

(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27日(27.01.2022)



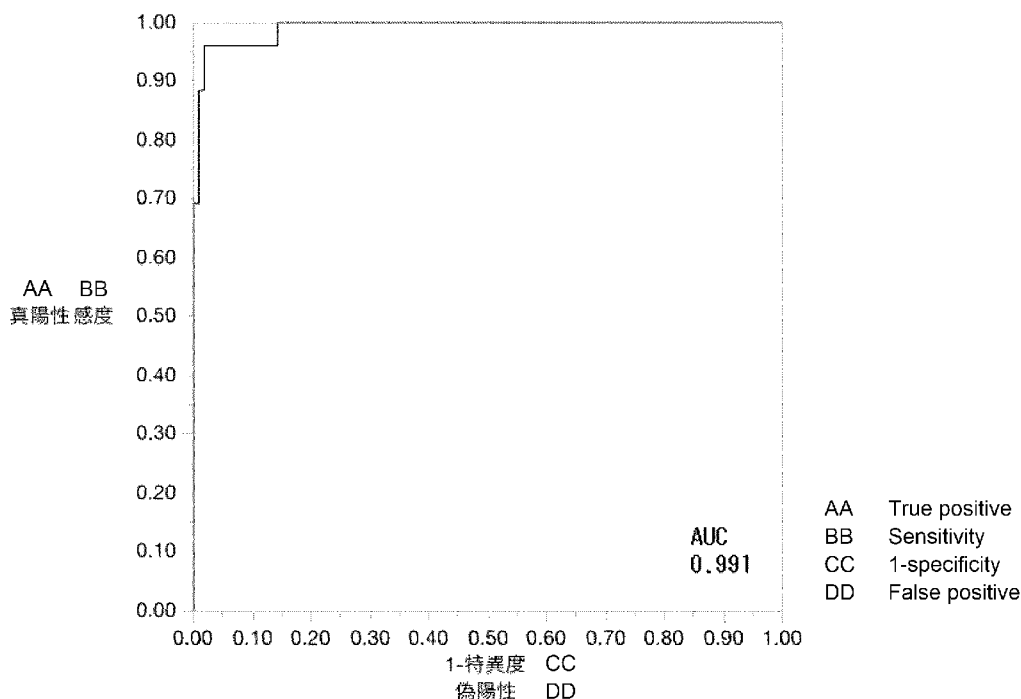
(10) 国際公開番号

WO 2022/019326 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/113 (2010.01) C12Q 1/6886 (2018.01)
C12Q 1/6869 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2021/027292
- (22) 国際出願日: 2021年7月21日(21.07.2021)
- (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 2020-124854 2020年7月22日(22.07.2020) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人広島大学(HIROSHIMA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目3番2号 Hiroshima (JP).
- (72) 発明者: 田原 栄俊 (TAHARA, Hidetoshi); 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目3番2号 国立大学法人広島大学内 Hiroshima (JP). 大西 俊平(ONISHI, Shumpei); 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目3番2号 国立大学法人広島大学内 Hiroshima (JP). 山崎 文之(YAMASAKI, Fumiyuki); 〒7398511 広島県東広島市鏡山一丁目3番2号 国立大学法人広島大学内 Hiroshima (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,

(54) Title: METHOD FOR PROVIDING ASSISTANCE IN DETECTING BRAIN TUMOR

(54) 発明の名称: 脳腫瘍の検出を補助する方法



(57) Abstract: The present invention provides a method for providing assistance in detecting a brain tumor with high accuracy. The present invention provides a method for providing assistance in detecting a brain tumor, the method using as an index the abundance of, in a specimen isolated from an organism, at least one of: a miRNA having a base sequence shown in any one of SEQ ID NO: 1-9; and an isoform (isomiR), a transfer RNA fragment (tRF), or a non-coding RNA fragment (lncRNA) of the miRNA.

WO 2022/019326 A1

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))

(57) 要約 : 本発明は、脳腫瘍を高精度に検出することを補助する方法を提供する。本発明は、生体から分離された被検試料中に含まれる、塩基配列が配列番号1~9のいずれかで示されるmiRNA、そのアイソフォーム (isomiR)、転移RNA断片 (tRF)、若しくは非コードRNA断片 (lncRNA) の少なくとも1種の存在量を指標として用いる、脳腫瘍の検出を補助する方法を提供する。

明 細 書

発明の名称：脳腫瘍の検出を補助する方法

技術分野

[0001] 本発明は、脳腫瘍の検出を補助する方法に関する。

背景技術

[0002] 脳腫瘍とは頭蓋骨の内部に発生する腫瘍であり、悪性脳腫瘍の中でも膠芽腫及び中枢神経原発リンパ腫は高い割合を占める。膠芽腫は、現在の脳腫瘍の分類の中で最も致死的な腫瘍であり、腫瘍の摘出率が予後に関与している。また、中枢神経原発リンパ腫は、脳腫瘍の中で2.4～3%を占め、過去20年で60歳以上の患者の発症率が増加している。これらの腫瘍の治療方法は大きく異なるため、正確な術前診断を行うことが臨床上極めて重要である。

脳腫瘍の診断には従来からMRIとCTが使用されているが、膠芽腫と中枢神経原発リンパ腫は放射線学的な特徴が類似しているため、両者の診断には病理学的な診断が必須であり、外科的な生検なしに診断を行うことは困難であった。

[0003] このような脳腫瘍を検出する方法として、摘出された脳組織を解析し、脳腫瘍に特有の糖蛋白質のN結合型糖鎖の検出に基づいて脳腫瘍を検出する方法（特許文献1）が提案されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第2006/022114号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 上記の通り、従来の脳腫瘍の検出方法は脳組織を摘出する必要があり患者への負担が大きく、非侵襲的なバイオマーカーが切望されていた。

[0006] したがって、本発明の目的は、脳腫瘍を高精度に検出することを補助する

方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 本願発明者らは、鋭意研究の結果、脳腫瘍において存在量が増大又は減少するmiRNA、そのアイソフォーム(isomiR)、転移RNA断片(tRF)、及び非コードRNA断片(lncRNA)を新たに見出し、これらを指標とすることにより、高精度に脳腫瘍の検出が可能になることを見出し、本発明を完成した。

[0008] すなわち、本発明は、生体から分離された被検試料中に含まれる、塩基配列が配列番号1～9のいずれかで示されるmiRNA、そのアイソフォーム(isomiR)、転移RNA断片(tRF)、若しくは非コードRNA断片(lncRNA)の少なくとも1種の存在量を指標として用いる、脳腫瘍の検出を補助する方法、を提供する。

発明の効果

[0009] 本発明の方法によれば、高精度に、かつ、それでいて簡便に脳腫瘍を検出することが可能であるので、脳腫瘍の検出に大いに寄与する。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]実施例1～3のマーカを用いたモデル1のROC曲線を示す図である

。

[図2]実施例4～6のマーカを用いたモデル2のROC曲線を示す図である

。

[図3]実施例7～9のマーカを用いたモデル3のROC曲線を示す図である

。

発明を実施するための形態

[0011] 上記の通り、本発明の方法では、生体から分離された被検試料中に含まれる特定のmiRNA、isomiR、転移RNA断片、又は非コードRNA断片(以下、便宜的に「miRNA等」と呼ぶことがある)の存在量を指標とする。これらのmiRNA等自体の塩基配列は配列表に示すとおりである。本発明の方法に用いるmiRNA等の一覧を下記表1に示す。

[0012] [表1]

配列番号	種別	小分子 RNA の名称	タイプ	長さ (塩基数)	配列
1	miRNA	mir-205	Mature 5'	22	UCUUUCAUCCACCGGAGUCUG
2	tRF	tRF-Val (AAC/CAC)	Exact	18	GUUUCGGUAGUGUAGUGG
3	isomiR	mir-133a-1//mir-133a-2	Mature 3' sub/super	22	UUGGUCCCCUUCACCCAGCUGU
4	lncRNA	lncRNA-derived fragment 1	Exact	15	GGGAGGGCGCGCGCC
5	tRF	tRF-Pro (AGG/CGG/TGG)	Exact	20	GGGUCCGAGAGGUCCCCGGU
6	lncRNA	lncRNA-derived fragment 2	Exact	27	AAGGAGUGUGUAACAACUCACCGCGG
7	lncRNA	lncRNA-derived fragment 3	Exact	21	GACAGCAGGACGGUGGCCAUG
8	tRF	tRF-Val (AAC/CAC)	Exact	15	GUUUCGGUAGUGUAG
9	isomiR	mir-122	Mature 5' super	23	UGGAGUGUGACAAUGGGUUUGU

- [0013] 塩基配列が配列番号1～9で示されるmiRNA等は、血清中に存在するものである（以下、便宜上、例えば「塩基配列が配列番号1で示されるmiRNA等」を単に「配列番号1のmiRNA等」や「配列番号1のもの」と呼ぶことがある）。
- [0014] 配列番号1及び3のmiRNA等は、膠芽腫患者中の存在量が健常者中の存在量よりも有意に多いmiRNA等であり、配列番号2のmiRNA等は、膠芽腫患者中の存在量が健常者中の存在量よりも有意に少ないmiRNA等である。これらのmiRNA等は単独でも膠芽腫の検出を補助することができるが、配列番号1～3のmiRNA等を組み合わせることにより、膠芽腫をさらに高精度に検出することができる。
- [0015] 配列番号4及び6のmiRNA等は、中枢神経原発リンパ腫患者中の存在量が健常者中の存在量よりも有意に多いmiRNA等であり、配列番号5のmiRNA等は、中枢神経原発リンパ腫患者中の存在量が健常者中の存在量よりも有意に少ないmiRNA等である。これらのmiRNA等は単独でも中枢神経原発リンパ腫の検出を補助することができるが、配列番号4～6のmiRNA等を組み合わせることにより、中枢神経原発リンパ腫をさらに高精度に検出することができる。
- [0016] 配列番号7～9のmiRNA等は、膠芽腫患者中の存在量が中枢神経原発リンパ腫患者中の存在量よりも有意に少ないmiRNA等である。これらのmiRNA等は単独でも膠芽腫と中枢神経原発リンパ腫の鑑別を補助することができるが、配列番号7～9のmiRNA等を組み合わせることにより、膠芽腫と中枢神経原発リンパ腫の鑑別をさらに高精度に行うことができる。
- [0017] がんマーカーの精度を示す指標としてROC曲線下面積(AUC(Area Under Curve))が用いられており、一般的にAUCが0.7以上のものががんマーカーとして有効であると言われている。AUCが0.90以上のものは高精度であり、0.97以上は非常に高精度、0.99以上は極めて高精度、1.00で完璧（偽陽性及び偽陰性が全くない）である。したがって、本発明においても、AUCが0.90のものが好ましく、さらに0.97以上のものが好ましく、さらに0.99以上のものが好ましく、1.00のものが最も好ましい。
- [0018] 被検試料としては、miRNAを含む体液であれば特に限定されないが、通常、

血液試料（血漿、血清及び全血を包含する）が好ましく用いられる。血清中に存在するものは、血清又は血漿を被検試料とすることが簡便で好ましい。血清又は血漿中の全RNAの抽出方法は周知であり、下記実施例に具体的に記載されている。

[0019] 各miRNA等の存在量の測定（定量）は、次世代シーケンサーを用いて行うことが好ましい。次世代シーケンサーのように配列を読む機器であれば、機種を特定しない。下記実施例に具体的に記載されるように、本発明の方法では、定量するmiRNA等には、例えば、通常の成熟型miRNAの5'末端および／または3'末端からわずか1塩基以上が欠失または付加されているだけのisomiRを、基本となるmiRNAと区別して定量する必要があるので、精度の観点から、miRNAの定量に広く用いられている定量的逆転写PCR (qRT-PCR)よりも次世代シーケンサーを用いて行うことが好ましい。具体的には下記実施例において詳細に記載するが、簡単に述べると、この定量方法は、次のようにしておくことができる。血清或いは血漿中に存在するRNAが一定である場合、それらを用いた次世代シーケンス解析において読まれたリード数のうち、ヒト由来のシーケンスを100万リード数に換算して、100万リード数当たりのそれぞれのisomiRや成熟型miRNAのリード数を測定値とする。疾患によって健常人に比較して血清中または血漿中のRNAが変化する場合は、血清及び血漿中で存在量の変動が少ないmiRNAを用いる場合がある。なお、血清又は血漿中のmiRNA等を定量する場合には、血清及び血漿中で存在量の変動が少ないmiRNAであるlet-7g-5p、miR-425-3p及びmiR-425-5pから成る群より選ばれる少なくとも1種のmiRNAを内部標準として用いることが好ましい。

[0020] 判定に用いる、各miRNA等の存在量のカットオフ値としては、各miRNA等について、比較対象に対する統計学的有意差(t検定で、 $p < 0.05$ 、好ましくは $p < 0.01$ 、さらに好ましくは $p < 0.001$)の有無を基準とすることが好ましい。具体的には、好ましくは、例えば、偽陽性率が最良の値（最も低くなる値）となるプロット点におけるLog2 リード数（カットオフ値）を各miRNA等について設定することができる。なお、これらのカットオフ値は、単なる例に過ぎず、

統計学的有意差が出る限り、他の値をカットオフ値として採用することができる。通常、表2～表4に示されるカットオフ値の±20%の範囲内、特に±10%の範囲内でカットオフ値を設定することができる。

[0021] また、脳腫瘍が疑われるか又は脳腫瘍に罹患するヒトの被検試料中のmiRNA等の存在量を検出する方法も提供される。すなわち、

脳腫瘍が疑われる又は脳腫瘍に罹患するヒトの被検試料中の塩基配列が配列番号1～9のいずれかで示されるmiRNA、そのアイソフォーム(isomiR)、転移RNA断片(tRF)又は非コードRNA断片(lncRNA)の少なくとも1種の存在量を検出する方法であって、

ヒトから血液試料を得る工程、及び

次世代シーケンサーまたはqRT-PCRを用いて、前記血液試料内のmiRNA等の存在量を測定する工程を含む方法、も提供される。

[0022] 本発明において、脳腫瘍としては、膠芽腫又は中枢神経原発リンパ腫が挙げられる。また、本発明において、脳腫瘍を検出するとは、膠芽腫や中枢神経原発リンパ腫などの脳腫瘍に分類される疾患を検出することのみならず、膠芽腫と中枢神経原発リンパ腫とを鑑別するように、脳腫瘍に分類される複数の疾患を鑑別することも含む。

[0023] また、上記した本願発明の方法により、脳腫瘍が検出された場合、脳腫瘍が検出された患者に必要な応じて摘出手術を施した後、有効量の脳腫瘍治療薬を投与することにより、脳腫瘍を治療することができる。脳腫瘍治療薬としては、テモゾロマイド、ロムスチン、カルムスチン、シスプラチン、ペバシズマブ、ゲフティニブ、エルロチニブ等を挙げることができる。

[0024] 以下、本発明を実施例及び比較例に基づき具体的に説明する。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。

[0025] 実施例1～9

1. 方法

(1) 臨床検体

WHO脳腫瘍分類2016に基づいて診断されたイソクエン酸脱水素酵素

野生型の膠芽腫患者26名、中枢神経原発リンパ腫14名、健常人112名から血液検体を採取した。血液検体は、3,500×gで10分間遠心を行い、上部の血清を再度採取し、12,000×gで10分間さらに遠心を行い上部の血清を回収した。血清は-80℃で保管した。

[0026] (2) 血清中のRNAの抽出

200μLの血清からmiRNeasy Mini Kit (キアゲン) を使用して、全RNAを50μLのヌクレアーゼフリー水で抽出した。次いで、抽出したRNAは遠心濃縮器機で5倍に濃縮した。

[0027] (3) miRNA等の定量

(転写産物のライブラリの作成)

4μLの濃縮したRNAからライブラリの作成を行った。ライブラリは、Total RNA-Seq Kit v2 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を使用し、製品手順書に従って作成した。3.0%アガロースゲルとパルスフィールドゲル電気泳動 (ブルーピッピン, セージサイエンス) を用いて、88から112塩基の産物を抽出した。高感度DNAアッセイチップとアジレント 2100 バイオアナライザー (アジレント・テクノロジー) を用いて、製品手順書に従い最終産物の品質を確認した。

[0028] (次世代シーケンス解析)

各々のサンプルは75pMに希釈し、Ion Chef システムで準備を行った。Ion 540 kit と Ion S5XL system (サーモフィッシャーサイエンティフィック) を用いて、製品手順書に従いシーケンスを行った。

[0029] (短鎖ノンコーディングRNAの解析)

短鎖ノンコーディングRNAのシーケンシングデータは、CLC Genomics Workbench 7.5.1 (キアゲン) を用い、15~55塩基の短鎖ノンコーディングRNAの解析を行った。小分子RNAのシーケンスデータは、miRbase Release 21, GtRNAb hg19-tRNAs, Ensembl Homo_sapiens.GRCh38.ncrnaを参照した。データを標準化するために、総リード数が100万リードだった場合に合わせて補正を行った。

[0030] (統計学的解析)

統計学的解析は、JMP pro ver. 14.0とGraphPad Prism 7を用いて行った。短鎖ノンコーディングRNAを対数変換し、下記のグループで2群間比較を行った(マン・ホイットニーのU検定)：1) 膠芽腫と健常人、2) 中枢神経原発リンパ腫と健常人、3) 膠芽腫と中枢神経原発リンパ腫。その後、候補となる短鎖ノンコーディングRNAを検索するために、一個抜き交差検証を行った後、ロジスティック解析を行った。短鎖ノンコーディングRNAを組み合わせた診断モデルの正確性は、受信者動作特性曲線を用いて評価を行った。

[0031] 2. 結果

(実施例1～3) 膠芽腫患者と健常人における血清中小分子RNAの発現の比較

膠芽腫患者と健常人において、一個抜き交差検証に続き、ロジスティック解析を行った結果、マイクロRNA-205 (Mature5') (実施例1：配列番号1)、トランスファーRNA由来フラグメント-バリン(AAC/CAC) (実施例2：配列番号2)、マイクロRNA-133a-1//マイクロRNA-133a-2 (実施例3：配列番号3)の3つの小分子RNAを選択した。

続いて、血清中小分子RNAの発現の比較評価を行った。結果を表2に示す。マイクロRNA-205 (配列番号1)とマイクロRNA-133a-1//マイクロRNA-133a-2 (配列番号3)の存在量は、膠芽腫患者において健常人より上昇していた。一方、トランスファーRNA由来フラグメント-バリン(AAC/CAC) (配列番号2)の存在量は、膠芽腫患者において健常人より減少していた。

[0032] 膠芽腫予測モデル(モデル1)は下記のように算出した：

$$((2.39923846 \times \text{マイクロRNA-205 (Mature5')}) + (-0.9319122 \times \text{トランスファーRNA由来フラグメント-バリン(AAC/CAC)}) + (0.92272519 \times \text{マイクロRNA-133a-1//マイクロRNA-133a-2}) - 12.556536)$$

モデル1のROC曲線を図1に示す。モデル1は、膠芽腫患者を健常人から感度96.2%、特異度98.2%、AUC(曲線下面積)0.991で鑑別することができた。カットオフ値は、-0.0667であった。

[0033]

[表2]

例	配列番号	種別	小分子RNAの名称	膠芽腫 標準化した 平均リード数	健常人 標準化した 平均リード数	倍率 変化	p 値	AUC	カット オフ値
実施例 1	1	miRNA	mir-205	6.40	2.17	4.24	<0.01		
実施例 2	2	tRF	tRF-Val (AAC/CAC)	2.34	4.68	-2.34	<0.01	0.991	-0.0667
実施例 3	3	isomiR	mir-133a-1//mir-133a-2	5.62	2.60	3.02	<0.01		

[0034] 上記の結果から分かるように、配列番号1及び3のmiRNA等は、膠芽腫患者中の存在量が健常者中の存在量よりも有意に多く、配列番号2のmiRNA等は、膠芽腫患者中の存在量が健常者中の存在量よりも有意に少なかった。また、配列番号1～3のmiRNA等を組み合わせることにより、膠芽腫を高精度に検出できることが示された。

[0035] (実施例4～6) 中枢神経原発リンパ腫患者と健常人における血清中小分子RNAの発現の比較

中枢神経原発リンパ腫患者と健常人において、一個抜き交差検証に続き、ロジスティック解析を行い、長鎖型ノンコーディングRNAフラグメント1(実施例4:配列番号4)、トランスファーRNA由来フラグメント-プロリン(AGG/CGG/TGG)(実施例5:配列番号5)、長鎖型ノンコーディングRNAフラグメント2(実施例6:配列番号6)を選択した。

続いて、血清中small RNAの発現の比較評価を行った。結果を表3に示す。長鎖型ノンコーディングRNAフラグメント1及び2(配列番号4及び6)の存在量は、中枢神経原発リンパ腫患者において健常人より上昇していた。トランスファーRNA由来フラグメント-プロリン(AGG/CGG/TGG)(配列番号5)の存在量は、中枢神経原発リンパ腫患者において健常人より減少していた。

[0036] 中枢神経原発リンパ腫予測モデル(モデル2)は下記のように算出した:
$$((1.05542133 \times \text{長鎖型ノンコーディングRNAフラグメント1}) + (-1.0234034 \times \text{トランスファーRNA由来フラグメント-プロリン(AGG/CGG/TGG)}) + (0.43273974 \times \text{長鎖型ノンコーディングRNAフラグメント2}) - 3.6261834)$$

モデル2のROC曲線を図2に示す。モデル2は、中枢神経原発リンパ腫患者を健常人から感度100%、特異度96.4%、AUC(曲線下面積)0.992で鑑別することができた。カットオフ値は、-1.7574であった。

[0037]

[表3]

例	配列番号	種別	小分子RNAの名称	中枢神経原発リンパ腫 標準化した 平均リード数	健常人 標準化した 平均リード数	倍率 変化	p値	AUC	カット オフ値
実施例4	4	lncRNA	lncRNA-derived fragment 1	4.85	1.30	3.54	<0.01		
実施例5	5	tRF	tRF-Pro (AGG/CGG/TGG)	1.26	4.06	-2.79	<0.01	0.992	-1.7574
実施例6	6	lncRNA	lncRNA-derived fragment 2	4.62	0.85	3.77	<0.01		

[0038] 上記の結果から分かるように、配列番号4及び6のmiRNA等は、中枢神経原発リンパ腫患者中の存在量が健常者中の存在量よりも有意に多く、配列番号5のmiRNA等は、中枢神経原発リンパ腫患者中の存在量が健常者中の存在量よりも有意に少なかった。また、配列番号4～6のmiRNA等を組み合わせることにより、中枢神経原発リンパ腫を高精度に検出できることが示された。

[0039] (実施例7～9) 膠芽腫患者と中枢神経原発リンパ腫患者における血清中小分子RNAの発現の比較

膠芽腫患者と中枢神経原発リンパ腫患者において、一個抜き交差検証に続き、ロジスティック解析を行い、長鎖型ノンコーディングRNAフラグメント3 (実施例7：配列番号7)、トランスファーRNA由来フラグメント-バリリン (AAC/CAC) (実施例8：配列番号8)、マイクロRNA-122 (Mature 5' super) (実施例9：配列番号9)の3つの小分子RNAを選択した。

続いて、血清中小分子RNAの発現の比較評価を行った。結果を表4に示す。長鎖型ノンコーディングRNAフラグメント3 (配列番号7)、トランスファーRNA由来フラグメント-バリリン (AAC/CAC) (配列番号8)、マイクロRNA-122 (Mature 5' super) (配列番号9)の存在量は、膠芽腫患者において中枢神経原発リンパ腫患者より減少していた。

[0040] 膠芽腫患者を中枢神経原発リンパ腫患者から鑑別するモデル (モデル3) は、下記のように算出した：

$((-0.9585476 \times \text{長鎖型ノンコーディングRNAフラグメント3}) + (-0.9110373 \times \text{トランスファーRNA由来フラグメント-バリリン (AAC/CAC)}) + (-0.5038918 \times \text{マイクロRNA-122 (Mature 5' super)}) + 9.48875825)$ 。

モデル3のROC曲線を図3に示す。モデル3は、膠芽腫患者を中枢神経原発リンパ腫患者から、感度92.3%、特異度78.6%、AUC (曲線下面積) 0.920で鑑別することができた。カットオフ値は、0.23985であった。

[0041]

[表4]

例	配列番号	種別	小分子RNAの名称	膠芽腫標準化した平均リード数	中枢神経原発リンパ腫標準化した平均リード数	倍率変化	p値	AUC	カットオフ値
実施例7	7	lncRNA	lncRNA-derived fragment 3	2.43	4.17	-1.73	0.015		
実施例8	8	tRF	tRF-Val (AAC/CAC)	1.64	3.98	-2.34	<0.01	0.920	0.23985
実施例9	9	isomiR	mir-122	4.60	6.63	-2.04	<0.01		

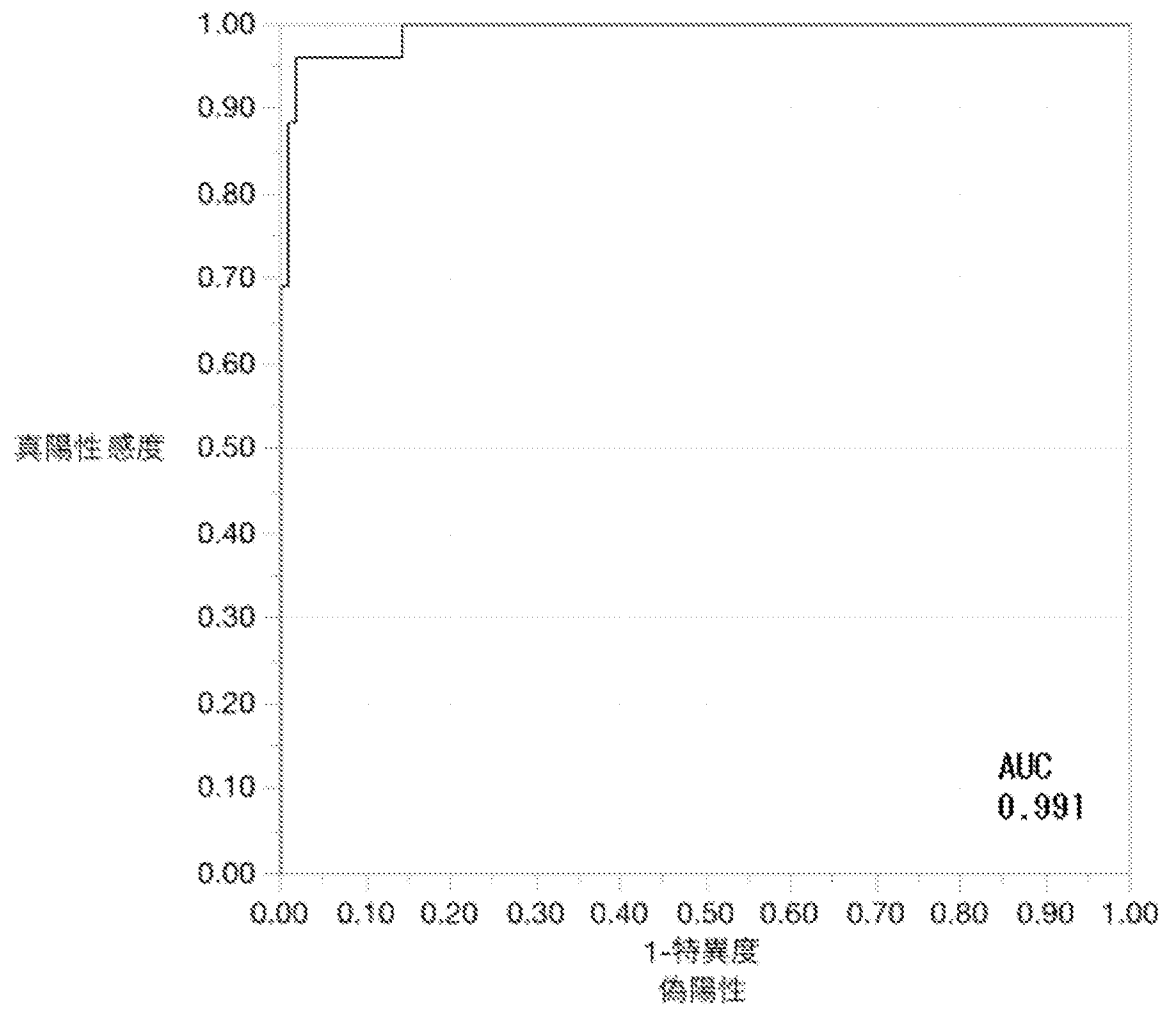
[0042] 上記の結果から分かるように、配列番号7～9のmiRNA等は、膠芽腫患者中の存在量が中枢神経原発リンパ腫患者中の存在量よりも有意に少なかった。また、配列番号7～9のmiRNA等を組み合わせることにより、膠芽腫と中枢神経原発リンパ腫を高精度に鑑別できることが示された。

請求の範囲

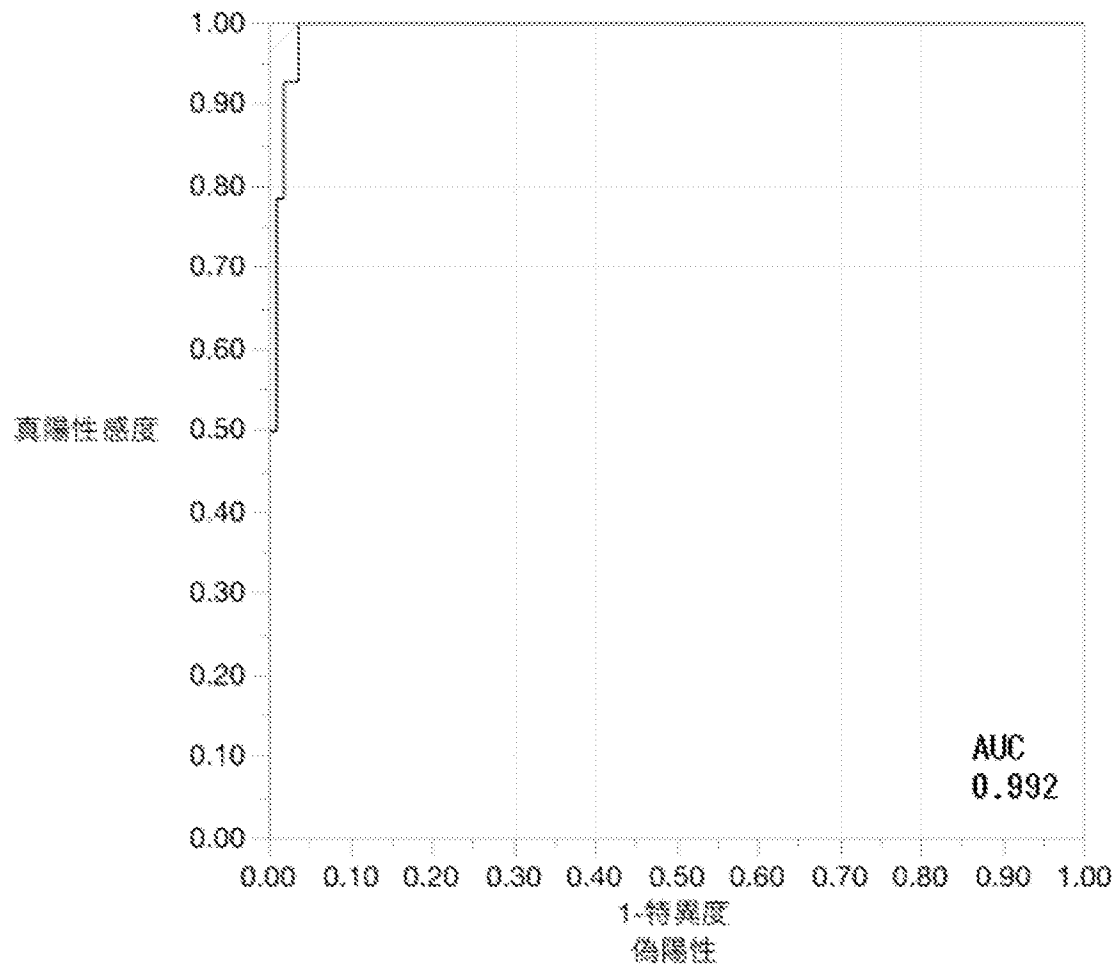
- [請求項1] 生体から分離された被検試料中に含まれる、塩基配列が配列番号1～9のいずれかで示されるmiRNA、そのアイソフォーム (isomiR)、転移RNA断片 (tRF)、若しくは非コードRNA断片 (lncRNA) の少なくとも1種の存在量を指標として用いる、脳腫瘍の検出を補助する方法。
- [請求項2] 塩基配列が配列番号1～3のいずれかで示されるmiRNA、そのアイソフォーム (isomiR)、若しくは転移RNA断片 (tRF) の少なくとも1種の存在量を指標とし、塩基配列が配列番号1及び3のいずれかで示される少なくとも1種のmiRNA、若しくはisomiRの存在量が健常者よりも多いこと、又は塩基配列が配列番号2で示される転移RNA断片の存在量が健常者よりも少ないことが、脳腫瘍を発症している可能性が大きいことを示す、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 塩基配列が配列番号1のmiRNAと、塩基配列が配列番号2の転移RNA断片と、塩基配列が配列番号3のisomiRの存在量を指標とする、請求項2記載の方法。
- [請求項4] 脳腫瘍が膠芽腫である請求項2又は3記載の方法。
- [請求項5] 塩基配列が配列番号4～6のいずれかで示される転移RNA断片 (tRF)、若しくは非コードRNA断片 (lncRNA) の少なくとも1種の存在量を指標とし、塩基配列が配列番号4及び6のいずれかで示される少なくとも1種の非コードRNA断片の存在量が健常者よりも多いこと、又は塩基配列が配列番号5で示される転移RNA断片の存在量が健常者よりも少ないことが、脳腫瘍を発症している可能性が大きいことを示す、請求項1記載の方法。
- [請求項6] 塩基配列が配列番号4の非コードRNA断片と、塩基配列が配列番号5の転移RNA断片と、塩基配列が配列番号6の非コードRNA断片の存在量を指標とする、請求項5記載の方法。
- [請求項7] 脳腫瘍が中枢神経原発リンパ腫である請求項5又は6記載の方法。

- [請求項8] 被検試料が膠芽腫患者又は中枢神経原発リンパ腫患者から分離された試料であり、塩基配列が配列番号7～9のいずれかで示されるmiRNAのアイソフォーム (isomiR)、転移RNA断片 (tRF)、若しくは非コードRNA断片 (lncRNA) の少なくとも1種の存在量を指標として用いて膠芽腫と中枢神経原発リンパ腫を鑑別する、請求項1記載の方法。
- [請求項9] 塩基配列が配列番号7～9のいずれかで示される少なくとも1種のisomiR、転移RNA断片、若しくは非コードRNA断片の存在量が中枢神経原発リンパ腫患者よりも少ないことが、膠芽腫を発症している可能性が大きいことを示す、請求項8記載の方法。
- [請求項10] 塩基配列が配列番号7の非コードRNA断片と、塩基配列が配列番号8の転移RNA断片と、塩基配列が配列番号9のisomiRの存在量を指標とする、請求項8又は9記載の方法。

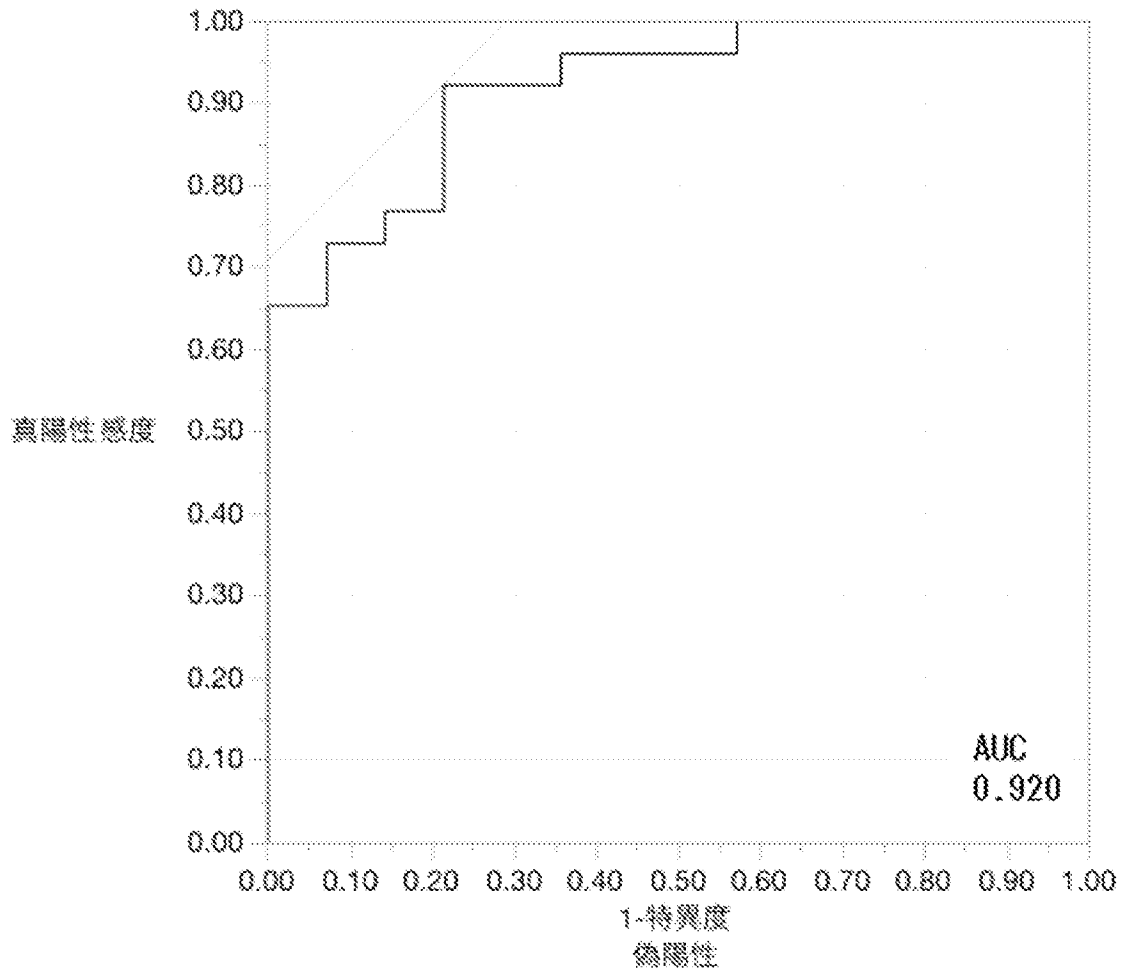
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/027292

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
<i>C12N 15/113</i> (2010.01)i; <i>C12Q 1/6869</i> (2018.01)i; <i>C12Q 1/6886</i> (2018.01)i; <i>G01N 33/574</i> (2006.01)i FI: C12N15/113 Z; C12Q1/6869 Z; G01N33/574 Z; C12Q1/6886 Z ZNA		
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) C12N15/113; C12Q1/6869; 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 (STN); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	YUE, X. et al., Downregulation of serum microRNA-205 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma. J Neurosurg. 124:122-128, 2016 abstract, fig. 1-3	1
X	HERMAN, A. et al., Analysis of Glioblastoma Patients' Plasma Revealed the Presence of MicroRNAs with a Prognostic Impact on Survival and Those of Viral Origin. PLOS ONE. 07 May 2015, pp. 1-20, DOI: 10.1371/journal.pone.0125791 table 1	1
X	JP 2010-522554 A (ROSETTA GENOMICS, LTD.) 08 July 2010 (2010-07-08) paragraph [0025]	1-2, 4
A	CN 106978415 A (THE EAST HOSPITAL OF SHANGHAI THE SIXTH PEOPLES HOSPITAL) 25 July 2017 (2017-07-25)	1-10
A	WO 2009/066291 A2 (ROSETTA GENOMICS LTD.) 28 May 2009 (2009-05-28)	1-10
<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 07 September 2021		Date of mailing of the international search report 05 October 2021
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	NAKANO, Y. et al., ANALYSIS OF MICRORNA EXPRESSION PROFILE OF INTRACRANIAL GERM CELL TUMORS: A PROMISING TOOL FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS. NEURO-ONCOLOGY. December 2020, ii342, ii343, GCT-72 results	1-10
P, X	大西 俊平 外, 膠芽腫と中枢神経原発リンパ腫の血中バイオマーカー-NGSによるsmall noncoding RNA解析-, 第38回日本脳腫瘍学会学術集会 プログラム・抄録集, 10 November 2020, p. 83, S5-3, (ONISHI, Shumpei et al., Circulating biomarker for glioblastoma and primary central nervous system lymphoma-Next Generation Sequencing of small noncoding RNA-), non-official translation (Program/abstracts of the 38th Annual Meeting of Japanese Society for Neuro-Oncology) 方法、結果, non-official translation (methods, results)	1-10

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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2021/027292

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
JP	2010-522554	A	08 July 2010	US	2010/0178653	A1	
					paragraph [0025]		
				WO	2008/117278	A2	
				EP	2132327	A2	
				CA	2678919	A	
				AU	2008231393	A	
				IL	200465	D	

CN	106978415	A	25 July 2017	(Family: none)			

WO	2009/066291	A2	28 May 2009	US	2010/0273172	A1	
				IL	205559	D	

<p>A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC）） C12N 15/113(2010.01)i; C12Q 1/6869(2018.01)i; C12Q 1/6886(2018.01)i; G01N 33/574(2006.01)i FI: C12N15/113 Z; C12Q1/6869 Z; G01N33/574 Z; C12Q1/6886 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）） C12N15/113; C12Q1/6869; 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 (JDreamIII); CPlus/REGISTRY (STN); CPlus/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>YUE, X. et al., Downregulation of serum microRNA-205 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma, J Neurosurg 124:122-128, 2016 Abstract, Fig. 1-3</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>HERMAN, A. et al., Analysis of Glioblastoma Patients' Plasma Revealed the Presence of MicroRNAs with a Prognostic Impact on Survival and Those of Viral Origin, PLOS ONE, 2015.05.07, pp.1-20, DOI:10.1371/journal.pone.0125791 Table 1</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP 2010-522554 A (ロゼッタ ゲノミックス エルティイーディー.) 08.07.2010 (2010 - 07 - 08) 段落0025</td> <td>1-2, 4</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106978415 A (THE EAST HOSPITAL OF SHANGHAI THE SIXTH PEOPLES HOSPITAL) 25.07.2017 (2017 - 07 - 25)</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2009/066291 A2 (ROSETTA GENOMICS LTD.) 28.05.2009 (2009 - 05 - 28)</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" 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>"&" 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*	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	YUE, X. et al., Downregulation of serum microRNA-205 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma, J Neurosurg 124:122-128, 2016 Abstract, Fig. 1-3	1	X	HERMAN, A. et al., Analysis of Glioblastoma Patients' Plasma Revealed the Presence of MicroRNAs with a Prognostic Impact on Survival and Those of Viral Origin, PLOS ONE, 2015.05.07, pp.1-20, DOI:10.1371/journal.pone.0125791 Table 1	1	X	JP 2010-522554 A (ロゼッタ ゲノミックス エルティイーディー.) 08.07.2010 (2010 - 07 - 08) 段落0025	1-2, 4	A	CN 106978415 A (THE EAST HOSPITAL OF SHANGHAI THE SIXTH PEOPLES HOSPITAL) 25.07.2017 (2017 - 07 - 25)	1-10	A	WO 2009/066291 A2 (ROSETTA GENOMICS LTD.) 28.05.2009 (2009 - 05 - 28)	1-10	* 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*	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	YUE, X. et al., Downregulation of serum microRNA-205 as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma, J Neurosurg 124:122-128, 2016 Abstract, Fig. 1-3	1																														
X	HERMAN, A. et al., Analysis of Glioblastoma Patients' Plasma Revealed the Presence of MicroRNAs with a Prognostic Impact on Survival and Those of Viral Origin, PLOS ONE, 2015.05.07, pp.1-20, DOI:10.1371/journal.pone.0125791 Table 1	1																														
X	JP 2010-522554 A (ロゼッタ ゲノミックス エルティイーディー.) 08.07.2010 (2010 - 07 - 08) 段落0025	1-2, 4																														
A	CN 106978415 A (THE EAST HOSPITAL OF SHANGHAI THE SIXTH PEOPLES HOSPITAL) 25.07.2017 (2017 - 07 - 25)	1-10																														
A	WO 2009/066291 A2 (ROSETTA GENOMICS LTD.) 28.05.2009 (2009 - 05 - 28)	1-10																														
* 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																																
国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日																															
07.09.2021	05.10.2021																															
名称及びあて先 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	権限のある職員（特許庁審査官） 高山 敏充 4B 4153 電話番号 03-3581-1101 内線 3448																															

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	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
P, X	NAKANO, Y. et al., ANALYSIS OF MICRORNA EXPRESSION PROFILE OF INTRACRANIAL GERM CELL TUMORS: A PROMISING TOOL FOR DIFFERENTIAL DIAGNOSIS, NEURO-ONCOLOGY, 2020.12, ii342-ii343, GCT-72 RESULTS	1-10
P, X	大西 俊平 外, 膠芽腫と中枢神経原発リンパ腫の血中バイオマーカー—NGSによる small noncoding RNA 解析—, 第38回日本脳腫瘍学会学術集会 プログラム・抄録集, 2020.11.10, p.83, S5-3 方法、結果	1-10

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:

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/JP2021/027292

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2010-522554	A	08.07.2010	US	2010/0178653	A1	
					[0025]		
				WO	2008/117278	A2	
				EP	2132327	A2	
				CA	2678919	A	
				AU	2008231393	A	
				IL	200465	D	

CN	106978415	A	25.07.2017	(ファミリーなし)			

WO	2009/066291	A2	28.05.2009	US	2010/0273172	A1	
				IL	205559	D	
