

(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
2011年10月13日(13.10.2011)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2011/126089 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/113 (2010.01) G01N 33/50 (2006.01)
C12Q 1/68 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/058843
- (22) 国際出願日: 2011年4月7日(07.04.2011)
- (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 2010-089180 2010年4月8日(08.04.2010) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 京都府公立大学法人(KYOTO PREFECTURAL PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION) [JP/JP]; 〒6028566 京都府京都市上京区河原町通広小路上る梶井町4 6 5 番地 Kyoto (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 細井 創 (HOSOI, Hajime) [JP/JP]; 〒6028566 京都府京都市上京区河原町通広小路上る梶井町4 6 5 番地 京都府公立大学法人 京都府立医科大学内 Kyoto (JP). 宮地 充 (MIYACHI, Mitsuru) [JP/JP]; 〒6028566 京都府京都市上京区河原町通広小路上る梶井町4 6 5 番地 京都府公立大学法人 京都府立医科大学内 Kyoto (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(Saegusa & Partners); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル 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, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, 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))



WO 2011/126089 A1

(54) Title: METHOD OF DETECTING RHABDOMYOSARCOMA USING SAMPLE DERIVED FROM BODY FLUID

(54) 発明の名称: 体液由来検体を用いた横紋筋肉腫の検出方法

(57) Abstract: Provided is a method of detecting rhabdomyosarcoma, whereby the expression of at least one type of miRNA selected from a group comprising hsa-miR-1, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b and hsa-miR-206 in a sample derived from body fluid is evaluated.

(57) 要約: 本発明は、体液由来の検体において、hsa-miR-1, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b 及び hsa-miR-206 からなる群から選ばれる少なくとも1種のmiRNAの発現を評価することを特徴とする、横紋筋肉腫の検出方法を提供する。

明 細 書

発明の名称： 体液由来検体を用いた横紋筋肉腫の検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、体液由来検体を用いた横紋筋肉腫の検出方法に関する。

背景技術

[0002] 本発明者らは、血清中の腫瘍由来の遊離DNAを用いた非侵襲的診断技術の開発に取り組んできた（非特許文献1,2）。近年、microRNA（miRNA）というタンパク質に翻訳されない非コードRNAの存在が明らかになり、その発現プロファイルは組織や腫瘍特異的であることが報告されている（非特許文献3,4）。小児がんにおいても細胞株を用いた検討で、発現プロファイルが腫瘍により異なるとする報告がある（非特許文献5）。また、小児がんでも最も多い軟部肉腫である横紋筋肉腫では、筋に特異的に発現するmiRNAの発現が上昇していることが明らかにされている（非特許文献5,6）。一方、血清中に腫瘍由来のmiRNAが存在することも明らかにされ、大腸がん、リンパ腫、前立腺がん、肝がんなどで、miRNAのバイオマーカーとしての有用性が示唆されている（非特許文献7~10）。

先行技術文献

非特許文献

- [0003] 非特許文献1：Gotoh, et al. J Clin Oncol 23:5205-5210, 2005
非特許文献2：Yagyu, et al. Clin Cancer Res 14:7011-7019, 2008
非特許文献3：Calin GA, et al. Nat Rev Cancer;6:857-866, 2006
非特許文献4：Lu J, et al. Nature;435:834-838, 2005
非特許文献5：Wei JS, et al. Clin Cancer Res;15:5560-5568, 2009
非特許文献6：Subramanian S, et al. Oncogene;27:2015-2026, 2008
非特許文献7：Ng EK0, et al. Gut;58:1375-1381, 2009
非特許文献8：Mitchell PS, et al. PNAS;105:10513-10518, 2008
非特許文献9：Lawrie CH, et al. Br J Haematol;141:672-675, 2008

非特許文献10 : Yamamoto Y, et al. Biomarkers;14:529-538, 2009

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] 本発明は、診断の困難な横紋筋肉腫を容易に検出する方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0005] 本発明者らは、小児腫瘍患者の体液由来検体において、筋に特異的に発現するmiRNA群であるhsa-miR-1, 133a, 133b, 206を定量し、横紋筋肉腫の非侵襲的な診断が可能かについて検討を行った。その結果、これらのmiRNAにより横紋筋肉腫が検出できることを見出した。

[0006] 本発明は、以下の横紋筋肉腫の検出方法を提供するものである。

項 1. 体液由来の検体において、hsa-miR-1, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b 及びhsa-miR-206からなる群から選ばれる少なくとも1種のmiRNAの発現を評価することを特徴とする、横紋筋肉腫の検出方法。

項 2. 体液由来の検体において、hsa-miR-1, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b 及びhsa-miR-206からなる群から選ばれる少なくとも1種の発現量が健常者より有意に亢進していることを検出の基準とする項1に記載の横紋筋肉腫の検出方法。

項 3. hsa-miR-133a, hsa-miR-133b及びhsa-miR-206からなる群から選ばれる少なくとも1種のmiRNAの発現を評価することを特徴とする項1に記載の横紋筋肉腫の検出方法。

項 4. 少なくともhsa-miR-206の発現を評価することを特徴とする、項1に記載の横紋筋肉腫の検出方法。

項 5. リアルタイムPCR法により検出する、項1に記載の横紋筋肉腫の検出方法。

項 6. 体液が血液であり、体液由来の検体が血漿又は血清である項1に記載の横紋筋肉腫の検出方法。

発明の効果

[0007] 横紋筋肉腫は診断が難しい腫瘍の1つであるが、本発明によれば、従来無理と思われていた体液由来の検体を用い、横紋筋肉腫を検出できるようになった。

[0008] 横紋筋肉腫は、化学療法、放射線療法の前に腫瘍を完全に切除することが予後の改善に重要であり、術前に暫定診断を行い初回に完全切除を目標とした手術方針を決定できることが重要である。本発明により横紋筋肉腫の診断がより正確かつ迅速にできるようになり、横紋筋肉腫の治療成績の向上が期待できる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]横紋筋肉腫細胞株で、筋特異的microRNAの発現が亢進していることを示す。縦軸は筋特異的miRNAとhsa-miR-16の比である。RMS：横紋筋肉腫、NB：神経芽腫、EWS：ユーイング肉腫、MRT：悪性横紋筋様腫瘍。

[図2]横紋筋肉腫腫瘍検体で、筋特異的microRNAの発現が亢進していることを示す。縦軸は筋特異的miRNAとhsa-miR-16の比である。RMS：横紋筋肉腫、nonRMS：横紋筋肉腫以外の腫瘍。

[図3]hsa-miR-1、hsa-miR-206、hsa-miR-133a、hsa-miR-133bの横紋筋肉腫細胞株の培養上清の発現量を示す。縦軸は筋特異的miRNAとhsa-miR-16の比である。RMS：横紋筋肉腫、NB：神経芽腫、EWS：ユーイング肉腫、MRT：悪性横紋筋様腫瘍。

[図4]健常人、担癌患児、横紋筋肉腫(RMS)患児の血清hsa-miR-1の比較。縦軸はhsa-miR-1/hsa-miR-16比である。RMS：横紋筋肉腫、nonRMS：横紋筋肉腫以外の腫瘍。

[図5]健常人、担癌患児、横紋筋肉腫(RMS)患児の血清hsa-miR-133aの比較。縦軸はhsa-miR-133a/hsa-miR-16比である。RMS：横紋筋肉腫、nonRMS：横紋筋肉腫以外の腫瘍。

[図6]健常人、担癌患児、横紋筋肉腫(RMS)患児の血清hsa-miR-133bの比較。縦軸はhsa-miR-133b/hsa-miR-16比である。RMS：横紋筋肉腫、nonRMS：横

紋筋肉腫以外の腫瘍。

[図7] 健常人、担癌患児、横紋筋肉腫(RMS) 患児の血清hsa-miR-206の比較。縦軸はhsa-miR-206/hsa-miR-16比である。RMS : 横紋筋肉腫、nonRMS : 横紋筋肉腫以外の腫瘍。

[図8] 治療後のRMS患児における筋特異的miRNA/hsa-miR-16比の低下。縦軸は筋特異的miRNA/hsa-miR-16比である。

[図9] ヒト血清中におけるmiRNAの安定性。4°C保存にて血清microRNAの安定性を検証した。Ct値はhsa-miR-16, hsa-miR-133b両者において、保存期間とともに漸増傾向にありday30で3から4上昇した(絶対量として16分の1から8分の1)。一方、hsa-miR-133b/has-miR-16について大きな変化は認めなかった。

[図10] 血清筋特異的miRNAは、横紋筋肉腫の病勢を反映することを示す。

[図11] 横紋筋肉腫患児の血清以外の体液(髄液、胸水)においても筋特異的miRNAが検出されることを示す。

[図12] 体液中の筋特異的miRNAは、横紋筋肉腫の病勢を反映することを示す。

発明を実施するための形態

[0010] 本発明で検出の対象とするhsa-miR-1, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b及びhsa-miR-206の配列を以下に示す。また、発現が高く、組織間での発現にばらつきが少ないためにinternal controlとして使用可能なhsa-miR-16の配列を合わせて表1に示す。

[0011] [表1]

miRNA	RNA 配列	配列番号
<i>hsa-miR-1</i>	UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	配列番号 1
<i>hsa-miR-133a</i>	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUG	配列番号 2
<i>hsa-miR-133b</i>	UUUGGUCCCCUUCAACCAGCUA	配列番号 3
<i>hsa-miR-206</i>	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	配列番号 4
<i>hsa-miR-16</i>	UAGCAGCACGUAAAUUUGGCG	配列番号 5

[0012] hsa-miR-1, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b及びhsa-miR-206は、図3に示すように、横紋筋肉腫細胞株の培養上清に多量に放出されており、腫瘍由来のmiRNAが腫瘍細胞内から遊離して存在する。人体内においても、腫瘍由来の遊

離のmiRNAが体液中に存在することにより、横紋筋肉腫の検出、診断に利用できるものと考えられる。

- [0013] 本明細書において、体液としては、血液、胸水、腹水、髄液、尿などが挙げられる。血液は横紋筋肉腫の発生部位もしくは転移部位によらず有効であるが、発生部位もしくは転移部位が泌尿器である場合には尿が、中枢神経系などの場合には髄液が、腹腔内などの場合には腹水が、胸腔内の場合には胸水が各々有効である。
- [0014] 体液として血液を使用する場合、血液由来サンプル(血漿、血清)を18,000g、10分の遠心処理を行い、その上清を用いて、白血球、赤血球の混入を防止することが必要である。
- [0015] 本発明で使用するmiRNAは、20年前の-20℃保存血清検体からも検出可能であり、血清中で本発明に使用するのに十分な安定性を有している(図9)。例えば、血清を4℃で30日間保存すると絶対量として16分の1から8分の1程度になるが、hsa-miR-133bとhsa-miR-16の比には大きな変化を認めなかった。
- [0016] miRNAの検出、定量は、miRNAを含むサンプルを逆転写してcDNAを得て、これを定量的リアルタイムPCRなどの適当な方法により実施することができる。cDNAは、例えばTaqMan MicroRNA RT kit (Applied Biosystems)、TaqMan MicroRNA assays のMature microRNA特異的RT primerなどを用いて、逆転写反応を行うことにより調製できる。また、定量的リアルタイムPCRは、TaqMan MicroRNA assays のTaqman primer とprobe、TaqMan Universal PCR Master Mixを用いて実施することができる。
- [0017] 横紋筋肉腫の検出に関しては、 $p < 0.05$ で有意に筋特異的miRNAの発現が、横紋筋肉腫群において増加する。
- [0018] 測定対象のmiRNAとしては、hsa-miR-206が感度、特異度ともに最も高く、有用と考えられる。hsa-miR-133a, hsa-miR-133b、hsa-miR-206については、腫瘍と血清のmicroRNA量の相関が認められた。
- [0019] 本発明の横紋筋肉腫の検出に関し、筋特異的miRNA (hsa-miR-1, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b及びhsa-miR-206) とhsa-miR-16の比(筋特異的miRNA/hsa

-miR-16) は、横紋筋肉腫の診断時の体液、特に血清のバイオマーカーとして期待される。

[0020] 本発明の検出方法によれば、横紋筋肉腫(RMS)を他の小児の腫瘍である神経芽腫(NB)、ユーイング肉腫(EWS)、悪性横紋筋様腫瘍(MRT)と区別して検出可能である。従来これらの腫瘍との鑑別は困難であり、本発明は、横紋筋肉腫の特異的な検出に極めて有効な手段を提供する。

[0021] 本発明の筋特異的miRNAは、横紋筋肉腫の治療後に発現量が低下するので、治療の有効性の指標にもなる(図8, 10, 11)。

[0022] 以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例により限定されるものではない。

実施例

[0023] 実施例1

1. 方法

細胞株、腫瘍検体、血清

京都府立医科大学小児科で保有している16細胞株(横紋筋肉腫7、神経芽腫4、ユーイング肉腫3、悪性横紋筋様腫瘍2)、21腫瘍検体(横紋筋肉腫7、未分化肉腫4、ウィルムス腫瘍2、神経芽腫2、ユーイング肉腫1、悪性横紋筋様腫瘍1、副腎がん1、網膜芽腫1、胞巣状軟部肉腫1、骨肉腫1)、48血清検体(横紋筋肉腫8、神経芽腫3、ウィルムス腫瘍2、ユーイング肉腫2、肝芽腫2、網膜芽腫2、骨肉腫2、未分化肉腫2、悪性横紋筋様腫瘍1、胞巣型軟部肉腫1、副腎がん1、臍芽腫1、奇形腫1、急性リンパ芽球性白血病1、ランゲルハンス細胞組織球症1、神経膠腫1、健常人ボランティア17)、15体液検体(横紋筋肉腫2(髄液1、胸水1)、神経芽腫3(髄液1、胸水1、腹水1)、髄芽腫3(髄液3)、上衣腫1(髄液1)、網膜芽腫1(髄液1)、悪性横紋筋様腫瘍1(髄液1)、ウィルムス腫瘍1(髄液1)、胚細胞腫瘍1(腹水1)、乳び胸1(胸水1)、自己免疫疾患1(髄液1))を用いて検討を行った。

[0024] RNAの抽出

miRNAを含むtotal RNAはmirVana PARIS kit (Ambion) を用いて抽出した。

細胞株培養液の上清、血清については、細胞成分を除去するため、15,000 rpm、10分間の遠心処理をさらに加え、その上清を用いた。

[0025] 逆転写反応

Taqman MicroRNA RT kit (Applied Biosystems) , Taqman MicroRNA assays (Applied Biosystems) のmature miRNA特異的逆転写反应用プライマーを用いて逆転写反応を行った。

[0026] 定量的リアルタイムPCR

逆転写したcDNA溶液、Taman MicroRNA assaysのプライマーとプローブを用いて、定量的リアルタイムPCRを行った。体液以外の検体では、組織間で発現のばらつきが少なく、高発現しているhsa-miR-16を内在コントロールとし、筋特異的miRNAの発現をnormalizeして、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて定量した。体液検体では、hsa-miR-16の発現が一定しなかったため、コピー数が既知である合成miRNAを用いて検量線を作成し、絶対定量を用いて定量した。血清1 μ l当たりのhsa-miR-206コピー数を算出し比較した。筋特異的miRNA (hsa-miR-1, 133a, 133b, 206) 、およびhsa-miR-16の配列を表1に示す。

[0027] 統計解析

血清におけるmiRNAの発現は、Mann-WhitneyのU検定を用いて比較した。腫瘍と血清のmiRNAの発現の相関はSpearmanの順位相関係数を用いて検討した。いずれの検定も両側検定で行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

[0028] 統計解析

血清におけるmiRNAの発現は、Mann-WhitneyのU検定を用いて比較した。腫瘍と血清のmiRNAの発現の相関はSpearmanの順位相関係数を用いて検討した。いずれの検定も両側検定で行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。

[0029] 2. 結果

細胞株における筋特異的miRNAの発現

細胞株における検討では、横紋筋肉腫細胞株 (n=7) では、神経芽腫 (n=4) 、ユーイング肉腫 (n=3) 、悪性横紋筋様腫瘍 (n=2) 細胞株に比べて筋特異的miRNAの発現が増加していた (図1) 。

[0030] 臨床腫瘍検体における筋特異的miRNAの発現

臨床腫瘍検体における検討では、横紋筋肉腫腫瘍検体（n=7）で他の小児がん腫瘍検体（n=14）に比べて筋特異的miRNAの発現が増加していた（図2）。

[0031] 細胞株培養液上清における筋特異的miRNAの発現

細胞株培養液上清における検討では、横紋筋肉腫細胞株の培養液上清（n=7）で、神経芽腫（n=4）、ユーイング肉腫（n=3）、悪性横紋筋様腫瘍（n=2）細胞株の培養液上清に比べて筋特異的miRNAの発現が増加していた（図3）。

[0032] 血清における筋特異的miRNAの発現

血清における検討では、横紋筋肉腫の患児血清（n=8）において、他の小児がん患児血清（n=23）、健常人ボランティア血清（n=17）に比べて、筋特異的miRNAの発現が統計学的に有意差をもって増加していた（図4-7）。ROC曲線を用いて、cut off値を設定し感度、特異度を算出したところ、hsa-miR-206が最も高い感度、特異度を示し、感度100%、特異度91.3%であった（図7）。また、腫瘍と血清の両方の検体が得られたものについて、miRNAの発現の相関について検討したところ、hsa-miR-1では $p=0.0793$ と統計学的に有意ではないものの相関する傾向がみられ、hsa-miR-133a, 133b, 206では、有意な相関を認められた（表2）。また、治療前後のペア血清が得られた3症例について、治療による筋特異的miRNAの発現の変化についても検討を行っており、治療後には、いずれもcut off値を下回っており、発現は健常人ボランティアと同程度にまで低下した（図8）。血清中の筋特異的miRNAは、横紋筋肉腫の病勢を反映して増減し、治療奏功時には低下し、再発時や増悪時には上昇した（図10）。

[0033] [表2]

<i>hsa-miRNA</i>	<i>Rs</i>	<i>P</i> 値
<i>1</i>	0.48417	0.0793
<i>133a</i>	0.544	0.044
<i>133b</i>	0.557	0.038
<i>206</i>	0.780	0.001

[0034] 体液における筋特異的miRNAの発現

血清以外の体液である髄液、胸水においても、横紋筋肉腫患者（n=2）では、筋特異的miRNAの発現が、非横紋筋肉腫患者（n=13）と比較して高値であった（図11）。癌性髄膜炎を発症した横紋筋肉腫患者の髄液においても、その病勢を反映して増減し、治療奏功時には低下し、再発時や増悪時には上昇した（図12）。

[0035] 3. 考察

横紋筋肉腫の細胞株、臨床腫瘍検体において、いずれも筋特異的miRNAの発現は増加しており、横紋筋肉腫が未分化な筋細胞に由来する腫瘍であることと矛盾しない結果であった。また、細胞成分を除去した細胞株培養液上清からも筋特異的miRNAは検出可能であり、横紋筋肉腫において、発現が最も増加していた。これは、細胞外にも筋特異的miRNAが遊離していることを示唆しており、臨床腫瘍検体の結果と合わせると、横紋筋肉腫患児血清中にも筋特異的miRNAが多量に存在していると考えられた。

[0036] 血清での検討では、いずれの筋特異的miRNAの発現も横紋筋肉腫患児血清において有意に増加しており、横紋筋肉腫の術前診断に有用であると考えられた。なかでも、hsa-miR-206は感度100%、特異度91.3%とバイオマーカーとして最も有用であると考えられた。さらに、臨床腫瘍検体と血清のmiRNAの発現量は相関を認め、また、治療後には、横紋筋肉腫患児血清において筋特異的miRNAの発現は健常人ボランティアと同レベルまで低下しており、これらの結果は血清で検出されるmiRNAは腫瘍由来であることを示唆している。血清以外の体液においても横紋筋肉腫患者において、筋特異的miRNAの発現は高く、病勢に応じて発現の変化を認めた。

[0037] 横紋筋肉腫は、小児で最も多い軟部肉腫であるにもかかわらず、現在、血液検査で測定できる腫瘍マーカーは存在せず、その術前診断は困難である。一方、本腫瘍では初回手術後の残存腫瘍の存在は予後不良因子であるため、初回手術前に横紋筋肉腫の暫定診断がなされていれば、全摘を目標とした手術を計画することができる。このため、横紋筋肉腫の術前診断につながる非侵襲的なバイオマーカーの存在は重要である。今回検討した筋特異的miRNAは

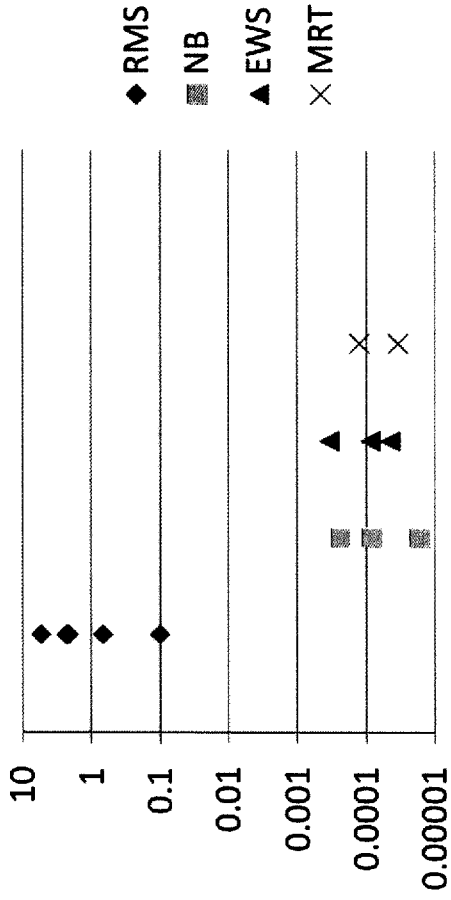
、高い感度、特異度をもって、横紋筋肉腫の術前診断を可能にし、予後の改善に寄与しうる新規バイオマーカーであると考えられる。

請求の範囲

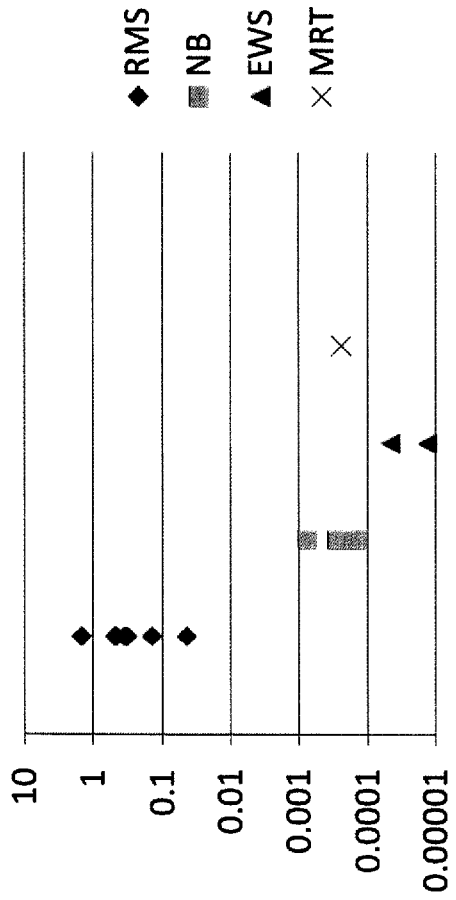
- [請求項1] 体液由来の検体において、hsa-miR-1, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b 及びhsa-miR-206からなる群から選ばれる少なくとも1種のmiRNAの発現を評価することを特徴とする、横紋筋肉腫の検出方法。
- [請求項2] 体液由来の検体において、hsa-miR-1, hsa-miR-133a, hsa-miR-133b 及びhsa-miR-206からなる群から選ばれる少なくとも1種の発現量が健常者より有意に亢進していることを検出の基準とする請求項1に記載の横紋筋肉腫の検出方法。
- [請求項3] hsa-miR-133a, hsa-miR-133b及びhsa-miR-206からなる群から選ばれる少なくとも1種のmiRNAの発現を評価することを特徴とする請求項1に記載の横紋筋肉腫の検出方法。
- [請求項4] 少なくともhsa-miR-206の発現を評価することを特徴とする、請求項1に記載の横紋筋肉腫の検出方法。
- [請求項5] リアルタイムPCR法により検出する、請求項1に記載の横紋筋肉腫の検出方法。
- [請求項6] 体液が血液であり、体液由来の検体が血漿又は血清である請求項1に記載の横紋筋肉腫の検出方法。

[1]

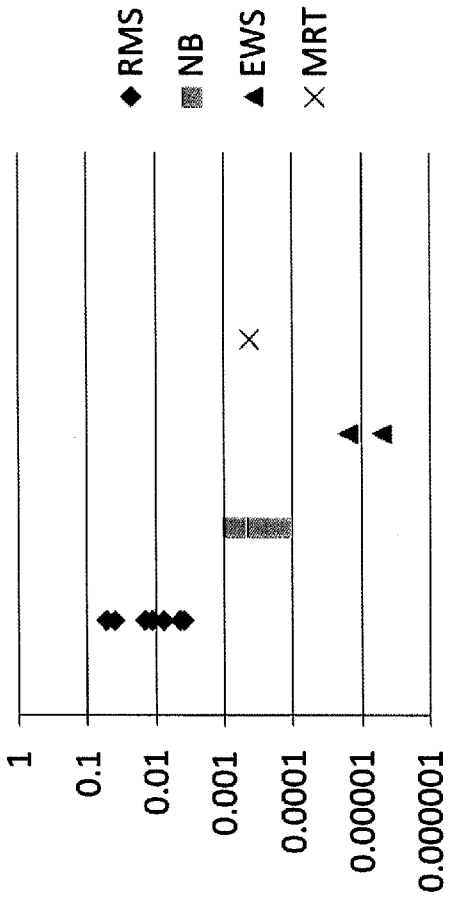
hsa-miR-206/hsa-miR-16



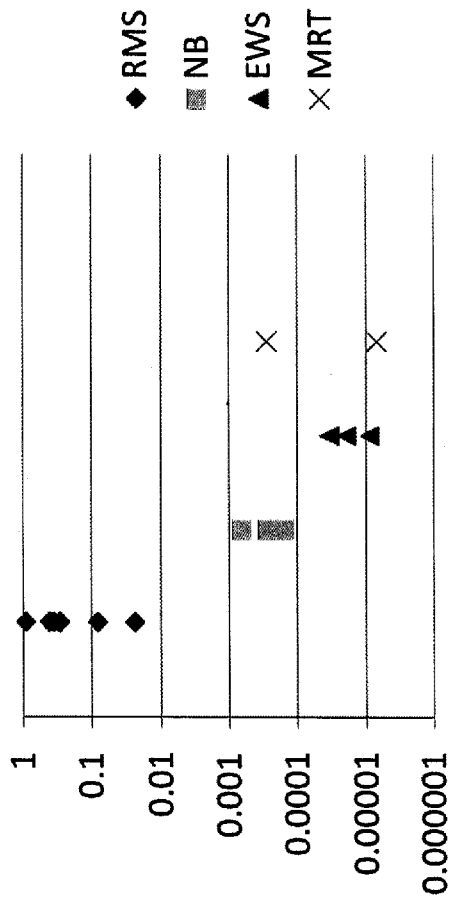
hsa-miR-133b/hsa-miR-16



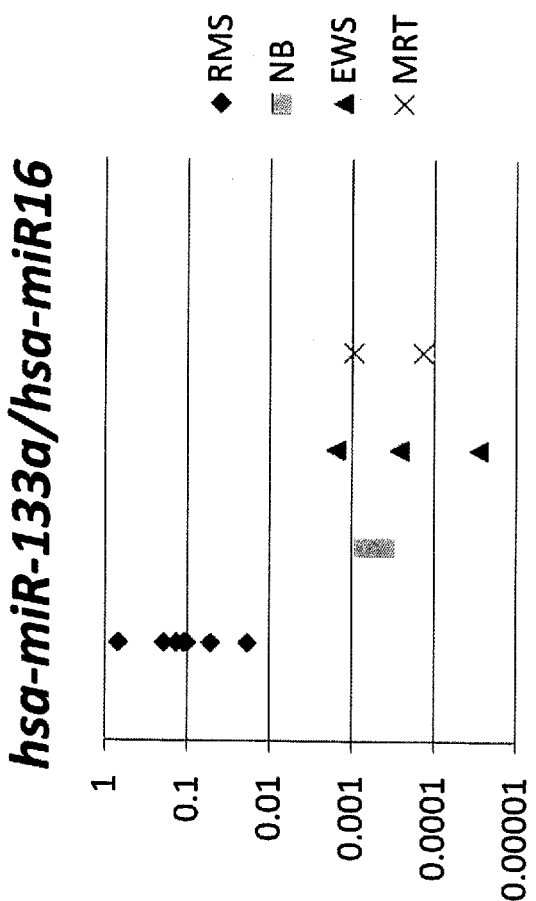
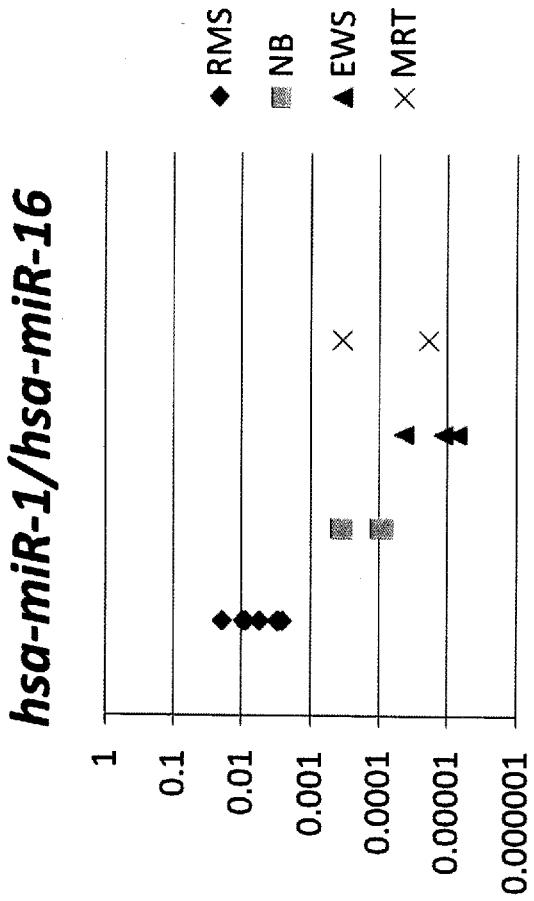
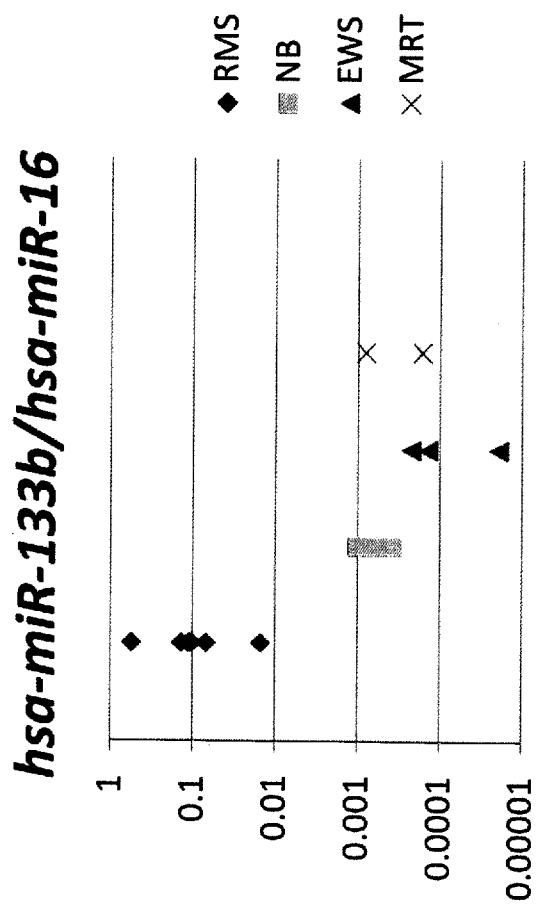
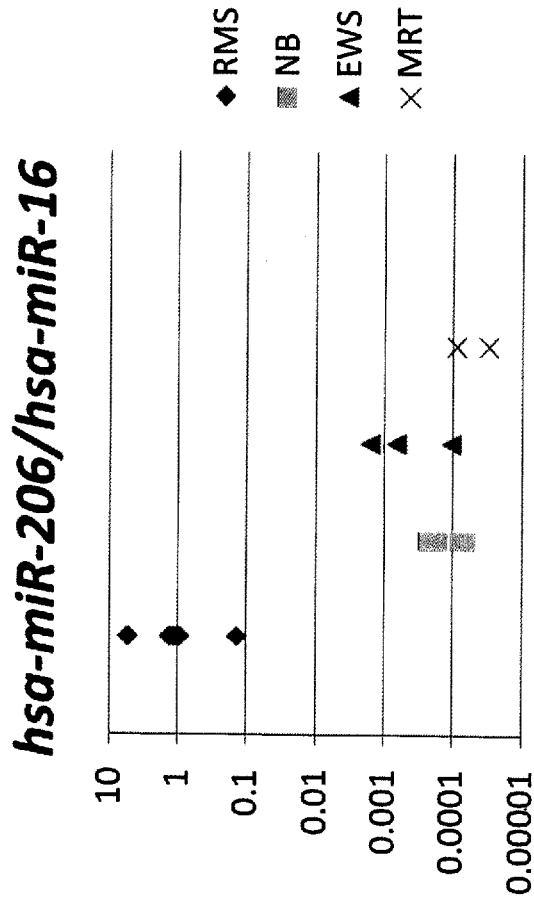
hsa-miR-1/hsa-miR-16



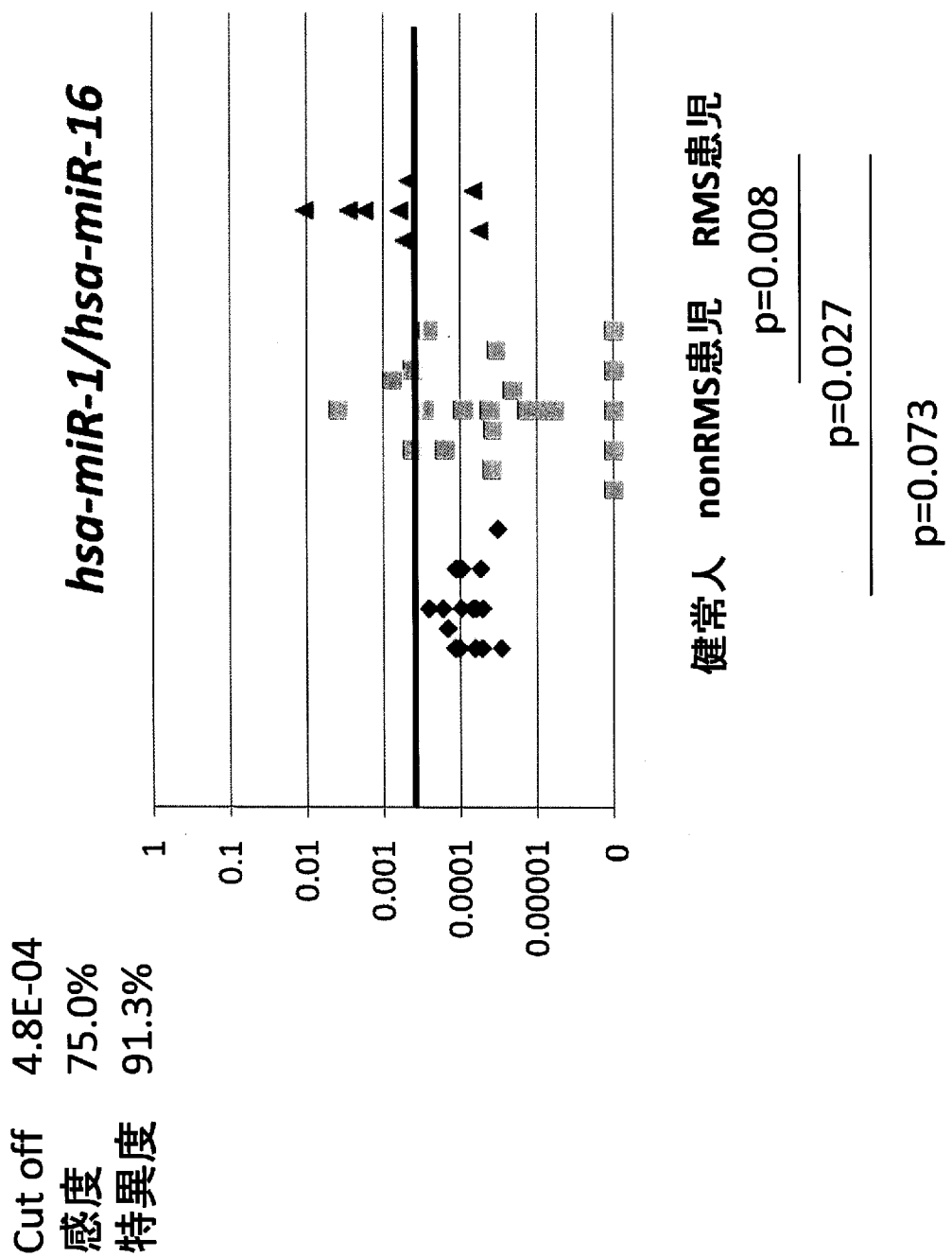
hsa-miR-133a/hsa-miR-16



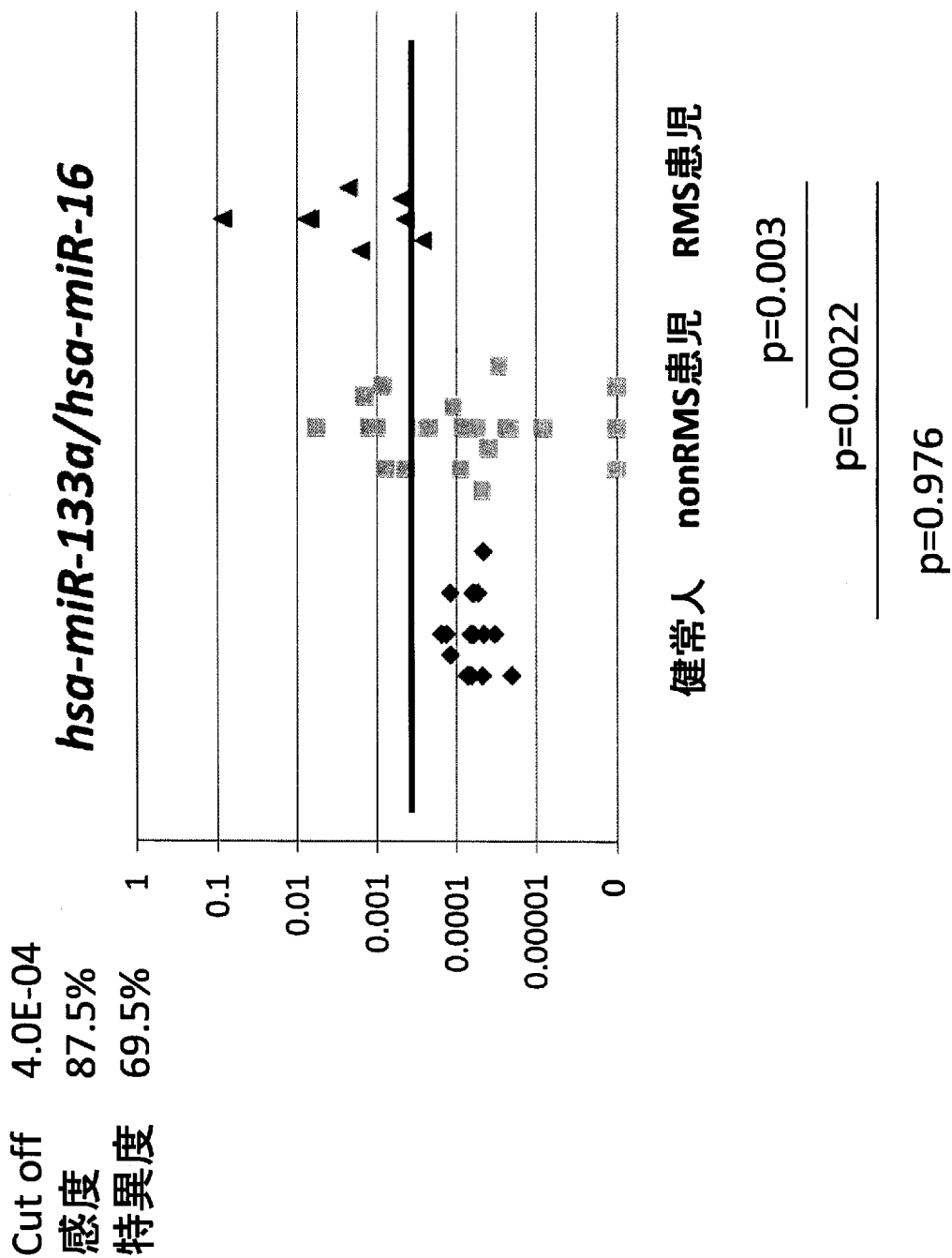
[3]



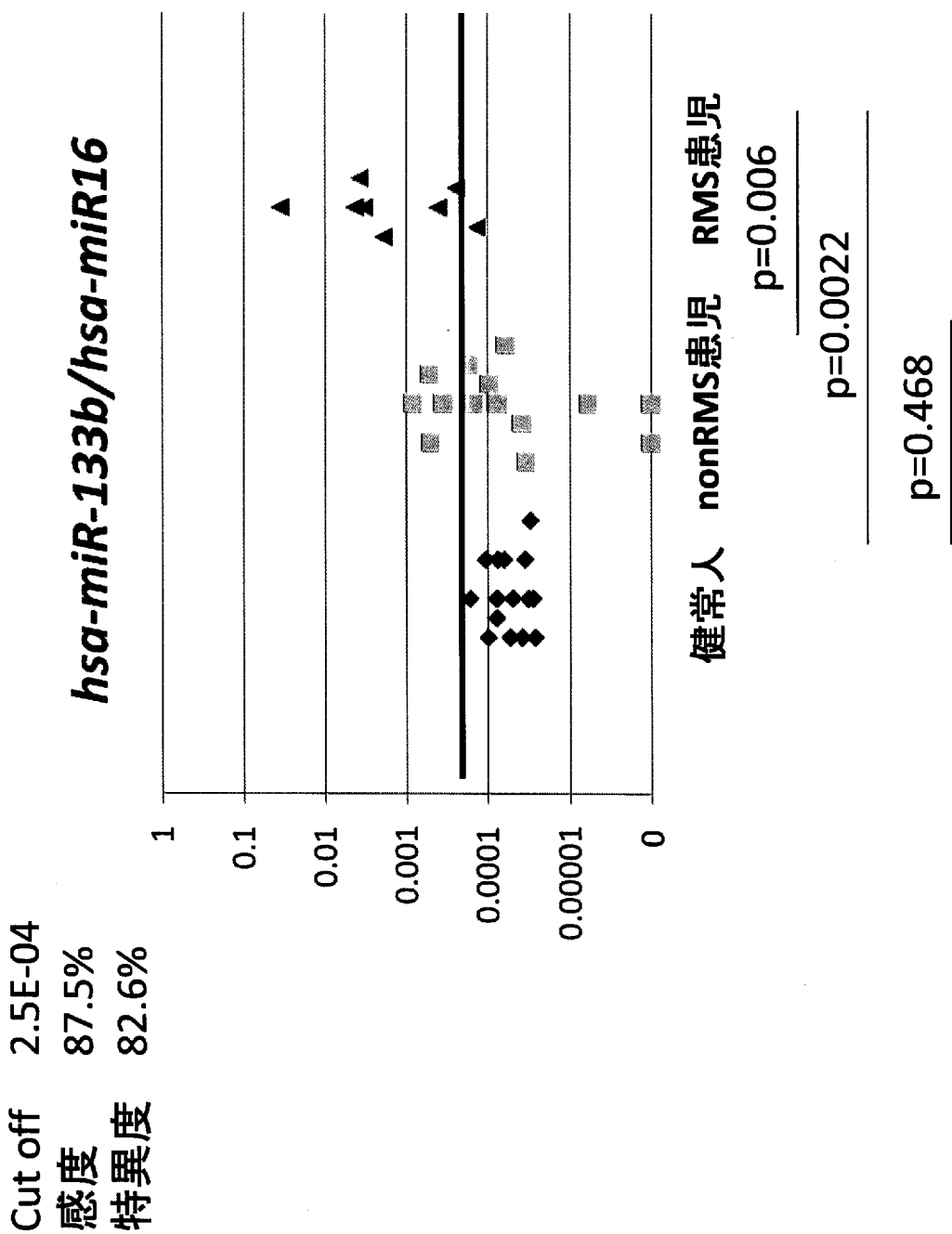
[図4]



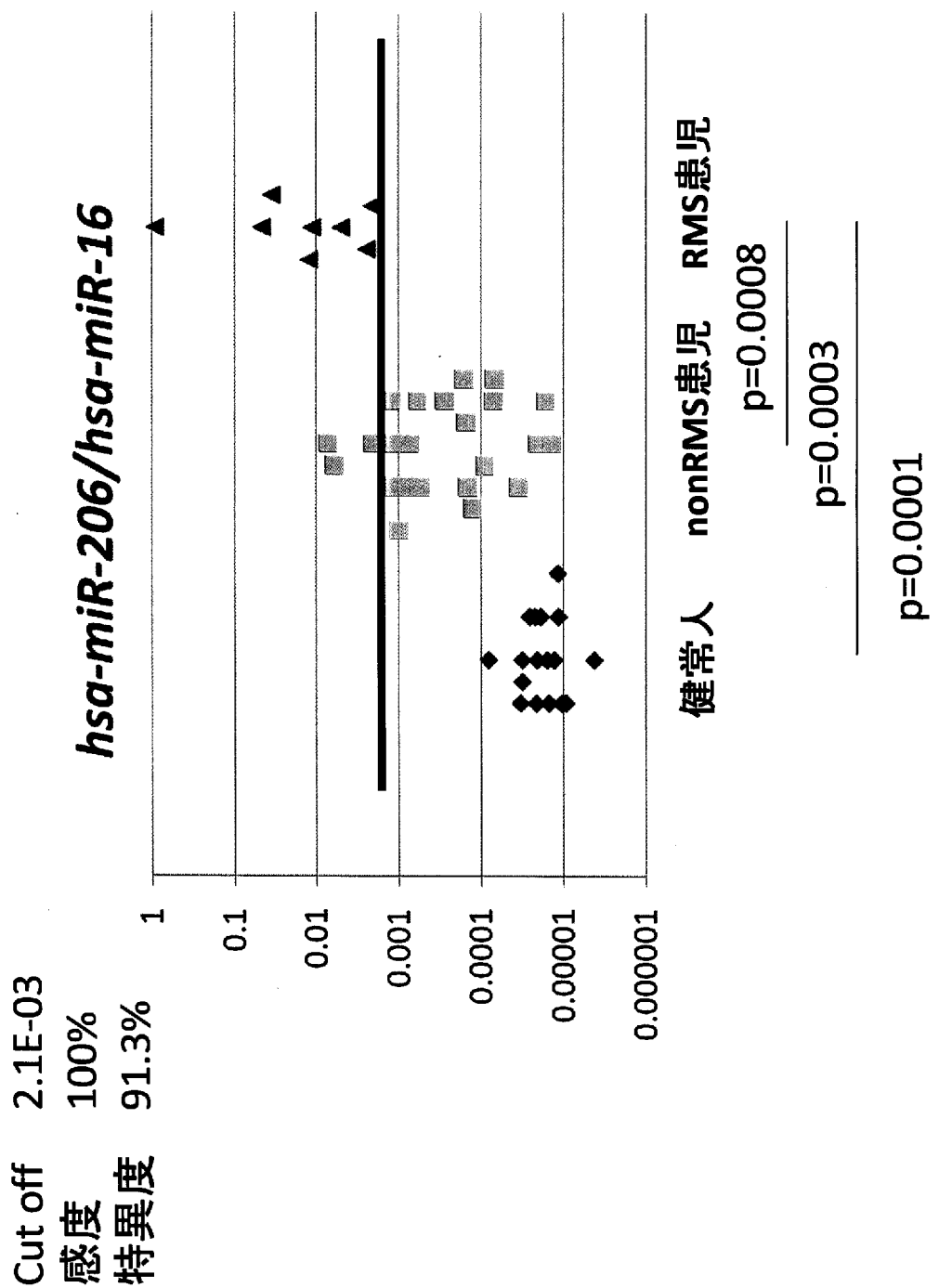
[図5]



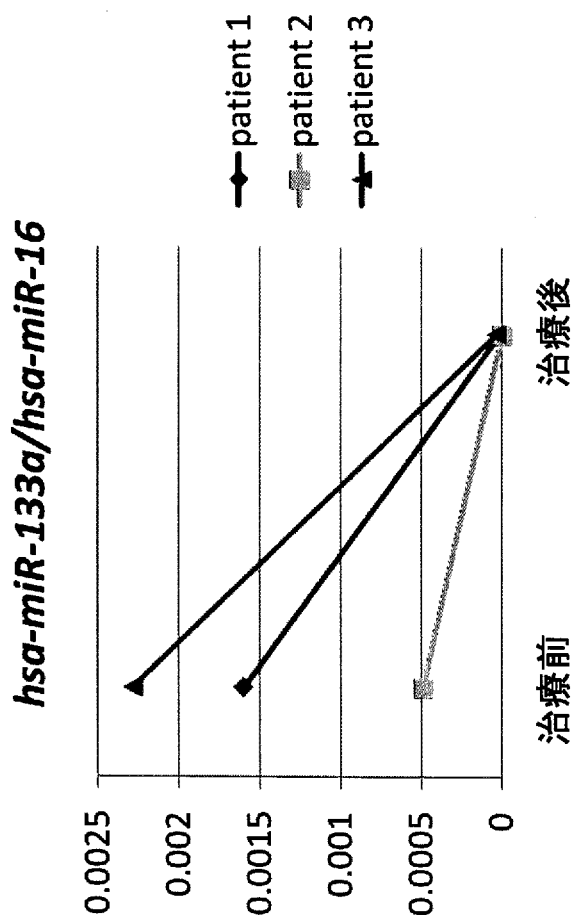
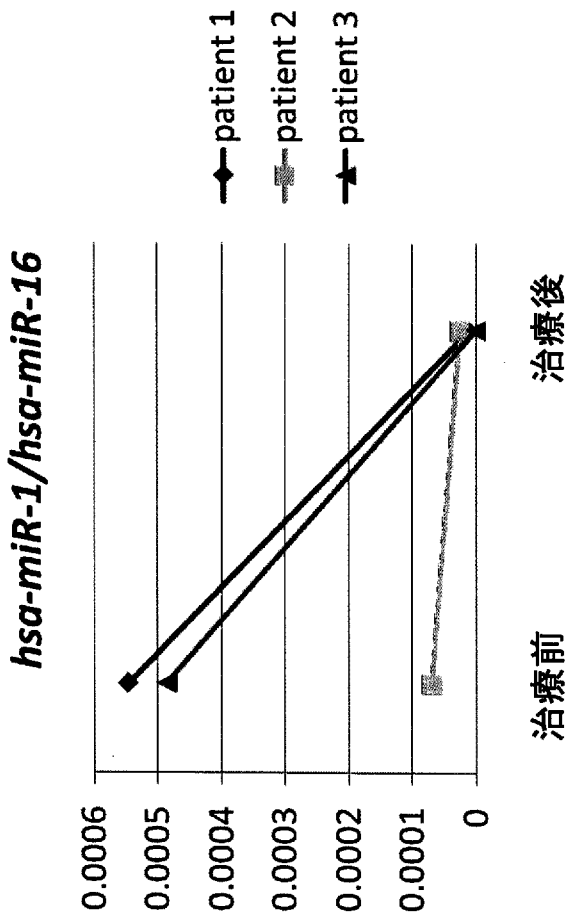
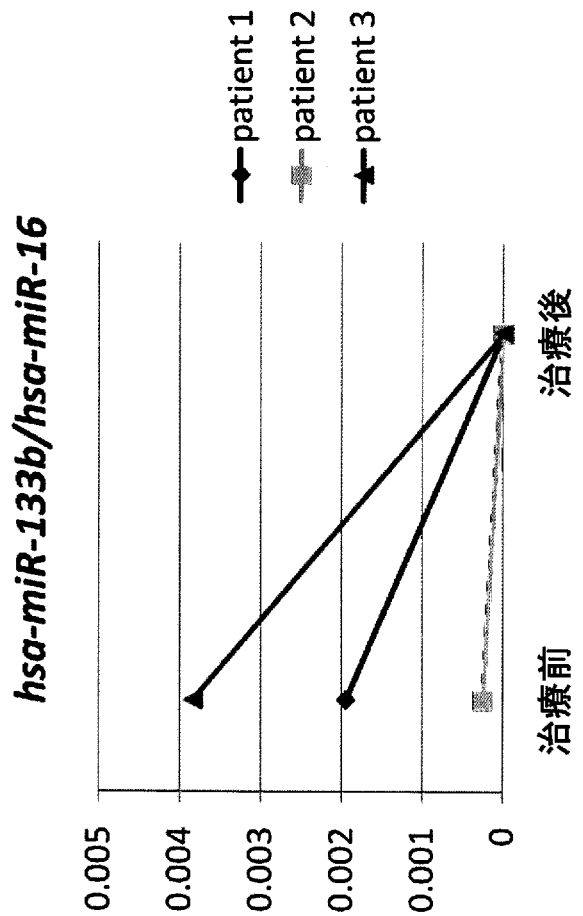
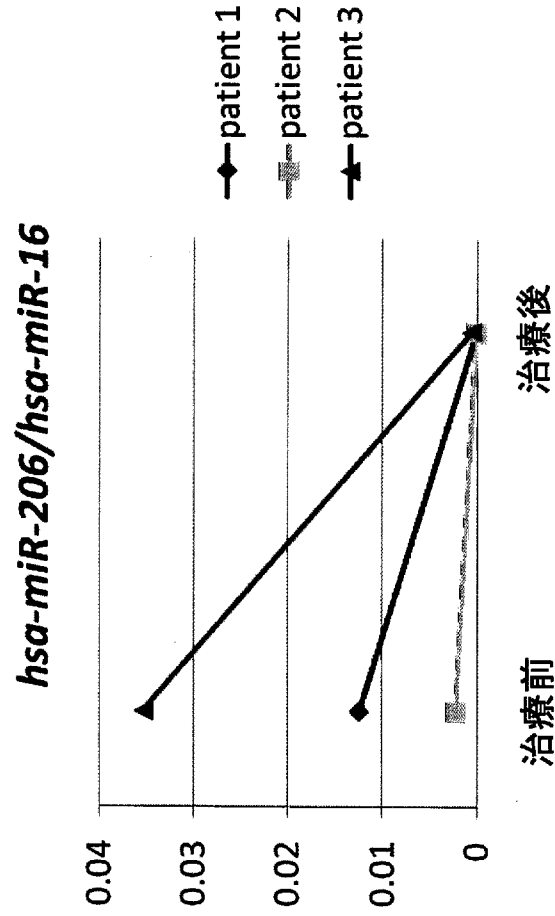
[図6]



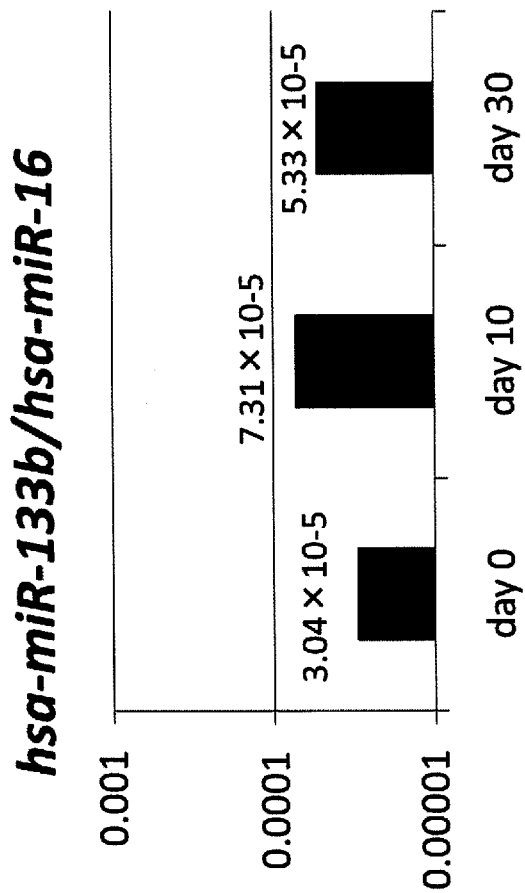
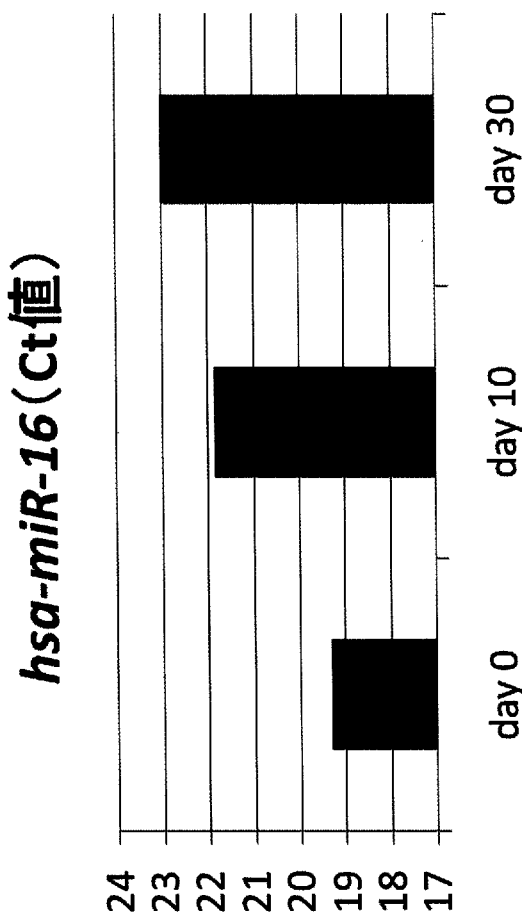
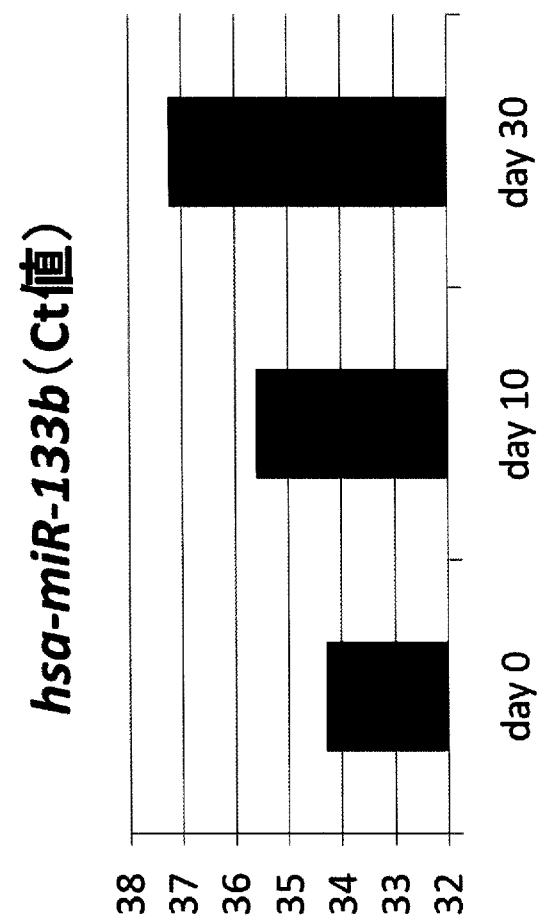
[図7]



[圖8]

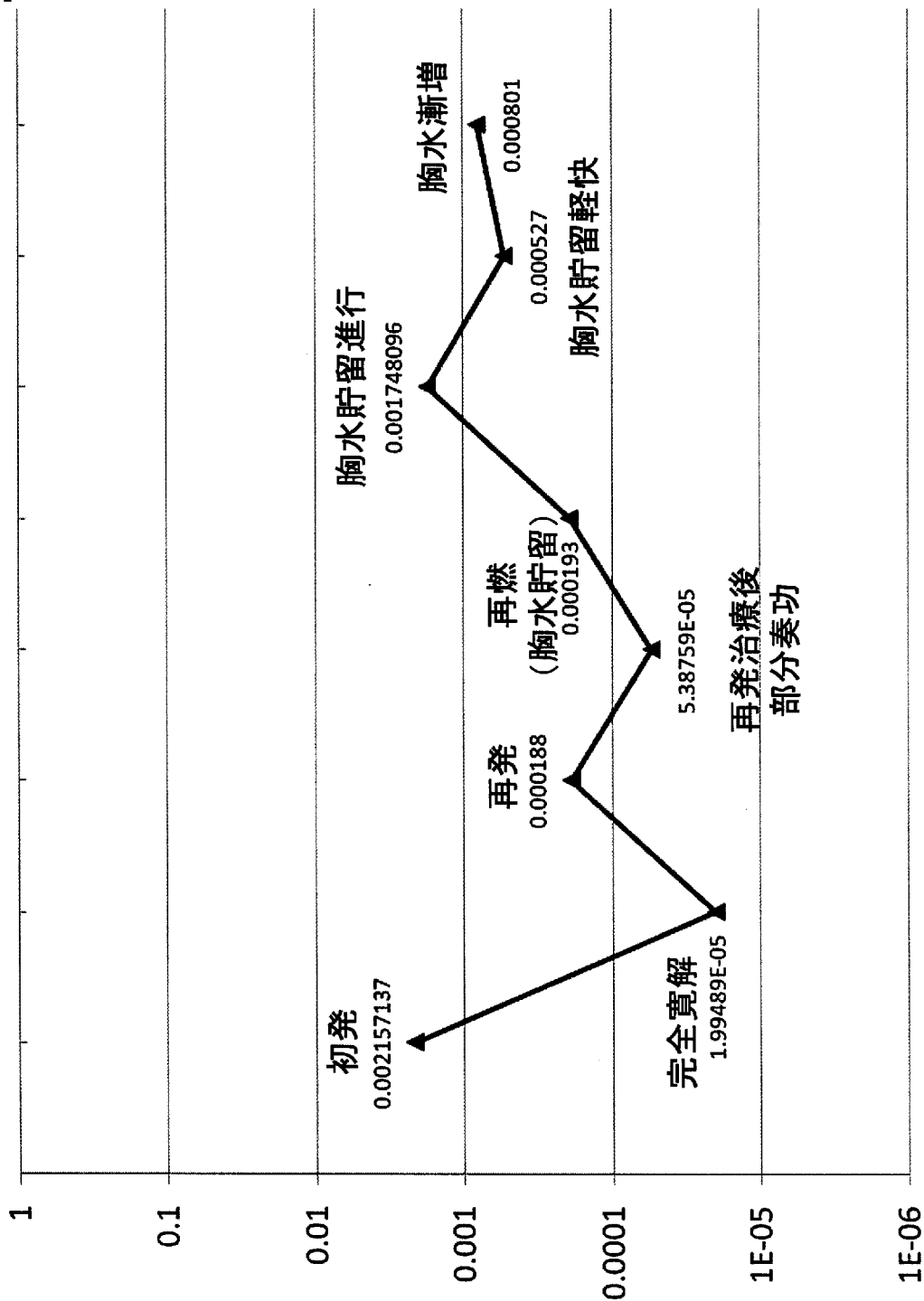


[図9]



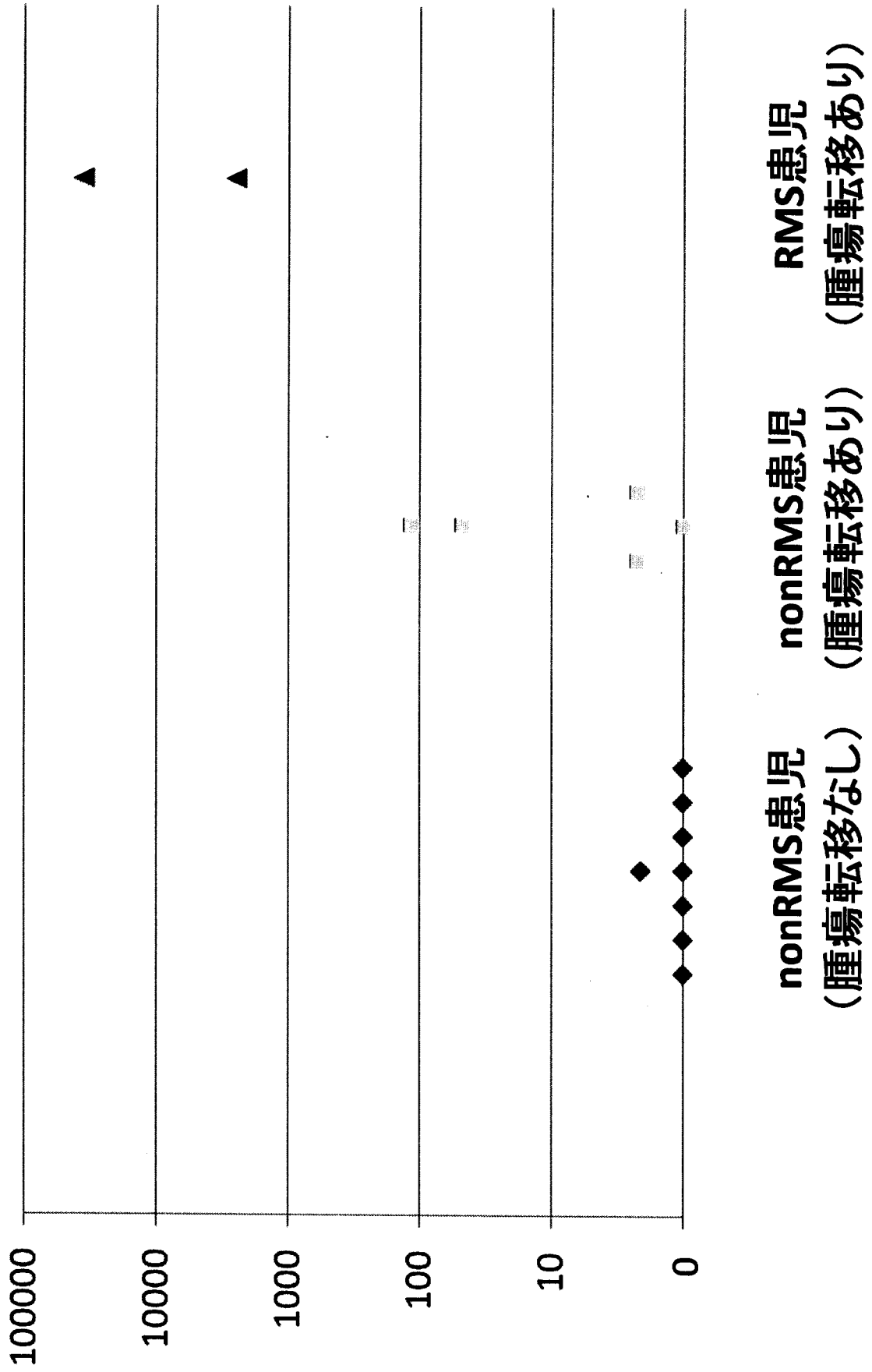
[図10]

hsa-miR-206/hsa-miR-16



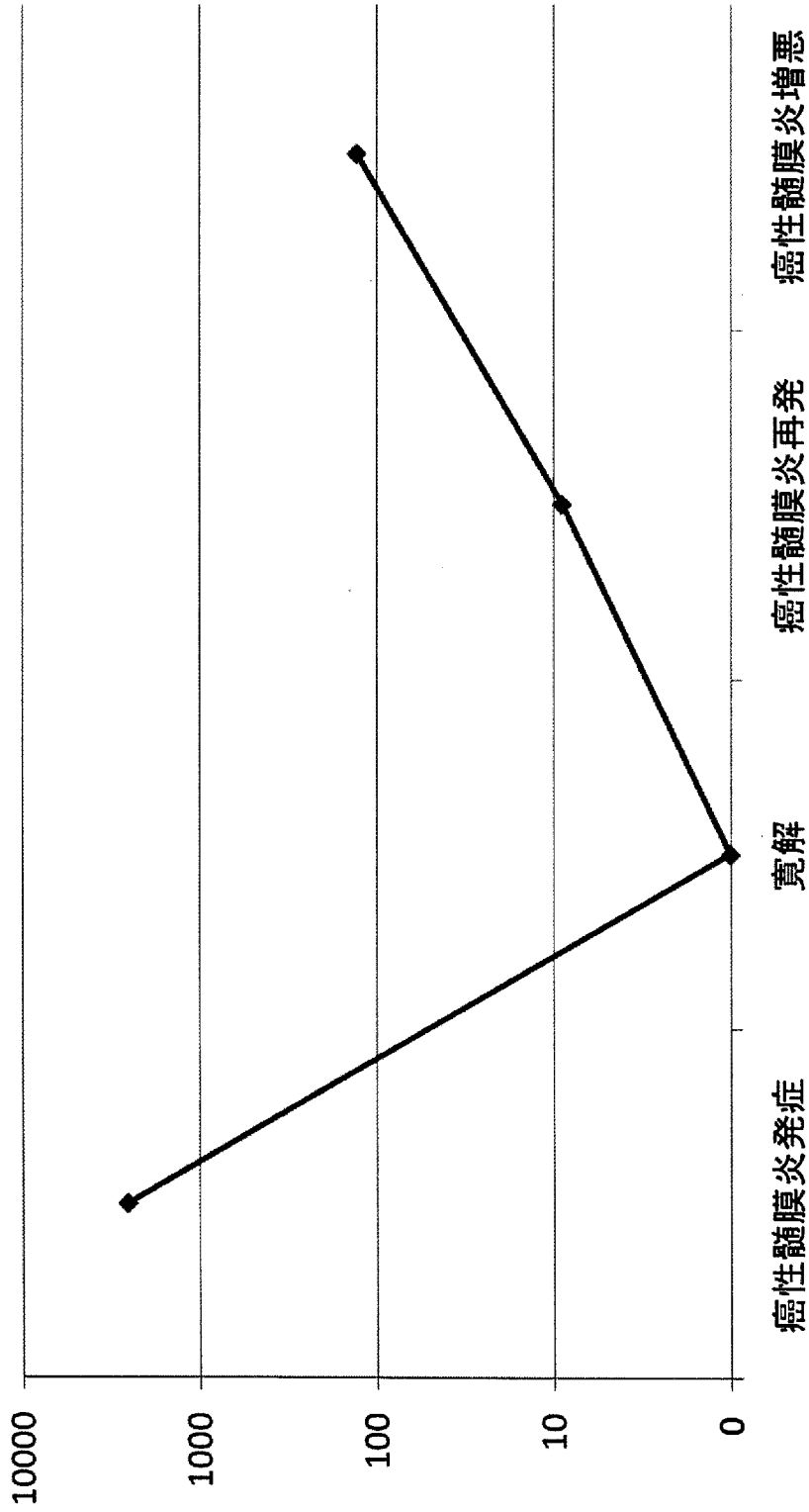
[図11]

hsa-miR-206コピー数



[図12]

髄液hsa-miR-206コピー数



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/058843

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/113(2010.01) i, C12Q1/68(2006.01) i, G01N33/50(2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/113, C12Q1/68, G01N33/50

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

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011

Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011

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

CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTplus/JMEDplus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	YAN D. et al., MicroRNA-1/206 Targets c-Met and Inhibits Rhabdomyosarcoma Development, J. Biol. Chem., (2009), vol.284, no.43, p.29596-29604	1-6
A	WO 2008/117278 A2 (Rosetta Genomics Ltd.), 02 October 2008 (02.10.2008), & JP 2010-522554 A & US 2010/0178653 A & US 2010/0273172 A & EP 2132327 A	1-6
A	MCCARTHY JJ., MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR, Biochim. Biophys. Acta., (2008), vol.1779, no.11, p.682-691	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09 June, 2011 (09.06.11)

Date of mailing of the international search report
21 June, 2011 (21.06.11)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/058843

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Mitsuru MIYACHI et al., "Kesseichu Kintokuiteki microRNA miR-206 wa Omonkinnikushu no Shinki Kessei Shuyo Marker de aru", The Japanese Society of Pediatric Hematology, Japanese Society of Pediatric Oncology, Japanese Society of Pediatric Oncology Nursing, Children's Cancer Association of Japan Kokai Symposium Program Sokaigo, (2010 November), Vol.52nd-26th-8th-15th, page 194	1-6
P,X	MIYACHI M. et al., Circulating muscle-specific microRNA, miR-206, as a potential diagnostic marker for rhabdomyosarcoma, Biochem. Biophys. Res. Commun., (2010 August), vol.400, no.1, p.89-93	1-6

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/113(2010.01)i, C12Q1/68(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i

B. 調査を行った分野
 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl. C12N15/113, C12Q1/68, G01N33/50

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2011年
 日本国実用新案登録公報 1996-2011年
 日本国登録実用新案公報 1994-2011年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
 CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN)
 JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	YAN D. et al., MicroRNA-1/206 Targets c-Met and Inhibits Rhabdomyosarcoma Development, J. Biol. Chem., (2009), vol. 284, no. 43, p. 29596-29604	1-6
A	WO 2008/117278 A2 (ロゼッタ ゲノミックス エルティイーディー) 2008.10.02, & JP 2010-522554 A & US 2010/0178653 A & US 2010/0273172 A & EP 2132327 A	1-6

C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

<p>* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p>	<p>の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献</p>
--	---

国際調査を完了した日 09.06.2011	国際調査報告の発送日 21.06.2011
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 福間 信子 電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	MCCARTHY J.J., MicroRNA-206: the skeletal muscle-specific myomiR, <i>Biochim. Biophys. Acta.</i> , (2008), vol.1779, no.11, p.682-691	1-6
P, X	宮地充 他, 血清中筋特異的 microRNA miR-206 は横紋筋肉腫の新規血清腫瘍マーカーである, 日本小児血液学会・日本小児がん学会・日本小児がん看護学会・財団法人がんと子供を守る会公開シンポジウムプログラム・総会号, (2010 11 月), Vol.52nd-26th-8th-15th P.194	1-6
P, X	MIYACHI M. et al., Circulating muscle-specific microRNA, miR-206, as a potential diagnostic marker for rhabdomyosarcoma, <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i> , (2010 8 月), vol.400, no.1, p.89-93	1-6