国立研究開発法人
国立がん研究センター
National Cancer Center Japan

第6回JMACシンポジウム

Jan. 24, 2019

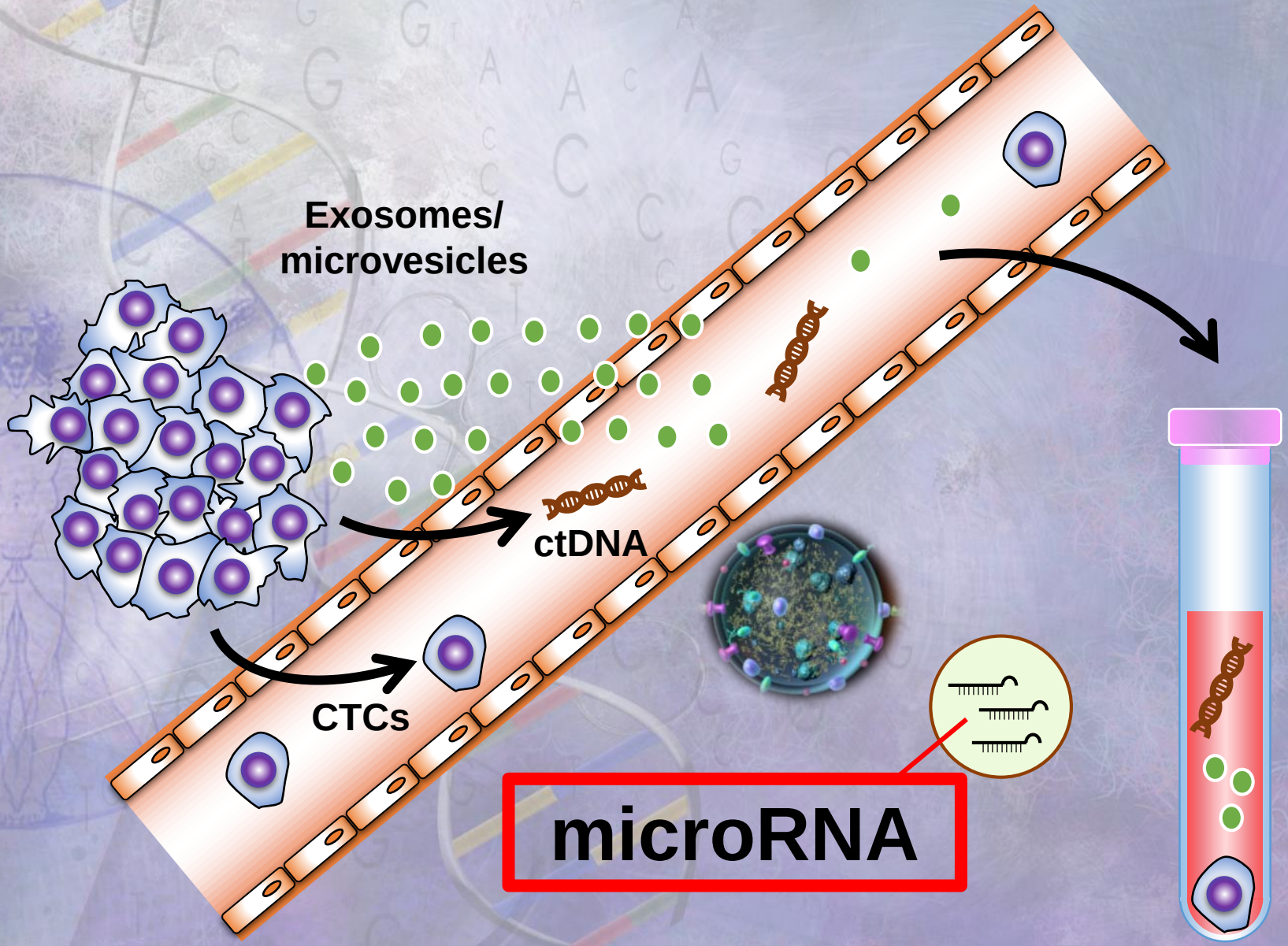
血清miRNAによるがん早期診断研究の現状

Circulating microRNA profiling for the detection of cancers in the early stage

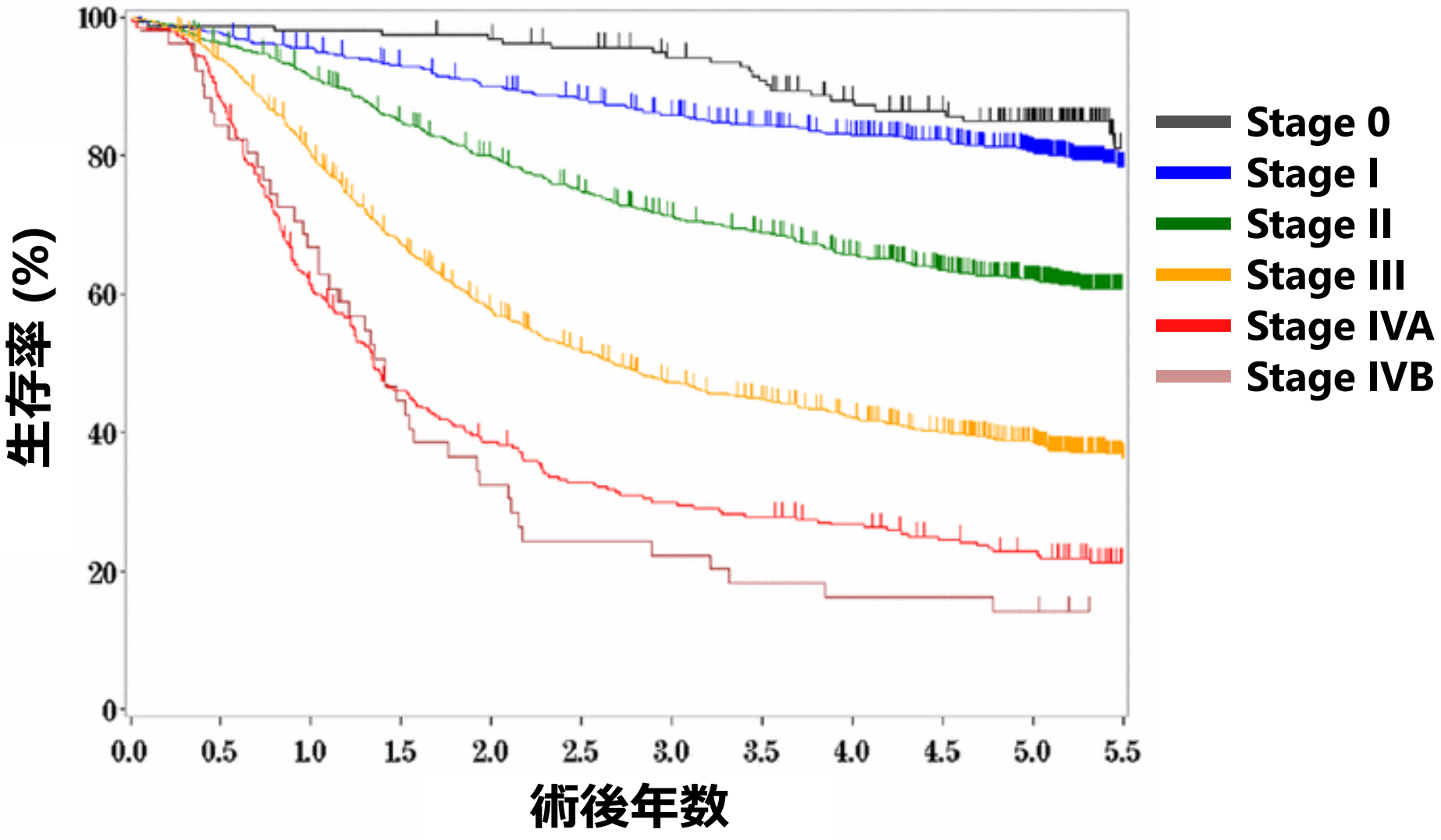
松﨑 潤太郎
Juntaro Matsuzaki, MD, PhD

Division of Molecular and Cellular Medicine,
National Cancer Center Research Institute,
Tokyo, Japan

がんの体液診断（リキッドバイオプシー）

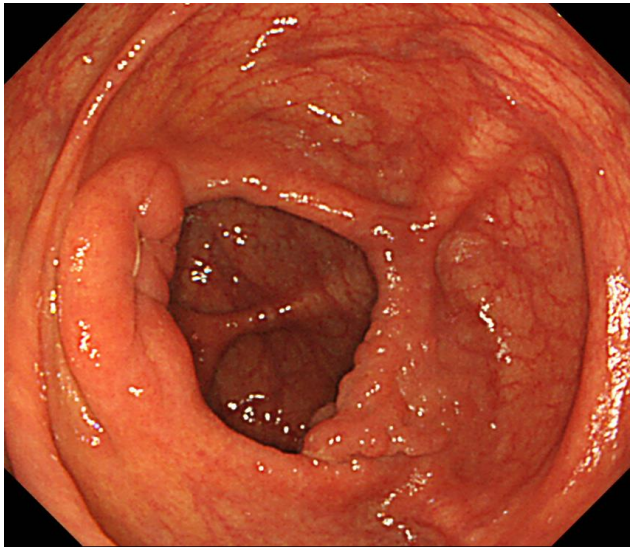


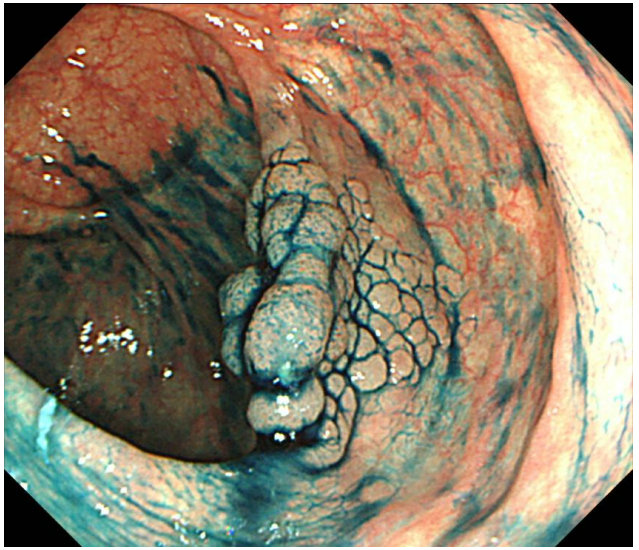
食道がん手術後の臨床病期(ステージ)と予後

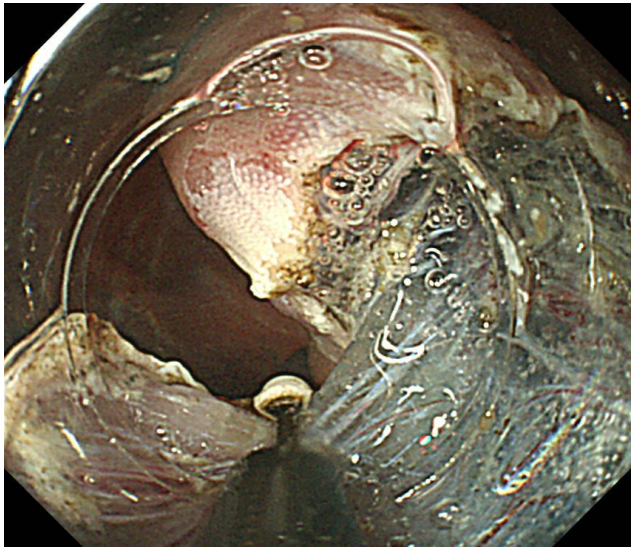


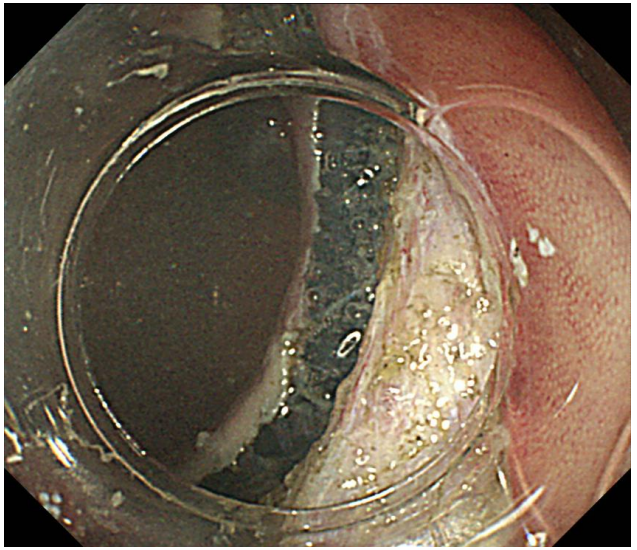
(Tachimori et al. Esophagus 14:189, 2017)

消化管がんの内視鏡治療









(Takamaru, Matsuzaki et al. DDW 2017)

がん検診の現状

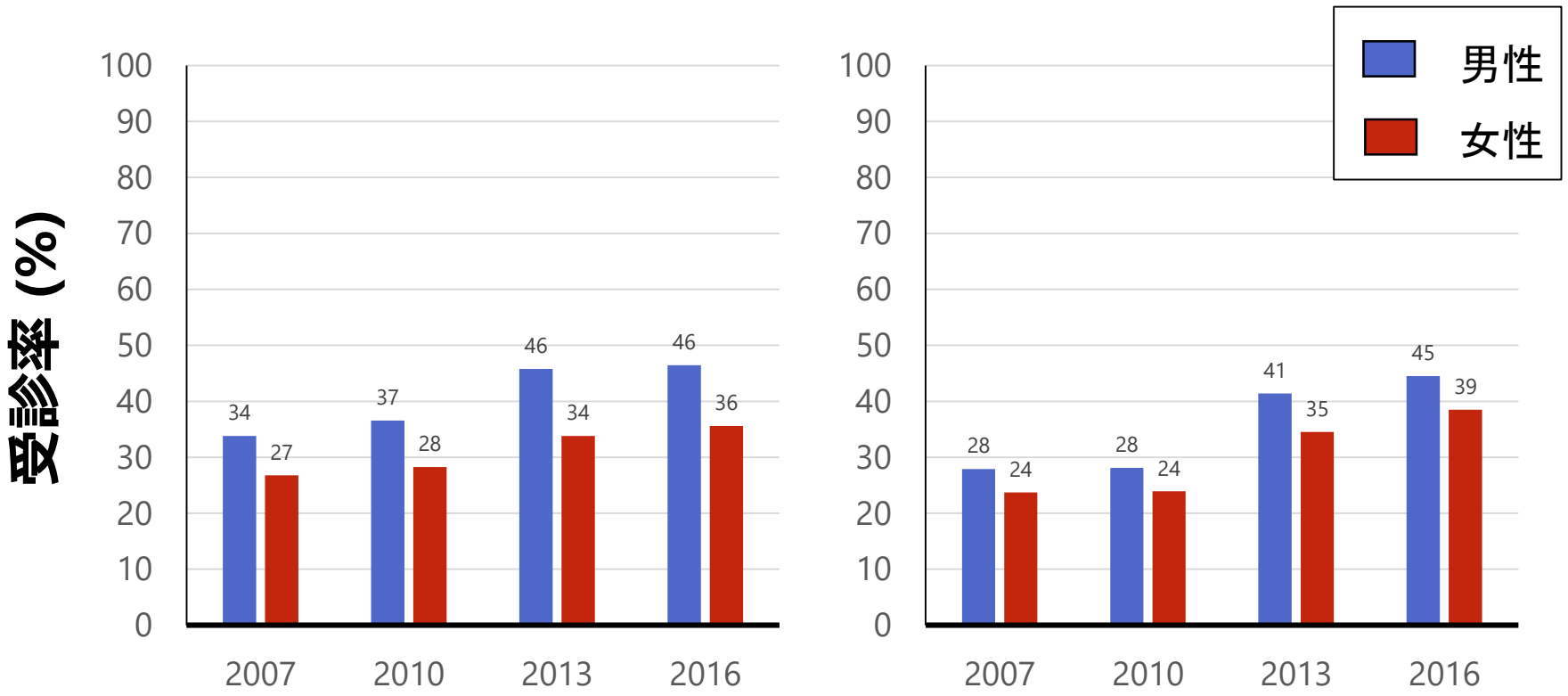
対策型検診 (住民検診)

- 胃がん
  - 胃バリウムX線
  - 上部消化管内視鏡
- 大腸がん
  - 便潜血検査
- 肺がん
  - 胸部X線
- 乳がん
  - マンモグラフィ
  - 視触診
- 子宮頸がん
  - 細胞診

任意型検診(人間ドック)

- 上部消化管内視鏡
- 下部消化管内視鏡
- 胃バリウムX線
- 大腸注腸X線
- 大腸CTコロノグラフィー
- 便潜血検査
- 超音波(エコー)
- CT
- MRI
- 血液検査(PSA, CA125等)
- マンモグラフィ
- 子宮頚部細胞診
- コルポスコピー
- PET-CT

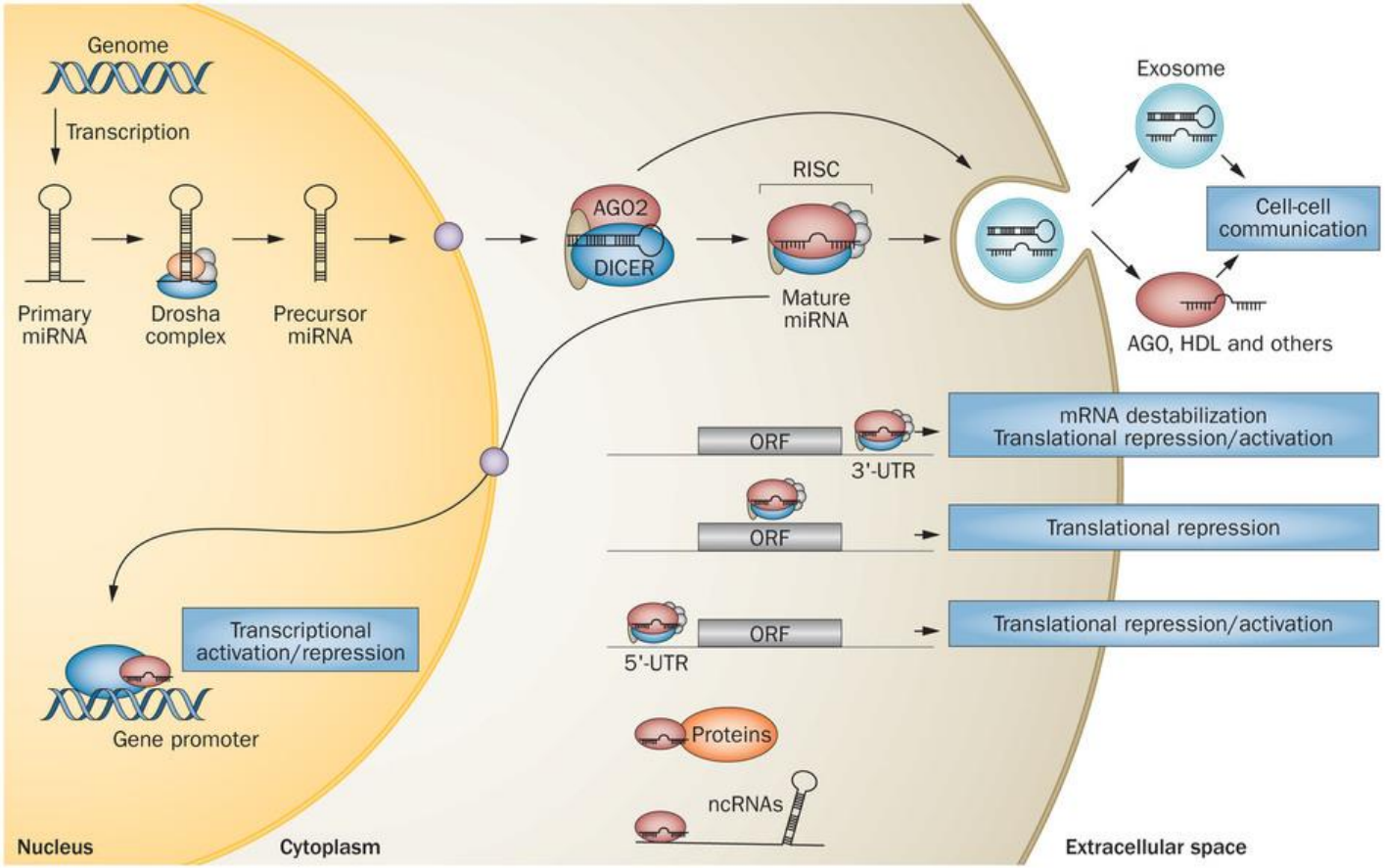
対策型検診の受診率 (40~69歳)



(国立がん研究センターがん対策情報センター)

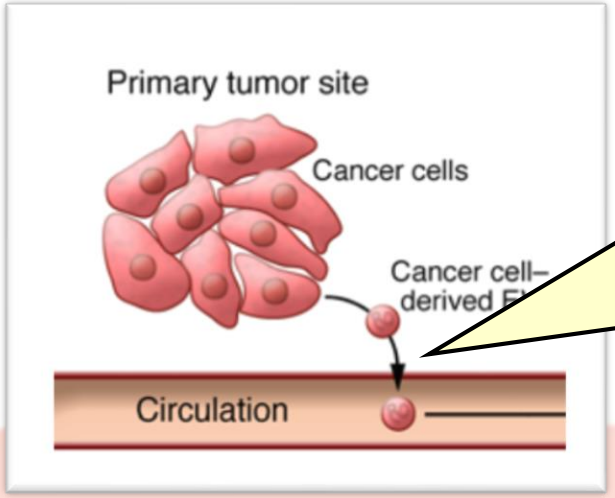
Biogenesis and function of microRNAs (miRNAs)

- miRNAs are short noncoding RNAs consisting of 17–25 nucleotides.
- miRNAs regulate gene expression by inhibiting the translation of target mRNAs.
- A total of 2656 miRNAs were identified (miRBase 22).

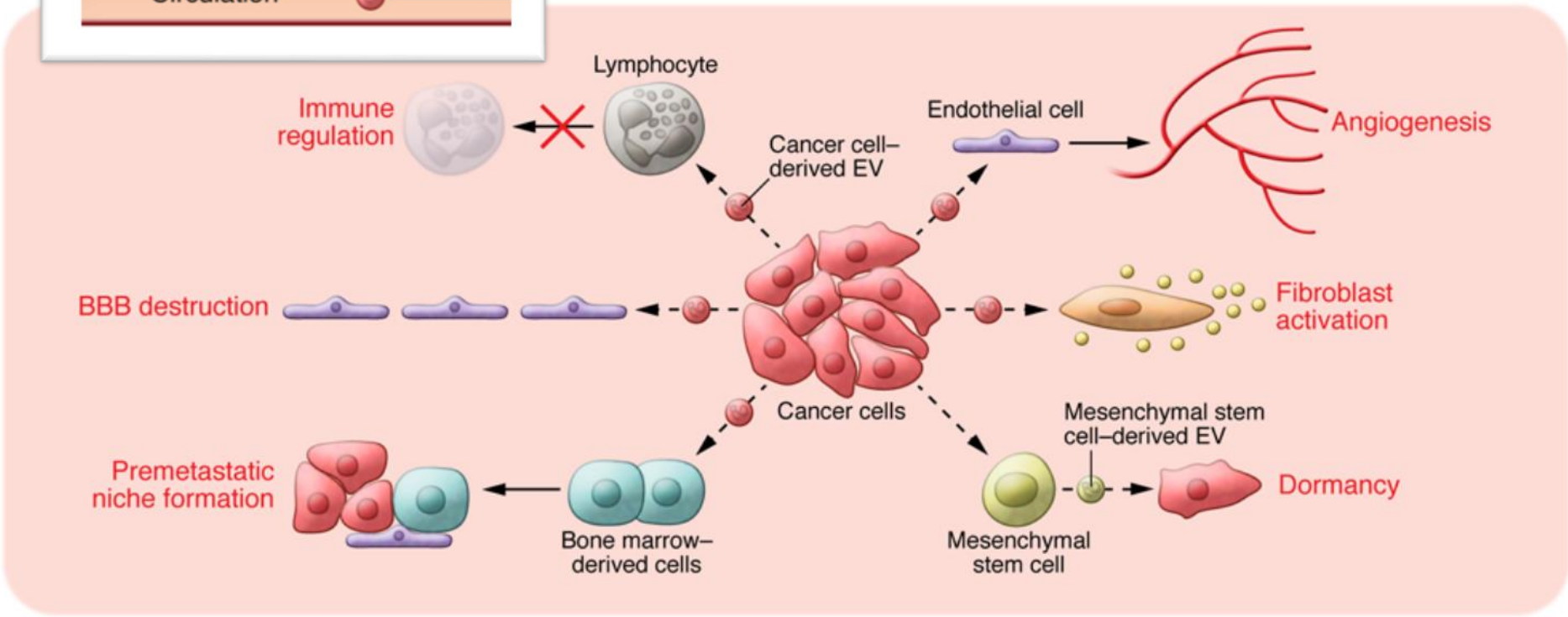


(Nat Rev Clin Oncol 11:145, 2015)

Circulating miRNAs

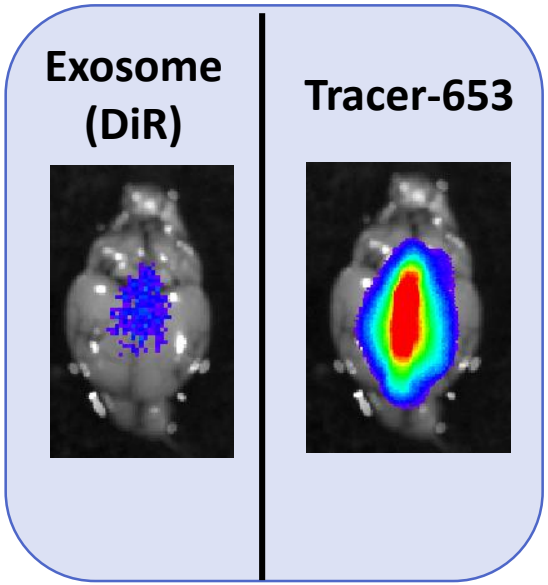


- Stably present in the circulation
- Taken up by the other cells (assist cancer progression)
- **Good candidate of non-invasive biomarkers for cancer diagnosis**

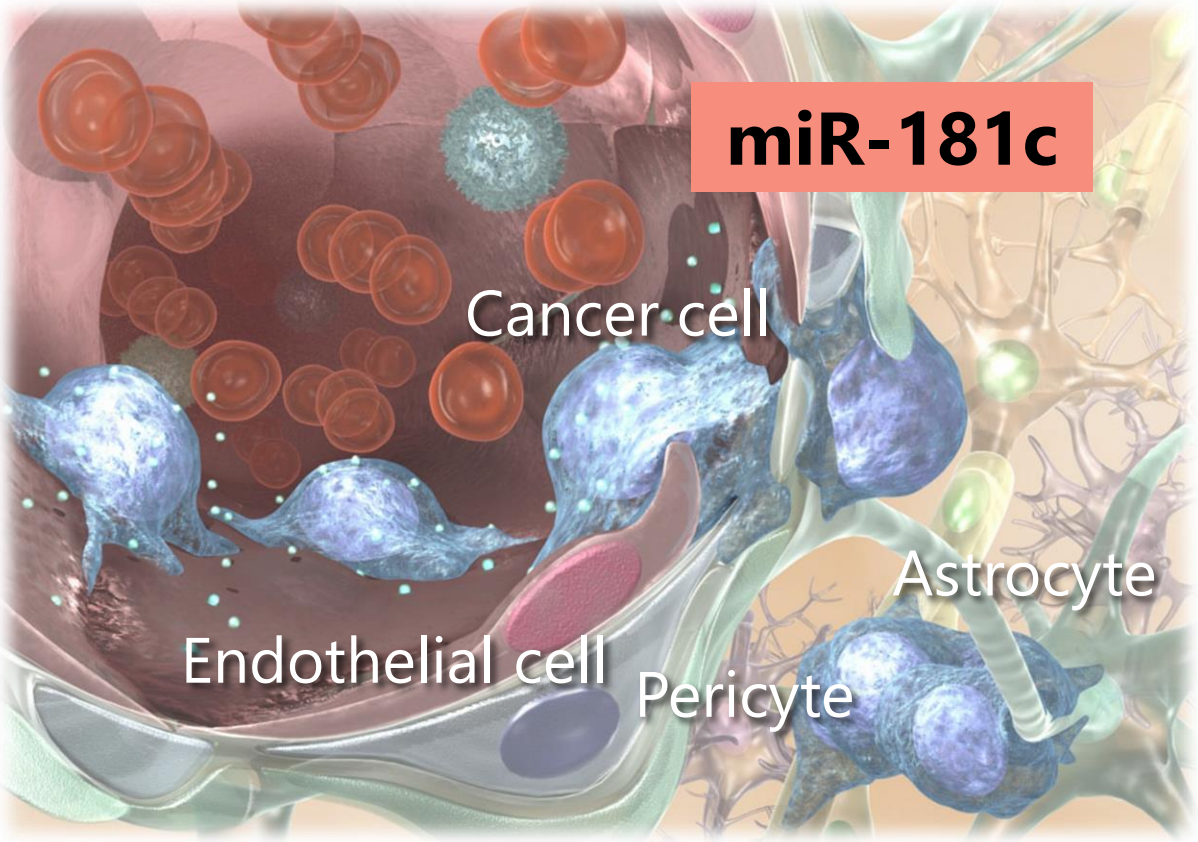


(Kosaka et al. JCI 2016)

乳がん由来エクソソーム内miRNAによるBBBの破壊



BMD2a DiR-labeled EVs
treatment (5 μg/animal)



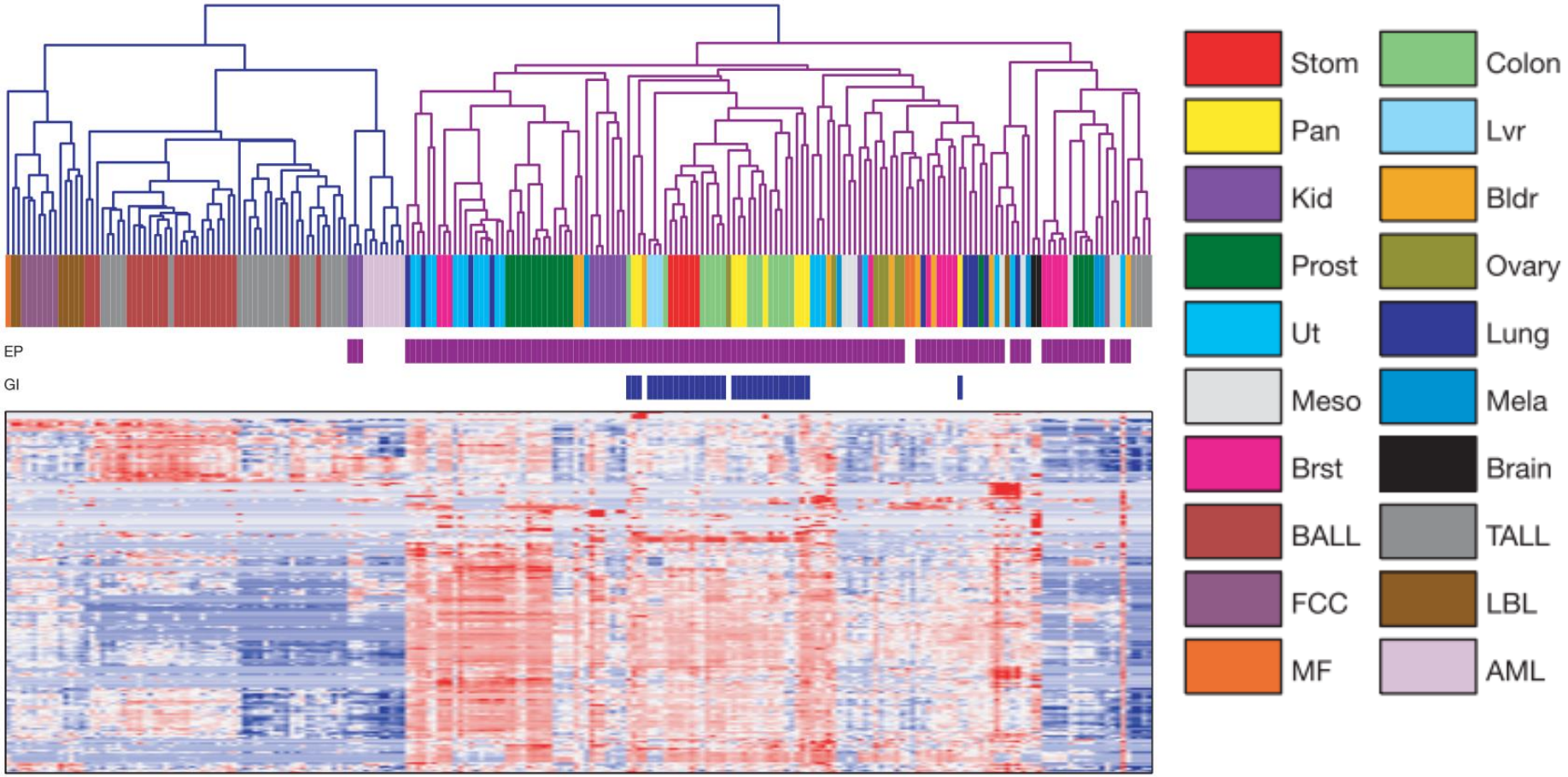
(Tominaga et al., Nat Commun, 2015)

nature Vol 435|9 June 2005|doi:10.1038/nature03702

LETTERS

MicroRNA expression profiles classify human cancers

Jun Lu[1,4]*, Gad Getz[1]*, Eric A. Miska[2]*†, Ezequiel Alvarez-Saavedra[2], Justin Lamb[1], David Peck[1], Alejandro Sweet-Cordero[3,4], Benjamin L. Ebert[1,4], Raymond H. Mak[1,4], Adolfo A. Ferrando[4], James R. Downing[5], Tyler Jacks[2,3], H. Robert Horvitz[2] & Todd R. Golub[1,4,6]



(Lu et al. ***Nature*** 435:834, 2005)

Circulating microRNAs and extracellular vesicles as potential cancer biomarkers: a systematic review

MEDLINE searching on January 20, 2017

2,686 papers

↓

Studies about circulating miRNAs or EVs as cancer biomarkers

876 papers

↓

Studies feasible to grasp the potential of circulating miRNAs or EVs as cancer biomarkers

219 papers

Table 1 The 10 most frequently documented miRNAs in cancer

	Cancer site	Representative targets[a]
hsa-miR-21-5p	Hepatocellular, colorectal, breast, lung, pancreatic, nasopharyngeal	*PTEN*, *PDCD4*, *RPS7*
hsa-miR-221-3p	Hepatocellular, colorectal, lung, sarcoma	*CDKN1B*, *KIT*, *TMED7*
hsa-miR-155-5p	Lung, breast, colorectal, pancreatic, laryngeal	*CEBPB*, *SOCS1*, *TP53INP1*
hsa-miR-223-3p	Hepatocellular, colorectal, lung, esophageal, pancreatic, sarcoma	*IGF1R*, *FBXW7*, *NFIA*
hsa-miR-92a-3p	Colorectal, hepatocellular, breast, gastric, endometrial	*BCL2L11*, *FOXN2*, *SOX4*
hsa-miR-16-5p	Breast, esophageal, gastric, lung, melanoma, pancreatic, ovarian	*BCL2*, *VEGFA*, *CCNE1*
hsa-miR-20a-5p	Lung, colorectal, gastric, hepatocellular, pancreatic	*CCND1*, *TGFBR2*, *E2F1*
hsa-miR-141-3p	Colorectal, hepatocellular, breast, lung	*ZEB2*, *ZEB1*, *YRDC*
hsa-miR-145-5p	Colorectal, hepatocellular, lung, breast, gastric, ovarian	*IRS1*, *FSCN1*, *POU5F1*
hsa-miR-210-3p	Colorectal, breast, lung, pancreatic, glioma, hepatocellular, melanoma, renal, bladder	*EFNA3*, *ISCU*, *E2F3*

[a] The top 3 reported genes according to miRTarBase

(Matsuzaki & Ochiya. ***Int J Clin Oncol.*** 22:413, 2017)

Japanese team develops blood test that can check for 13 types of cancers

MONDAY , JULY 24, 2017 - 7:20 AM

TOKYO - A research team led by the Tokyo-based National Cancer Center Japan has developed a new test to diagnose 13 kinds of

マイクロRNAを使ったがんの検査法

がん細胞 採血 健康な細胞

1 マイクロRNAの抽出

血液からマイクロRNAを取り出す

2 チップで反応

マイクロRNAをチップにふりかけ、試薬と反応させる

3 画面で確認

反応したマイクロRNAを検査機器で解析

分泌されたマイ(指質の袋に包

※写真は国立がん研究センター提供

血液1滴 がん早期発見

■ 13種類を判定

負担軽く安価・精度に課題

国立がん研究センター（東京都）などのグループが、わずか一滴の血液で13種類のがんを早期発見する新たな検査法を開発し、今月から臨床研究を始めた。これほど多くのがんを一度に調べられる技術はない。早い段階での治療につなげ、がんによる死亡を減らし、医療費も節約できると期待される。早ければ3年以内に国に事業化を申請する計画だ。（大阪科学医療部 山崎光祥）

■ マイクロRNA

「人間ドックなどで採った血液を使えば、どのがんにかかっているかが、小さいうちからわかる。世界に類のない検査法だ」。リーダーで同センター研究所の落谷孝広・分子細胞治療研究分野長は強調する。

検査の手がかりは、血液中の「マイクロRNA」という微小物質。がん細胞は、特定の種類のマイクロRNAを分泌している。グループはここに着目した。

研究は2014年に開始。国から助成金の研究費を得て、同センターなどに保存されていた、がん患者と がんではない健康者の計4万人の血液で、がん種ごとのマイクロRNAの分泌パターンを調べてきた。

その結果、日本人に多い乳房、大腸、膵臓、胆道、食道、肝臓、膀胱、胃、腎臓、前立腺のがんと、脳腫瘍の3割を占める神経膠腫（グリオーマ）など、希少ながんの骨軟部腫瘍のパターンを突き止めた。

がんの進行度は、早期の「1期」から最も進んだ「4期」まで、大きく4段階で示される。乳がんは、五つのマイクロRNAを調べれば、1期を含む患者を97％の正確さで判定し、他のがんも96％以上を確保した。

マイクロRNAは血液中では時間とともに変異する。そのため、今月から始まった臨床研究では、患者ら約3400人の「新鮮な血液」を使って判定精度を最終的に検証する。

■ 事業化急ぐ

体への負担が軽く、簡便で正確にがんを早期発見することが検査の最大の目標だ。これまで様々な検査法が開発されてきた。

血液中の「腫瘍マーカー」を調べるのもその一つだが、マーカーは、がん細胞が死んで分解された時に出るため、がんがある程度進行しなければ発見できない問題がある。

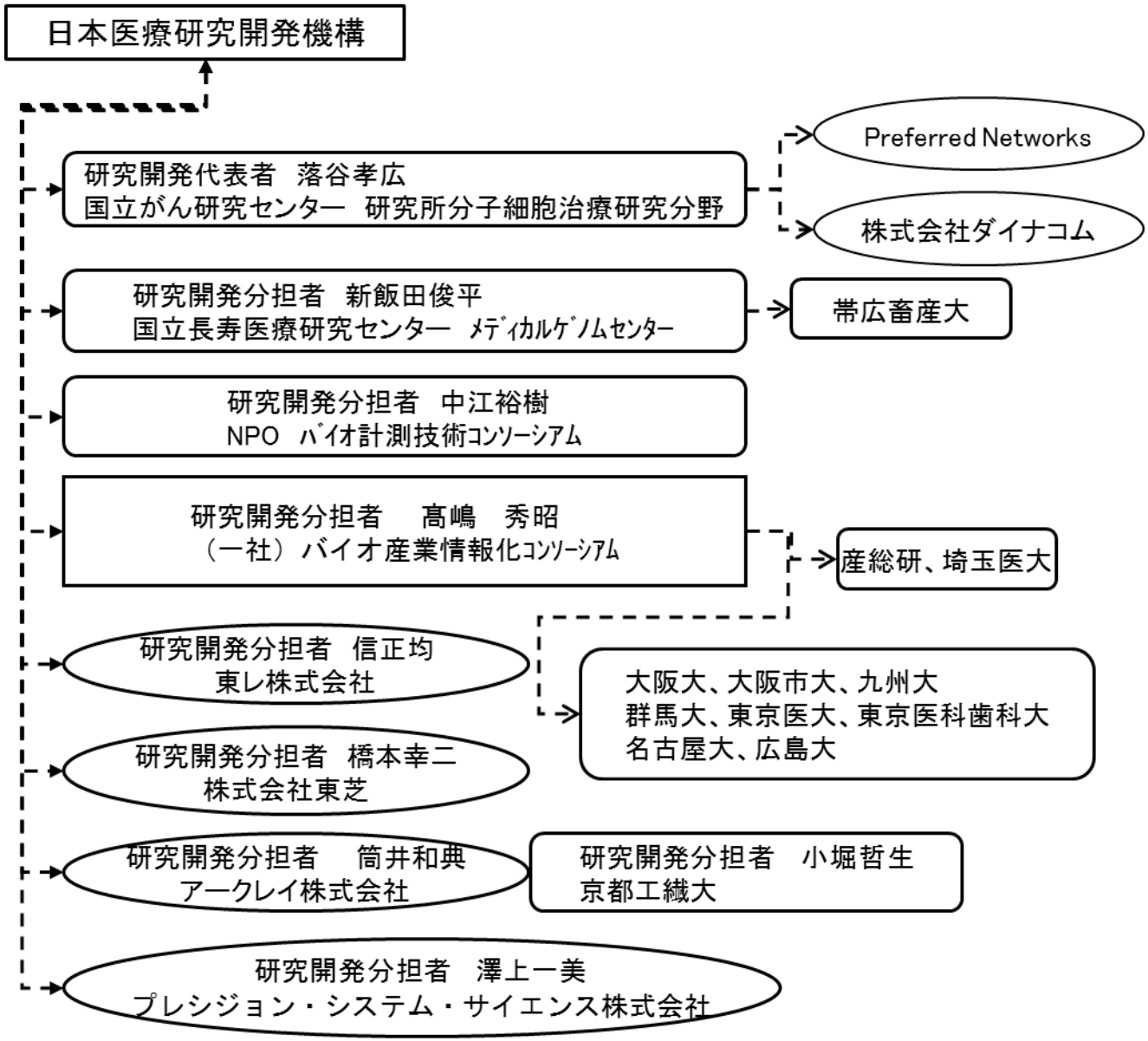
企業や自治体などのがん検診で対象となる胃、肺、大腸、肺、子宮頸部の5種類のがんは、乳腺科や消化器科などが複数の診療科にまたがる。検査機器のエックス線や内視鏡などの性能は向上しているが、大阪国際がんセンター婦人科部長は「これからがんになるかもしれない人には朗報になるだろう」と期待をかける。

医療分野長は「マイクロRNAの検査は一度に13種類のがんを調べられ、1回の費用は2万円程度とかなり低コストだ。事業化を急ぎたい」と話す。NPO法人がん患者団体支援機構（東京都）の副中和子理事長は「これからがんになるかもしれない人には朗報になるだろう」と期待をかける。

いる」と指摘する。

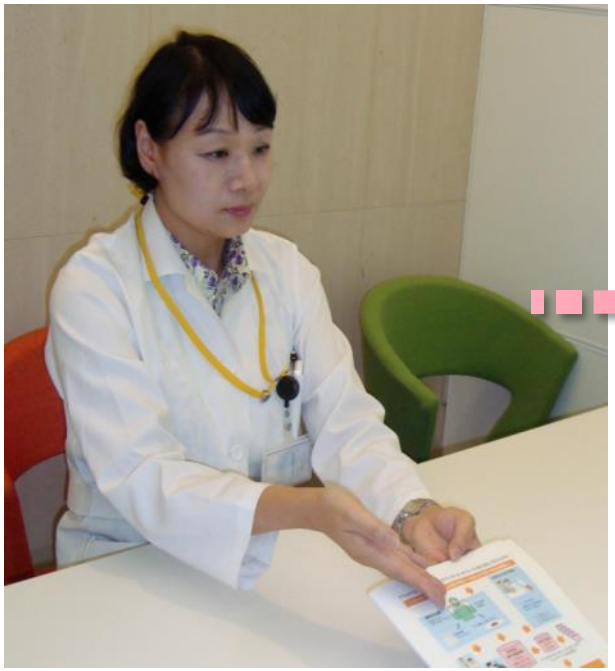
昨年のがん検診の受診率が全国平均で30～40％台と、国の目標（50％）を下回った。受診が頻繁で、検診を受けられない地域があることも大きいという。

Members in the project

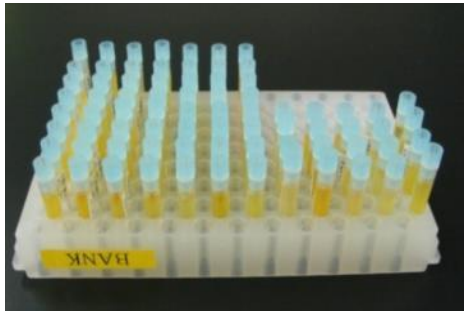


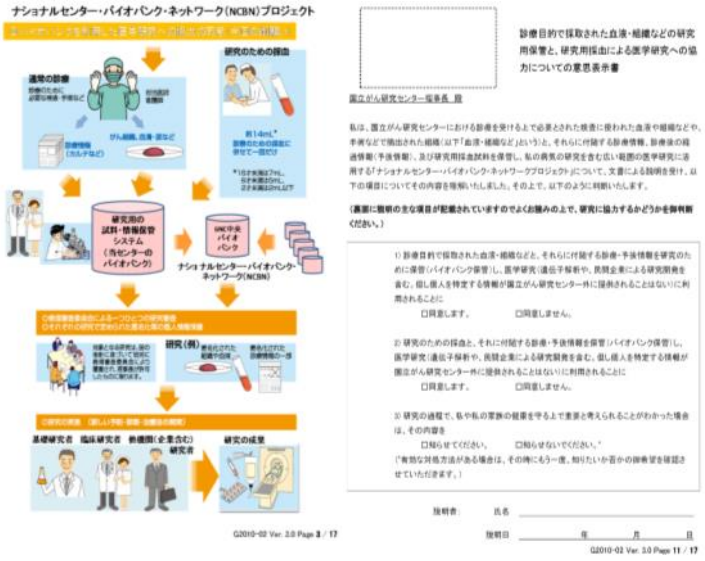
Natl. Cancer Center Biobank Japan

National Cancer Center Biobank



14mL





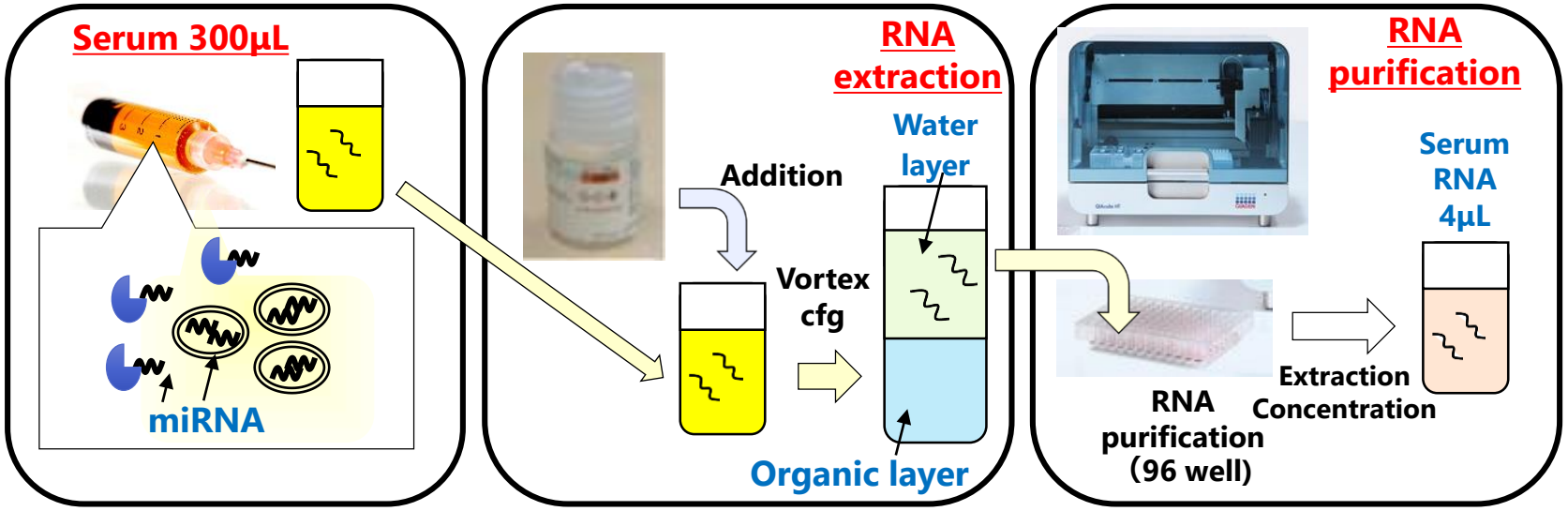
BioBank Blood samples

- Stock number (2014. 4.1)

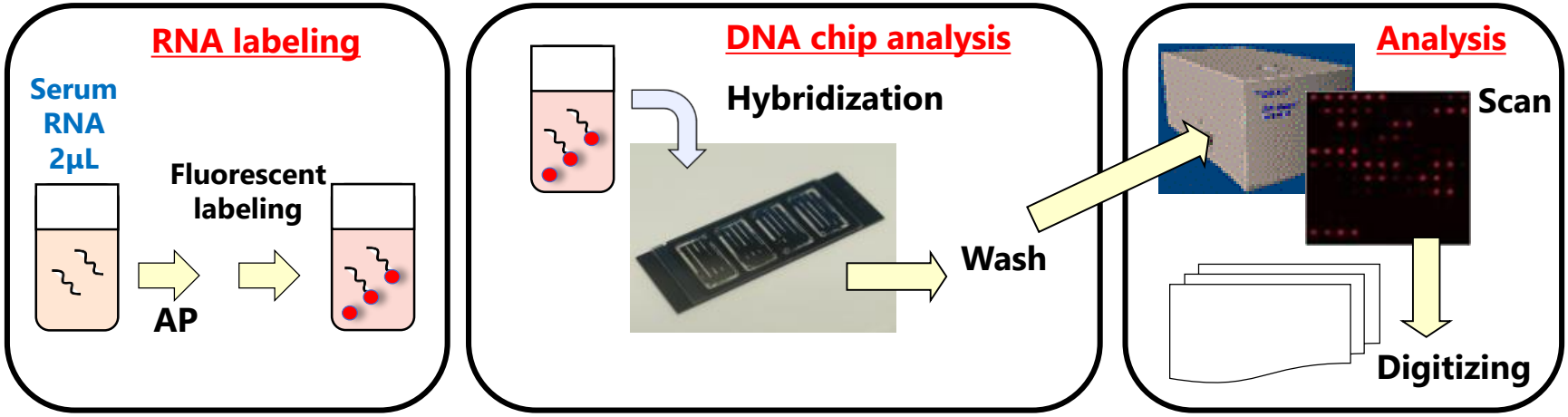
Plasma	88,639
Serum	739,152

Circulating miRNA microarray analysis

1. Total RNA extraction from serum



2. Comprehensive miRNA analysis with DNA chips



2500 samples / month

Analytical steps

2,588 miRNA expression levels for each sample (miRBase rel. 21)

↓

Normalization

(internal control miRNAs: miR-149-3p, miR-2861, miR-4463)

(Shimomura, Matsuzaki et al. Cancer Sci 2016)

↓

Samples were randomly divided into training & validation sets

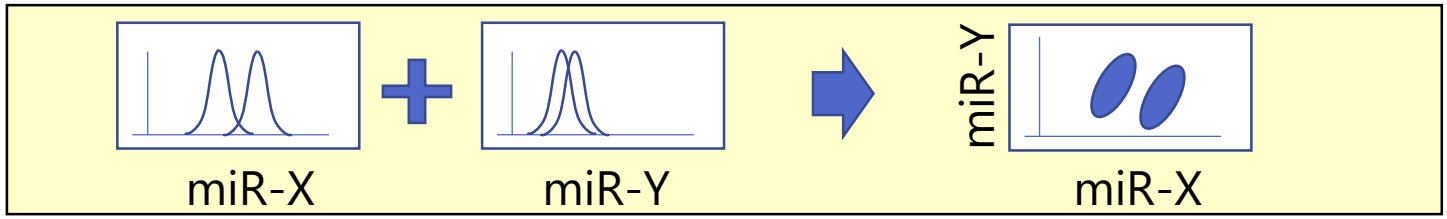
↓

Construction of discriminant models in the training set

↓

Validation

Fisher線形判別＋組合せ最適化



Pivot (1)

- miR-α
- miR-β
- miR-γ
- ・・・
- ・・・
- ・・・
- miR-X

Select best 20

- miR-β
- miR-γ
- miR-δ
- ・・・
- miR-X
- miR-α
- miR-γ
- miR-δ
- ・・・
- miR-X
- miR-α
- miR-β
- miR-δ
- ・・・
- miR-X
- ・・・

残りのmiRNA

クロスバリデーションに基づく診断精度を指標に並べ替え

Pivot (2)

- miR-ζ, β
- miR-ζ, δ
- miR-λ, β
- ・・・
- ・・・
- miR-ε, γ

Select best 20

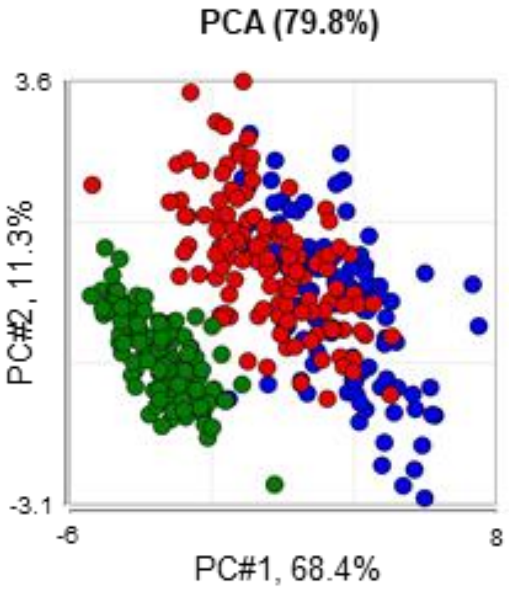
- miR-α
- miR-γ
- miR-δ
- ・・・
- miR-X
- miR-α
- miR-β
- miR-γ
- ・・・
- miR-X
- miR-α
- miR-γ
- miR-δ
- ・・・
- miR-X
- ・・・

残りのmiRNA

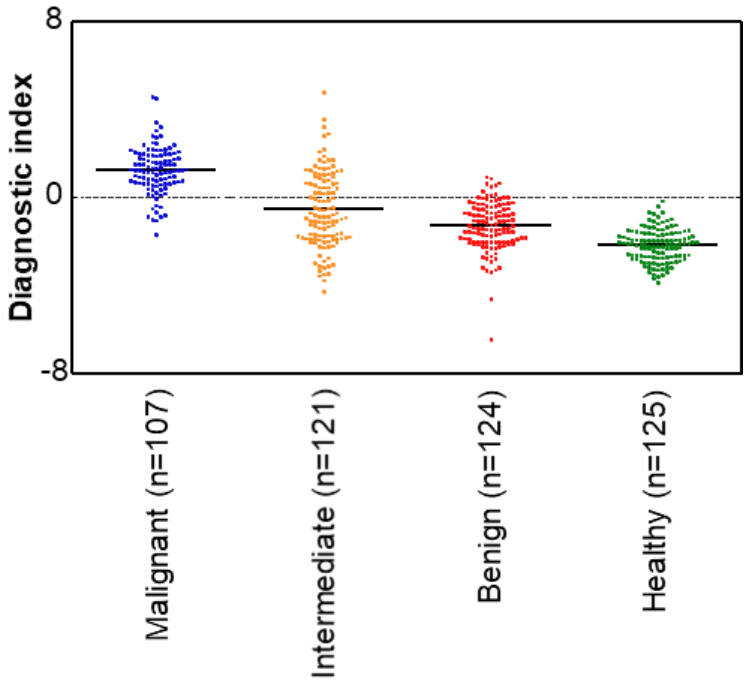
指定された回数まで反復

Detection of sarcoma

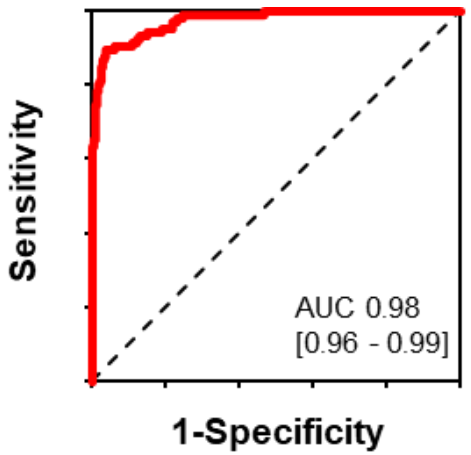
- Malignant (n=117)
- Benign (n=134)
- Healthy (n=125)



[7 miRNAs]



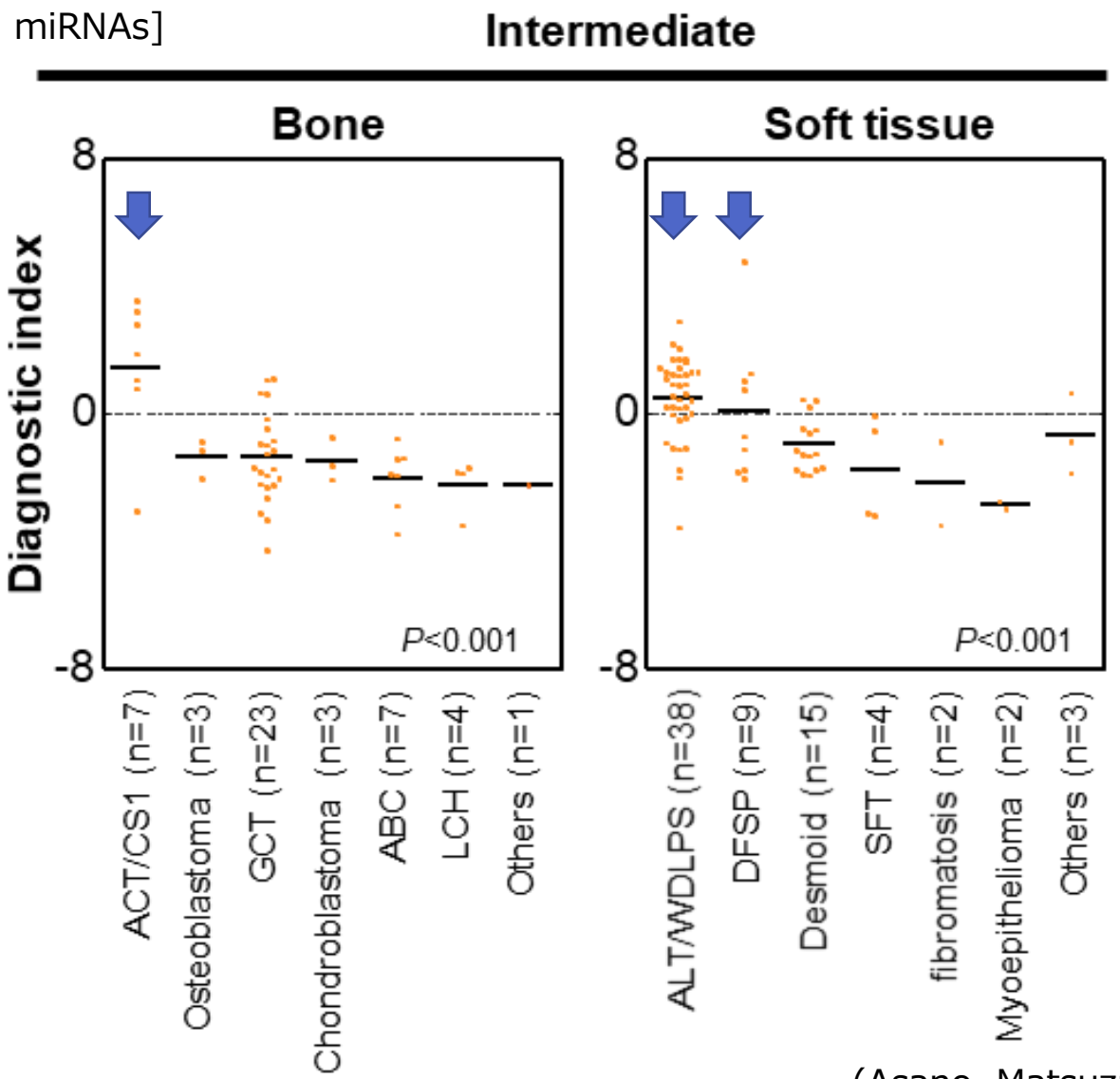
Validation set



Sensitivity, 0.90
Specificity, 0.95

miRNA index and histological subtypes in intermediate tumors

[7 miRNAs]



miRNA index was associated with malignant transformation potential in intermediate tumors.

(Asano, Matsuzaki et al. ***Nat Commun*** [in revision])

Detection of prostate cancer

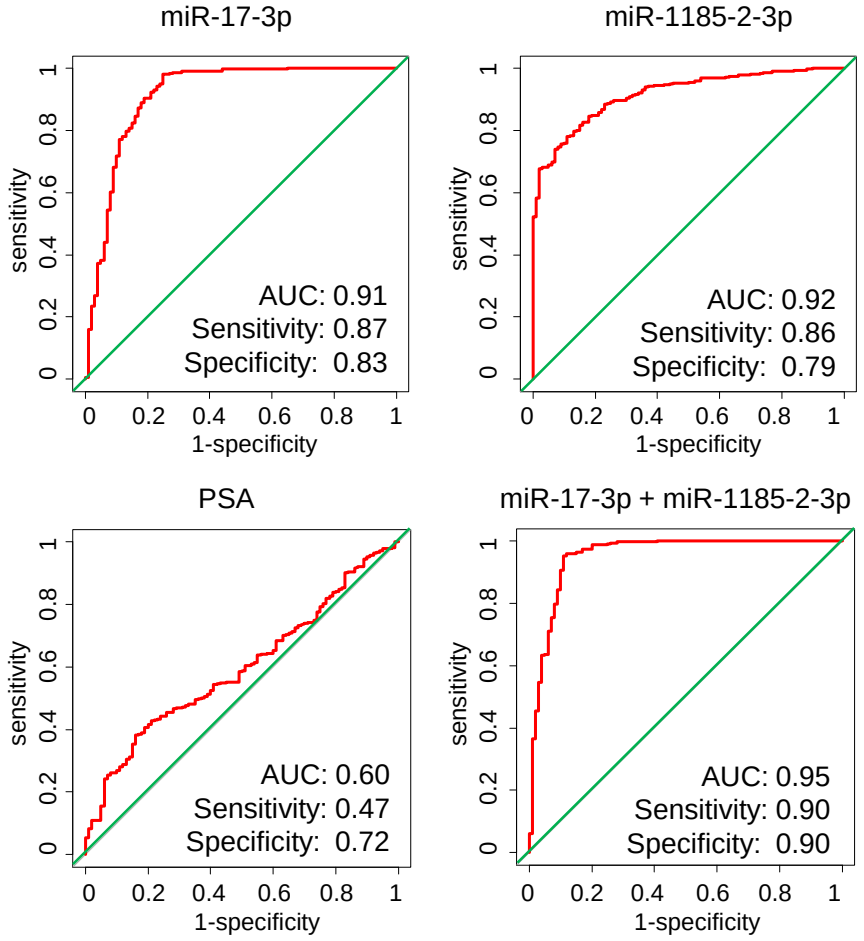
1050 patients with serum RNA samples

809 PCa (positive prostate biopsy)

241 NPBx (negative prostate biopsy)

Discovery set	Training set	Validation set
41 PCa	384 PCa	384 PCa
41 NPBx	100 NPBx	100 NPBx

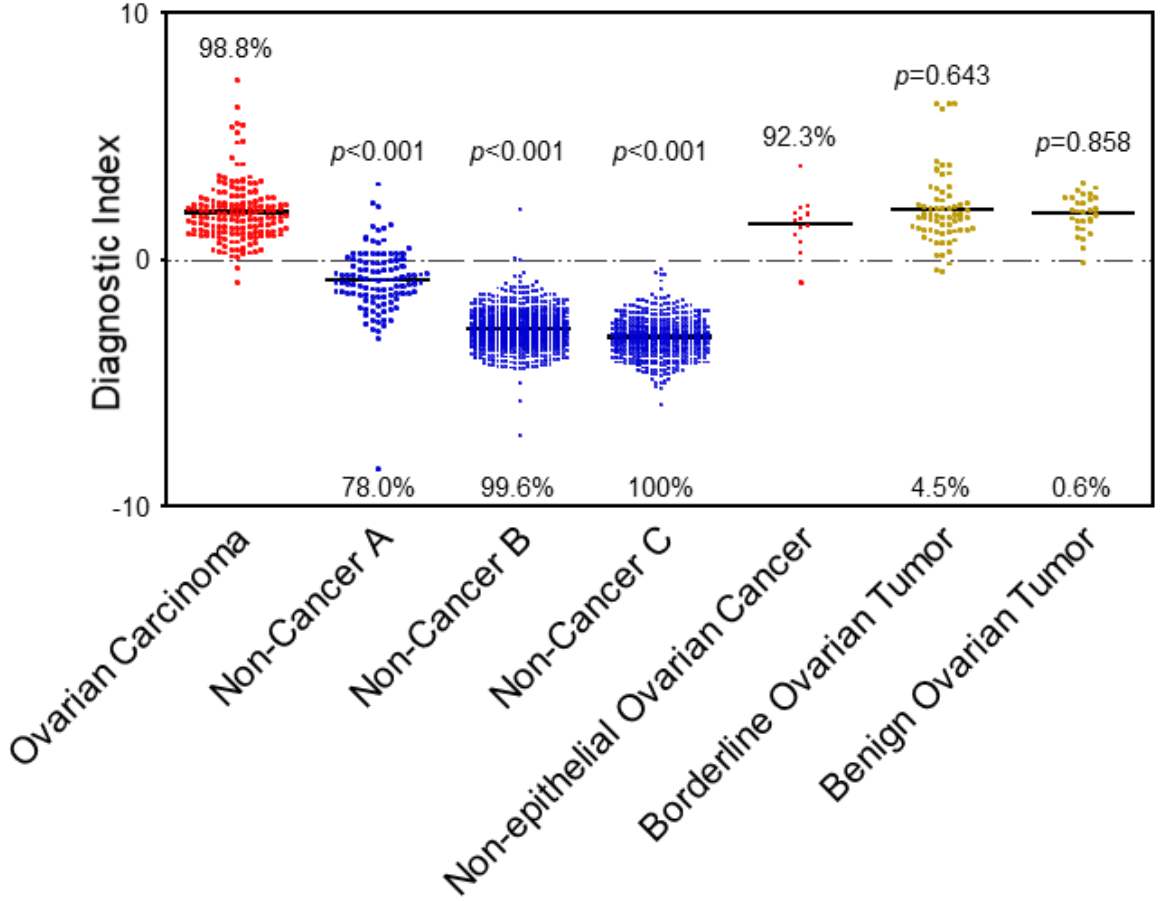
Validation set

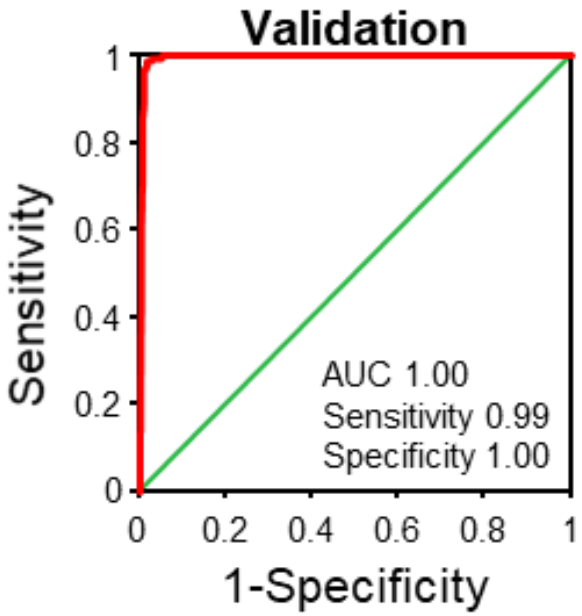


(Urabe, Matsuzaki et al. ***Clin Cancer Res*** [in press])

Detection of ovarian cancer

[10 miRNAs]



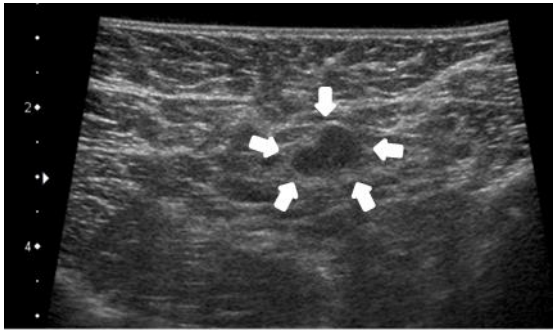


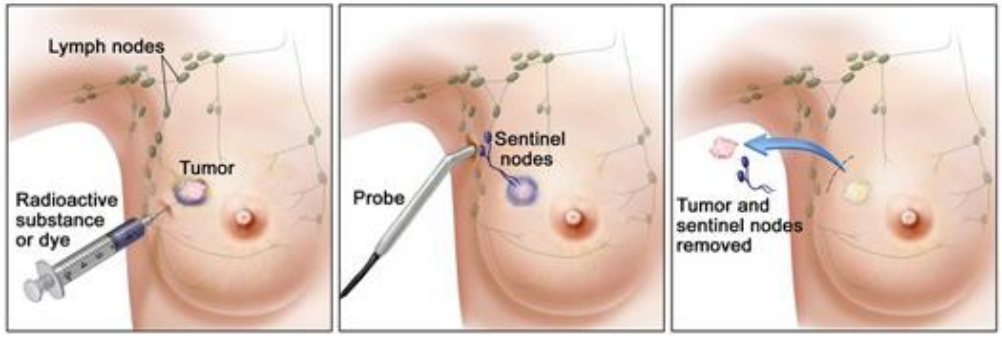
Diagnostic index = (0.996) × miR-4687-3p + (−0.741) × miR-939-5p + (0.718) × miR-5739 + (−0.798) × miR-211-3p + (0.719) × miR-1273g-3p + (1.036) × miR-3663-3p + (0.520) × miR-4726-5p + (−0.583) × miR-4745-5p + (0.786) × miR-1268b + (−0.223) × miR-658 − 25.0

(Yokoi, Matsuzaki et al. ***Nat Commun***, 2018)

Preoperative prediction of lymph node metastasis

- ✓ Sentinel lymph node biopsy (SLNB) has become the gold-standard, less invasive procedure to evaluate the axillary lymph node metastasis[1].
- ✓ SLNs, which are considered as lymph nodes which receives first drainage from tumor, can be detected by radioactive dye.
- ✓ **The morbidity after SLNB is not negligible.**
  - impaired shoulder range of motion, pain[2]
  - Radiation exposure for pregnant female surgeons[3]

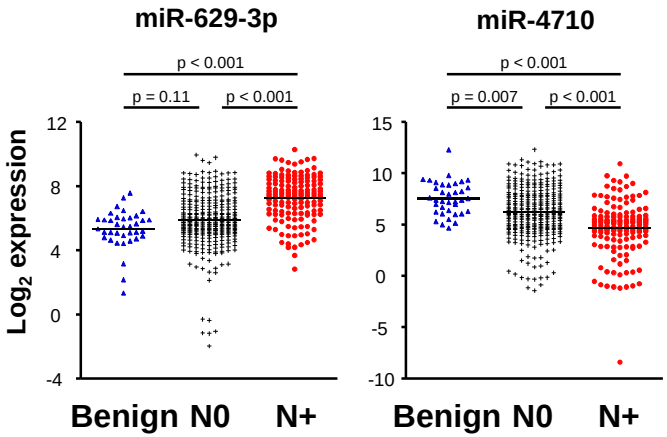


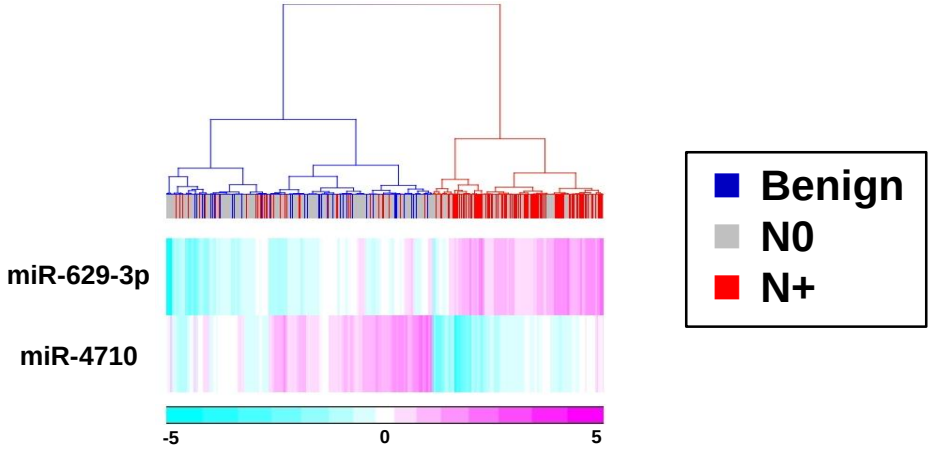


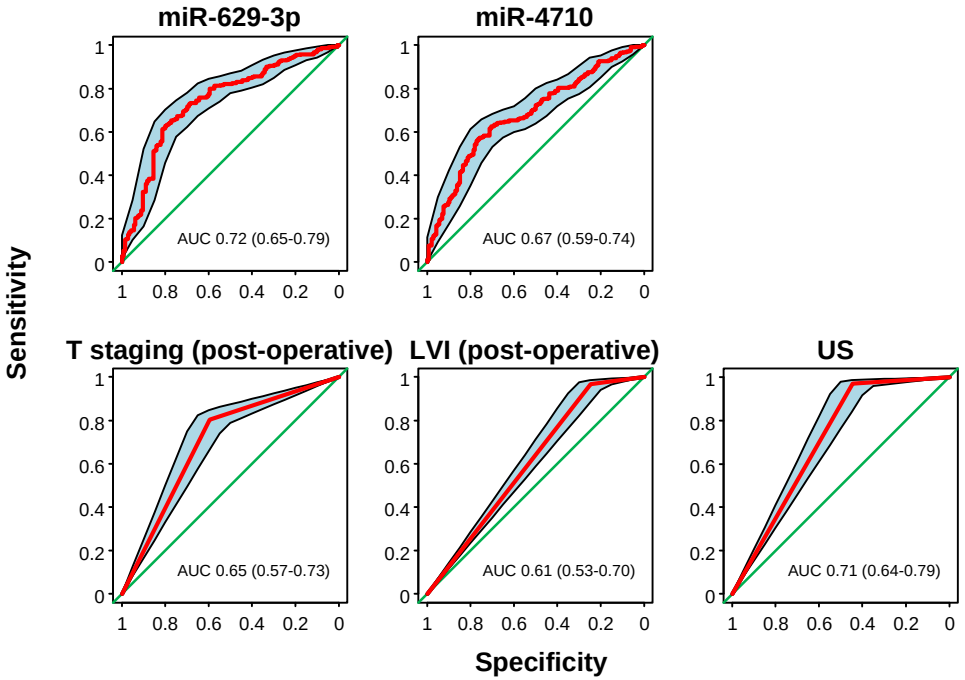
Biomarkers to predict the need of SLNB are required!

1. Krag et al. Lancet Oncol, 2010.
2. Langer et al. Ann Surg 2007.
3. Kimura et al. Breast Cancer 2015.

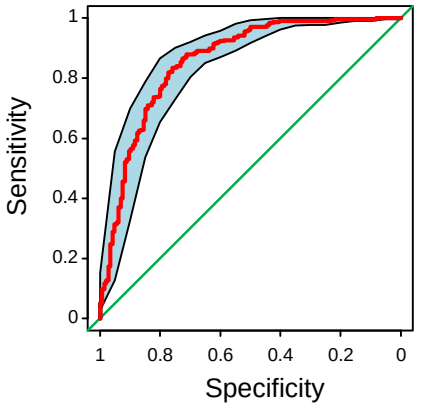
Diagnostic accuracy







Test set

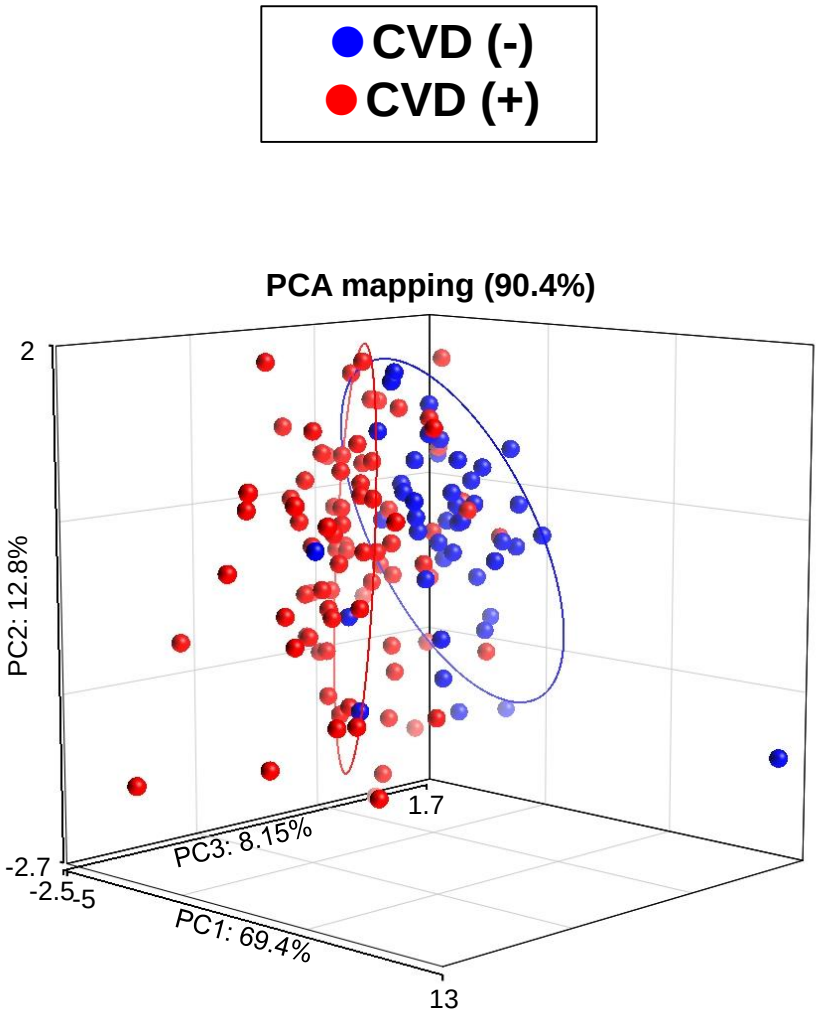


AUC 0.85 (0.80-0.91)
Sensitivity 0.86 (0.81-0.92)
Specificity 0.70 (0.59-0.81)

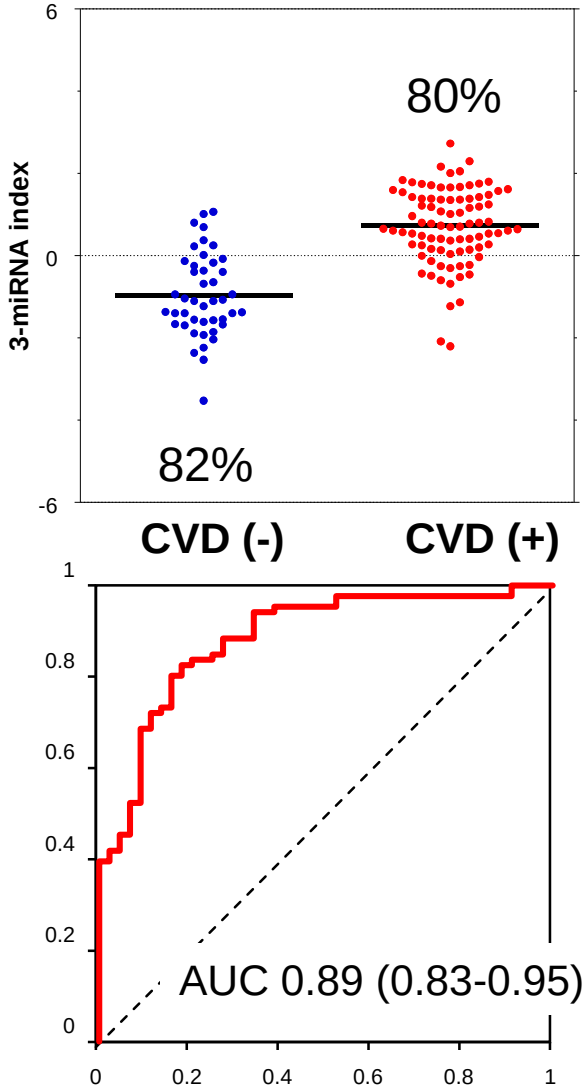
(Shiino, Matsuzaki et al. ***Clin Cancer Res***, 2018)

Risk prediction of stroke

[3 miRNAs]



Validation set

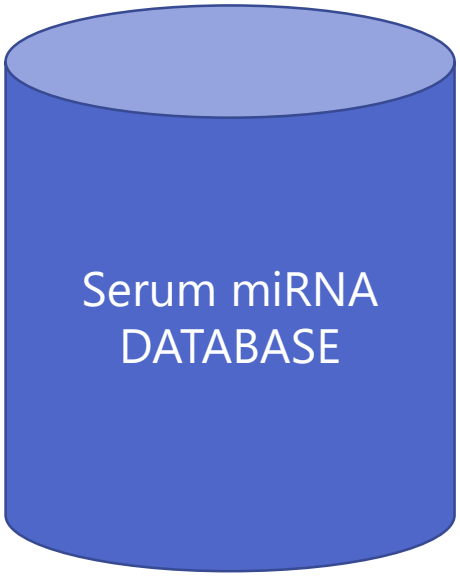


(Sonoda, Matsuzaki et al. ***Stroke*** [in revision])

Summary

- Circulating miRNA profiles…
  - provide us accurate cancer diagnosis in the early stage.
  - predict cancer localization.
  - could be useful to improve therapeutic strategies

NEXT STEP



Validation using fresh samples

Approval as clinical application

血清中マイクロRNAによる疾患横断的
早期診断技術開発研究における前向き検証研究

対　象

- 登録症例数(予定): **3440例**

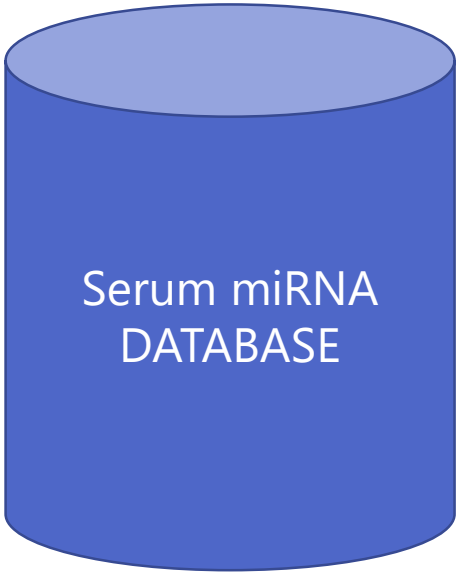
<内訳>

胃がん, 大腸がん, 肺がん, 乳がん, 前立腺がん: **各280例**

食道がん, 膵臓がん, 肝臓がん, 胆道がん, 膀胱がん,
卵巣がん, 神経膠腫/頭蓋内悪性腫瘍, 肉腫など: **各180例**

非悪性腫瘍症例: **男性200例, 女性200例**

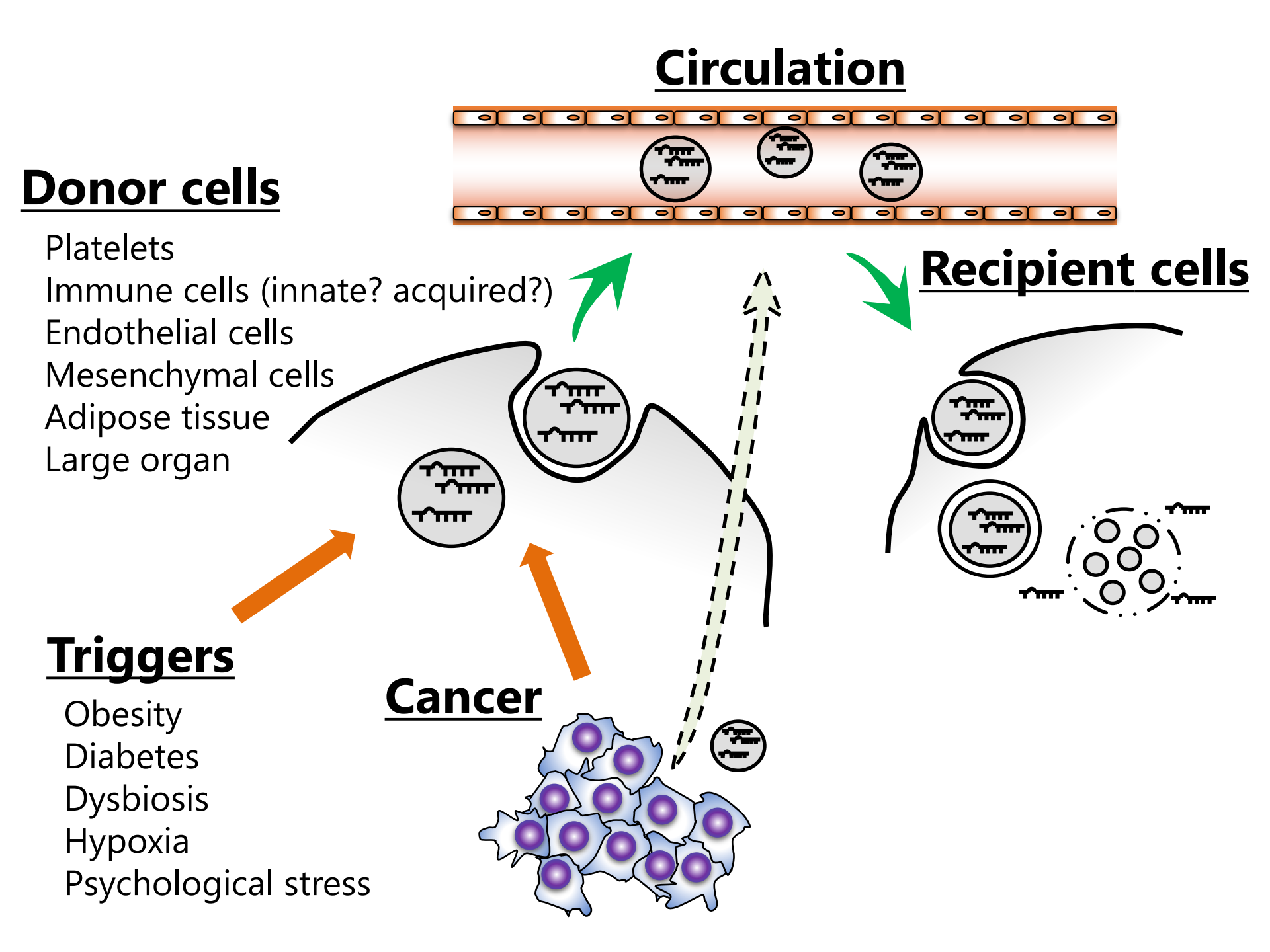
NEXT STEP



Validation using fresh samples → **Approval as clinical application**

Investigation of the "natural history" of circulating miRNAs

- ✓ Understand reasons for false-positive and false-negative
- ✓ Reveal novel mechanisms of disease development/progression
- ✓ Identify potential preventive/therapeutic targets


Circulation
Donor cells
Platelets
Immune cells (innate? acquired?)
Endothelial cells
Mesenchymal cells
Adipose tissue
Large organ
Recipient cells
Triggers
Obesity
Diabetes
Dysbiosis
Hypoxia
Psychological stress
Cancer

Acknowledgement

[National Cancer Center]

Research Institute

Ochiya Lab

Takahiro Ochiya
Takeshi Katsuda
Yusuke Yamamoto
Nobuyoshi Kosaka
Akira Yokoi
Tomomi Fukuda
Takumi Sonoda
Hiroko Tadokoro
Tetsuya Suzuki

Fumitaka Takeshita

Center for Cancer Registries

NCC Biobank

Hiromi Sakamoto

[National Cancer for Geriatrics and Gerontology]

Medical Genome Center
(Biobank)

Shumpei Niida

Hospital

Ken Kato
Naofumi Asano
Makoto Ohno
Kazuki Sudo
Yutaka Saito
Seiichiro Abe
Hiroyuki Takamaru
Hiroyuki Daiko
Hitoshi Katai
Hiroki Ochiai
Yukihide Kanemitsu
Shunsuke Kondo
Takuji Okusaka
Minoru Esaki
Kazuaki Shimada
Kuniko Sunami
Noriko Abe
Michiko Ohori

[Toray Industries, Inc.]

Satoko Takizawa
Makiko Ichikawa
Junpei Kawauchi

[DYNACOM Co., Ltd.]

Hitoshi Fujimiya
Yoshiaki Aoki
Junichiro Miura

[Preferred Networks, Inc.]

Nobuyuki Ota
Kenta Oono

AMED

国立研究開発法人 日本医療研究開発機構
Japan Agency for Medical Research and Development

"Development of Diagnostic Technology for Detection of miRNA in Body Fluids" Project