

(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  
2022年1月20日(20.01.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/014670 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) C12Q 1/6886 (2018.01)

C12N 15/113 (2010.01) G01N 33/574 (2006.01)

C12Q 1/6809 (2018.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2021/026597

(22) 国際出願日: 2021年7月15日(15.07.2021)

(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 2020-122124 2020年7月16日(16.07.2020) JP

(71) 出願人: 学校法人 久留米大学 (KURUME UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒8300011 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 Fukuoka (JP).

(72) 発明者: 阪上 尊彦 (SAKAUE, Takahiko); 〒8300011 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 学校法人 久留米大学内 Fukuoka (JP). 岩本 英希 (IWAMOTO, Hideki); 〒8300011 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 学校法人 久留米大学内 Fukuoka (JP). 古賀 浩徳 (KOGA, Hironori); 〒8300011 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 学校法人 久留米大学内 Fukuoka (JP). 岡部 義信 (OKABE, Yoshinobu); 〒8300011 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 学校法人 久留米大学内 Fukuoka (JP). 鳥村 拓司 (TORIMURA, Takuji); 〒8300011 福岡県久留米市旭町 6 7 番地 学校法人 久留米大学内 Fukuoka (JP).

(74) 代理人: 山尾 憲人, 外 (YAMAOKA, Norihito et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町

8 番 1 号 梅田 阪急 ビル オフィスタワー  
青山特許事務所 Osaka (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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), ヨーロッパ (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).

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))

(54) Title: USE OF MICRORNA AS PANCREATIC CANCER BIOMARKER

(54) 発明の名称: 膵臓がんのバイオマーカーとしてのマイクロRNAの使用

(57) Abstract: One purpose of the present invention is to provide a novel use of a microRNA as a pancreatic cancer biomarker. A use of a microRNA in a biological sample derived from a subject, said microRNA containing a nucleotide sequence represented by any of SEQ ID NOS: 1 to 15, as a pancreatic cancer biomarker, wherein the pancreatic cancer biomarker is to be used for determining whether a subject suffers from pancreatic cancer or not, for determining the clinical conditions of a subject suffering or once suffered from pancreatic cancer, or identifying a test substance which can be used in treating pancreatic cancer.

(57) 要約: 本発明の1つの目的は、膵臓がんのバイオマーカーとしてのマイクロRNAの新規使用を提供することである。被験体由来の生体試料中の配列番号1~15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むマイクロRNAの、膵臓がんのバイオマーカーとしての使用であって、前記膵臓がんのバイオマーカーが、被験体が膵臓がんを患っているかを判定するための、膵臓がんを患っている又は患っていた被験体の病態を判定するための、又は膵臓がんを処置し得る被験物質を特定するためのものである、使用。



WO 2022/014670 A1

## 明 細 書

発明の名称：

### 膵臓がんのバイオマーカーとしてのマイクロRNAの使用

#### 技術分野

[0001] 本開示は、膵臓がんのバイオマーカーとしてのマイクロRNAの使用に関する。本開示はまた、膵臓がんを患っているかを判定するためのマイクロRNAを選抜する方法、被験体が膵臓がんを患っているかを判定するための方法、膵臓がんを患っている又は患っていた被験体の病態を判定するための方法、及び膵臓がんを処置し得る被験物質を特定するための方法に関する。本開示はまた、前記使用又は方法に用いるためのキット、膵臓がんを検出するための又は膵臓がん処置の効果をモニタするためのバイオマーカー、及び膵臓がんを検出するための組成物に関する。

#### 背景技術

[0002] 膵臓がんは、極めて予後不良な悪性腫瘍の1つである。膵臓がんの診断において、限局的な膵管狭窄を有する患者に対する内視鏡的逆行性胆管膵管造影による膵液細胞診の重要性が報告されている。しかし、その診断能は、30～84.7%と施設間に差があり、有用性が一定していない。

[0003] エクソソームをバイオマーカーとして利用した膵臓がんの診断に関する報告がなされている。非特許文献1は、膵臓がん患者の血清中のGlypican-1陽性エクソソームをフローサイトメトリー法により検出する、感度100%、特異度100%という方法を提示した。

[0004] 非特許文献2は、膵臓がん患者の血清中エクソソーム由来のDNAからKRAS変異を検出する方法、及び切除可能膵臓がん例の66.7%に同変異を認めたことを報告する。非特許文献3は、膵臓がん患者の膵液中エクソソームに着目した研究を報告する。

#### 先行技術文献

#### 非特許文献

- [0005] 非特許文献1：Nature 2015；523：177-182  
非特許文献2：Ann Oncol 2017；28：741-747  
非特許文献3：Ann Surg Oncol 2019；26：2104-2111

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

- [0006] 非特許文献1に記載の方法には、真に予後延長に寄与する早期膵臓がんの症例数が少ないなどの問題点があり、大規模コホートによる追試が必要と考えられる。非特許文献2に記載の発明では、健常者でも7.4%の陽性率が認められ、感度も75.4%であった。非特許文献2に記載の発明には、その特異度および感度に課題がある。非特許文献3に記載の発明は、既知のマイクロRNA（miR-21とmiR-155）を解析対象としたものである。

- [0007] 本開示は、膵臓がんのバイオマーカーとしてのマイクロRNAの新規使用を提供することを1つの目的とする。本開示はまた、膵臓がんを患っているかを判定するためのマイクロRNAを選抜する新規方法、被験体が膵臓がんを患っているかを判定するための新規方法、膵臓がんを患っている又は患っていた被験体の病態を判定するための新規方法、及び膵臓がんを処置し得る被験物質を特定するための新規方法を提供することを1つの目的とする。本発明はまた、前記使用又は方法に用いるための新規キット、膵臓がんを検出するための又は膵臓がん処置の効果をモニタするための新規バイオマーカー、及び膵臓がんを検出するための新規組成物を提供することを1つの目的とする。

### 課題を解決するための手段

- [0008] 本開示の1つの態様は、被験体由来の生体試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAの、膵臓がんのバイオマーカーとしての使用であって、前記膵臓がんのバイオマーカーが、被験体が膵臓がんを患っているかを判定するための、膵臓が

んを患っている又は患っていた被験体の病態を判定するための、又は膵臓がんを処置し得る被験物質を特定するためのものである、使用を提供する。

[0009] 本開示の1つの態様は、膵臓がんを患っているかを判定するためのマイクロRNAを選抜する方法であって、膵臓がんを患っている被験体由来の生体試料中のマイクロRNAのA群と、膵臓がん細胞を培養した培養液中のマイクロRNAのB群と、膵臓がんに関連する兆候が認められない被験体由来の生体試料中のマイクロRNAのC群とから、前記マイクロRNAのA群と前記マイクロRNAのB群とで共通するマイクロRNAであって、且つ前記マイクロRNAのC群とは共通しないマイクロRNAを選抜することを含む、方法を提供する。

[0010] 本開示の1つの態様は、被験体が膵臓がんを患っているかを判定するための方法であって、前記被験体由来の生体試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAの量と、前記少なくとも1種のマイクロRNAに対応する少なくとも1種の閾値とを比較すること、及び前記少なくとも1種のマイクロRNAの量が前記少なくとも1種の閾値より大きい場合に、前記被験体は膵臓がんを患っていると判定することを含む、方法を提供する。

[0011] 本開示の1つの態様は、膵臓がんを患っている又は患っていた被験体の病態を判定するための方法であって、前記被験体由来の第一の生体試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAの第一の量と、前記被験体の第二の生体試料中の前記少なくとも1種のマイクロRNAの第二の量とを比較すること、及び前記第一の量が前記第二の量よりも小さい場合に、前記被験体の病態が改善されていると判定することを含み、前記第一の生体試料が、前記第二の生体試料を採取した後に採取される、方法を提供する。

[0012] 本開示の1つの態様は、膵臓がんを処置し得る被験物質を特定するための方法であって、膵臓がんを患っている被験体に、前記被験物質を投与すること、前記被験物質を投与した後の前記被験体由来の第一の生体試料中の配列

番号 1 ~ 15 のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 種のマイクロ RNA の第一の量と、前記被験物質を投与する前の前記被験体の第二の生体試料中の前記少なくとも 1 種のマイクロ RNA の第二の量とを比較すること、及び前記第一の量が前記第二の量よりも小さい場合に、前記被験物質が膵臓がんを処置し得る被験物質であると特定することを含む、方法を提供する。

[0013] 本開示の 1 つの態様は、被験体由来の生体試料中の配列番号 1 ~ 15 のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 種のマイクロ RNA である、膵臓がんを検出するためのバイオマーカーを提供する。本開示の 1 つの態様は、被験体由来の血清又は血漿試料中の配列番号 1 ~ 5、9 及び 15 のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 種のマイクロ RNA である、膵臓がん処置の効果をモニタするためのバイオマーカーを提供する。

[0014] 本開示の 1 つの態様は、本開示に係るマイクロ RNA のバイオマーカーとしての使用又は本開示に係る方法に用いるための、配列番号 1 ~ 15 のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 種のマイクロ RNA を測定するための試薬を含む、キットを提供する。

[0015] 本開示の 1 つの態様は、配列番号 1 ~ 15 のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも 1 種のマイクロ RNA を測定するための試薬を含む、膵臓がんを検出するための組成物を提供する。

### 図面の簡単な説明

[0016] [図1]図 1 は、マイクロ RNA miR-6858-5p に関するリアルタイム PCR の結果を示す棒グラフである。

[図2]図 2 は、マイクロ RNA miR-4516 (配列番号 1) に関するリアルタイム PCR の結果を示す棒グラフである。

[図3]図 3 は、マイクロ RNA miR-4674 (配列番号 2) に関するリアルタイム PCR の結果を示す棒グラフである。

[図4]図 4 は、マイクロ RNA miR-6800-5p (配列番号 3) に関

するリアルタイムPCRの結果を示す棒グラフである。

[図5]図5は、マイクロRNA miR-149-3p（配列番号4）に関するリアルタイムPCRの結果を示す棒グラフである。

[図6]図6は、マイクロRNA miR-3621（配列番号5）に関するリアルタイムPCRの結果を示す棒グラフである。

[図7]図7は、マイクロRNA miR-4484（配列番号6）に関するリアルタイムPCRの結果を示す棒グラフである。

[図8]図8は、マイクロRNA miR-3940-5p（配列番号9）に関するリアルタイムPCRの結果を示す棒グラフである。

[図9]図9は、マイクロRNA miR-3656（配列番号15）に関するリアルタイムPCRの結果を示す棒グラフである。

[図10]図10は、腭液試料中のマイクロRNA miR-4516（配列番号1）に関するリアルタイムPCRの結果を示す棒グラフである。

[図11]図11は、腭液試料中のマイクロRNA miR-4674（配列番号2）に関するリアルタイムPCRの結果を示す棒グラフである。

[図12]図12は、多数の腭液試料中のマイクロRNA miR-4516（配列番号1）に関するリアルタイムPCRの結果を示す棒グラフである。

[図13]図13は、多数の腭液試料中のマイクロRNA miR-4674（配列番号2）に関するリアルタイムPCRの結果を示す棒グラフである。

[図14]図14Aは、腭液試料中のmiR-4516（配列番号1）に関する受信者操作特性（ROC）曲線のグラフである。図14Bは、miR-4674（配列番号2）に関する受信者操作特性（ROC）曲線のグラフである。

[図15]図15は、血清試料中のマイクロRNA miR-4516（配列番号1）に関するリアルタイムPCRの結果を示す棒グラフである。

[図16]図16は、血清試料中のマイクロRNA miR-4674（配列番号2）に関するリアルタイムPCRの結果を示す棒グラフである。

[図17]図17は、手術前後にPDAC-8から採取した血清試料中のmiR

− 4 5 1 6（配列番号 1）の発現量を示す棒グラフである。

[図18]図 1 8 は、手術前後に P D A C − 4 から採取した血清試料中の m i R − 4 6 7 4（配列番号 2）の発現量を示す棒グラフである。

[図19]図 1 9 は、多数の血清試料中の m i R − 4 5 1 6（配列番号 1）の発現量を示す棒グラフである。

[図20]図 2 0 は、多数の血清試料中の m i R − 4 5 1 6（配列番号 1）に関する受信者操作特性（R O C）曲線のグラフである。

### 発明を実施するための形態

#### [0017] [膵臓がんのバイオマーカーとしての使用]

本開示の 1 つの態様は、被験体由来の生体試料中の配列番号 1 ~ 1 5 のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む又はからなる少なくとも 1 種のマイクロ RNA の、膵臓がんのバイオマーカーとしての使用を提供する。1 つの実施形態において、前記膵臓がんのバイオマーカーは、被験体が膵臓がんを患っているかを判定するためのものである。1 つの実施形態において、前記膵臓がんのバイオマーカーは、膵臓がんを患っている又は患っていた被験体の病態を判定するためのものである。1 つの実施形態において、前記膵臓がんのバイオマーカーは、膵臓がんを処置し得る被験物質を特定するためのものである。

[0018] 用語「膵臓がん」は、膵臓から発生した癌を意味する。膵臓がんの主たる治療方法には、外科手術、放射線治療、及び化学療法が挙げられる。膵臓がんの外科手術は、限定するものではないが、膵臓がんが形成されている箇所に応じて、膵臓を切除することにより行われる。膵臓がんの放射線治療は、限定するものではないが、放射線を膵臓がんの体外から照射する方法、又は膵臓がんが形成されている箇所に手術中に照射する方法がある。膵臓がんの化学療法は、限定するものではないが、抗がん剤を点滴投与方法がある。膵臓がんの他の治療方法としては、免疫療法及び遺伝子治療が挙げられる。

[0019] 用語「膵臓がんのバイオマーカー」は、膵臓がんに関する情報を反映する

物を意味する。膵臓がんに関する情報は、例えば、ヒト又は非ヒト哺乳動物における膵臓がんの存在又は病態に係る情報、或いは膵臓がんを処置し得る物質を特定するための情報であってよい。膵臓がんに関する情報は、例えば、ヒト又は非ヒト哺乳動物由来の生体試料中の本開示に係るマイクロRNAの濃度又は含有量であってよい。

[0020] 用語「被験体」は、ヒト又は非ヒト哺乳動物を意味する。用語「膵臓がんを患っている被験体」は、医師及び獣医師などの専門知識を有する者により、例えば公知の診断基準に基づいて、膵臓がんを診断されたヒト又は非ヒト哺乳動物を意味する。膵臓がんを患っている被験体は、例えば、外科手術、放射線治療、及び化学療法などの治療を受ける前又は受けた後の被験体であってよい。用語「膵臓がんを患っていた被験体」は、膵臓がんの処置を受けた後のヒト又は非ヒト哺乳動物を意味する。膵臓がんを患っていた被験体は、例えば、医師及び獣医師などの専門知識を有する者により、例えば公知の診断基準に基づいて、膵臓がんが寛解又は完治したと診断されたヒト又は非ヒト哺乳動物であってよい。非ヒト哺乳動物は、例えばマウス、ラット、ラビット、イヌ、ヒツジ、ブタ、又は非ヒト霊長類であってよい。被験体は、好ましくはヒトである。被験体は、例えば、公知の診断基準に基づいて膵臓がんを診断されたヒト、または慢性膵炎と診断されたヒト又は非ヒト哺乳動物であってよい。被験体は、例えば、膵臓がんに関連する兆候が認められないヒト又は非ヒト哺乳動物であってよい。被験体は、好ましくは、ヒトである。

[0021] 用語「生体試料」は、測定対象とする少なくとも1種のマイクロRNAを含み得る、被験体から得られた組成物を意味する。生体試料は、例えば、膵液試料、血清若しくは血漿試料、便試料、十二指腸液試料、又は胆液試料であってよい。膵液試料は、被験体から採取された膵液であってよく、又は膵液中の測定対象とする少なくとも1種のマイクロRNAを含み得るエクソソームを分離及び／又は濃縮する処理を行った試料であってよい。膵液の採取方法は、特に限定されず、公知の方法（例えば、膵管を挿管して採取する方



法)を用いて採取することができる。血清若しくは血漿試料は、被験体から採取された全血から遠心分離などの公知の方法を用いて血球成分が除去された血清若しくは血漿であってよく、又は血漿若しくは血清中の測定対象とする少なくとも1種のマイクロRNAを含み得るエクソソームを分離及び／又は濃縮する処理を行った試料であってよい。便試料、十二指腸液試料、又は胆液試料は、被験体から採取された便、十二指腸液又は胆液であってよく、或いは便、十二指腸液又は胆液中の測定対象とする少なくとも1種のマイクロRNAを含み得るエクソソームを分離及び／又は濃縮する処理を行った試料であってよい。

[0022] 膵液の採取方法は、特に限定されず、公知の方法を用いて採取することができる。生体試料は、測定対象とする少なくとも1種のマイクロRNAの測定に支障とならない範囲で、添加物を含んでいてもよい。そのような添加物は、例えば、緩衝剤、ヌクレアーゼ阻害剤（例えばDNase阻害剤及びRNase阻害剤）、pH調整剤、界面活性剤、およびキレート剤のいずれか又はそれらの組合せであってよい。

[0023] 1つの実施形態において、前記少なくとも1種のマイクロRNAの、膵臓がんのバイオマーカーとしての使用は、被験体から採取した膵液、血清若しくは血漿、便、十二指腸液又は胆液から、膵液試料、血清若しくは血漿試料、便試料、十二指腸液試料又は胆液試料を調製することを含んでよい。1つの実施形態において、生体試料は、膵液試料又は血清若しくは血漿試料である。1つの実施形態において、生体試料は、膵液試料又は血清試料である。1つの実施形態において、生体試料は、膵液試料である。1つの実施形態において、生体試料は、配列番号1に示すヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAに関して血清又は血漿試料、好ましくは血清試料である。

[0024] 用語「エクソソーム」は、脂質二重膜に囲まれた約100nmの小胞顆粒を意味する。エクソソームは、その発生機序やサイズにより区別されない。膵液、血清若しくは血漿、便、十二指腸液又は胆液中のエクソソームは、例

例えば、遠心分離などを用いた公知の方法又は商業的に入手可能な抽出キットにより分離及び／又は濃縮することができる。

[0025] 用語「マイクロRNA」は、16～25塩基からなるRNAを意味する。マイクロRNAは、例えば、エクソソーム中に含まれ、体液又は血液中に存在する。測定対象とするマイクロRNAは、配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む又はからなる。配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む又はからなる少なくとも1種のマイクロRNAは、膵臓がんのマーカースとなり得る。マイクロRNAは、公知の方法又は商業的に入手可能な抽出カラムにより分離及び／又は濃縮することができる。所定のヌクレオチド配列「からなるマイクロRNA」は、主要な成分が所定のヌクレオチド配列を構成するポリヌクレオチドのみからなり、他のヌクレオチドを含まないことを意味する。1つの例において、所定のヌクレオチド配列からなるマイクロRNAは、前記所定にヌクレオチド配列を構成するポリヌクレオチドのみをヌクレオチド成分として含み、糖鎖及びメチル基などの付加物をさらに含んでよい。

[0026] 用語「を含む」は、列挙される要素及び／又はステップが存在し、その他の要素及び／又はステップが追加されてもよいことを意味する。用語「から本質的になる」は、列挙される要素及び／又はステップが存在し、その他の要素及び／又はステップが、組成物、キット及び方法の新規の技術的特徴に影響を与えない範囲で追加されてよいことを意味する。例えば、所定のヌクレオチド配列「から本質的になる」マイクロRNAは、所定のヌクレオチド配列の境界に、5塩基～1塩基、例えば3塩基、2塩基、又は1塩基をさらに含んでよい。

[0027] 少なくとも1種のマイクロRNAは、配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む又はからなるマイクロRNAの1種であってよく、2種以上の組合せであってよい。少なくとも1種のマイクロRNAは、配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む又はからなるマイクロRNAであってよく、例えば配列番号1～5、9及び15のい

れかに示されるヌクレオチド配列、好ましくは配列番号1～3、5及び15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む又ははからなるマイクロRNAであってよく、より好ましくは、配列番号1又は2に示されるヌクレオチド配列を含む又ははからなるマイクロRNAであってよい。

[0028] 生体試料中の少なくとも1種のマイクロRNAは、例えば、腭液試料、血清若しくは血漿試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む又ははからなるマイクロRNAの1種であってよく、2種以上の組合せであってよい。1つの実施形態において、生体試料中の少なくとも1種のマイクロRNAは、腭液試料、血清若しくは血漿試料中の配列番号1～5、9及び15のいずれか、例えば配列番号1～3、5及び15のいずれかに示されるヌクレオチド配列、好ましくは配列番号1又は2に示されるヌクレオチド配列を含む又ははからなるマイクロRNAの1種であってよく、2種以上の組合せであってよい。1つの実施形態において、生体試料中の少なくとも1種のマイクロRNAは、腭液試料中の配列番号1～3、5及び15のいずれかに示されるヌクレオチド配列、好ましくは配列番号1又は2に示されるヌクレオチド配列を含む又ははからなるマイクロRNAの1種であってよく、2種以上の組合せであってよい。1つの実施形態において、生体試料中の少なくとも1種のマイクロRNAは、血清若しくは血漿試料中の配列番号1、3～5、9及び15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む又ははからなるマイクロRNAの1種であってよく、2種以上の組合せであってよい。1つの実施形態において、生体試料中の少なくとも1種のマイクロRNAは、血清若しくは血漿試料中の配列番号1に示されるヌクレオチド配列を含む又ははからなるマイクロRNAの1種であってよい。

[0029] 膵臓がんを患っているかを判定するためのバイオマーカーとしてのマイクロRNAの使用

被験体が膵臓がんを患っているかを判定するための膵臓がんのバイオマーカーとしてのマイクロRNAの使用は、前記被験体由来の生体試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む又ははからなる少

なくとも1種のマイクロRNAの量と、前記少なくとも1種のマイクロRNAに対応する少なくとも1種の閾値とを比較すること、及び前記少なくとも1種のマイクロRNAの量が前記少なくとも1種の閾値より大きい場合に、前記被験体は膵臓がんを患っていると判定することを含む。

[0030] 用語「マイクロRNAの量」は、例えば、単位量あたりの腓液試料、血清若しくは血漿試料、便試料、十二指腸液試料、又は胆液試料中の測定対象とするマイクロRNAの含有量又は濃度であってよい。マイクロRNAの量は、特定の配列を有するヌクレオチドを定量的に測定できる方法（例えば定量PCR及び免疫酵素測定法）によって測定できる。マイクロRNAの量は、測定方法によって得られるシグナル強度であってよく、又は生体試料から得られたシグナル強度から、既知濃度の対照試料から得られたシグナル強度を用いて算出された含有量又は濃度であってよい。

[0031] 1つの実施形態において、膵臓がんを患っているかを判定するための膵臓がんバイオマーカーとしての使用は、被験体由来の生体試料中の少なくとも1種のマイクロRNAの量を測定することを含んでよい。マイクロRNAの量は、例えば、定量PCR又は酵素結合免疫吸着法（ELISA）により測定することができる。

[0032] 用語「閾値」は、測定対象とするマイクロRNAの量に基づいて、膵臓がんを患っているかを判定するために設定される値である。閾値は、測定対象とするマイクロRNAの種類、試料の種類、性別、年齢、人種に応じて適宜設定することができる。閾値は、例えば、膵臓がんと健常者若しくは慢性膵炎患者とを判別するための値（診断閾値）であってよい。診断閾値は、例えば、膵臓がん患者群の測定対象とするマイクロRNAの量と健常者若しくは慢性膵炎患者群の前記マイクロRNAの量とを測定し、偽陰性率、偽陽性率、費用および有病率を考慮して設定することができる。前記閾値の設定には、例えば、ROC曲線（Receiver Operator Characteristic Curve）を用いてもよい。閾値は、例えば、経験則から設定してもよい。

- [0033] 用語「判定」は、医師及び検査技師などの専門知識を有する者の判断によらず、自動的又は機械的に行うことができる。従って、判定は、測定対象とするマイクロRNAの量（測定値）と、そのマイクロRNAに対応する閾値とを比較することにより、自動的又は機械的に行われる。膵臓がんを患っているかの判定は、例えば、測定値が前記閾値よりも大きい場合、被験体は膵臓がんを患っていると判定することができる。他の例では、膵臓がんを患っているかの判定は、測定値が前記閾値よりも小さい場合、被験体は膵臓がんを患っている可能性が低いと判定してもよい。
- [0034] 閾値がゼロに規格化される場合、前記マイクロRNAの量と閾値との比較は、前記マイクロRNAが存在するか否かであってよい。この例において、本判定方法は、マイクロRNAが存在する場合に、前記被験体は膵臓がんを患っていると判定してよい。
- [0035] 前記比較することは、例えば、被験体由来の2種以上の異なる生体試料（例えば膵液試料、又は血清若しくは血漿試料）中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む又はからなるマイクロRNAの量と、閾値とを比較することを組合せてよい。1つの実施形態において、前記比較することは、被験体由来の膵液試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列（例えば配列番号1）からなる第一のマイクロRNAの第一の量と、膵液に関する前記マイクロRNA（配列番号1）の第一の閾値とを比較すること；及び前記被験体由来の血清試料中の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなる第一のマイクロRNAの第二の量と、血清に関する前記マイクロRNA（配列番号1）の第二の閾値とを比較することを含んでよい。
- [0036] 前記比較することは、例えば、被験体由来の特定の生体試料（例えば膵液試料、又は血清若しくは血漿試料）中の配列番号1～15のいずれかに示される2種以上のヌクレオチド配列を含む又はからなるマイクロRNAの量と閾値とを比較することを組合せてよい。1つの実施形態において、前記比較することは、被験体由来の第一の膵液試料中の配列番号1～15のいずれか

に示されるヌクレオチド配列（例えば配列番号1）からなる第一のマイクロRNAの量と、腭液に関する前記第一のマイクロRNA（配列番号1）の第一の閾値とを比較すること；及び前記被験体由来の第二の腭液試料中の前記配列番号以外の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列（例えば配列番号2）を含む第二のマイクロRNAの量と、腭液に関する前記第二のマイクロRNA（配列番号2）の第二の閾値とを比較することを含んでよい。

[0037] 前記比較することは、例えば、被験体由来の2種以上の異なる生体試料（例えば腭液試料、又は血清若しくは血漿試料）中の2種以上の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む又はからなるマイクロRNAの量と閾値とを比較することを組合せてよい。1つの実施形態において、前記比較することは、被験体由来の腭液試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列（例えば配列番号1）からなる第一のマイクロRNAの量と、腭液に関する前記第一のマイクロRNA（配列番号1）の第一の閾値とを比較すること；及び前記被験体由来の血清試料中の前記配列番号以外の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列（例えば配列番号2）を含む第二のマイクロRNAの量と、血清に関する前記第二のマイクロRNA（配列番号2）の第二の閾値とを比較することを含んでよい。

[0038] 前記実施形態において、前記判定することは、前記マイクロRNAの第一の量が前記第一の閾値より大きく、且つ前記マイクロRNAの第二の量が前記第二の閾値より大きい場合に、前記被験体は腭臓がんを患っていると判定してよい。前記実施形態において、前記判定することは、前記マイクロRNAの第一の量が前記第一の閾値より大きい、前記マイクロRNAの第二の量が前記第二の閾値より小さい場合、前記被験体は再検査を要する又は経過観察を要すると判定してよい。前記実施形態において、前記判定することは、前記マイクロRNAの第一の量が前記第一の閾値より小さく、且つ前記マイクロRNAの第二の量が前記第二の閾値より小さい場合に、前記被験体は

膵臓がんを患っていないと判定してよい。

[0039] 膵臓がんを患っている又は患っていた被験体の病態を判定するためのバイオマーカーとしてのマイクロRNAの使用

膵臓がんを患っている又は患っていた被験体の病態を判定するためのバイオマーカーとしてのマイクロRNAの使用は、前記被験体由来の第一の生体試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む又はからなる少なくとも1種のマイクロRNAの第一の量と、前記被験体の第二の生体試料中の前記少なくとも1種のマイクロRNAの第二の量とを比較すること、及び前記第一の量が前記第二の量よりも小さい場合に、前記被験体の病態が改善されていると判定することを含み、前記第一の生体試料が、前記第二の生体試料を測定した後に測定される。1つの実施形態において、本発明は、膵臓がんを患っている被験体の病態を判定するためのバイオマーカーとしてのマイクロRNAの使用を提供する。

[0040] 前記第一の生体試料は、第二の生体試料と同種の生体試料であることが好ましい。一例において、第一の生体試料が膵液試料である場合、第二の生体試料もまた膵液試料である。他の例において、第一の生体試料が血清試料である場合、第二の生体試料もまた血清試料である。他の例において、第一の生体試料は、第二生体試料と異なる種類の生体試料であってもよい。一例において、第一の生体試料が膵液試料である場合、第二の生体試料は血清試料であってもよい。

[0041] 前記第一の生体試料は、例えば、膵臓がんを患っている又は患っていた被験体が外科手術、放射線治療、及び化学療法などの治療を受けた後に採取されてよい。この例において、前記第二の生体試料は、前記治療を受ける前に採取されてよい。第一の生体試料の採取時期と第二の生体試料の採取時期との間隔は、例えば、2週間、1カ月、2カ月、又は3カ月であってもよい。他の例において、第一の生体試料及び第二の生体試料はそれぞれ、前記治療を受けた後に採取されてよい。

[0042] 被験体の「病態」は、膵臓がんを患っている若しくは膵臓がんを患ってい

たヒト又は非ヒト哺乳動物における膵臓がんの状態を意味する。1つの例において、被験体の病態は、膵臓がんを患っていたヒト又は非ヒト哺乳動物における寛解した膵臓がんの状態であってよい。

[0043] 病態の判定は、例えば、第一の量が第二の量よりも小さい場合、被験体の病態が改善されていると判定することができる。他の例では、病態の判定は、第一の量が第二の量よりも大きい場合、被験体の病態が悪化していると判定することができる。他の例では、病態は、第一の量が第二の量と等しい場合、被験体の病態は安定していると判定することができる。

[0044] 前記比較することは、例えば、被験体由来の2種以上の第一の生体試料（例えば膵液試料、又は血清若しくは血漿試料）中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む又はからなる少なくとも1種のマイクロRNAの第一の量と、前記被験体由来の第二の生体試料中の前記少なくとも1種のマイクロRNAの第二の量とを比較することを組合せてよい。1つの実施形態において、前記比較することは、被験体由来の第一の膵液試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列（例えば配列番号1）からなるマイクロRNAの第一の量と、前記被験体由来の第二の膵液試料中の前記マイクロRNA（配列番号1）の第二の量とを比較すること；及び被験体由来の第一の血清試料中の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるマイクロRNAの第三の量と、前記被験体由来の第二の血清試料中の前記マイクロRNA（配列番号1）の第四の量とを比較することを含んでよい。

[0045] 前記比較することは、例えば、被験体由来の第一の生体試料（例えば膵液試料、又は血清若しくは血漿試料）中の配列番号1～15のいずれかに示される2種以上のヌクレオチド配列を含む又はからなるマイクロRNAの第一の量と、前記被験体由来の同種の第二の生体試料（膵液試料）中の前記マイクロRNAの第二の量とを比較することを組合せてよい。1つの実施形態において、前記比較することは、前記被験体由来の第一の膵液試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列（例えば配列番号1）か



らなるマイクロRNAの第一の量と、前記被験体の第二の腭液試料中の前記マイクロRNA（配列番号1）の第二の量とを比較すること；及び前記被験体由来の前記第一の腭液試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列（例えば配列番号2）からなるマイクロRNAの第三の量と前記被験体の前記第二の腭液試料中の前記マイクロRNA（配列番号2）の第四の量とを比較することを含んでよい。

[0046] 前記比較することは、例えば、被験体由来の2種以上の第一の生体試料（例えば腭液試料、又は血清若しくは血漿試料）中の配列番号1～15のいずれかに示される2種以上のヌクレオチド配列を含む又はからなるマイクロRNAの第一の量と、前記被験体由来の第二の生体試料中の前記マイクロRNAの第二の量とを比較することを組合せてよい。1つの実施形態において、前記比較することは、被験体由来の第一の腭液試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列（例えば配列番号1）からなるマイクロRNAの第一の量と、前記被験体由来の第二の腭液試料中の前記マイクロRNA（配列番号1）の第二の量とを比較すること；及び前記被験体由来の第一の血清試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列（例えば配列番号2）からなるマイクロRNAの第三の量と、前記被験体由来の第二の血清試料中の前記マイクロRNA（配列番号2）の第四の量とを比較することを含んでよい。

[0047] 前記実施形態において、前記判定することは、前記マイクロRNAの第一の量が前記マイクロRNAの第二の量より大きく、且つ前記マイクロRNAの第三の量が前記第四の閾値より大きい場合に、腭臓がんを患っている前記被験体の病態は悪化していると判定してよい。前記実施形態において、前記判定することは、前記マイクロRNAの第一の量が前記マイクロRNAの第二の量より大きい、前記マイクロRNAの第三の量が前記マイクロRNAの第四の量より小さい場合、腭臓がんを患っている前記被験体の病態は変化なし又は経過観察を要すると判定してよい。前記実施形態において、前記判定することは、前記マイクロRNAの第一の量が前記マイクロRNAの第二

の量より小さく、且つ前記マイクロRNAの第三の量が前記マイクロRNAの第四の量より小さい場合に、膵臓がんを患っている前記被験体の病態は改善していると判定してよい。

[0048] 膵臓がんを処置し得る被験物質を特定するためのバイオマーカーとしてのマイクロRNAの使用

膵臓がんを処置し得る被験物質を特定するためのバイオマーカーとしてのマイクロRNAの使用は、膵臓がんを患っている被験体に前記被験物質を投与すること、前記被験物質を投与した後の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAの第一の量と、前記被験物質を投与する前の前記被験体の第二の生体試料中の前記少なくとも1種のマイクロRNAの第二の量とを比較すること、及び前記第一の量が前記第二の量よりも小さい場合に、前記被験物質が前記膵臓がんを処置し得る被験物質であると特定すること、を含む。

[0049] 用語「膵臓がんを処置し得る被験物質」は、膵臓がんの進行を低下させ、又は維持させる、或いは膵臓がんを後退させることが期待される物質を意味する。膵臓がんを処置し得る被験物質は、例えば、低分子化合物、タンパク質（例えば抗体）、DNA、又はRNAであってよい。膵臓がんを処置し得る被験物質は、例えば、膵臓がん以外の疾患又はがんを治療するための薬剤であってよい。被験物質は、例えば、1種類であってもよく、又は2種以上の混合物であってもよい。

[0050] 被験物質の投与は、公知の方法により実施することができる。被験物質の投与は、例えば、経口投与、点滴、又は注射により実施することができる。

[0051] 本実施形態における用語「膵臓がんを患っている被験体」は、非ヒト哺乳動物である。非ヒト哺乳動物は、例えばマウス、ラット、ラビット、イヌ、ヒツジ、ブタ、又は非ヒト霊長類（例えばサル及びオラウータン）であってよい。

[0052] 前記第一の生体試料は、第二の生体試料と同種の生体試料であることが好ましい。一例において、第一の生体試料が膵液試料である場合、第二の生体

試料もまた腭液試料である。他の例において、第一の生体試料が血清試料である場合、第二の生体試料もまた血清試料である。

[0053] 前記第一の生体試料の採取時期と第二の生体試料の採取時期との間隔は、例えば、1時間、3時間、12時間、1日、3日、1週間、又は1カ月であってよい。

[0054] 膵臓がんを処置し得る被験物質の特定は、例えば、前記第一の量が前記第二の量よりも小さい場合、その被験物質を、膵臓がんを処置し得る被験物質であると特定することができる。他の例では、膵臓がんを処置し得る被験物質の特定は、前記第一の量が前記第二の量よりも大きい場合、その被験物質を、膵臓がんを悪化させ得る被験物質であると特定することができる。

[0055] 前記比較することは、例えば、被験物質を投与した後の被験体由来の2種以上の第一の生体試料（例えば腭液試料、又は血清若しくは血漿試料）中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む又はからなる少なくとも1種のマイクロRNAの第一の量と、前記被験物質を投与する前の前記被験体由来の第二の生体試料中の前記少なくとも1種のマイクロRNAの第二の量とを比較することを組合せてよい。1つの実施形態において、前記比較することは、被験物質を投与した後の被験体由来の第一の腭液試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列（例えば配列番号1）からなるマイクロRNAの第一の量と、前記被験物質を投与する前の前記被験体由来の第二の腭液試料中の前記マイクロRNA（配列番号1）の第二の量とを比較すること；及び前記被験物質を投与した後の前記被験体由来の第一の血清試料中の配列番号1に示されるヌクレオチド配列からなるマイクロRNAの第三の量と、前記被験物質を投与する前の前記被験体由来の第二の血清試料中の前記マイクロRNA（配列番号1）の第四の量とを比較することを含んでよい。

[0056] 前記比較することは、例えば、被験物質を投与した後の被験体由来の第一の生体試料（例えば腭液試料、又は血清若しくは血漿試料）中の配列番号1～15のいずれかに示される2種以上のヌクレオチド配列を含む又はからな

るマイクロRNAの第一の量と、前記被験物質を投与する前の前記被験体由来の同種の第二の生体試料（腭液試料）中の前記マイクロRNAの第二の量とを比較することを組合せてよい。1つの実施形態において、前記比較することは、被験物質を投与した後の被験体由来の第一の腭液試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列（例えば配列番号1）からなるマイクロRNAの第一の量と、前記被験物質を投与する前の前記被験体の第二の腭液試料中の前記マイクロRNA（配列番号1）の第二の量とを比較すること；及び前記被験物質を投与した後の前記被験体由来の前記第一の腭液試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列（例えば配列番号2）からなるマイクロRNAの第三の量と、前記被験物質を投与する前の前記被験体の前記第二の腭液試料中の前記マイクロRNA（配列番号2）の第四の量とを比較することを含んでよい。

[0057] 前記比較することは、例えば、被験物質を投与した後の被験体由来の2種以上の第一の生体試料（例えば腭液試料、又は血清若しくは血漿試料）中の配列番号1～15のいずれかに示される2種以上のヌクレオチド配列を含む又はからなるマイクロRNAの第一の量と、前記被験物質を投与する前の前記被験体由来の第二の生体試料中の前記マイクロRNAの第二の量とを比較することを組合せてよい。1つの実施形態において、前記比較することは、被験物質を投与した後の被験体由来の第一の腭液試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列（例えば配列番号1）からなるマイクロRNAの第一の量と、前記被験物質を投与する前の前記被験体由来の第二の腭液試料中の前記マイクロRNA（配列番号1）の第二の量とを比較すること；及び前記被験物質を投与した後の前記被験体由来の第一の血清試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列（例えば配列番号2）からなるマイクロRNAの第三の量と、前記被験物質を投与する前の前記被験体由来の第二の血清試料中の前記マイクロRNA（配列番号2）の第四の量とを比較することを含んでよい。

[0058] 被験物質であるとの特定は、例えば、前記第一の量が第二の量よりも小さ

い場合に、被験物質が膵臓がんを処置し得る被験物質であると特定してよい。他の例において、被験物質であるとの特定は、前記第一の量が第二の量よりも大きい場合に、被験物質は膵臓がんを処置できない被験物質であると特定してよい。

[0059] 「膵臓がんのバイオマーカーとしての使用」、その例示的な実施形態である「被験体が膵臓がんを患っているかを判定するための使用」、「膵臓がんを患っている又は患っていた被験体の病態を判定するための使用」又は「膵臓がんを処置し得る被験物質を特定するための使用」における用語及び実施形態の説明（例えば、生体試料とマイクロRNAとの組合せ）は、特に言及がない限り、それらの間で適宜適用される。

[0060] [マイクロRNAを選抜する方法]

本開示の1つの態様は、膵臓がんを患っているかを判定するためのマイクロRNAを選抜する方法であって、膵臓がんを患っている被験体由来の生体試料中のマイクロRNAのA群と、膵臓がん細胞を培養した培養液中のマイクロRNAのB群と、膵臓がんに関連する兆候が認められない被験体由来の生体試料中のマイクロRNAのC群とから、前記マイクロRNAのA群と前記マイクロRNAのB群とで共通するマイクロRNAであって、且つ前記マイクロRNAのC群とは共通しないマイクロRNAを選抜することを含む方法を提供する。

[0061] 用語「膵臓がん細胞」は、例えば、公知の膵臓がん細胞株であってよい。膵臓がん細胞は、商業的に入手可能であり、又は膵臓がんを患っている被験体から採取された膵臓がん細胞を培養することによって調製することができる。膵臓がん細胞は、例えば、1種の細胞株又は2種以上の細胞株の組合せ若しくは混合物であってもよい。膵臓がん細胞は、例えば、KLM-1、MIA Paca2、Panc-1、PK-1、PK-45H、PK-45P、PK-59、PK-8、T3M-4、58-Pan、Hc48、HPC-YT、PAN-1-JCK、PAN-2-JCK、PAN-4-JCK、PAN-5-JCK、PAN-6-JCK、PAN-7-JCK、PAN-8

— JCK、PCI-6、PCI-10、PCI-19、PCI-24、PCI-35、PCI-43、PCI-55、PCI-64、PCI-66、PCI-68、PK-9、AsPc-1、Capan-1、Capan-2、DAN-G、FAMPAC、FAMPAC-A、BxPC-3、及びMIA PaCa-2が挙げられる。1つの実施形態において、膵臓がん細胞が、ヒト膵臓がん細胞株Panc-1、BxPC-3、及びMIA PaCa-2からなる群より選択される少なくとも1種、又は2種以上の組合せ若しくは混合物を含む。

[0062] 用語「膵臓がん細胞を培養する」は、生体外 (ex vivo) で膵臓がん細胞を維持又は増殖させることを意味する。膵臓がん細胞の培養は、例えば、公知の条件下で公知の培養液を用いて実施することができる。用語「培養液」は、細胞培養に必要な成分を含む液体を意味する。培養液は、例えば、培養液を構成する所定量の各成分 (固体) と、所定濃度となる量の純水とを混合することにより調製することができる。培養液は、例えば、ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、最小必須培地 (MEM)、基本培地イーグル (BME)、又はDMEM/F12であってよい。培養液は、所定の添加剤 (抗生物質など) をさらに含んでよい。

[0063] 用語「マイクロRNAの群」は、少なくとも2種のマイクロRNAのヌクレオチド配列に関する情報を含む。マイクロRNAの群は、各マイクロRNAの発現量に関する情報をさらに含んでよい。マイクロRNAの群は、例えば、試料又は培養液中のマイクロRNAをマイクロアレイ解析することにより調製することができる。マイクロRNAの群は、例えば、少なくとも100種、300種、500種、1000種、1500種、又は2000種のマイクロRNAのヌクレオチド配列の情報を含む。

[0064] 用語「共通するマイクロRNA」は、少なくとも2つのマイクロRNAがヌクレオチド配列に関していずれも一致することを意味する。一例において、共通するマイクロRNAは、少なくとも2つのマイクロRNAがいずれも20ヌクレオチド長であり、且つ1番目から20番目の各ヌクレオチドの種

類がいずれも一致する。用語「共通しないマイクロRNA」は、少なくとも2つのマイクロRNAがヌクレオチド配列に関して異なることを意味する。一例において、共通しないマイクロRNAは、一方のマイクロRNAが18ヌクレオチド長であり、他方のマイクロRNAが20ヌクレオチド長である。一例において、共通しないマイクロRNAは、少なくとも2つのマイクロRNAがいずれも20ヌクレオチド長であり、且ついずれかのマイクロRNAにおいて1番目から20番目のヌクレオチドの種類が他のマイクロRNAと少なくとも1か所で異なる。

[0065] 用語「膵臓がんに関連する兆候が認められない被験体」は、膵臓がんであることを示唆する兆候がないこと又は前記兆候が所定の基準に達していない被験体を意味する。膵臓がんであることを示唆する兆候は、例えば、腹部超音波検査、CT検査、MRI検査、超音波内視鏡検査（EUS）、MR胆管膵管撮影（MRCP）、又はPET検査、若しくはこれらの組合せによって調べられる。

[0066] 用語「選抜する」又は「選抜」は、多数の中から目的に合ったものを選び出すこと、又は前記多数から目的に合わないものを除くことを意味する。用語「マイクロRNAを選抜する」は、多数のマイクロRNAの中から、被験体が膵臓がんを患っているかを判定するための指標として有用なマイクロRNAを選び出すこと、又は前記多数のマイクロRNAから前記指標として有用でないマイクロRNAを除くことを意味する。

[0067] 1つの実施形態において、前記マイクロRNAを選抜することは、前記マイクロRNAのA群と、前記マイクロRNAのB群とで共通するマイクロRNAの第一の群を得ること、及び前記マイクロRNAの第一の群から、前記マイクロRNAのA群と前記マイクロRNAのB群と前記マイクロRNAのC群とで共通するマイクロRNAを除くことを含む。

[0068] 1つの実施形態において、前記マイクロRNAを選抜することは、前記マイクロRNAのA群から、前記マイクロRNAのA群と前記マイクロRNAのC群とで共通するマイクロRNAを除いた、マイクロRNAの第二の群を

得ること、前記マイクロRNAのB群から、前記マイクロRNAのB群と前記マイクロRNAのC群とで共通するマイクロRNAを除いた、マイクロRNAの第三の群を得ること、及び前記マイクロRNAの第二の群と前記マイクロRNAの第三の群とで共通するマイクロRNAを選抜することを含む。

[0069] 前記マイクロRNAを選抜する方法は、膵臓がんを患っている被験体由来の生体試料及び膵臓がん細胞を培養した培養液のいずれ一方又は両方を用いて、選抜したマイクロRNAが発現していることを検証してもよい。前記マイクロRNAを選抜する方法は、膵臓がんに関連する兆候が認められない被験体由来の生体試料を用いて、選抜したマイクロRNAが発現していないことを検証してもよい。発現している又は発現していないことの検証は、例えば、定量PCRによって実施することができる。選抜したマイクロRNAが発現していることは、例えば、前記選抜したマイクロRNAの発現量が所定の閾値以上である場合に、発現しているとしてよい。選抜したマイクロRNAが発現していないことは、例えば、前記選抜したマイクロRNAの発現量が所定の閾値未満である場合に、発現していないとしてよい。

[0070] [被験体が膵臓がんを患っているかを判定するための方法]

本開示の1つの態様は、被験体が膵臓がんを患っているかを判定するための方法であって、前記被験体由来の生体試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAの量と、前記マイクロRNAに対応する少なくとも1種の閾値とを比較すること、及び前記少なくとも1種のマイクロRNAの量が前記少なくとも1種の閾値より大きい場合に、前記被験体は膵臓がんを患っていると判定することを含む、方法を提供する。

[0071] 膵臓がんを患っていると判定された被験体に、膵臓がんの処置を施してもよい。従って、本態様に係る1つの実施形態は、被験体において膵臓がんを処置する方法を提供する。前記実施形態は、被験体において膵臓がんを処置する方法を提供し、前記方法は、被験体由来の生体試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロ



RNAの量と、前記マイクロRNAに対応する少なくとも1種の閾値とを比較すること、前記少なくとも1種のマイクロRNAの量が前記少なくとも1種の閾値より大きい場合に、前記被験体は膵臓がんを患っていると判定すること、及び膵臓がんを患っていると判定された前記被験体において膵臓がんを処置すること、を含む。用語「膵臓がんの処置」は、例えば、被験体における膵臓がんに対する化学療法、免疫療法、遺伝子治療、放射線治療又は外科手術、若しくはそれらの組み合わせであってよい。

[0072] [膵臓がんを患っている又は患っていた被験体の病態を判定するための方法]

本開示の1つの態様は、膵臓がんを患っている又は患っていた被験体の病態を判定するための方法であって、前記被験体由来の第一の生体試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAの第一の量と、前記被験体の第二の生体試料中の前記少なくとも1種のマイクロRNAの第二の量とを比較すること、及び前記第一の量が前記第二の量よりも小さい場合に、前記被験体の病態が改善されていると判定することを含み、前記第一の生体試料が、前記第二の生体試料を採取した後に採取される、方法を提供する。1つの実施形態において、本発明は、膵臓がんを患っている被験体の病態を判定するための方法を提供する。

[0073] [膵臓がんを処置し得る被験物質を特定するための方法]

本開示の1つの態様は、膵臓がんを処置し得る被験物質を特定するための方法であって、膵臓がんを患っている被験体に、前記被験物質を投与すること、前記被験物質を投与した後の前記被験体由来の第一の生体試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAの第一の量と、前記被験物質を投与する前の前記被験体の第二の生体試料中の前記少なくとも1種のマイクロRNAの第二の量とを比較すること、及び前記第一の量が前記第二の量よりも小さい場合に、前記被験物質が膵臓がんを処置し得る被験物質であると特定することを含む、方法を提供する。

## [0074] [バイオマーカー]

本開示の1つの態様は、被験体由来の生体試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAである、膵臓がんを検出するための又は膵臓がん処置の効果をモニタするためのバイオマーカーを提供する。本開示の1つの態様は、被験体由来の血清又は血漿試料中の配列番号1～5、9及び15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAである、膵臓がん処置の効果をモニタするためのバイオマーカーを提供する。1つの実施形態において、膵臓がん処置の効果をモニタするためにバイオマーカーは、被検体由来の血清又は血漿試料中の配列番号1、3～5、9及び15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含むマイクロRNAである。1つの実施形態において、膵臓がん処置の効果をモニタするためにバイオマーカーは、被検体由来の血清又は血漿試料中の配列番号1に示されるヌクレオチド配列を含むマイクロRNAである。

[0075] 用語「膵臓がんを検出する」は、膵臓がんに関する情報を得ることを意味する。膵臓がんを検出するための又は膵臓がん処置の効果をモニタするための「バイオマーカー」は、膵臓がんに関する情報又は膵臓がん処置の効果に関する情報を得るために用いられる、膵臓がんに関する情報を反映する物を意味する。膵臓がんに関する情報は、例えば、ヒト又は非ヒト哺乳動物における膵臓がんの存在又は病態に係る情報、膵臓がんの処置の効果に係る情報、或いは膵臓がんを処置し得る物質を特定するための情報であってよい。膵臓がんに関する情報は、例えば、ヒト又は非ヒト哺乳動物由来の生体試料中の本開示に係るマイクロRNAの濃度又は含有量であってよい。膵臓がんを検出するための又は膵臓がん処置の効果をモニタするためのバイオマーカーは、例えば、本開示に係る被験体が膵臓がんを患っているかを判定するための方法、膵臓がんを患っている又は患っていた被験体の病態を判定するための方法、又は膵臓がんを処置し得る被験物質を特定するための方法に用いることができる。膵臓がんの処置をモニタするためのバイオマーカー

は、例えば、膵臓がんの処置を受けた被検体から得られた組成物中の本明細書に開示したバイオマーカーである。バイオマーカーは、例えば、本開示に係るマイクロRNAを含み得る、被験体から得られた組成物（例えば膵液試料、血清若しくは血漿試料、便試料、十二指腸液試料、又は胆液試料）から調製することができる。用語「膵臓がんの処置」は、限定するものではないが、化学療法、免疫療法、遺伝子治療、放射線治療又は外科手術、若しくはそれらの組み合わせであってよい。

[0076] [キット]

本開示の1つの態様は、上記した膵臓がんのバイオマーカーとしての使用に用いるための、配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む又はからなる少なくとも1種のマイクロRNAを測定するための試薬を含むキットを提供する。

[0077] 用語「測定するための試薬」又は「測定試薬」は、測定対象とするマイクロRNAに特異的に結合できるプローブを含む。プローブは、例えば、蛍光物質により標識化されていてもよい。プローブは、例えば、マイクロRNAのヌクレオチド配列と相補的な配列を含む少なくとも1種のヌクレオチド（例えばDNA又はRNA）が挙げられる。そのようなヌクレオチドは、例えば、商業的に入手可能である。プローブは、例えば、PCRなどの核酸増幅方法に用いるためのプライマーセットであってよい。そのようなプライマーセットは、当業者であれば増幅対象であるマイクロRNAの配列に基づいて適宜設定及び調製することができる。

[0078] キットは、例えば、液体形態または固体形態の緩衝剤、及びヌクレアーゼ阻害剤（例えばDNase阻害剤及びRNase阻害剤）をさらに含んでもよい。測定試薬の特徴は、測定対象とするマイクロRNAを測定する方法に依存して適宜設定することができる。例えば、前記測定する方法が定量PCRである場合、測定試薬は、測定対象とするマイクロRNAと相補的な配列を有するヌクレオチドをプローブとして含み、前記プローブは蛍光物質により標識化されていてもよい。

[0079] [膵臓がんを検出するための組成物]

本開示の1つの態様は、配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む又はからなる少なくとも1種のマイクロRNAを測定するための試薬を含む、膵臓がんを検出するための組成物を提供する。

[0080] 1つの実施形態において、前記組成物は、配列番号1～5のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む又はからなる少なくとも1種のマイクロRNAのいずれか又はその組合せを測定するための試薬を含む。

[0081] 1つの実施形態において、前記組成物は、配列番号1に示されるヌクレオチド配列を含む又はからなるマイクロRNAを測定するための試薬及び配列番号2に示されるヌクレオチド配列を含む又はからなるマイクロRNAを測定するための試薬の両方を含む。

[0082] 本開示により提供される態様 [膵臓がんのバイオマーカーとしての使用]、 [マイクロRNAを選抜する方法]、 [被験体が膵臓がんを患っているかを判定するための方法]、 [膵臓がんを患っている又は患っていた被験体の病態を判定するための方法]、 [膵臓がんを処置し得る被験物質を特定するための方法]、 [バイオマーカー]、 [キット] 及び [膵臓がんを検出するための組成物] における用語及び実施形態の説明（例えば、生体試料とマイクロRNAとの組合せ）は、特に言及がない限り、それらの間で適宜適用される。

[0083] 以下、具体的な実施例を記載するが、それらは本発明の好ましい実施形態を示すものであり、添付する特許請求の範囲に記載の発明をいかようにも限定するものではない。

[0084] 実施例

[試験1] マイクロアレイ解析

ヒト膵臓がん細胞株Panc-1を培養し、その培養液中に分泌されたエクソソームをexoEasy Maxi Kit (QIAGEN社、#76064)を用いて抽出した。抽出したエクソソームからNucleoSpin miRNA (タカラバイオ)を用いてマイクロRNAを回収した。上記

と同様にして、ヒト膵臓がん細胞株 B x P C - 3 及び M I A P a C a - 2 の培養液からそれぞれマイクロRNAを回収した。4名の膵臓がん患者からそれぞれ膵管挿管を用いて膵液を採取し、上記と同様にして、採取した膵液試料中のエクソソームからマイクロRNAを得た。3名の慢性膵炎患者からも、上記と同様にして、それぞれ膵液を採取し、前記膵液試料中のエクソソームからマイクロRNAを得た。

[0085] 前記した3種類のヒト膵臓がん細胞株 P a n c - 1、B x P C - 3、及び M I A P a C a - 2 から分泌されたエクソソーム由来のマイクロRNA、前記した4名の膵臓がん患者の膵液試料中のエクソソーム由来のマイクロRNA、並びに前記した3名の慢性膵炎患者の膵液試料中のエクソソーム由来のマイクロRNAについて、マイクロアレイ解析を行った。マイクロアレイ解析は、株式会社セルイノベーターによって実施された。より具体的には、各マイクロRNAのトータルRNA 1000ngを、FlashTag (登録商標) B i o t i n H S R R N A L a b e l i n g K i t を用いて標識化した。標識化したRNAを、Affymetrix社 GeneChip (登録商標) m i R N A 4 . 0 A r r a y に対してハイブリダイズさせ、ハイブリダイズさせたArrayをスキャンした。スキャンしたデータを、Affymetrix Transcriptome Analysis Console 4.0を用いて解析した。

[0086] 前記3種類のヒト膵臓がん細胞株から分泌されたエクソソーム由来のマイクロRNAについてマイクロアレイ解析により得られたマイクロRNA配列の情報と、前記4名の膵臓がん患者の膵液試料中のエクソソーム由来のマイクロRNAについてマイクロアレイ解析により得られたマイクロRNA配列の情報とを比較し、両試料において高発現であった複数種類のマイクロRNA配列を取得した。取得した複数種類のマイクロRNA配列から、前記3名の慢性膵炎患者の膵液試料中のエクソソーム由来のマイクロRNA配列と重複するマイクロRNA配列を除いた。この結果得られるマイクロRNAは、膵臓がん患者及び／又は膵臓がん細胞株にて発現が高く、且つ、非がん患者

(慢性膵炎患者)では発現が低く、膵臓がんのバイオマーカーとして利用し得ることが推測される。本試験1にて得られた15種類のマイクロRNAを以下の表に示す。

[0087]

[表1]

Transcript ID (Array Design)	Accession	Sequence	Fold Change	P-value
hsa-miR-4484	MIMAT0019018	AAAAGCCGGAGAAGCCCCA	130.69	0.0268
hsa-miR-6800-5p	MIMAT0027500	GUAGGUGACAGUCAGGGCGG	70.52	<0.0001
hsa-miR-4516	MIMAT0019053	GGGAGAAGGUCGGGGC	68.59	0.0222
hsa-miR-4745-5p	MIMAT0019878	UGAGUGGGUCUCCCGGACGGCG	52.35	<0.0001
hsa-miR-3178	MIMAT0015055	GGGGCCGGCCGAUCG	42.52	0.0020
hsa-miR-3940-5p	MIMAT0019229	GUGGUUGGGCGGGCUCUG	31.34	0.0010
hsa-miR-4530	MIMAT0019069	CCAGCAGGACGGGACCG	26.17	0.0003
hsa-miR-4463	MIMAT0018987	GAGACUGGGUGGGGCC	22.78	0.0010
hsa-miR-3621	MIMAT0018002	CGCGGUCGGGUCUGCAGG	22.47	0.0042
hsa-miR-149-3p	MIMAT0004609	AGGAGGGACGGGGCUGUGC	20.68	0.0018
hsa-miR-4674	MIMAT0019756	CUGGGUCGGGACGCCGGCU	20.39	0.0010
hsa-miR-6821-5p	MIMAT0027542	GUGCGUGGUGGUCGAGCGGGG	19.84	0.0006
hsa-miR-4487	MIMAT0019032	CUCGGGACGGCUGGGC	19.16	0.0042
hsa-miR-4734	MIMAT0019859	GCUGCGGGCUGCGGUCAGGGCG	17.15	0.0001
hsa-miR-3656	MIMAT0018076	GGCGGUGCGGGGUGG	13.93	0.0093

[0088] 本明細書中で言及する配列番号と、表1に記載のマイクロRNAとの関係

を以下の表にまとめた。

[表2]

配列番号	マイクロRNA	配列
1	miR-4516	GGGAGAAGGGUCGGGGC
2	miR-4674	CUGGGCUCGGGACGCGGGCU
3	miR-6800-5p	GUAGGUGACAGUCAGGGGGCGG
4	miR-149-3p	AGGGAGGGACGGGGGUCUGC
5	miR-3621	CGCGGGUCGGGGUCUGCAGG
6	miR-4484	AAAAGGCGGGAGAAGCCCA
7	miR-4745-5p	UGAGUGGGGCUCCGGGACGGCG
8	miR-3178	GGGGCGGGCCGGAUCG
9	miR-3940-5p	GUGGGUUGGGCGGGCUCUG
10	miR-4530	CCCAGCAGGACGGGAGCG
11	miR-4463	GAGACUGGGGUGGGGCC
12	miR-6821-5p	GUGCGUGGUGGCUCGAGGCGGGG
13	miR-4497	CUCCGGGACGGCUGGGC
14	miR-4734	GCUCGGGGCUCGGUCAGGGCG
15	miR-3656	GGCGGGUGCGGGGGUGG

[0089] [試験2] リアルタイムPCR解析

試験1のマイクロアレイ解析の結果、非がん患者（慢性膵炎患者）での発現量に比べて、膵臓がん患者及び／又は膵臓がん細胞株での発現量が高いという条件を満たさなかったマイクロRNA miR-6858-5pに関して、4名の膵臓がん患者の膵液、2名の慢性膵炎患者の膵液、及3種類の膵臓がん細胞株の培養液中のマイクロRNAをリアルタイムPCRにて定量した。リアルタイムPCRの陰性対照は、膵液試料を含めない増幅試薬のみ（blank）を用いた。これらの結果を図1に示す。図1は、慢性膵炎の膵液（2検体）、膵臓がん患者の膵液（4検体）及び膵臓がん細胞株の培養液（3検体）のいずれにおいても、miR-6858-5pの量に大きな差がなく、非がん患者（慢性膵炎患者）での発現量に比べて、膵臓がん患者及び／又は膵臓がん細胞株にて発現量が高いという条件を満たしていないことを示す。図1は、マイクロRNA miR-6858-5pが膵臓がんのバイオマーカーとして有用とは言えないことを示唆する。

[0090] 表2記載のマイクロRNA miR-4516（配列番号1）に関して、



上記した患者の腭液及び培養細胞の培養液中のマイクロRNAをリアルタイムPCRにて定量した。この結果を図2に示す。図2は、非がん患者（慢性膵炎患者）の腭液（2検体）中のmiR-4516の量に比べて、膵臓がん患者の腭液（3検体）及び膵臓がん細胞株（2体）中のmiR-4516の量の方が多いことを示す。この結果は、miR-4516に関して、非がん患者（慢性膵炎患者）での発現量に比べて、膵臓がん患者及び／又は膵臓がん細胞株にて発現量が高いという条件を満たし、miR-4516が膵臓がんのバイオマーカーとなり得ることを示唆する。

[0091] 上記と同様にして、表2記載の幾つかマイクロRNA（配列番号2～6、9及び15）に関し、リアルタイムPCRを行った。これらの結果を図3～図9に示す。図3は、非がん患者（慢性膵炎患者）の腭液（2検体）中のmiR-4674（配列番号2）の量に比べて、膵臓がん患者の腭液（3検体）及び膵臓がん細胞株の培養液（3検体）中のmiR-4674の量の方が多いことを示す。この結果は、非がん患者（慢性膵炎患者）での発現量に比べて、膵臓がん患者及び／又は膵臓がん細胞株にて発現量が高いという条件を満たし、miR-4674が膵臓がんのバイオマーカーとなり得ることを示唆する。

[0092] 図4は、非がん患者（慢性膵炎患者）の腭液（2検体）中のmiR-6800-5p（配列番号3）の量に比べて、膵臓がん患者の腭液（1検体）及び膵臓がん細胞株の培養液（1検体）中のmiR-6800-5pの量の方が多いことを示す。この結果は、miR-6800-5pに関して、非がん患者（慢性膵炎患者）での発現量に比べて、膵臓がん患者（1検体）及び／又は膵臓がん細胞株（1検体）にて発現量が高いという条件を満たし、miR-6800-5pが膵臓がんのバイオマーカーとなり得ることを示唆する。

[0093] 図5は、非がん患者（慢性膵炎患者）の腭液（1検体）中のmiR-149-3p（配列番号4）の量に比べて、膵臓がん細胞株の培養液（2検体）中のmiR-149-3pの量の方が多いことを示す。この結果は、miR

− 1 4 9 − 3 p に関して、非がん患者（慢性膵炎患者）での発現量に比べて、膵臓がん患者及び／又は膵臓がん細胞株にて発現量が高いという条件を満たし、m i R − 1 4 9 − 3 p が膵臓がんのバイオマーカーとなり得ることを示唆する。

[0094] 図6は、非がん患者（慢性膵炎患者）の膵液（2検体）中のm i R − 3 6 2 1（配列番号5）の量に比べて、膵臓がん患者の膵液（2検体）及び膵臓がん細胞株の培養液（2検体）中のm i R − 3 6 2 1の量の方が多いことを示す。この結果は、m i R − 3 6 2 1に関して、非がん患者（慢性膵炎患者）での発現量に比べて、膵臓がん患者及び／又は膵臓がん細胞株にて発現量が高いという条件を満たし、m i R − 3 6 2 1が膵臓がんのバイオマーカーとなり得ることを示唆する。

[0095] 図7は、非がん患者（慢性膵炎患者）の膵液（2検体）中のm i R − 4 4 8 4（配列番号6）の量が、膵臓がん患者の膵液（4検体）及び膵臓がん細胞株の培養液（3検体）中のm i R − 4 4 8 4の量よりも多いことを示す。この結果は、m i R − 4 4 8 4に関して、非がん患者（慢性膵炎患者）での発現量に比べて、膵臓がん患者及び／又は膵臓がん細胞株にて発現量が高いという条件を満たさず、膵液中のm i R − 4 4 8 4が膵臓がんのバイオマーカーとして利用可能とは言えないことを示す。

[0096] 図8は、非がん患者（慢性膵炎患者）の膵液（2検体）中のm i R − 3 9 4 0 − 5 p（配列番号9）の量に比べて、膵臓がん細胞株の培養液（2検体）中のm i R − 3 9 4 0 − 5 pの量の方が多いことを示す。この結果は、m i R − 3 9 4 0 − 5 pに関して、非がん患者（慢性膵炎患者）での発現量に比べて、膵臓がん患者及び／又は膵臓がん細胞株にて発現量が高いという条件を満たし、m i R − 3 9 4 0 − 5 pが膵臓がんのバイオマーカーとなり得ることを示唆する。

[0097] 図9は、非がん患者（慢性膵炎患者）の膵液（1検体）中のm i R − 3 6 5 6（配列番号15）の量に比べて、膵臓がん患者の膵液（1検体）及び膵臓がん細胞株の培養液（2検体）中のm i R − 3 6 5 6の量の方が多いこと

を示す。この結果は、miR-3656に関して、非がん患者（慢性膵炎患者）での発現量に比べて、膵臓がん患者及び／又は膵臓がん細胞株にて発現量が高いという条件を満たし、miR-3656が膵臓がんのバイオマーカーとなり得ることを示唆する。

[0098] 図2～図6及び図8～図9は、配列番号1～5、9及び15に示すヌクレオチド配列からなるマイクロRNAに関して、試験2のリアルタイムPCRの結果と、試験1のマイクロアレイ解析の結果とが整合することを示す。図2～図6及び図8～図9はまた、配列番号1～3、5及び15に示すヌクレオチド配列からなるマイクロRNAは、非がん患者（慢性膵炎患者）での発現量に比べて、膵臓がん細胞株及び膵臓がん患者にて発現量が高いことを示し、前記マイクロRNAが、膵臓がんのバイオマーカーとして好ましいことを示唆する。

[0099] [試験3] 膵液試料での検証I

試験2で示唆された膵臓がんのバイオマーカーmiR-4516（配列番号1）及びmiR-4674（配列番号2）の有用性についてさらに試験するため、上記4名の膵臓がん患者に加えて4名の膵臓がん患者の膵液、及び上記2名の慢性膵炎患者に加えて4名の慢性膵炎患者の膵液を用いた。試験3に用いた膵液検体を以下の表に示す。

[表3]

	膵液試料	患者ID
1	慢性膵炎患者 a の膵液試料	No. 13
2	慢性膵炎患者 b の膵液試料	No. 21
3	慢性膵炎患者 c の膵液試料	No. 53
4	慢性膵炎患者 d の膵液試料	No. 39
5	慢性膵炎患者 e の膵液試料	No. 23
6	慢性膵炎患者 f の膵液試料	No. 27
7	膵臓がん患者 A の膵液試料	No. 2
8	膵臓がん患者 B の膵液試料	No. 29
9	膵臓がん患者 C の膵液試料	No. 31
10	膵臓がん患者 D の膵液試料	No. 26
11	膵臓がん患者 E の膵液試料	No. 45
12	膵臓がん患者 F の膵液試料	No. 10
13	膵臓がん患者 G の膵液試料	No. 30
14	膵臓がん患者 H の膵液試料	No. 57

[0100] 慢性膵炎患者 a ~ f の膵液（6検体）、及び膵臓がん患者 A ~ H の膵液（8検体）中のマイクロRNA miR-4516（配列番号1）の量及びmiR-4674（配列番号2）の量を定量リアルタイムPCRにより調べた。これらの結果を図10及び図11にそれぞれ示す。図10は、慢性膵炎患者 a の膵液試料中のマイクロRNA miR-4516（配列番号1）の測定値に対して規格化した、各患者の膵液試料中のmiR-4516相対値を示す。図10は、相対値3を閾値とした場合、慢性膵炎患者6名中5名が陰性と判定されること（特異度：約83.3%）、膵臓がん患者8名中7名が陽性と判定されること（感度：87.5%）、及び膵臓がん細胞の3種類中3種類が陽性と判定されること（陽性率：100%）を示す。この結果は、膵液試料中のマイクロRNA miR-4516（配列番号1）が膵臓がんのバイオマーカーとして有用であることを示す。

[0101] 図11は、慢性膵炎患者 a の膵液試料中のマイクロRNA miR-4674（配列番号2）の測定値に対して規格化した、各患者の膵液試料中のmiR-4674の相対値を示す。図11は、相対値2を閾値とした場合、慢性膵炎患者6名中5名が陰性と判定されること（特異度：83.3%）、膵

臓がん患者8名中5名が陽性と判定されること（感度：62.5%）、及び膵臓がん細胞の3種類中3種類が陽性と判定されること（陽性率：100%）を示す。この結果は、膵液試料中のマイクロRNA miR-4674（配列番号2）が膵臓がんのバイオマーカーとして有用であることを示す。

[0102] [試験4] 膵液試料での検証！！

試験3で膵臓がんのバイオマーカーとしての有用性が実証されたmiR-4516（配列番号1）及びmiR-4674（配列番号2）について、以下の表に示す15名の膵臓がん患者の膵液、及び11名の慢性膵炎患者の膵液を用いて、試験3と同様の試験を行った。

[表4]

Sample Number	Age	Sex	Tumor Location	Tumor Size (mm)	TS	Stage	T	N	M	metastasis site	CEA	CA19-9	PJC
PDAC-1	63	F	Pb	23	TS2	IV	3	1	1	LYM, HEP	1.8	<1.0	Negative
PDAC-2	55	F	Ph	45	TS3	IV	4	1	1	LYM, PER	1.9	126	-
PDAC-3	68	M	Ph+fb	20+22	TS1+TS2	IV	3	0	1	PER	1.0	>12000	-
PDAC-4	71	M	Ph	40	TS2	IB	3	1	0	-	3.5	206	Positive
PDAC-5	76	M	Ph	39	TS2	IV	4	1	1	PUL	3.1	47.9	Positive
PDAC-6	70	M	Ph	16	TS1	IIA	3	0	0	-	5.1	133.5	Negative
PDAC-7	70	M	Ph	45	TS3	IV	4	1	1	LYM, PUL, HEP, PER	33.6	>12000	-
PDAC-8	83	M	Pfb	34	TS2	III	4	0	0	-	2.2	271	Positive
PDAC-9	82	M	Ph	14	TS1	III	4	0	0	-	4.1	288.6	Positive
PDAC-10	57	F	Ph	22	TS2	III	3	1	0	-	3.5	143.0	Positive
PDAC-11	77	F	Ph	35	TS2	IB	3	1	0	-	2.9	992	Positive
PDAC-12	72	F	Pb	20	TS1	IB	3	1	0	-	3.2	163.2	Positive
PDAC-13	78	F	Pf	42	TS3	IIA	3	0	0	-	23.4	>12000	Positive
PDAC-14	81	M	Ph	33	TS2	IV	3	1	1	LYM, HEP	4	>12000	-
PDAC-15	80	M	Pf	51	TS3	IIA	3	0	0	-	6.5	1840.5	Positive
CP-1	73	M									-	-	Negative
CP-2	71	M									7.3	<2.0	Negative
CP-3	60	F									2.1	<2.0	Negative
CP-4	52	M									5.1	<2.0	Negative
CP-5	41	F									-	-	Negative
CP-6	61	M									8.9	-	Negative
CP-7	84	M									7.7	161	Negative
CP-8	87	M									2	13.7	Negative
CP-9	91	M									-	65.1	Negative
CP-10	76	M									8.3	19.2	Negative
CP-11	64	M									3.3	2.4	Negative

- [0103] 試験3と同様の試験を行った結果を図12及び図13にそれぞれ示す。図12は、慢性膵炎患者CP1の膵液試料中のマイクロRNA miR-4516（配列番号1）の測定値に対して規格化した、各患者の膵液試料中のmiR-4516相対値を示す。図13は、慢性膵炎患者CP1の膵液試料中のマイクロRNA miR-4674（配列番号2）の測定値に対して規格化した、各患者の膵液試料中のmiR-4674相対値を示す。前記結果に基づいて、受信者操作特性（ROC）曲線をmiR-4516及びmiR-4674についてそれぞれ作成した（図14）。図14Aは、miR-4516（配列番号1）の曲線下面積（AUC）が0.82（ $p=0.026$ ）であることを示す。図14Bは、miR-4674（配列番号2）のAUCが0.73（ $p=0.22$ ）であることを示す。
- [0104] miR-4516（配列番号1）及びmiR-4674（配列番号2）を膵臓がんのバイオマーカーとして用いる検査における指標（感度、特異度、陽性的中率、陰性的中率及び正診率）を算出した。

[表5]

	TP	FN	FP	TN	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Accuracy (%)	PPV (%)	NPV (%)
Ex-mR-4518	12	3	2	9	80	81.8	80.8	85.7	75
Ex-mR-4674	11	4	2	9	73.3	81.8	76.9	84.6	69.2
Ex-mR-4518/4674	14	1	3	8	93.3	72.7	84.6	82.4	88.9
PJC	9	2	0	11	81.8	100	90.9	100	84.6
Ex-mR-4518/PJC	14	1	2	9	93.3	81.8	88.5	87.5	90
Ex-mR-4674/PJC	15	0	2	9	100	81.8	92.3	88.2	100
Ex-mR-4518/4674/PJC	15	0	3	8	100	72.7	88.5	83.3	100

TP: true positive, FN: false negative, FP: false positive, TN: true negative, PPV: positive predictive value, NPV: negative predictive value, PJC: pancreatic juice cytology



[0105] miR-4516（配列番号1）を単独で用いる検査における感度、特異度及び正診率はそれぞれ80%、81.8%及び80.8%であった。miR-4674（配列番号2）を単独で用いる検査における感度、特異度及び正診率はそれぞれ73.3%、81.8%及び76.9%であった。これらの結果は、miR-4516（配列番号1）及びmiR-4674（配列番号2）がそれぞれ高い感度、高い特異度及び高い正診率をもって、膵臓がんの診断、特に早期診断に利用できることを示唆する。

[0106] miR-4516（配列番号1）とmiR-4674（配列番号2）との組合せ（miR-4516/4674）を用いた検査における感度、特異度及び正診率はそれぞれ93.3%、72.7%及び84.6%であった。この結果は、miR-4516とmiR-4674との組合せがより高い感度、高い特異度及びより高い正診率をもって、膵臓がんの診断、特に早期診断に利用できることを示唆する。

[0107] miR-4516（配列番号1）と膵液細胞診（PJC）との組合せ（miR-4516/PJC）を用いた検査における感度、特異度及び正診率はそれぞれ93.3%、81.8%及び88.5%であった。また、miR-4674（配列番号2）と膵液細胞診（PJC）との組合せ（miR-4674/PJC）を用いた検査における感度、特異度及び正診率はそれぞれ100%、81.8%及び92.3%であった。さらに、miR-4516とmiR-4674と膵液細胞診（PJC）との組合せ（miR-4516/4674/PJC）を用いた検査における感度、特異度及び正診率はそれぞれ100%、72.7%及び88.5%であった。これらの結果は、miR-4516単独に、miR-4674単独に、又はmiR-4516とmiR-4674との組合せに、PJCをさらに組合せることで、優れた膵臓がんのバイオマーカーとして利用できることを示唆する。

[0108] [試験5] 血清試料での検証

試験2及び試験3で膵臓がんのバイオマーカーとしての有用性が実証されたmiR-4516（配列番号1）及びmiR-4674（配列番号2）の

有用性についてさらに試験するために、膵臓がん患者7名（PDAC-2、4、5、8、9、10及び11）の血清、慢性膵炎患者5名（CP-2～6）の血清、及び健常者2名（HD-1及び2）の血清を用いた。慢性膵炎患者の血清（5検体）、健常者の血清（2検体）及び膵臓がん患者の血清（7検体）中のマイクロRNA miR-4516（配列番号1）の量及びmiR-4674（配列番号2）の量を定量リアルタイムPCRにより調べた。これらの結果を図15及び図16にそれぞれ示す。

[0109] 図15は、各患者の血清中のマイクロRNA miR-4516（配列番号1）の相対値を示す。図15は、相対値1.5を閾値とした場合、膵臓がん患者7名中2名が陽性と判定されること（感度：約28.6%）、及び慢性膵炎患者5名中5名が陰性と判定されること又は健常者2名中2名が陰性と判定されること（特異度：100%）を示す。この結果は、血清中のマイクロRNA miR-4516（配列番号1）が膵臓がんのバイオマーカーとして有用であることを示す。

[0110] 図16は、各患者の血清中のマイクロRNA miR-4674（配列番号2）の相対値を示す。図16は、相対値1.5を閾値とした場合、膵臓がん患者7名中0名が陽性と判定されること（感度：0%）、及び慢性膵炎患者5名中5名が陰性と判定されること又は健常者2名中2名が陰性と判定されること（特異度：100%）を示す。この結果は、血清中のマイクロRNA miR-4674（配列番号2）は膵臓がんのバイオマーカーとして利用可能とは言えないことを示す。

[0111] 試験5で、膵液と血清の両方を採取できた4症例（PDAC-2、4、5及び8）の膵臓がん患者では、2症例でmiR-4516の発現が高かったことが示された。また、膵液と血清の両方を採取できた5症例（CP-2～6）の非膵臓がん患者では、すべての症例でmiR-4516の発現が低かったことが示された。

[0112] [試験6] 治療効果モニタリング

膵臓がん患者PDAC-8は、化学療法を受けた後に腫瘍摘出手術を受け

た。PDAC-8は、miR-4516（配列番号1）の発現量が手術前に採取された膵液及び血清の両方で高かった（図12及び図15）。手術を受けた後のPDAC-8から血清を採取し、前記血清中のmiR-4516（配列番号1）の発現量を調べた（図17）。図17は、miR-4516（配列番号1）の発現量が、膵臓がんの治療後に低下したことを示す。

[0113] 膵臓がん患者PDAC-4は、腫瘍摘出手術を受けた。PDAC-4は、miR-4516（配列番号1）の発現量が手術前に採取された膵液では低く（図12）、採取された血清では高かった（図15）。手術を受けた後のPDAC-4から血清を採取し、前記血清中のmiR-4516（配列番号1）の発現量を調べた（図18）。図18は、miR-4516（配列番号1）の発現量が、膵臓がんの治療後に低下したことを示す。

[0114] 試験6の結果は、血清中のmiR-4516（配列番号1）が膵臓がんの治療効果を管理するためのバイオマーカーとして有用であることを示唆する。

[0115] [試験7] 膵臓がん特異的な血清マーカーとしての利用可能性

膵臓がん患者をそれ以外の被験体から判別するための血清中のバイオマーカーとしてmiR-4516（配列番号1）が膵臓がんの検査に利用できるかを調べた。膵臓がん患者（PDAC）39名及びそれ以外の被験体32名からそれぞれ血清を採取した。32名の被験体は、2名の健常者（HD）、5名の慢性膵炎（CP）、1名の膵管内乳頭粘液性腫瘍（IPMN）の患者、3名の膵管内乳頭粘液性腺がん患者（IPMC）、8名の肝細胞がん患者（HCC）、6名の大腸がん患者（CR）及び7名の胃がん患者（GC）を含んだ。採取した血清中のmiR-4516（配列番号1）の発現量をそれぞれ調べた（図19）。前記結果に基づいて、ROC曲線を作成した（図20）。図20は、miR-4516（配列番号1）の曲線下面積が0.53であることを示す。また、miR-4516（配列番号1）を用いた検査における感度及び正診率はそれぞれ15.4%及び53.5%であった。一方、特異度は、100%と良好な結果であった。

## 請求の範囲

- [請求項1] 被験体由来の生体試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAの、膵臓がんのバイオマーカーとしての使用であって、  
前記膵臓がんのバイオマーカーが、  
被験体が膵臓がんを患っているかを判定するための、  
膵臓がんを患っている又は患っていた被験体の病態を判定するための、又は  
膵臓がんを処置し得る被験物質を特定するためのものである、使用。
- [請求項2] 前記膵臓がんのバイオマーカーが、被験体が膵臓がんを患っているかを判定するためのものであり、  
前記被験体由来の生体試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAの量と、前記少なくとも1種のマイクロRNAに対応する少なくとも1種の閾値とを比較すること、及び  
前記少なくとも1種のマイクロRNAの量が前記少なくとも1種の閾値より大きい場合に、前記被験体は膵臓がんを患っていると判定することを含む、請求項1に記載の使用。
- [請求項3] 前記膵臓がんのバイオマーカーが、膵臓がんを患っている又は患っていた被験体の病態を判定するためのものであり、  
前記被験体由来の第一の生体試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAの第一の量と、前記被験体の第二の生体試料中の前記少なくとも1種のマイクロRNAの第二の量とを比較すること、及び  
前記第一の量が前記第二の量よりも小さい場合に、前記被験体の病態が改善されていると判定することを含み、  
前記第一の生体試料が、前記第二の生体試料を採取した後に採取さ

れる、請求項1に記載の使用。

[請求項4] 前記膵臓がんのバイオマーカーが、膵臓がんを処置し得る被験物質を特定するためのものであり、

膵臓がんを患っている被験体に、前記被験物質を投与すること、

前記被験物質を投与した後の前記被験体由来の第一の生体試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAの第一の量と、前記被験物質を投与する前の前記被験体の第二の生体試料中の前記少なくとも1種のマイクロRNAの第二の量とを比較すること、及び

前記第一の量が前記第二の量よりも小さい場合に、前記被験物質が膵臓がんを処置し得る被験物質であると特定することを含む、請求項1に記載の使用。

[請求項5] 前記少なくとも1種のマイクロRNAが、配列番号1～5、9及び15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の使用。

[請求項6] 前記生体試料が、膵液試料、血清若しくは血漿試料、便試料、十二指腸液試料又は胆液試料である、請求項1～5のいずれか一項に記載の使用。

[請求項7] 前記生体試料が、膵液試料又は血清若しくは血漿試料である、請求項1～5のいずれか一項に記載の使用。

[請求項8] 膵臓がんを患っているかを判定するためのマイクロRNAを選抜する方法であって、

膵臓がんを患っている被験体由来の生体試料中のマイクロRNAのA群と、膵臓がん細胞を培養した培養液中のマイクロRNAのB群と、膵臓がんに関連する兆候が認められない被験体由来の生体試料中のマイクロRNAのC群とから、前記マイクロRNAのA群と前記マイクロRNAのB群とで共通するマイクロRNAであって、且つ前記マイクロRNAのC群とは共通しないマイクロRNAを選抜することを

含む、方法。

[請求項9]

前記マイクロRNAを選抜することが、  
前記マイクロRNAのA群と、前記マイクロRNAのB群とで共通するマイクロRNAの第一の群を得ること、及び  
前記マイクロRNAの第一の群から、前記マイクロRNAのA群と前記マイクロRNAのB群と前記マイクロRNAのC群とで共通するマイクロRNAを除くことを含む、請求項8に記載の方法。

[請求項10]

前記マイクロRNAを選抜することが、  
前記マイクロRNAのA群から、前記マイクロRNAのA群と前記マイクロRNAのC群とで共通するマイクロRNAを除いた、マイクロRNAの第二の群を得ること、  
前記マイクロRNAのB群から、前記マイクロRNAのB群と前記マイクロRNAのC群とで共通するマイクロRNAを除いた、マイクロRNAの第三の群を得ること、及び  
前記マイクロRNAの第二の群と前記マイクロRNAの第三の群とで共通するマイクロRNAを選抜することを含む、請求項8に記載の方法。

[請求項11]

被験体が膵臓がんを患っているかを判定するための方法であって、  
前記被験体由来の生体試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAの量と、前記少なくとも1種のマイクロRNAに対応する少なくとも1種の閾値とを比較すること、及び  
前記少なくとも1種のマイクロRNAの量が前記少なくとも1種の閾値より大きい場合に、前記被験体は膵臓がんを患っていると判定することを含む、方法。

[請求項12]

膵臓がんを患っている又は患っていた被験体の病態を判定するための方法であって、  
前記被験体由来の第一の生体試料中の配列番号1～15のいずれか

に示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAの第一の量と、前記被験体の第二の生体試料中の前記少なくとも1種のマイクロRNAの第二の量とを比較すること、及び

前記第一の量が前記第二の量よりも小さい場合に、前記被験体の病態が改善されていると判定することを含み、

前記第一の生体試料が、前記第二の生体試料を採取した後に採取される、方法。

[請求項13] 膵臓がんを処置し得る被験物質を特定するための方法であって、膵臓がんを患っている被験体に、前記被験物質を投与すること、前記被験物質を投与した後の前記被験体由来の第一の生体試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAの第一の量と、前記被験物質を投与する前の前記被験体の第二の生体試料中の前記少なくとも1種のマイクロRNAの第二の量とを比較すること、及び

前記第一の量が前記第二の量よりも小さい場合に、前記被験物質が膵臓がんを処置し得る被験物質であると特定することを含む、方法。

[請求項14] 被験体由来の生体試料中の配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAである、膵臓がんを検出するためのバイオマーカー。

[請求項15] 被験体由来の血清又は血漿試料中の配列番号1～5、9及び15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAである、膵臓がん処置の効果をモニタするためのバイオマーカー。

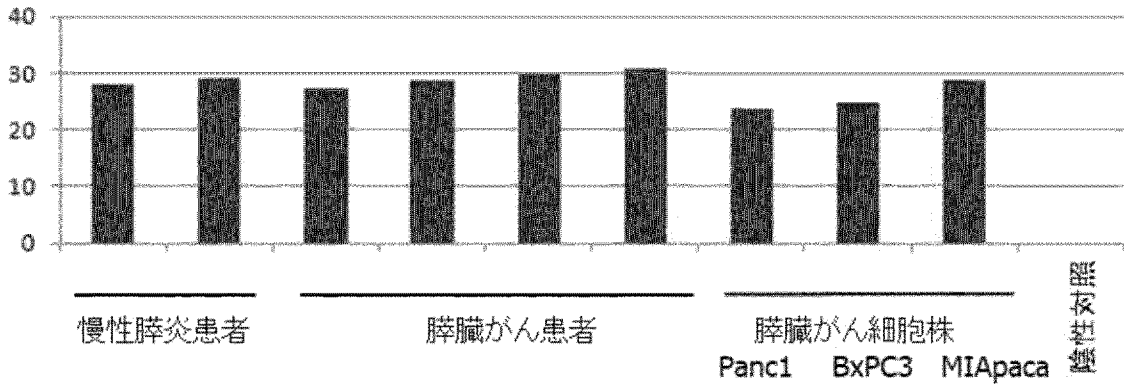
[請求項16] 請求項1～7のいずれか一項に記載の使用又は請求項8～13のいずれか一項に記載の方法に用いるための、配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAを測定するための試薬を含む、キット。

[請求項17] 配列番号1～15のいずれかに示されるヌクレオチド配列を含む少

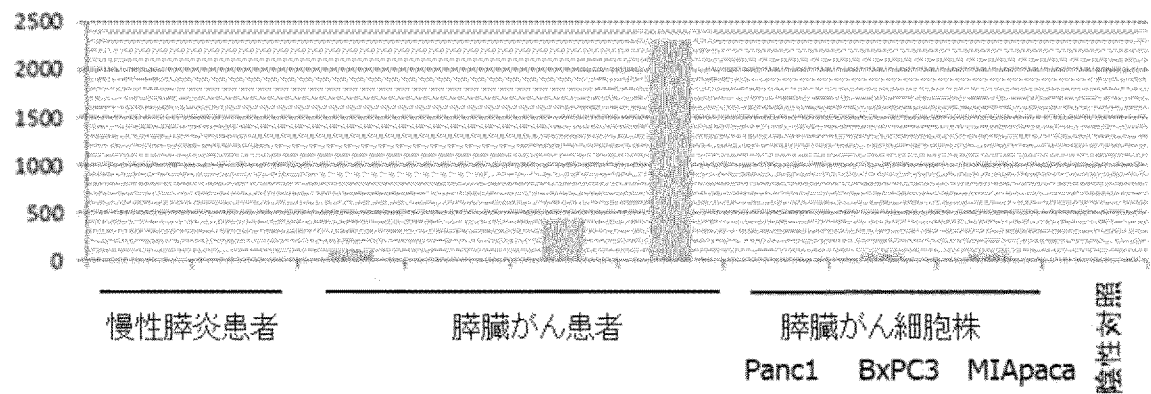
なくとも1種のマイクロRNAを測定するための試薬を含む、膵臓がんを検出するための組成物。



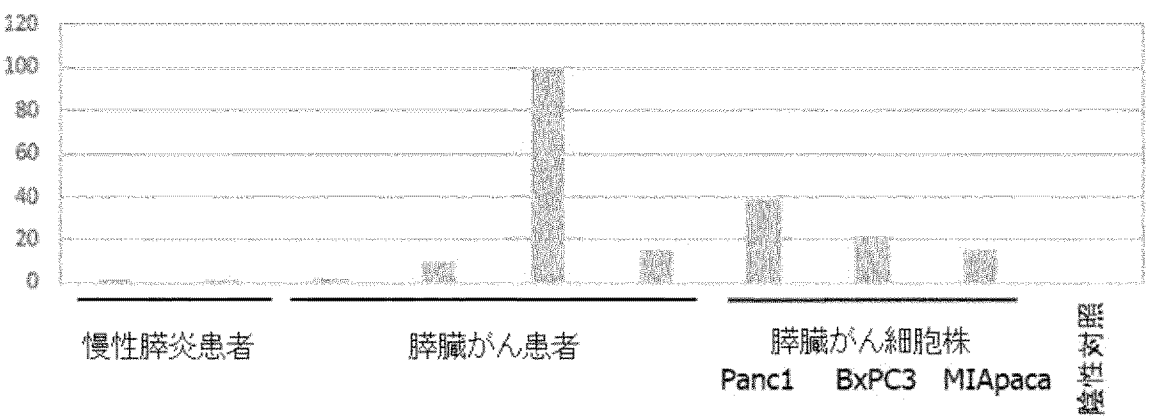
[図1]



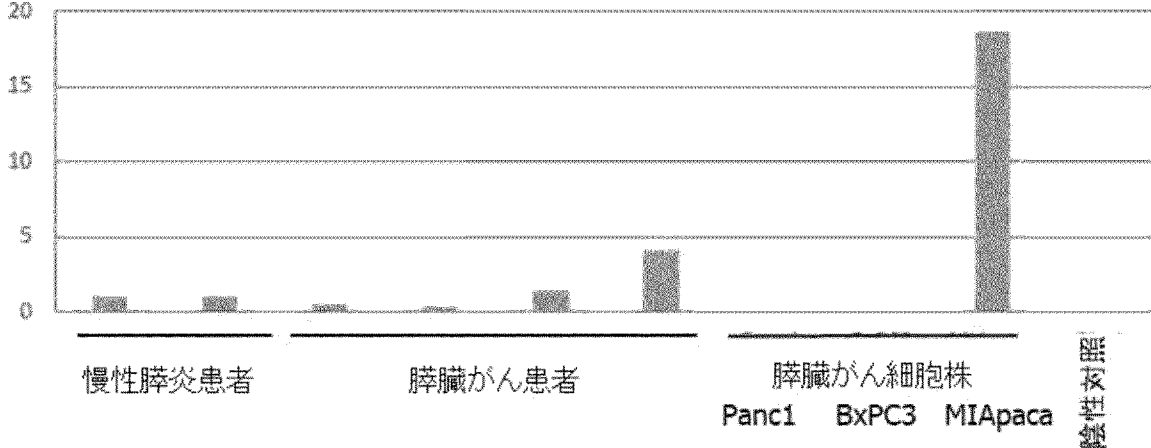
[図2]



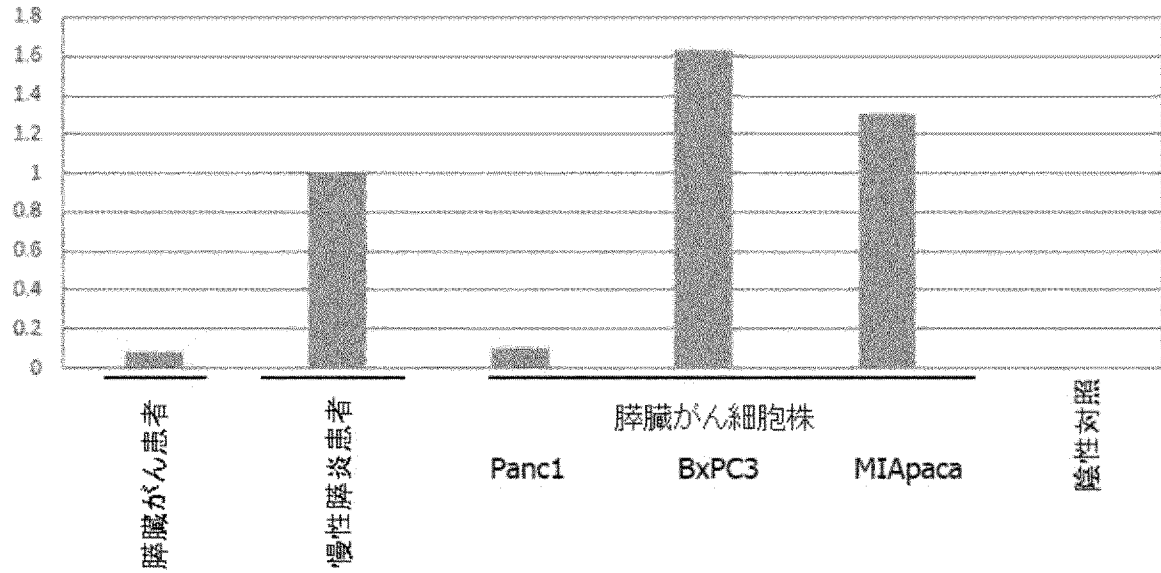
[図3]



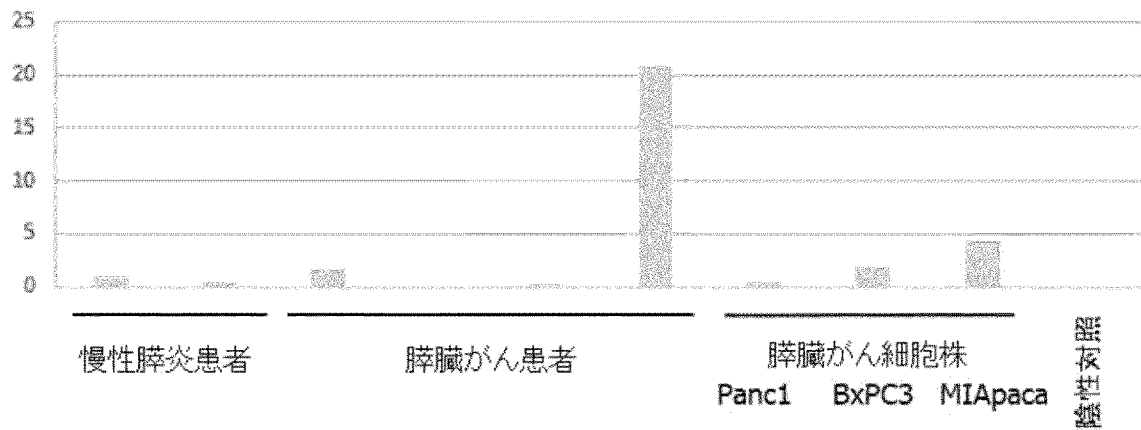
[図4]



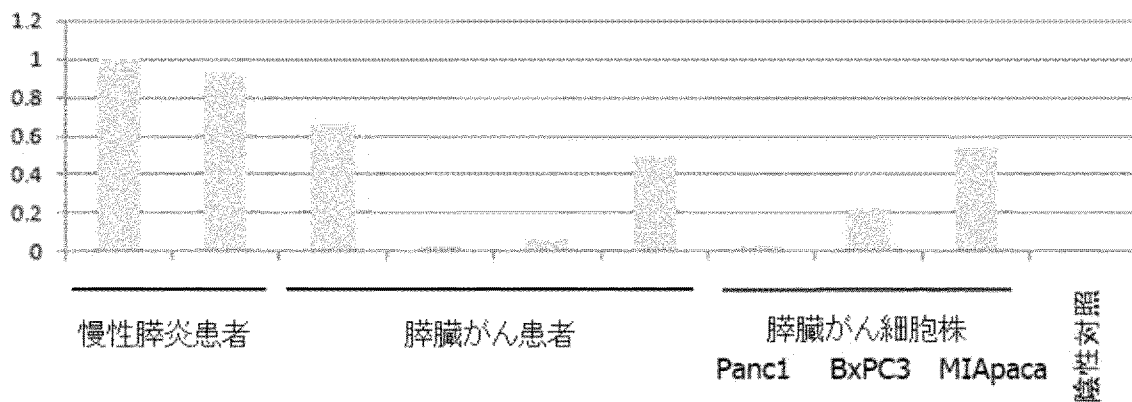
[図5]



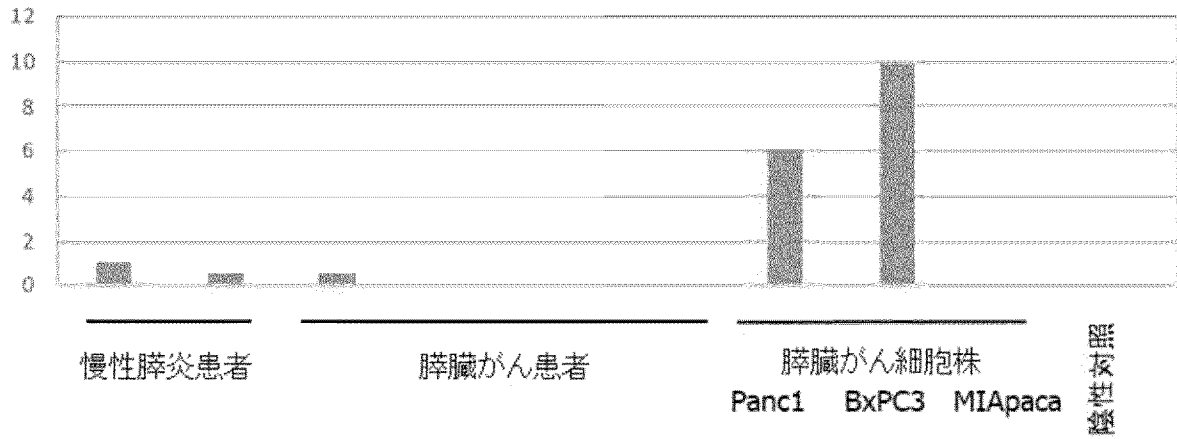
[図6]



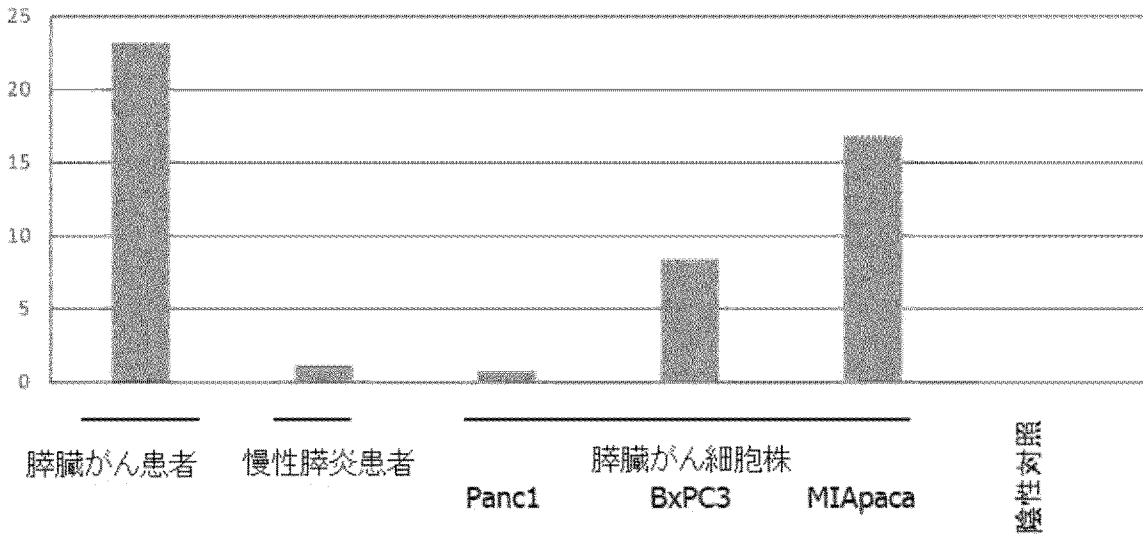
[図7]



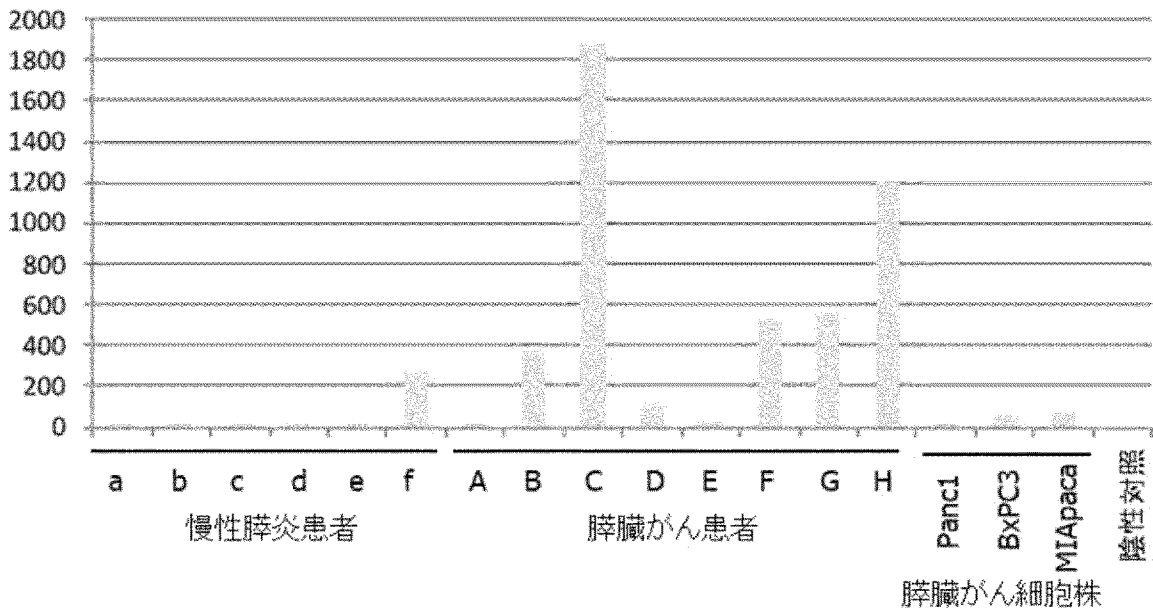
[図8]



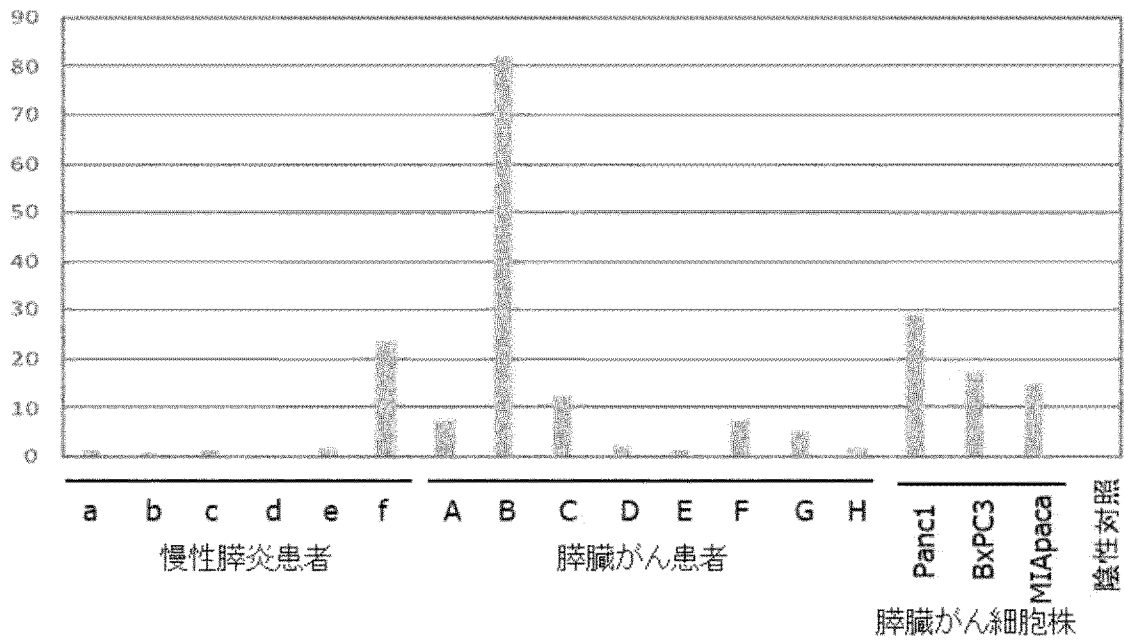
[図9]



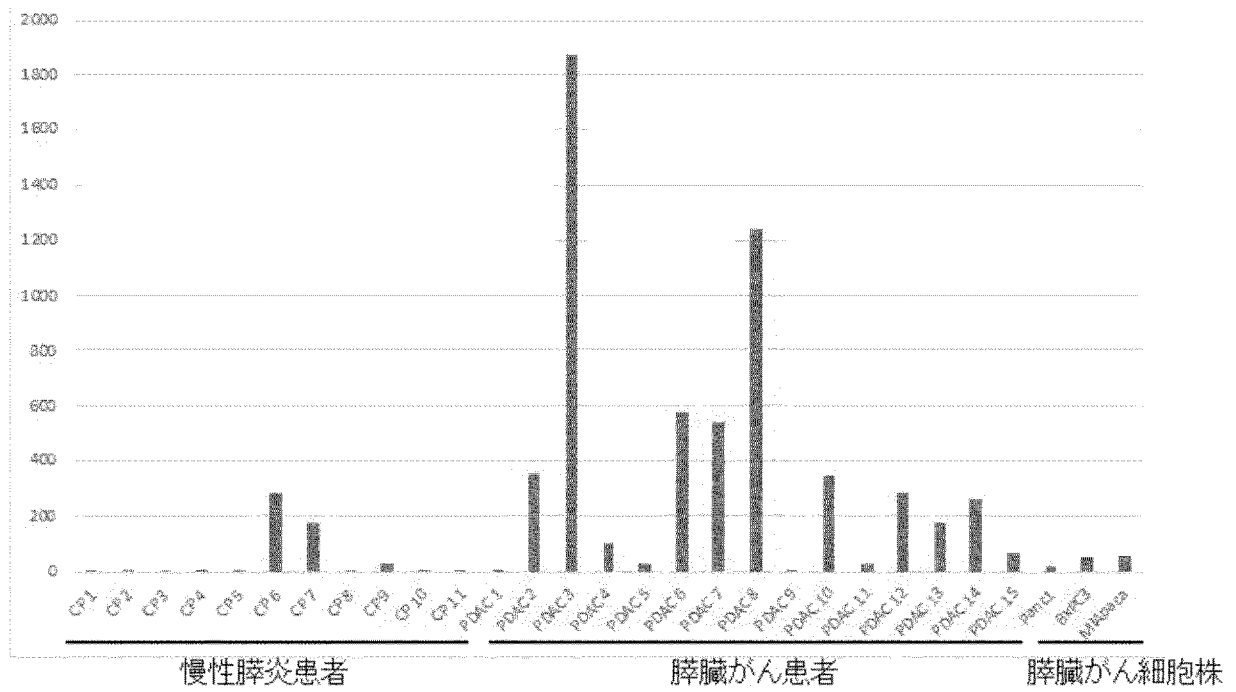
[図10]



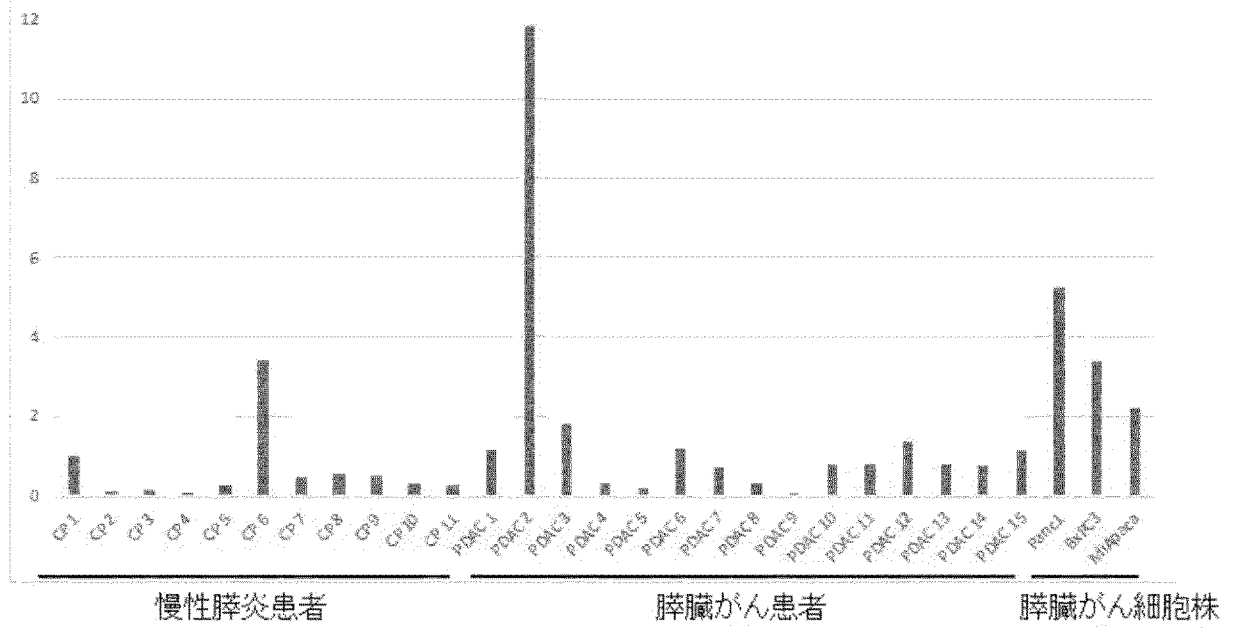
[図11]



[図12]

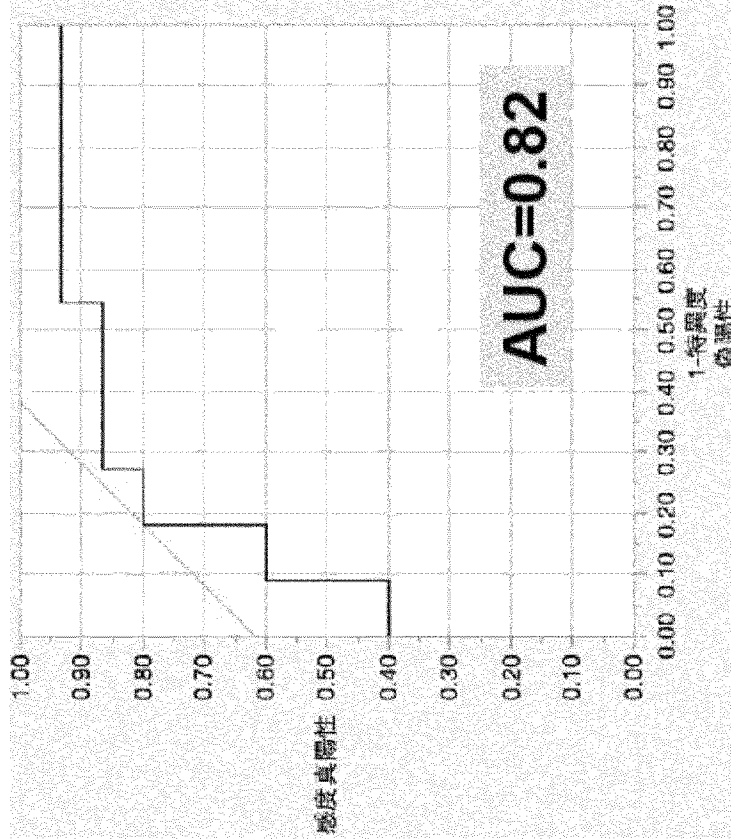


[図13]

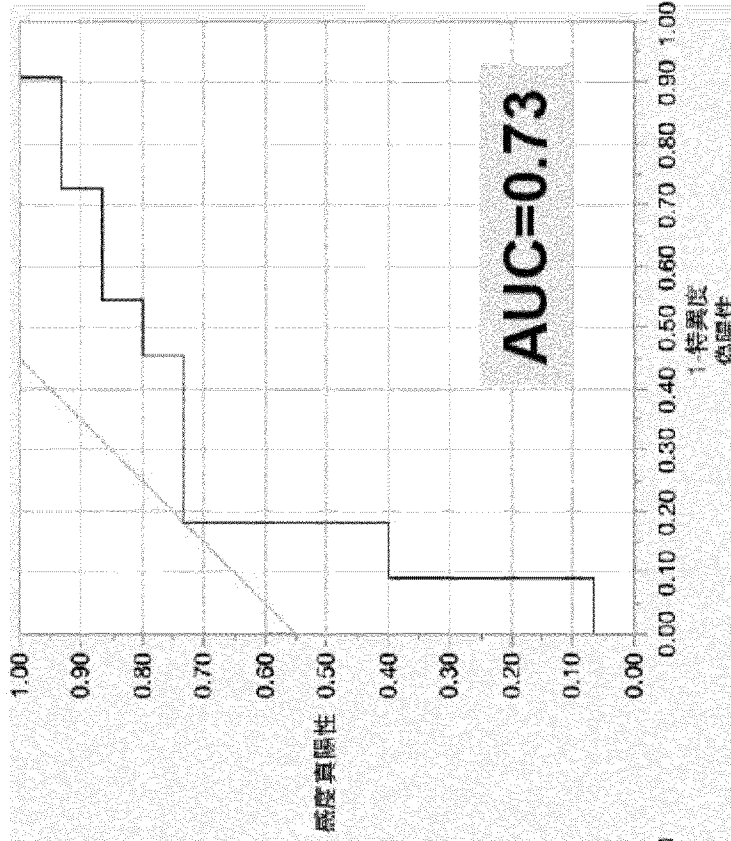


[図14]

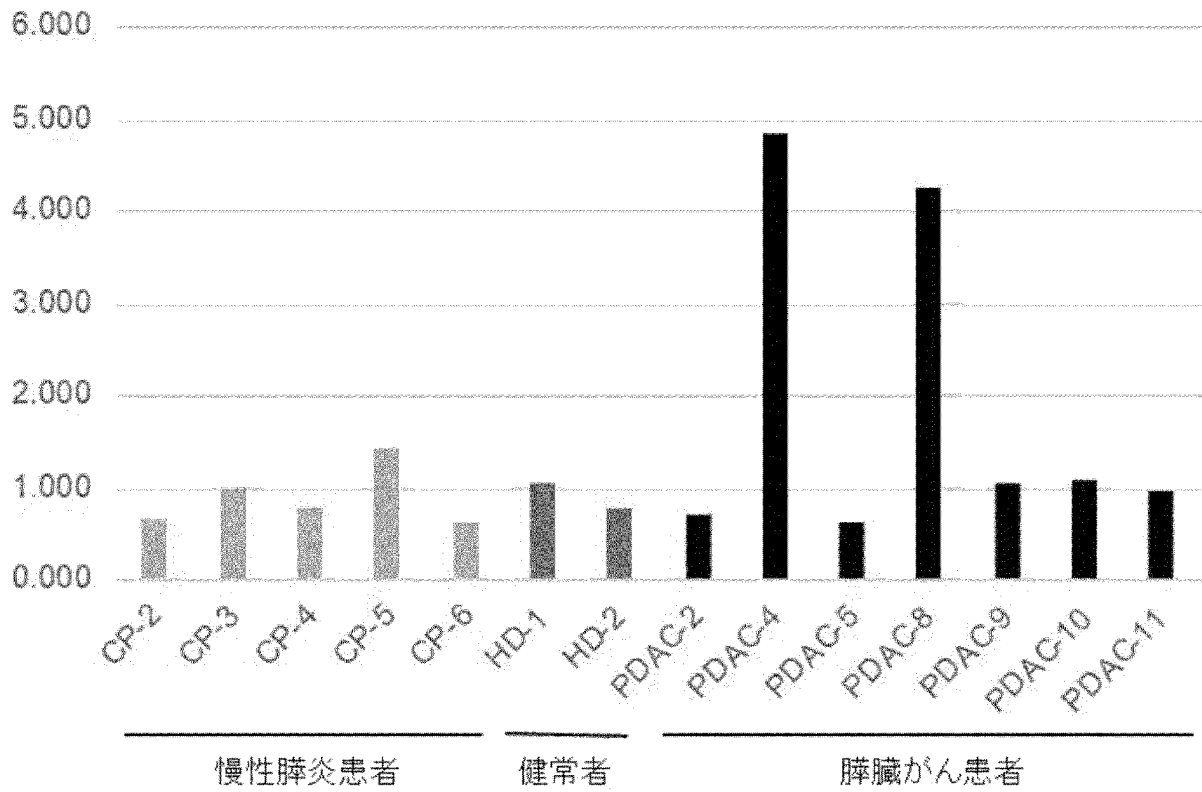
(A) ROC (Ex-miR-4516)  
(pancreatic juice)



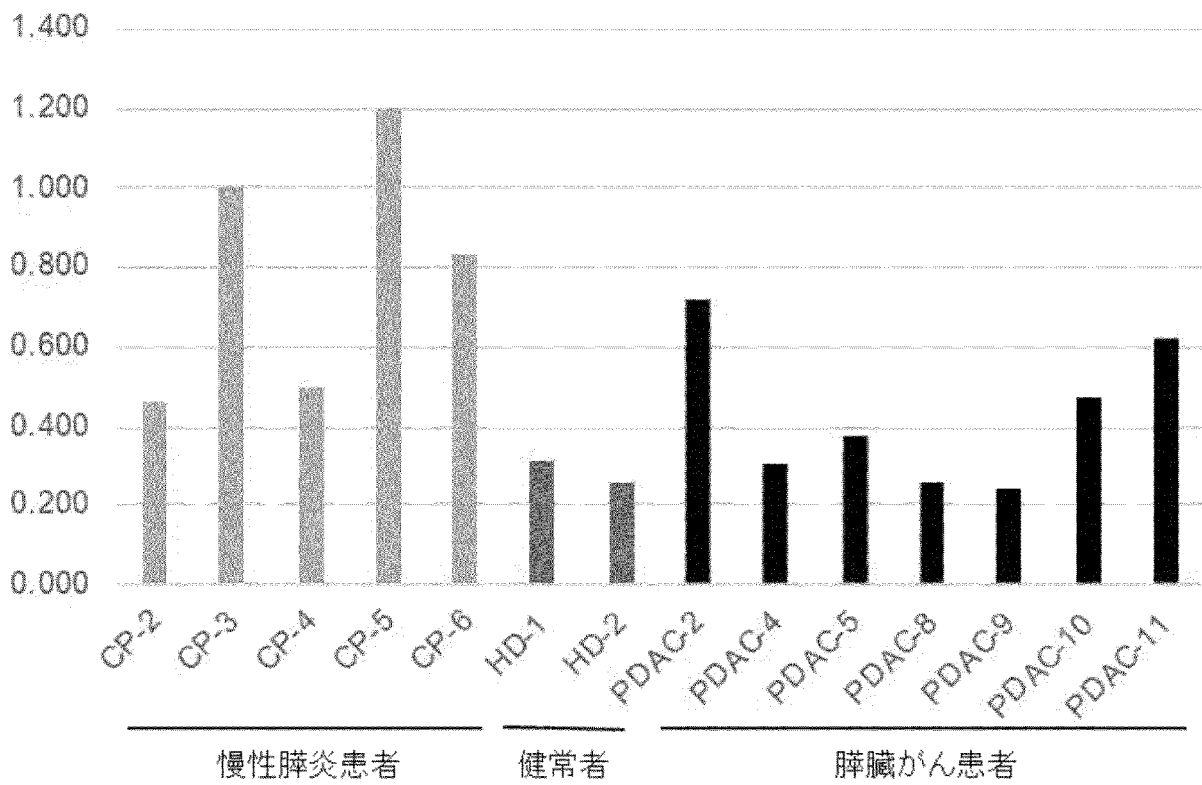
(B) ROC (Ex-miR-4674)  
(pancreatic juice)



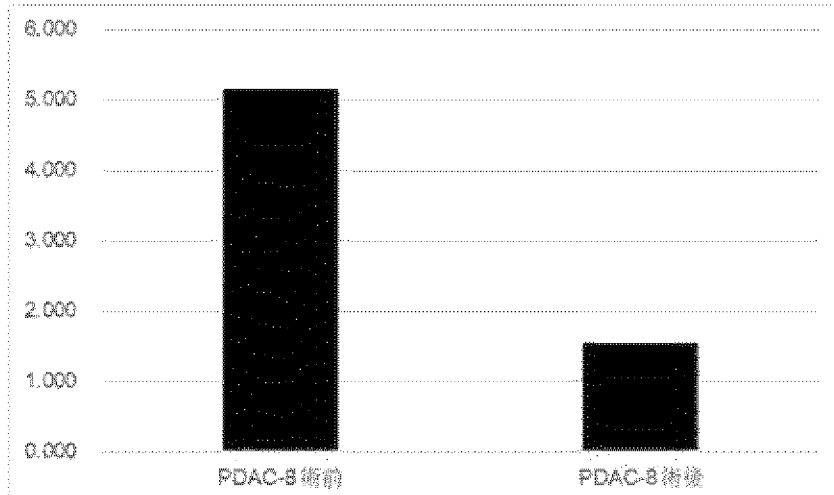
[図15]



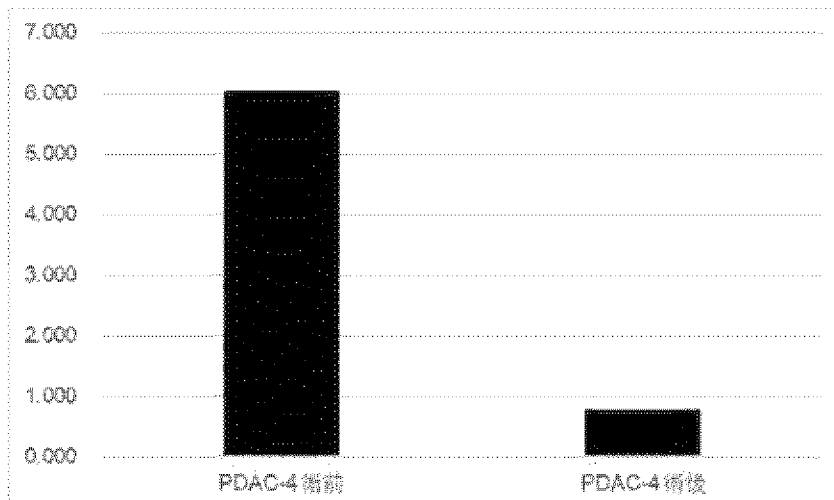
[図16]



[図17]

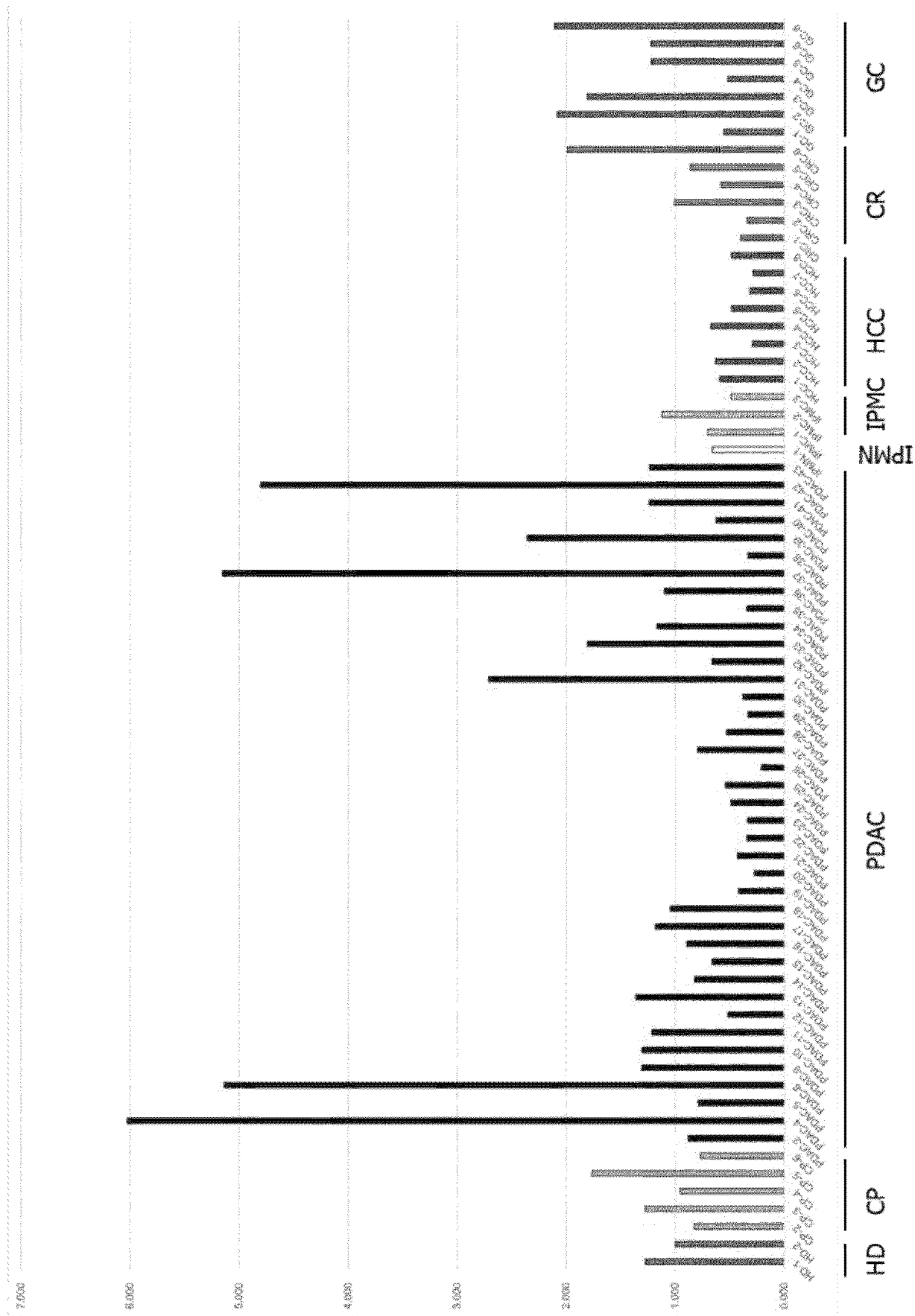


[図18]

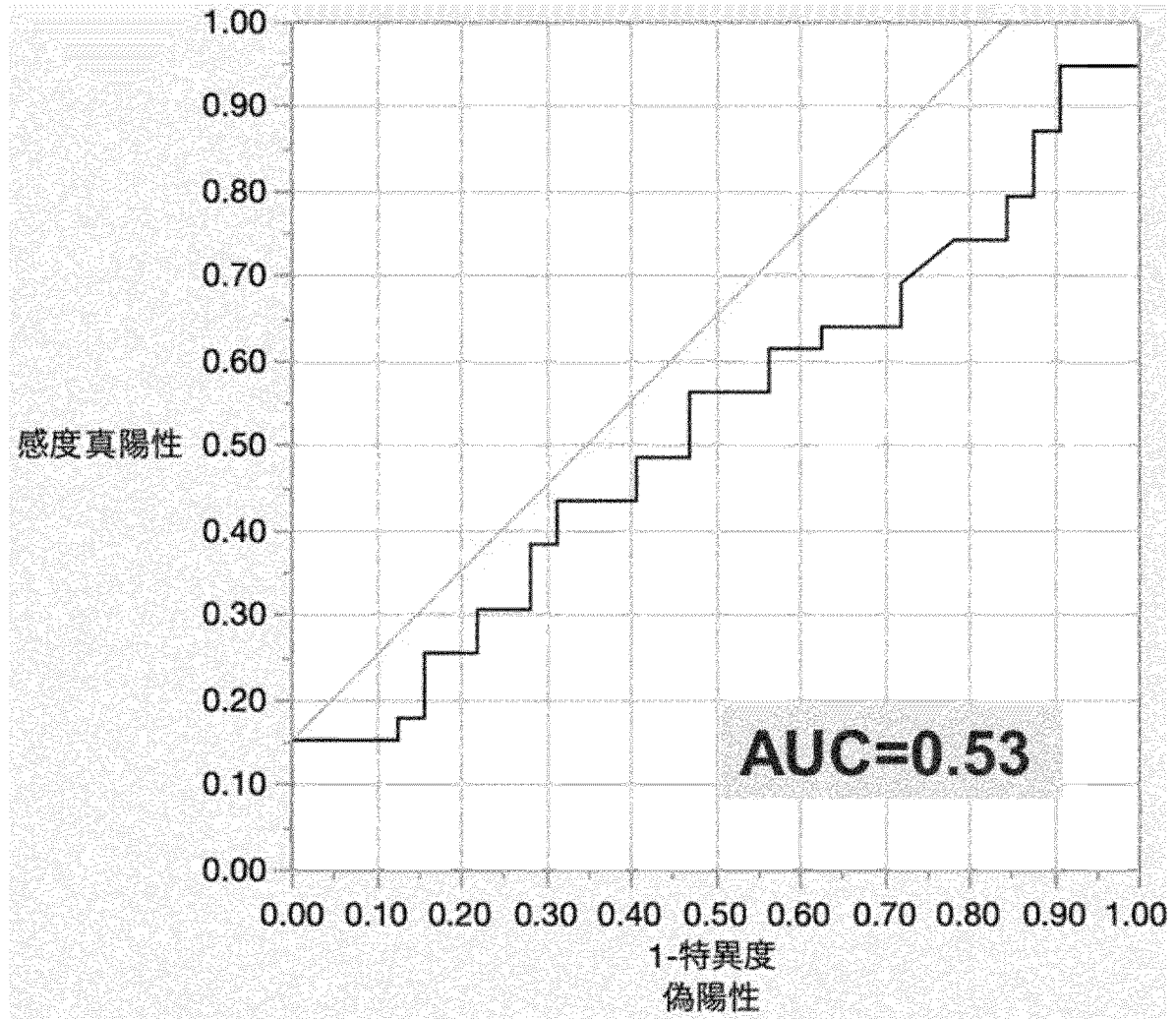




[19]



[図20]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/026597

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>C12N 15/09</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/113</i> (2010.01)i; <i>C12Q 1/6809</i> (2018.01)i; <i>C12Q 1/6886</i> (2018.01)i; <i>G01N 33/574</i> (2006.01)j FI: C12Q1/6886 Z; C12N15/113 Z; C12Q1/6809 Z; C12N15/09 Z; G01N33/574 Z ZNA		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N15/09; C12N15/113; C12Q1/6809; C12Q1/6886; G01N33/574		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CHEN, Shuo et al., MicroRNA-4516 suppresses pancreatic cancer development via negatively regulating orthodenticle homeobox 1. <i>Int. J. Biol. Sci.</i> , 18 May 2020, vol. 16, pp. 2159-2169 abstract, results, discussion	14, 15
Y	abstract, results, discussion	1-7, 11-17
Y	許文聰他, 膵臓がん患者血清中microRNAの網羅的解析による新規バイオマーカー探索, <i>東医大誌</i> , 2017, vol. 75, pp. 234-240, (KYO, Bunso et al., Comprehensive analysis of circulating microRNA and detection of novel biomarkers in patients with pancreatic cancer, <i>The Journal of Tokyo Medical Univ.</i> ) pp. 235-238	1-7, 11-17
Y	光永修一他, [特集] 膵臓の早期診断最前線 7. 膵臓早期診断を目指した血清マイクロRNA検査の研究開発, <i>膵臓</i> , 2017, vol. 32, pp. 56-61, (MITSUNAGA, Shuichi et al., Serum microRNAs as tumor markers for diagnosis of pancreatic cancer. <i>Journal of the Japan Pancreas Society</i> ), non-official translation ([special edition] <i>Forefront of early diagnosis of pancreatic cancer</i> ) pp. 57-59	1-7, 11-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 <b>24 September 2021</b>		Date of mailing of the international search report <b>05 October 2021</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/JP2021/026597**

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2009-528070 A (THE OHIO STATE UNIV.) 06 August 2009 (2009-08-06) claims, examples	1-7, 11-17

**Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
    - on paper or in the form of an image file.
  - b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
  - c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
    - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
    - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

Claim 1 sets forth the invention pertaining to use of at least one microRNA including any one of the nucleotide sequences SEQ ID NOs: 1-15 as a biomarker for pancreatic cancer. The invention pertaining to use of a microRNA including the nucleotide sequence "SEQ ID NO: 1", which is an option recited at the top among the inventions in claim 1, as a biomarker for pancreatic cancer has the special technical feature, and thus is classified as invention 1 as indicated hereinafter.

Next, the invention pertaining to use of a microRNA including the nucleotide sequence "SEQ ID NO: 2" as a biomarker for pancreatic cancer among the inventions in claim 1 shares the common technical feature of use of a microRNA as a biomarker for pancreatic cancer with the invention pertaining to use of a microRNA including the nucleotide sequence "SEQ ID NO: 1" as a biomarker for pancreatic cancer among the inventions in claim 1 classified as invention 1. However, said technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure in document 1 (document 1: p. 235-238), and thus said technical feature cannot be said to be a special technical feature. Moreover, there is no other same or corresponding special technical feature among these inventions.

The the invention pertaining to use of a microRNA including the nucleotide sequence "SEQ ID NO: 2" as a biomarker for pancreatic cancer among the inventions in claim 1 has the special technical feature, and thus is classified as invention 2.

The same applies to the inventions pertaining to use of microRNAs including the nucleotide sequences SEQ ID NOs: 3-15 as a biomarker for pancreatic cancer set forth in claim 1. Therefore, with regard to the inventions in claims 1-7 and 11-17, the inventions pertaining to use of microRNAs including the nucleotide sequences SEQ ID NOs: 3-15 as a biomarker for pancreatic cancer set forth in claim 1 are classified as inventions 3-15, respectively.

Claims 8-10 share the common technical feature of a microRNA with the inventions in claims 1-7 and 11-17 classified as invention 1 and invention 2. However, said technical feature does not make a contribution over the prior art in light of the disclosure in document 1 (document 1: p. 235-238), and thus said technical feature cannot be said to be a special technical feature. Moreover, there is no other same or corresponding special technical feature among these inventions.

Further, claims 8-10 are not dependent on claims 1-7 and 11-17. Moreover, claims 8-10 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1 or 2.

Thus, claims 8-10 cannot be classified as invention 1 or 2.

Claims 8-10 have the special technical feature of selecting a microRNA for determining whether or not a subject is suffering from pancreatic cancer, and are therefore classified as invention 16.

(Invention 1)

Inventions in claims 1-7 and 11-17 pertaining to use of a microRNA including the nucleotide sequence SEQ ID NO: 1 as a biomarker for pancreatic cancer

(Inventions 2-15)

Inventions in claims 1-7 and 11-17 pertaining to use of microRNAs including the nucleotide sequences SEQ ID NOs: 2-15 as a biomarker for pancreatic cancer

(Invention 16)

Inventions in claims 8-10

Document 1: 許 文聰他, 膵臓がん患者血清中microRNAの網羅的解析による新規バイオマーカー探索, 東医大誌, 2017, vol. 75, p.234-240, (KYO Bunso et al., Comprehensive analysis of circulating microRNA and detection of novel biomarkers in patients with pancreatic cancer. The Journal of Tokyo Medical University)

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **Inventions in claims 1-7 and 11-17 pertaining to use of a microRNA including the nucleotide sequence SEQ ID NO: 1 as a biomarker for pancreatic cancer**

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
  - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
  - No protest accompanied the payment of additional search fees.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2021/026597**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2009-528070 A	06 August 2009	WO 2007/103808 A2 claims, examples US 2010/0286232 A1	
.....			



<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））                  C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/113(2010.01)i; C12Q 1/6809(2018.01)i; C12Q 1/6886(2018.01)i;                  G01N 33/574(2006.01)i                  FI: C12Q1/6886 Z; C12N15/113 Z; C12Q1/6809 Z; C12N15/09 Z; G01N33/574 Z ZNA</p>																				
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））                  C12N15/09; C12N15/113; C12Q1/6809; C12Q1/6886; G01N33/574</p> <p>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</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922 - 1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996 - 2021年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994 - 2021年</td> </tr> </table> <p>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 (JDreamII); CPlus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)</p>			日本国実用新案公報	1922 - 1996年	日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年	日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年	日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年										
日本国実用新案公報	1922 - 1996年																			
日本国公開実用新案公報	1971 - 2021年																			
日本国実用新案登録公報	1996 - 2021年																			
日本国登録実用新案公報	1994 - 2021年																			
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CHEN Shuo.et al., MicroRNA-4516 suppresses pancreatic cancer development via negatively regulating orthodenticle homeobox 1, Int. J. Biol. Sci., 2020.05.18, Vol.16, p.2159-2169 abstract, results, discussion</td> <td>14, 15</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>abstract, results, discussion</td> <td>1-7, 11-17</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>許文聰他, 膵臓がん患者血清中microRNAの網羅的解析による新規バイオマーカー探索, 東医大誌, 2017, Vol.75, p.234-240 p.235-238</td> <td>1-7, 11-17</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>光永修一他, [特集]膵臓の早期診断最前線 7. 膵臓早期診断を目指した血清マイクロRNA検査の研究開発, 膵臓, 2017, Vol.32, p.56-61 p.57-59</td> <td>1-7, 11-17</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>JP 2009-528070 A (ザ オハイオ ステイト ユニバーシティ) 06.08.2009 (2009-08-06) 特許請求の範囲、実施例</td> <td>1-7, 11-17</td> </tr> </tbody> </table>			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	X	CHEN Shuo.et al., MicroRNA-4516 suppresses pancreatic cancer development via negatively regulating orthodenticle homeobox 1, Int. J. Biol. Sci., 2020.05.18, Vol.16, p.2159-2169 abstract, results, discussion	14, 15	Y	abstract, results, discussion	1-7, 11-17	Y	許文聰他, 膵臓がん患者血清中microRNAの網羅的解析による新規バイオマーカー探索, 東医大誌, 2017, Vol.75, p.234-240 p.235-238	1-7, 11-17	Y	光永修一他, [特集]膵臓の早期診断最前線 7. 膵臓早期診断を目指した血清マイクロRNA検査の研究開発, 膵臓, 2017, Vol.32, p.56-61 p.57-59	1-7, 11-17	Y	JP 2009-528070 A (ザ オハイオ ステイト ユニバーシティ) 06.08.2009 (2009-08-06) 特許請求の範囲、実施例	1-7, 11-17
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																		
X	CHEN Shuo.et al., MicroRNA-4516 suppresses pancreatic cancer development via negatively regulating orthodenticle homeobox 1, Int. J. Biol. Sci., 2020.05.18, Vol.16, p.2159-2169 abstract, results, discussion	14, 15																		
Y	abstract, results, discussion	1-7, 11-17																		
Y	許文聰他, 膵臓がん患者血清中microRNAの網羅的解析による新規バイオマーカー探索, 東医大誌, 2017, Vol.75, p.234-240 p.235-238	1-7, 11-17																		
Y	光永修一他, [特集]膵臓の早期診断最前線 7. 膵臓早期診断を目指した血清マイクロRNA検査の研究開発, 膵臓, 2017, Vol.32, p.56-61 p.57-59	1-7, 11-17																		
Y	JP 2009-528070 A (ザ オハイオ ステイト ユニバーシティ) 06.08.2009 (2009-08-06) 特許請求の範囲、実施例	1-7, 11-17																		
<p><input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>																				
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>"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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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）</td> <td>"&amp;" 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>"O" 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"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</td> <td></td> </tr> </table>			* 引用文献のカテゴリー	"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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	"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	"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	"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	"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	"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）	"&" 同一パテントファミリー文献	"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							
* 引用文献のカテゴリー	"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抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの																			
"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	"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																			
"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	"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																			
"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）	"&" 同一パテントファミリー文献																			
"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																				
<p>国際調査を完了した日</p> <p>24.09.2021</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>05.10.2021</p>																			
<p>名称及びあて先</p> <p>日本国特許庁(ISA/JP) 〒100-8915 日本国 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>権限のある職員（特許庁審査官）</p> <p>松原 寛子 4N 4154</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>																			

## 第 I 欄      ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a.  出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式
- 紙形式又はイメージファイル形式
- b.  国際出願とともに、PCT規則13の3.1(a)に基づき国際調査のためにのみ提出された、附属書C/ST.25テキストファイル形式の配列表
- c.  国際出願日後に、国際調査のためにのみ提出された配列表
- 附属書C/ST.25テキストファイル形式(PCT規則13の3.1(a))
- 紙形式又はイメージファイル形式(PCT規則13の3.1(b)及びPCT実施細則第713号)
2.  さらに、複数の版の配列表又は配列表の写しが提出され、変更後の配列表又は追加の写しに記載された情報が、出願時における配列表と同一である旨、又は出願時における国際出願の開示の範囲を超えない旨の陳述書の提出があった。
3. 補足意見:

## 第III欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求項1には、配列番号1-15のいずれか1つのヌクレオチド配列を含む少なくとも1種のマイクロRNAの膵臓がんのバイオマーカーとしての使用に関する発明が記載されているが、請求項1に係る発明のうち最初に記載された選択肢である、「配列番号1」のヌクレオチド配列を含むマイクロRNAの膵臓がんのバイオマーカーとしての使用に関する発明は、特別な技術的特徴を有しているため、下記に示すように発明1に区分する。

次に、請求項1に係る発明のうち、「配列番号2」のヌクレオチド配列を含むマイクロRNAの膵臓がんのバイオマーカーとしての使用に関する発明と、発明1に区分された請求項1に係る発明のうち、「配列番号1」のヌクレオチド配列を含むマイクロRNAの膵臓がんのバイオマーカーとしての使用に関する発明とは、マイクロRNAの膵臓がんのバイオマーカーとしての使用という共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献1（文献1：p.235-238）の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

そして、請求項1に係る発明のうち、「配列番号2」のヌクレオチド配列を含むマイクロRNAの膵臓がんのバイオマーカーとしての使用に関する発明は、特別な技術的特徴を有しているため、発明2に区分する。

また、請求項1に記載の配列番号3-15のヌクレオチド配列を含むマイクロRNAの膵臓がんのバイオマーカーとしての使用に関する発明についても同様であるから、請求項1-7、11-17に係る発明について、請求項1に記載の配列番号3-15のヌクレオチド配列を含むマイクロRNAの膵臓がんのバイオマーカーとしての使用に関する発明を、発明3-15にそれぞれ区分した。

請求項8-10は、発明1及び発明2に区分された請求項1-7及び11-17に係る発明と、マイクロRNAという共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、文献1（文献1：p.235-238）の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項8-10は、請求項1-7及び11-17の従属請求項ではない。また、請求項8-10は、発明1又は2に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項8-10は発明1又は2のいずれにも区分できない。

そして、請求項8-10は、膵臓がんを患っているかを判定するためのマイクロRNAを選抜するという特別な技術的特徴を有しているため、発明16に区分する。

（発明1）

請求項1-7、11-17に係る発明のうち、配列番号1のヌクレオチド配列を含むマイクロRNAの膵臓がんのバイオマーカーとしての使用に関する発明

（発明2-15）

請求項1-7、11-17に係る発明のうち、配列番号2-15のヌクレオチド配列を含むマイクロRNAの膵臓がんのバイオマーカーとしての使用に関する発明

（発明16）

請求項8-10に係る発明

文献1：許文聰他、膵臓がん患者血清中microRNAの網羅的解析による新規バイオマーカー探索、東医大誌、2017、Vol.75、p.234-240

## 第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。  
請求項1-7、11-17に係る発明のうち、  
配列番号1のヌクレオチド配列を含むマイクロRNAの膵臓がんのバイオマーカーとしての使用に関する発明

追加調査手数料の異議の  
申立てに関する注意

- 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告  
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号

PCT/JP2021/026597

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2009-528070 A	06.08.2009	WO 2007/103808 A2 claims, examples	
		US 2010/0286232 A1	