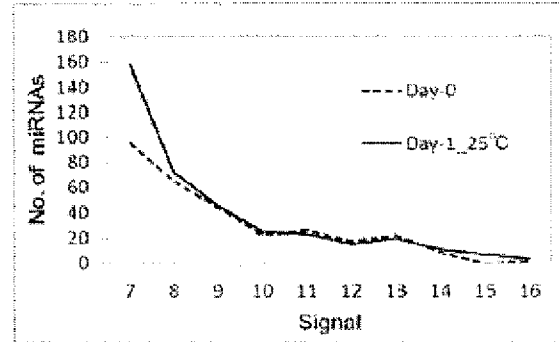
H



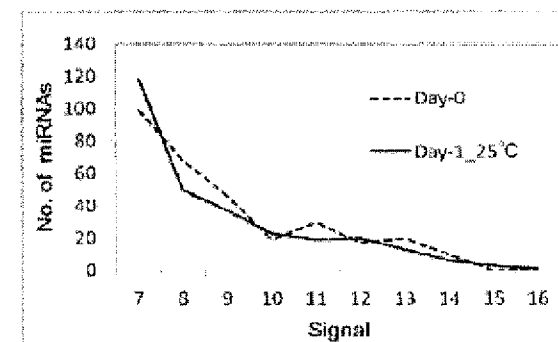
I



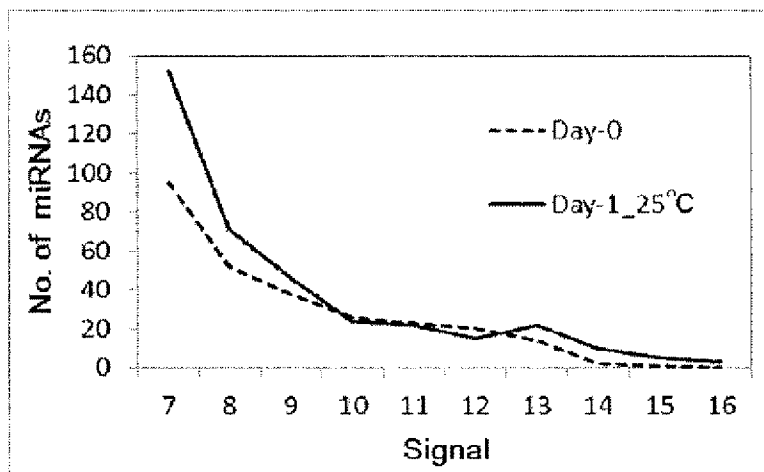
J



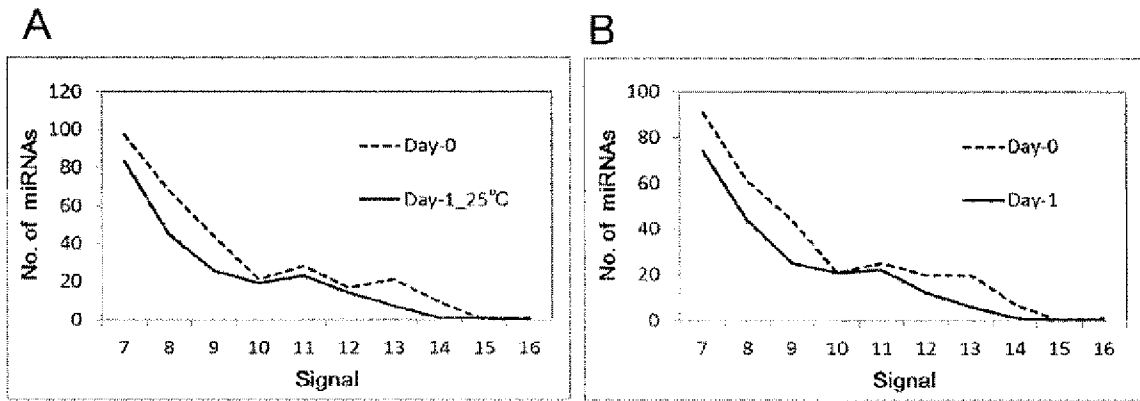
K



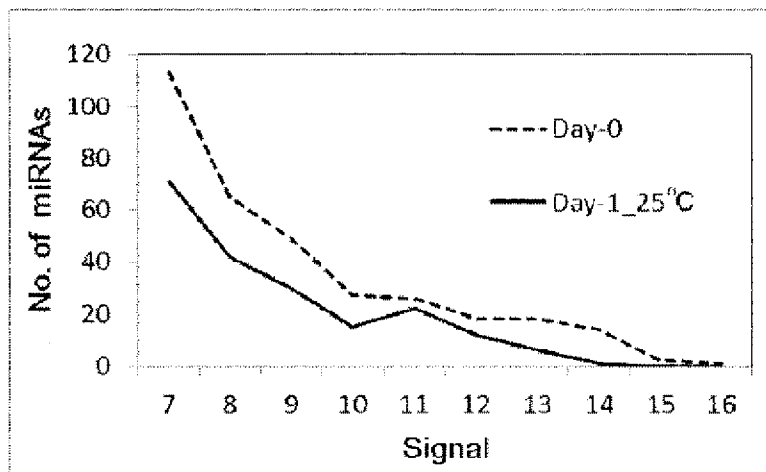
[図5]



[図6]

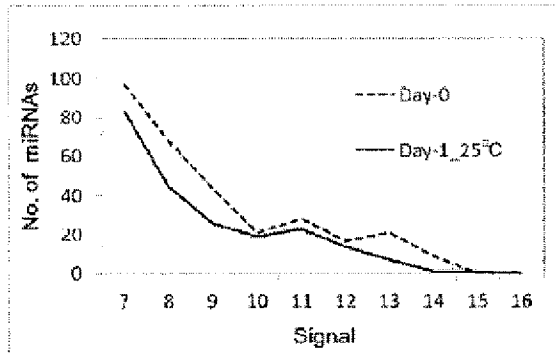


[図7]

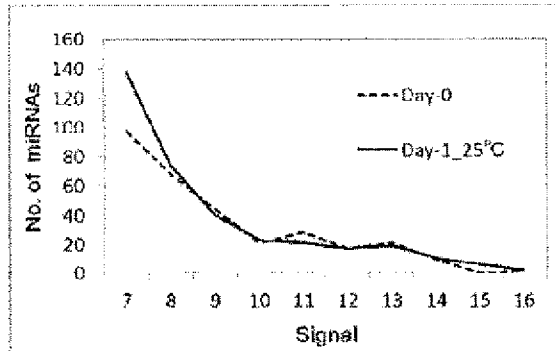


[図8-1]

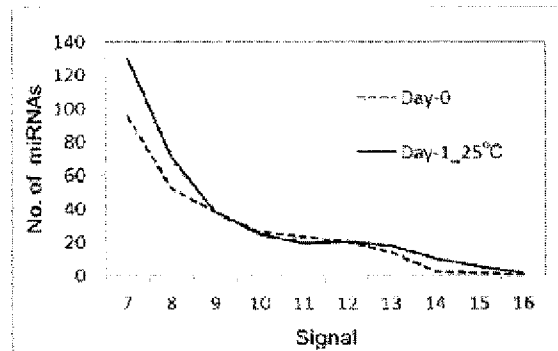
A



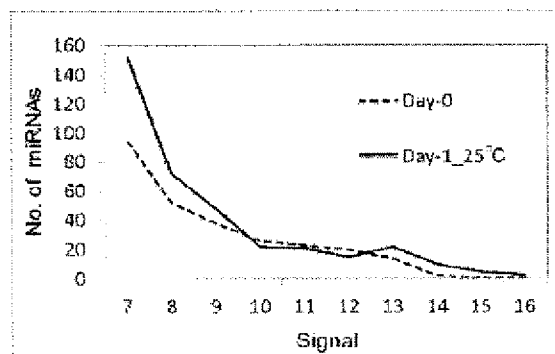
B



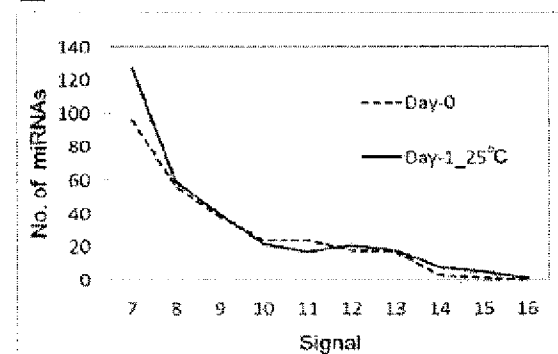
C



D

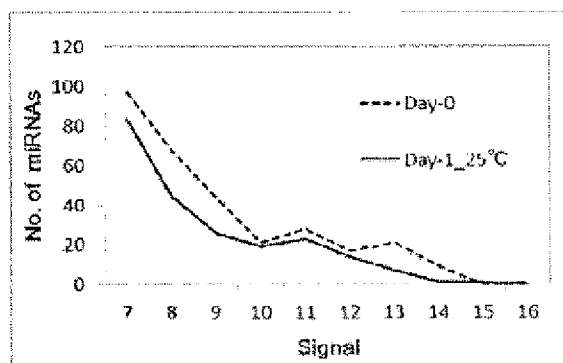


E

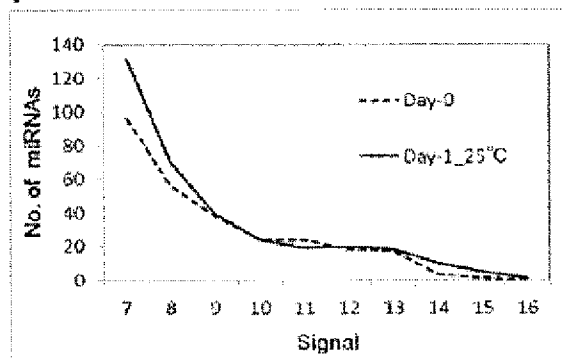


[図8-2]

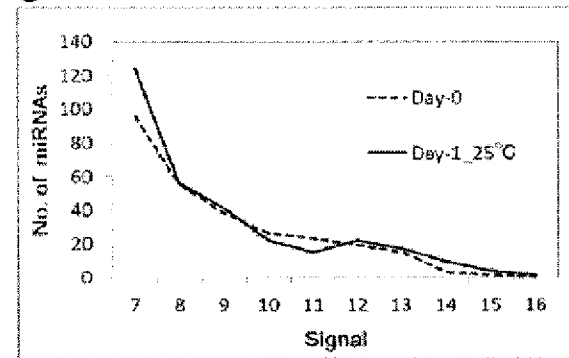
A



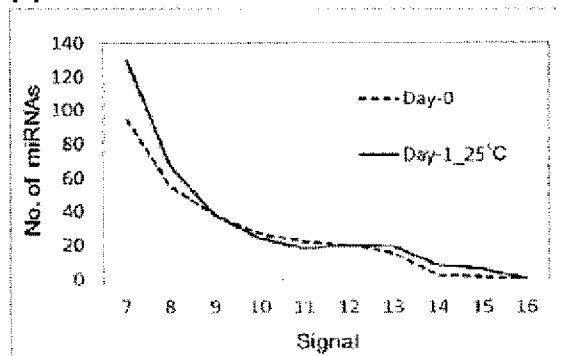
F



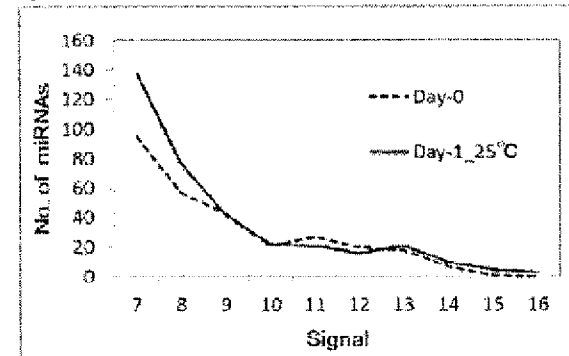
G



H



I



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/076085

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N33/53(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q1/68, C12M1/00, C12M1/34, C12N15/09, G01N33/53, G01N37/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/BIOSIS(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, DWPI(Thomson Innovation)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2014-007995 A (Toray Industries, Inc.), 20 January 2014 (20.01.2014), claims (Family: none)	1-13
Y	WO 2014/034685 A1 (Kyoto University), 06 March 2014 (06.03.2014), claims; paragraph [0020] (Family: none)	1-13
Y	US 2009/0075258 A1 (LATHAM J. Gary et al.), 19 March 2009 (19.03.2009), claims; paragraphs [0056] to [0059] (Family: none)	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 December 2015 (01.12.15)

Date of mailing of the international search report
08 December 2015 (08.12.15)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/076085

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/133915 A1 (NEC Corp.), 05 November 2009 (05.11.2009), claims; paragraphs [0068] to [0079] & US 2011/0143360 A1 claims; paragraphs [0084] to [0101] & US 2012/0270746 A1 & US 2014/0170648 A1 & EP 2281903 A1	1-13
Y	WO 2014/048441 A1 (MIRRX THERAPEUTICS), 03 April 2014 (03.04.2014), SEQ ID NO:142, 439, 552, 576, 713, 1326, 1556 & EP 2900822 A1 & CA 2886116 A & CN 104955950 A	1-13
Y	LADEWIG Erik et al., "Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data", Genome Research, 2012, Vol.22,No.9, p.1634-1645	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68(2006.01)i, C12M1/00(2006.01)i, C12M1/34(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i,
G01N33/53(2006.01)i, G01N37/00(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12Q1/68, C12M1/00, C12M1/34, C12N15/09, G01N33/53, G01N37/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 5 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 5 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 5 年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/REGISTRY/MEDLINE/ BIOSIS (STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq,
DWPI (Thomson Innovation)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2014-007995 A (東レ株式会社) 2014. 01. 20, 特許請求の範囲など, (ファミリーなし)	1-13
Y	WO 2014/034685 A1 (国立大学法人京都大学) 2014. 03. 06, 請求の範囲及び[0020]など, (ファミリーなし)	1-13

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

0 1 . 1 2 . 2 0 1 5

国際調査報告の発送日

0 8 . 1 2 . 2 0 1 5

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)
郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官 (権限のある職員)

坂崎 恵美子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 4 8

4 B

9 4 5 1

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	US 2009/0075258 A1 (LATHAM J. Gary et al.) 2009.03.19, 請求の範囲及び[0056]-[0059]など, (ファミリーなし)	1-13
Y	WO 2009/133915 A1 (日本電気株式会社) 2009.11.05, 請求の範囲及び[0068]～[0079]など, & US 2011/0143360 A1, claims & [0084]-[0101], & US 2012/0270746 A1 & US 2014/0170648 A1 & EP 2281903 A1	1-13
Y	WO 2014/048441 A1 (MIRRX THERAPEUTICS) 2014.04.03, 配列番号 142, 439, 552, 576, 713, 1326, 1556, & EP 2900822 A1 & CA 2886116 A & CN 104955950 A	1-13
Y	LADEWIG Erik et al., “Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data”, Genome Research, 2012, Vol.22, No. 9, p. 1634-1645	1-13