

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-68673  
(P2020-68673A)

(43) 公開日 令和2年5月7日(2020.5.7)

(5) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 1 2 M</b> 1/34 (2006.01)	C 1 2 M 1/34 Z N A B	4 B O 2 9
<b>G O 1 N</b> 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 M	4 B O 6 3
<b>C 1 2 Q</b> 1/6813 (2018.01)	C 1 2 Q 1/6813 Z	
<b>C 1 2 Q</b> 1/686 (2018.01)	C 1 2 Q 1/686 Z	
<b>C 1 2 N</b> 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113 Z	

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 26 頁)

(21) 出願番号 特願2018-203289 (P2018-203289)  
(22) 出願日 平成30年10月29日 (2018.10.29)

(71) 出願人 504258527  
国立大学法人 鹿児島大学  
鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号  
(74) 代理人 100095407  
弁理士 木村 満  
(74) 代理人 100168114  
弁理士 山中 生太  
(74) 代理人 100133592  
弁理士 山口 浩一  
(74) 代理人 100162259  
弁理士 末富 孝典  
(72) 発明者 中村 康大  
鹿児島県鹿児島市郡元一丁目21番24号  
国立大学法人 鹿児島大学内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 口腔癌判定装置、口腔癌判定方法、プログラム及び口腔癌判定キット

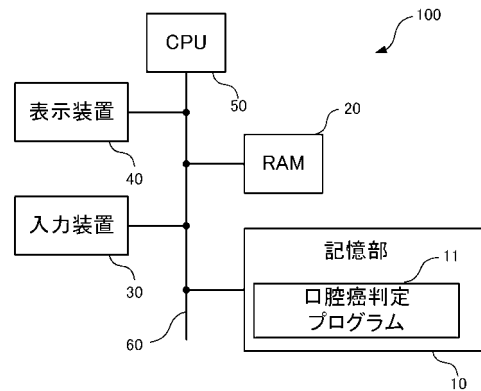
(57) 【要約】

【課題】 低侵襲で、かつ高い精度で口腔癌を判定できる口腔癌判定装置、口腔癌判定方法、プログラム及び口腔癌判定キットを提供する。

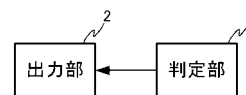
【解決手段】 口腔癌判定装置 100 は、被験者の体液試料における microRNA の発現量に基づいて被験者の口腔癌を判定する判定部 1 を備え、microRNA は、下記表 1 に示される群から選択される少なくとも 1 つである。

hsa-miR-144-3p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-451a	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-18b-5p	hsa-miR-100b-5p
hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-424-5p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-208a-5p	hsa-miR-3194-3p
hsa-miR-16-5p	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-30a-5p	hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-143-3p	hsa-miR-363-3p
hsa-miR-324-5p	hsa-miR-525-5p	hsa-miR-452-5p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-5093	hsa-miR-17-5p
hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-4000-3p	hsa-miR-4289	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-3170
hsa-miR-591	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-181a-3p	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-8090	hsa-miR-205-5p
hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-181d-5p	hsa-miR-93-5p	hsa-miR-3660	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-7515
hsa-miR-126-3p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-527	hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-7156-3p
hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-3678-3p	hsa-miR-185-5p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-1180-5p	hsa-miR-4658
hsa-miR-33b-3p	hsa-miR-132-3p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-7-1-3p	hsa-miR-1284	hsa-miR-8503-5p
hsa-miR-617	hsa-miR-4306	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-4745-3p	hsa-miR-5195-5p	hsa-miR-7153-5p
hsa-miR-5100	hsa-miR-622	hsa-miR-6842-3p	hsa-miR-4307	hsa-miR-7107-3p	hsa-miR-6718-5p
hsa-miR-4644	hsa-miR-3666	hsa-miR-1285-5p	hsa-miR-4502	hsa-miR-4764	hsa-miR-766-5p
hsa-miR-7112-3p	hsa-miR-363-5p	hsa-miR-6864-3p	hsa-miR-3976	hsa-miR-6809-5p	hsa-miR-6739-3p
hsa-miR-7-2-3p	hsa-miR-4419a	hsa-miR-1266-5p	hsa-miR-4470	hsa-miR-181a-2-3p	hsa-miR-4448
hsa-miR-519e-5p	hsa-miR-3927-5p	hsa-miR-5684	hsa-miR-550a-5p	hsa-miR-4717-5p	hsa-miR-4317
hsa-miR-4446-5p	hsa-miR-4421	hsa-miR-6074	hsa-miR-517a-3p	hsa-miR-517b-3p	hsa-miR-566
hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-125b-2-3p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-24-3p	

(A)



(B)



【選択図】 図 1

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

被験者の体液試料におけるmicroRNAの発現量に基づいて前記被験者の口腔癌を判定する判定部を備え、

前記microRNAは、

下記表1：

## 【表1】

hsa-miR-144-3p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-451a	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-18b-5p	hsa-miR-106b-5p
hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-424-5p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-208a-5p	hsa-miR-3194-3p
hsa-miR-16-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-143-3p	hsa-miR-363-3p
hsa-miR-324-5p	hsa-miR-525-5p	hsa-miR-452-5p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-5093	hsa-miR-17-5p
hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-4800-3p	hsa-miR-4289	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-3170
hsa-miR-591	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-151a-3p	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-8080	hsa-miR-205-5p
hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-181d-5p	hsa-miR-93-5p	hsa-miR-3660	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-7515
hsa-miR-126-3p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-527	hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-7156-3p
hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-3678-3p	hsa-miR-185-5p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-1180-5p	hsa-miR-4658
hsa-miR-33b-3p	hsa-miR-132-3p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-7-1-3p	hsa-miR-1284	hsa-miR-6503-5p
hsa-miR-617	hsa-miR-4306	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-4745-3p	hsa-miR-5195-5p	hsa-miR-7153-5p
hsa-miR-5100	hsa-miR-622	hsa-miR-6842-3p	hsa-miR-4307	hsa-miR-7107-3p	hsa-miR-6718-5p
hsa-miR-4644	hsa-miR-3666	hsa-miR-1285-5p	hsa-miR-4502	hsa-miR-4784	hsa-miR-766-5p
hsa-miR-7112-3p	hsa-miR-363-5p	hsa-miR-6864-3p	hsa-miR-3976	hsa-miR-6809-5p	hsa-miR-6739-3p
hsa-miR-7-2-3p	hsa-miR-4419a	hsa-miR-1266-5p	hsa-miR-4470	hsa-miR-181a-2-3p	hsa-miR-4448
hsa-miR-519e-5p	hsa-miR-3927-5p	hsa-miR-5684	hsa-miR-550a-5p	hsa-miR-4717-5p	hsa-miR-4317
hsa-miR-4446-5p	hsa-miR-4421	hsa-miR-6074	hsa-miR-517a-3p	hsa-miR-517b-3p	hsa-miR-566
hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-125b-2-3p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-24-3p	

10

20

に示される群から選択される少なくとも1つである、  
口腔癌判定装置。

## 【請求項2】

前記microRNAは、

hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-183-5p、hsa-miR-423-5p、hsa-miR-5100及びhsa-miR-144-3pの少なくとも1つであって、

30

前記判定部は、

前記microRNAの発現量を基準値と比較することによって、前記被験者における口腔癌の有無を判定する、

請求項1に記載の口腔癌判定装置。

## 【請求項3】

前記microRNAは、

hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-24-3p及びhsa-miR-5100の少なくとも1つであって、

40

前記判定部は、

前記microRNAの発現量を基準値と比較することによって、前記被験者における口腔癌の予後を判定する、

請求項1又は2に記載の口腔癌判定装置。

## 【請求項4】

前記microRNAは、

前記表1に示される群から選択されるhsa-miR-24-3p、hsa-miR-4419a及びhsa-miR-5100と、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-122-5p及びhsa-miR-150-3pとであって、

前記判定部は、

前記microRNAの発現量及び該発現量に対応する口腔癌の有無を示す情報を、そ

50

れぞれ説明変数に対応する情報及び目的変数に対応する情報とする教師あり学習で構築されたモデルによって、前記被験者の前記miRNAの発現量から前記被験者における口腔癌の有無を判定する、

請求項1から3のいずれか一項に記載の口腔癌判定装置。

【請求項5】

前記miRNAは、

前記表1に示される群から選択されるhsa-miR-423-5p及びhsa-miR-5100と、hsa-miR-150-3pとであって、

前記判定部は、

前記miRNAの発現量及び該発現量に対応する口腔癌の予後を示す情報を、それぞれ説明変数に対応する情報及び目的変数に対応する情報とする教師あり学習で構築されたモデルによって、前記被験者の前記miRNAの発現量から前記被験者における口腔癌の予後を判定する、

請求項1から4のいずれか一項に記載の口腔癌判定装置。

【請求項6】

被験者の体液試料におけるmiRNAの発現量に基づいて前記被験者の口腔癌を判定する判定ステップを含み、

前記miRNAは、

下記表2：

【表2】

hsa-miR-144-3p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-451a	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-18b-5p	hsa-miR-106b-5p
hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-424-5p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-208a-5p	hsa-miR-3194-3p
hsa-miR-16-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-143-3p	hsa-miR-363-3p
hsa-miR-324-5p	hsa-miR-525-5p	hsa-miR-452-5p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-5093	hsa-miR-17-5p
hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-4800-3p	hsa-miR-4289	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-3170
hsa-miR-591	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-151a-3p	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-8080	hsa-miR-205-5p
hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-181d-5p	hsa-miR-93-5p	hsa-miR-3660	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-7515
hsa-miR-126-3p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-527	hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-7156-3p
hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-3678-3p	hsa-miR-185-5p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-1180-5p	hsa-miR-4658
hsa-miR-33b-3p	hsa-miR-132-3p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-7-1-3p	hsa-miR-1284	hsa-miR-6503-5p
hsa-miR-617	hsa-miR-4306	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-4745-3p	hsa-miR-5195-5p	hsa-miR-7153-5p
hsa-miR-5100	hsa-miR-622	hsa-miR-6842-3p	hsa-miR-4307	hsa-miR-7107-3p	hsa-miR-6718-5p
hsa-miR-4644	hsa-miR-3666	hsa-miR-1285-5p	hsa-miR-4502	hsa-miR-4784	hsa-miR-766-5p
hsa-miR-7112-3p	hsa-miR-363-5p	hsa-miR-6864-3p	hsa-miR-3976	hsa-miR-6809-5p	hsa-miR-6739-3p
hsa-miR-7-2-3p	hsa-miR-4419a	hsa-miR-1266-5p	hsa-miR-4470	hsa-miR-181a-2-3p	hsa-miR-4448
hsa-miR-519e-5p	hsa-miR-3927-5p	hsa-miR-5684	hsa-miR-550a-5p	hsa-miR-4717-5p	hsa-miR-4317
hsa-miR-4446-5p	hsa-miR-4421	hsa-miR-6074	hsa-miR-517a-3p	hsa-miR-517b-3p	hsa-miR-566
hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-125b-2-3p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-24-3p	

に示される群から選択される少なくとも1つである、

口腔癌判定方法。

【請求項7】

コンピュータを、

被験者の体液試料におけるmiRNAの発現量に基づいて前記被験者の口腔癌を判定する判定部として機能させ、

前記miRNAは、

下記表3：

10

20

30

40

【表 3】

hsa-miR-144-3p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-451a	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-18b-5p	hsa-miR-106b-5p
hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-424-5p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-208a-5p	hsa-miR-3194-3p
hsa-miR-16-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-143-3p	hsa-miR-363-3p
hsa-miR-324-5p	hsa-miR-525-5p	hsa-miR-452-5p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-5093	hsa-miR-17-5p
hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-4800-3p	hsa-miR-4289	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-3170
hsa-miR-591	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-151a-3p	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-8080	hsa-miR-205-5p
hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-181d-5p	hsa-miR-93-5p	hsa-miR-3660	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-7515
hsa-miR-126-3p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-527	hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-7156-3p
hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-3678-3p	hsa-miR-185-5p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-1180-5p	hsa-miR-4658
hsa-miR-33b-3p	hsa-miR-132-3p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-7-1-3p	hsa-miR-1284	hsa-miR-6503-5p
hsa-miR-617	hsa-miR-4306	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-4745-3p	hsa-miR-5195-5p	hsa-miR-7153-5p
hsa-miR-5100	hsa-miR-622	hsa-miR-6842-3p	hsa-miR-4307	hsa-miR-7107-3p	hsa-miR-6718-5p
hsa-miR-4644	hsa-miR-3666	hsa-miR-1285-5p	hsa-miR-4502	hsa-miR-4784	hsa-miR-766-5p
hsa-miR-7112-3p	hsa-miR-363-5p	hsa-miR-6864-3p	hsa-miR-3976	hsa-miR-6809-5p	hsa-miR-6739-3p
hsa-miR-7-2-3p	hsa-miR-4419a	hsa-miR-1266-5p	hsa-miR-4470	hsa-miR-181a-2-3p	hsa-miR-4448
hsa-miR-519e-5p	hsa-miR-3927-5p	hsa-miR-5684	hsa-miR-550a-5p	hsa-miR-4717-5p	hsa-miR-4317
hsa-miR-4446-5p	hsa-miR-4421	hsa-miR-6074	hsa-miR-517a-3p	hsa-miR-517b-3p	hsa-miR-566
hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-125b-2-3p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-24-3p	

10

に示される群から選択される少なくとも1つである、  
プログラム。

20

## 【請求項 8】

被験者の体液試料における microRNA を定量する試薬を備え、  
前記 microRNA は、  
下記表 4 :

【表 4】

hsa-miR-144-3p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-451a	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-18b-5p	hsa-miR-106b-5p
hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-424-5p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-208a-5p	hsa-miR-3194-3p
hsa-miR-16-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-143-3p	hsa-miR-363-3p
hsa-miR-324-5p	hsa-miR-525-5p	hsa-miR-452-5p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-5093	hsa-miR-17-5p
hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-4800-3p	hsa-miR-4289	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-3170
hsa-miR-591	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-151a-3p	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-8080	hsa-miR-205-5p
hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-181d-5p	hsa-miR-93-5p	hsa-miR-3660	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-7515
hsa-miR-126-3p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-527	hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-7156-3p
hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-3678-3p	hsa-miR-185-5p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-1180-5p	hsa-miR-4658
hsa-miR-33b-3p	hsa-miR-132-3p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-7-1-3p	hsa-miR-1284	hsa-miR-6503-5p
hsa-miR-617	hsa-miR-4306	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-4745-3p	hsa-miR-5195-5p	hsa-miR-7153-5p
hsa-miR-5100	hsa-miR-622	hsa-miR-6842-3p	hsa-miR-4307	hsa-miR-7107-3p	hsa-miR-6718-5p
hsa-miR-4644	hsa-miR-3666	hsa-miR-1285-5p	hsa-miR-4502	hsa-miR-4784	hsa-miR-766-5p
hsa-miR-7112-3p	hsa-miR-363-5p	hsa-miR-6864-3p	hsa-miR-3976	hsa-miR-6809-5p	hsa-miR-6739-3p
hsa-miR-7-2-3p	hsa-miR-4419a	hsa-miR-1266-5p	hsa-miR-4470	hsa-miR-181a-2-3p	hsa-miR-4448
hsa-miR-519e-5p	hsa-miR-3927-5p	hsa-miR-5684	hsa-miR-550a-5p	hsa-miR-4717-5p	hsa-miR-4317
hsa-miR-4446-5p	hsa-miR-4421	hsa-miR-6074	hsa-miR-517a-3p	hsa-miR-517b-3p	hsa-miR-566
hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-125b-2-3p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-24-3p	

30

に示される群から選択される少なくとも1つである、  
口腔癌判定キット。

40

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、口腔癌判定装置、口腔癌判定方法、プログラム及び口腔癌判定キットに関する。

## 【背景技術】

50

## 【0002】

世界で毎年28万人が口腔癌に罹患する。口腔癌の患者は年々、増加傾向にある。多くの場合、口内炎に類似した前癌病変が癌化し口腔癌となる。初期には自覚症状に乏しく、類似した症状を呈する他の疾患が多くあることから、口腔癌は早期発見が難しい癌である。口腔癌の5年生存率は約65%である。口腔癌の早期発見によって、術後予後の改善が見込まれ、5年生存率の増加が期待される。口腔を対象とする外科手術での癌の切除によって、審美的な障害に加え、咀嚼、嚥下及び構音等の機能障害を遺すことがある。生存予後及び機能温存の両方の観点からも、口腔癌の早期発見の意義は極めて大きい。

## 【0003】

口腔癌の確定診断を得るためには、組織を切除して検査する生検しか方法がない。生検は侵襲的な検査であるため、出血及び治癒不全等のリスクを伴い、被験者に負担を強いることになる。被験者の負担を軽減するため、組織を切除するよりも低侵襲である液体生検の利用が考えられる。

10

## 【0004】

液体生検では、体液、例えば血液、尿及び唾液等における癌に関連する腫瘍マーカーが定量される。口腔癌の腫瘍マーカーとしては、扁平上皮癌関連抗原(SCC)及び癌胎児性抗原(CEA)が知られている。しかし、口腔癌におけるSCC及びCEAの陽性率は10~30%であり、検出精度が低い。また、SCC及びCEAによって早期の口腔癌が検出されることはほとんどない。

## 【0005】

液体生検の標的となる腫瘍マーカーとして、血中循環腫瘍DNA及びmicroRNA(以下、「miRNA」ともいう)等の腫瘍核酸が挙げられる。腫瘍核酸を標的とした液体生検は、低侵襲であるため、経時的に変化する腫瘍の性状をリアルタイムに監視する方法として有用である。さらに、腫瘍の性状として腫瘍の遺伝子プロファイリングを経時的に監視することは、遺伝情報、生活様式及び環境に基づいて同一疾患の患者を精緻にグループ化し、各グループに最適な治療法を最適な時期に選択していく最適治療(プレシジョンメディシン)においても有利である。

20

## 【0006】

miRNAは、18~22塩基程度の1本鎖RNAである。ヒトには2656種のmiRNAが存在し、約800種のmiRNAが癌関連遺伝子の発現を制御している。特許文献1には、病状等を同定するためのバイオマーカーとして多数のmiRNAが開示されている。また、特許文献2には、乳癌を除く癌のマーカーとして、2種のmiRNAが示されている。

30

## 【先行技術文献】

## 【特許文献】

## 【0007】

【特許文献1】特表2014-522993号公報

【特許文献2】特開2015-51011号公報

## 【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

40

## 【0008】

上述のように、口腔癌の液体生検で腫瘍マーカーとして用いられるSCC及びCEAは口腔癌の検出精度が低く、口腔癌を高精度に検出できる腫瘍マーカーは未だ見いだされていない。特許文献1には、前立腺癌及び肺癌等とmiRNAとの関連が示されている。一方、特許文献2では、大腸癌、胆嚢癌、胃癌及び肝臓癌等とmiRNAとの関連が示されている。しかし、特許文献1及び特許文献2では、口腔癌については何ら検討されていない。口腔癌で有効な液体生検の腫瘍マーカーがない以上、現状では、被験者の負担が大きい侵襲的な検査である生検を行わざるを得ない。

## 【0009】

さらに、口腔癌に関しては、術後の再発リスク等の予後を予測する検査方法が実用化さ

50

れていない。低侵襲な検査方法であればリアルタイムに監視できるため、腫瘍の形質変化のタイミングと原因の両方を予測でき、より適切な治療法の選択が可能となる。

【 0 0 1 0 】

本発明は、上記実情に鑑みてなされたものであり、低侵襲で、かつ高い精度で口腔癌を判定できる口腔癌判定装置、口腔癌判定方法、プログラム及び口腔癌判定キット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 】

【 0 0 1 1 】

本発明の第1の観点に係る口腔癌判定装置は、  
被験者の体液試料におけるmicroRNAの発現量に基づいて前記被験者の口腔癌を判定する判定部を備え、

10

前記microRNAは、

下記表1：

【 表 1 】

hsa-miR-144-3p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-451a	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-18b-5p	hsa-miR-106b-5p
hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-424-5p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-208a-5p	hsa-miR-3194-3p
hsa-miR-16-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-143-3p	hsa-miR-363-3p
hsa-miR-324-5p	hsa-miR-525-5p	hsa-miR-452-5p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-5093	hsa-miR-17-5p
hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-4800-3p	hsa-miR-4289	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-3170
hsa-miR-591	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-151a-3p	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-8080	hsa-miR-205-5p
hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-181d-5p	hsa-miR-93-5p	hsa-miR-3660	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-7515
hsa-miR-126-3p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-527	hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-7156-3p
hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-3678-3p	hsa-miR-185-5p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-1180-5p	hsa-miR-4658
hsa-miR-33b-3p	hsa-miR-132-3p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-7-1-3p	hsa-miR-1284	hsa-miR-6503-5p
hsa-miR-617	hsa-miR-4306	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-4745-3p	hsa-miR-5195-5p	hsa-miR-7153-5p
hsa-miR-5100	hsa-miR-622	hsa-miR-6842-3p	hsa-miR-4307	hsa-miR-7107-3p	hsa-miR-6718-5p
hsa-miR-4644	hsa-miR-3666	hsa-miR-1285-5p	hsa-miR-4502	hsa-miR-4784	hsa-miR-766-5p
hsa-miR-7112-3p	hsa-miR-363-5p	hsa-miR-6864-3p	hsa-miR-3976	hsa-miR-6809-5p	hsa-miR-6739-3p
hsa-miR-7-2-3p	hsa-miR-4419a	hsa-miR-1266-5p	hsa-miR-4470	hsa-miR-181a-2-3p	hsa-miR-4448
hsa-miR-519e-5p	hsa-miR-3927-5p	hsa-miR-5684	hsa-miR-550a-5p	hsa-miR-4717-5p	hsa-miR-4317
hsa-miR-4446-5p	hsa-miR-4421	hsa-miR-6074	hsa-miR-517a-3p	hsa-miR-517b-3p	hsa-miR-566
hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-125b-2-3p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-24-3p	

20

に示される群から選択される少なくとも1つである。

【 0 0 1 2 】

この場合、前記microRNAは、

hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-183-5p、hsa-miR-423-5p、hsa-miR-5100及びhsa-miR-144-3pの少なくとも1つであって、

前記判定部は、

前記microRNAの発現量を基準値と比較することによって、前記被験者における口腔癌の有無を判定する、

40

こととしてもよい。

【 0 0 1 3 】

また、前記microRNAは、

hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-24-3p及びhsa-miR-5100の少なくとも1つであって、

前記判定部は、

前記microRNAの発現量を基準値と比較することによって、前記被験者における口腔癌の予後を判定する、

こととしてもよい。

【 0 0 1 4 】

50

また、前記 *microRNA* は、

前記表 1 に示される群から選択される *hsa-miR-24-3p*、*hsa-miR-4419a* 及び *hsa-miR-5100* と、*hsa-miR-20a-5p*、*hsa-miR-122-5p* 及び *hsa-miR-150-3p* とであって、

前記判定部は、

前記 *microRNA* の発現量及び該発現量に対応する口腔癌の有無を示す情報を、それぞれ説明変数に対応する情報及び目的変数に対応する情報とする教師あり学習で構築されたモデルによって、前記被験者の前記 *microRNA* の発現量から前記被験者における口腔癌の有無を判定する、

こととしてもよい。

10

【0015】

また、前記 *microRNA* は、

前記表 1 に示される群から選択される *hsa-miR-423-5p* 及び *hsa-miR-5100* と、*hsa-miR-150-3p* とであって、

前記判定部は、

前記 *microRNA* の発現量及び該発現量に対応する口腔癌の予後を示す情報を、それぞれ説明変数に対応する情報及び目的変数に対応する情報とする教師あり学習で構築されたモデルによって、前記被験者の前記 *microRNA* の発現量から前記被験者における口腔癌の予後を判定する、

こととしてもよい。

20

【0016】

本発明の第 2 の観点に係る口腔癌判定方法は、

被験者の体液試料における *microRNA* の発現量に基づいて前記被験者の口腔癌を判定する判定ステップを含み、

前記 *microRNA* は、

下記表 2 :

【表 2】

<i>hsa-miR-144-3p</i>	<i>hsa-miR-19a-3p</i>	<i>hsa-miR-451a</i>	<i>hsa-miR-130a-3p</i>	<i>hsa-miR-18b-5p</i>	<i>hsa-miR-106b-5p</i>
<i>hsa-miR-19b-3p</i>	<i>hsa-miR-126-5p</i>	<i>hsa-miR-424-5p</i>	<i>hsa-miR-29c-3p</i>	<i>hsa-miR-208a-5p</i>	<i>hsa-miR-3194-3p</i>
<i>hsa-miR-16-5p</i>	<i>hsa-let-7i-5p</i>	<i>hsa-miR-30e-5p</i>	<i>hsa-miR-106a-5p</i>	<i>hsa-miR-143-3p</i>	<i>hsa-miR-363-3p</i>
<i>hsa-miR-324-5p</i>	<i>hsa-miR-525-5p</i>	<i>hsa-miR-452-5p</i>	<i>hsa-miR-142-5p</i>	<i>hsa-miR-5093</i>	<i>hsa-miR-17-5p</i>
<i>hsa-miR-20b-5p</i>	<i>hsa-miR-4800-3p</i>	<i>hsa-miR-4289</i>	<i>hsa-miR-22-3p</i>	<i>hsa-miR-15a-5p</i>	<i>hsa-miR-3170</i>
<i>hsa-miR-591</i>	<i>hsa-miR-194-5p</i>	<i>hsa-miR-151a-3p</i>	<i>hsa-let-7f-5p</i>	<i>hsa-miR-8080</i>	<i>hsa-miR-205-5p</i>
<i>hsa-miR-27a-3p</i>	<i>hsa-miR-181d-5p</i>	<i>hsa-miR-93-5p</i>	<i>hsa-miR-3660</i>	<i>hsa-miR-146b-5p</i>	<i>hsa-miR-7515</i>
<i>hsa-miR-126-3p</i>	<i>hsa-miR-146a-5p</i>	<i>hsa-miR-527</i>	<i>hsa-miR-518a-5p</i>	<i>hsa-miR-15b-5p</i>	<i>hsa-miR-7156-3p</i>
<i>hsa-miR-29a-3p</i>	<i>hsa-miR-3678-3p</i>	<i>hsa-miR-185-5p</i>	<i>hsa-miR-26a-5p</i>	<i>hsa-miR-1180-5p</i>	<i>hsa-miR-4658</i>
<i>hsa-miR-33b-3p</i>	<i>hsa-miR-132-3p</i>	<i>hsa-miR-195-5p</i>	<i>hsa-miR-7-1-3p</i>	<i>hsa-miR-1284</i>	<i>hsa-miR-6503-5p</i>
<i>hsa-miR-617</i>	<i>hsa-miR-4306</i>	<i>hsa-let-7a-5p</i>	<i>hsa-miR-4745-3p</i>	<i>hsa-miR-5195-5p</i>	<i>hsa-miR-7153-5p</i>
<i>hsa-miR-5100</i>	<i>hsa-miR-622</i>	<i>hsa-miR-6842-3p</i>	<i>hsa-miR-4307</i>	<i>hsa-miR-7107-3p</i>	<i>hsa-miR-6718-5p</i>
<i>hsa-miR-4644</i>	<i>hsa-miR-3666</i>	<i>hsa-miR-1285-5p</i>	<i>hsa-miR-4502</i>	<i>hsa-miR-4784</i>	<i>hsa-miR-766-5p</i>
<i>hsa-miR-7112-3p</i>	<i>hsa-miR-363-5p</i>	<i>hsa-miR-6864-3p</i>	<i>hsa-miR-3976</i>	<i>hsa-miR-6809-5p</i>	<i>hsa-miR-6739-3p</i>
<i>hsa-miR-7-2-3p</i>	<i>hsa-miR-4419a</i>	<i>hsa-miR-1266-5p</i>	<i>hsa-miR-4470</i>	<i>hsa-miR-181a-2-3p</i>	<i>hsa-miR-4448</i>
<i>hsa-miR-519e-5p</i>	<i>hsa-miR-3927-5p</i>	<i>hsa-miR-5684</i>	<i>hsa-miR-550a-5p</i>	<i>hsa-miR-4717-5p</i>	<i>hsa-miR-4317</i>
<i>hsa-miR-4446-5p</i>	<i>hsa-miR-4421</i>	<i>hsa-miR-6074</i>	<i>hsa-miR-517a-3p</i>	<i>hsa-miR-517b-3p</i>	<i>hsa-miR-566</i>
<i>hsa-miR-23a-3p</i>	<i>hsa-miR-125b-2-3p</i>	<i>hsa-miR-423-5p</i>	<i>hsa-miR-183-5p</i>	<i>hsa-miR-24-3p</i>	

30

40

に示される群から選択される少なくとも 1 つである。

【0017】

本発明の第 3 の観点に係るプログラムは、

コンピュータを、

被験者の体液試料における *microRNA* の発現量に基づいて前記被験者の口腔癌を判定する判定部として機能させ、

50

前記 *microRNA* は、

下記表 3 :

【表 3】

hsa-miR-144-3p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-451a	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-18b-5p	hsa-miR-106b-5p
hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-424-5p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-208a-5p	hsa-miR-3194-3p
hsa-miR-16-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-143-3p	hsa-miR-363-3p
hsa-miR-324-5p	hsa-miR-525-5p	hsa-miR-452-5p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-5093	hsa-miR-17-5p
hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-4800-3p	hsa-miR-4289	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-3170
hsa-miR-591	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-151a-3p	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-8080	hsa-miR-205-5p
hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-181d-5p	hsa-miR-93-5p	hsa-miR-3660	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-7515
hsa-miR-126-3p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-527	hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-7156-3p
hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-3678-3p	hsa-miR-185-5p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-1180-5p	hsa-miR-4658
hsa-miR-33b-3p	hsa-miR-132-3p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-7-1-3p	hsa-miR-1284	hsa-miR-6503-5p
hsa-miR-617	hsa-miR-4306	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-4745-3p	hsa-miR-5195-5p	hsa-miR-7153-5p
hsa-miR-5100	hsa-miR-622	hsa-miR-6842-3p	hsa-miR-4307	hsa-miR-7107-3p	hsa-miR-6718-5p
hsa-miR-4644	hsa-miR-3666	hsa-miR-1285-5p	hsa-miR-4502	hsa-miR-4784	hsa-miR-766-5p
hsa-miR-7112-3p	hsa-miR-363-5p	hsa-miR-6864-3p	hsa-miR-3976	hsa-miR-6809-5p	hsa-miR-6739-3p
hsa-miR-7-2-3p	hsa-miR-4419a	hsa-miR-1266-5p	hsa-miR-4470	hsa-miR-181a-2-3p	hsa-miR-4448
hsa-miR-519e-5p	hsa-miR-3927-5p	hsa-miR-5684	hsa-miR-550a-5p	hsa-miR-4717-5p	hsa-miR-4317
hsa-miR-4446-5p	hsa-miR-4421	hsa-miR-6074	hsa-miR-517a-3p	hsa-miR-517b-3p	hsa-miR-566
hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-125b-2-3p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-24-3p	

10

20

に示される群から選択される少なくとも1つである。

【0018】

本発明の第4の観点に係る口腔癌判定キットは、

被験者の体液試料における *microRNA* を定量する試薬を備え、

前記 *microRNA* は、

下記表 4 :

【表 4】

hsa-miR-144-3p	hsa-miR-19a-3p	hsa-miR-451a	hsa-miR-130a-3p	hsa-miR-18b-5p	hsa-miR-106b-5p
hsa-miR-19b-3p	hsa-miR-126-5p	hsa-miR-424-5p	hsa-miR-29c-3p	hsa-miR-208a-5p	hsa-miR-3194-3p
hsa-miR-16-5p	hsa-let-7i-5p	hsa-miR-30e-5p	hsa-miR-106a-5p	hsa-miR-143-3p	hsa-miR-363-3p
hsa-miR-324-5p	hsa-miR-525-5p	hsa-miR-452-5p	hsa-miR-142-5p	hsa-miR-5093	hsa-miR-17-5p
hsa-miR-20b-5p	hsa-miR-4800-3p	hsa-miR-4289	hsa-miR-22-3p	hsa-miR-15a-5p	hsa-miR-3170
hsa-miR-591	hsa-miR-194-5p	hsa-miR-151a-3p	hsa-let-7f-5p	hsa-miR-8080	hsa-miR-205-5p
hsa-miR-27a-3p	hsa-miR-181d-5p	hsa-miR-93-5p	hsa-miR-3660	hsa-miR-146b-5p	hsa-miR-7515
hsa-miR-126-3p	hsa-miR-146a-5p	hsa-miR-527	hsa-miR-518a-5p	hsa-miR-15b-5p	hsa-miR-7156-3p
hsa-miR-29a-3p	hsa-miR-3678-3p	hsa-miR-185-5p	hsa-miR-26a-5p	hsa-miR-1180-5p	hsa-miR-4658
hsa-miR-33b-3p	hsa-miR-132-3p	hsa-miR-195-5p	hsa-miR-7-1-3p	hsa-miR-1284	hsa-miR-6503-5p
hsa-miR-617	hsa-miR-4306	hsa-let-7a-5p	hsa-miR-4745-3p	hsa-miR-5195-5p	hsa-miR-7153-5p
hsa-miR-5100	hsa-miR-622	hsa-miR-6842-3p	hsa-miR-4307	hsa-miR-7107-3p	hsa-miR-6718-5p
hsa-miR-4644	hsa-miR-3666	hsa-miR-1285-5p	hsa-miR-4502	hsa-miR-4784	hsa-miR-766-5p
hsa-miR-7112-3p	hsa-miR-363-5p	hsa-miR-6864-3p	hsa-miR-3976	hsa-miR-6809-5p	hsa-miR-6739-3p
hsa-miR-7-2-3p	hsa-miR-4419a	hsa-miR-1266-5p	hsa-miR-4470	hsa-miR-181a-2-3p	hsa-miR-4448
hsa-miR-519e-5p	hsa-miR-3927-5p	hsa-miR-5684	hsa-miR-550a-5p	hsa-miR-4717-5p	hsa-miR-4317
hsa-miR-4446-5p	hsa-miR-4421	hsa-miR-6074	hsa-miR-517a-3p	hsa-miR-517b-3p	hsa-miR-566
hsa-miR-23a-3p	hsa-miR-125b-2-3p	hsa-miR-423-5p	hsa-miR-183-5p	hsa-miR-24-3p	

30

40

に示される群から選択される少なくとも1つである。

【発明の効果】

【0019】

本発明によれば、低侵襲で、かつ高い精度で口腔癌を判定できる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

50



【図1】(A)は本発明の実施の形態に係る口腔癌判定装置のハードウェア構成を示すブロック図である。(B)は口腔癌判定装置の機能を示すブロック図である。

【図2】図1に示す口腔癌判定装置による判定処理のフローチャートを示す図である。

【図3】口腔癌群及び健常者群の各miRNAの発現量を示す図である。(A)はhsa-miR-19a-3pの発現量を示す図である。(B)はhsa-miR-19b-3pの発現量を示す図である。(C)はhsa-miR-20a-5pの発現量を示す図である。(D)はhsa-miR-122-5pの発現量を示す図である。(E)はhsa-miR-5100の発現量を示す図である。

【図4】miRNAの発現量に基づいて口腔癌の有無を判定するための指標の分布を示す図である。

10

【図5】口腔癌の有無を判定するための指標による判定精度を示す図である。

【図6】miRNAの高発現群及び低発現群の無病生存率を示す図である。(A)はhsa-miR-19b-3pの結果を示す図である。(B)はhsa-miR-24-3pの結果を示す図である。(C)はhsa-miR-122-5pの結果を示す図である。(D)はhsa-miR-5100の結果を示す図である。

【図7】miRNAの発現量に基づいて口腔癌の後発リンパ節転移の有無を判定するための指標の分布を示す図である。

【図8】口腔癌の後発リンパ節転移の有無を判定するための指標による判定精度を示す図である。

【発明を実施するための形態】

20

【0021】

本発明に係る実施の形態について図面を参照しながら説明する。なお、本発明は下記の実施の形態によって限定されるものではない。

【0022】

本実施の形態に係る口腔癌判定装置100について図1を参照して説明する。口腔癌判定装置100は、被験者の口腔癌を判定するための装置である。図1(A)に示すように、口腔癌判定装置100は、記憶部10、RAM(Random Access Memory)20、入力装置30、表示装置40及びCPU(Central Processing Unit)50が、バス60で接続された構成を有する。

【0023】

30

記憶部10は、ROM(Read Only Memory)、HDD(Hard Disk Drive)及びフラッシュメモリ等の不揮発性の記憶媒体を備える。記憶部10は、各種データ及びソフトウェアプログラムその他、口腔癌判定プログラム11を記憶している。

【0024】

RAM20はCPU50のメインメモリとして機能し、CPU50による口腔癌判定プログラム11の実行に際し、口腔癌判定プログラム11がRAM20に展開される。RAM20には、入力装置30から入力されたデータが一時的に記憶される。

【0025】

入力装置30は、使用者が口腔癌判定装置100にデータを入力するためのハードウェアである。入力装置30は、被験者の体液試料におけるmiRNAの発現量を示すデータをCPU50に入力する。CPU50は、入力されたmiRNAの発現量を示すデータを記憶部10に記憶させる。

40

【0026】

体液試料は、血清、血漿及び全血等の血液検体、尿検体及び痰検体等である。好ましくは、体液試料は血液検体であって、特に好ましくは血清である。本実施の形態では、体液試料として被験者の血清を用いる。miRNAの発現量を示すデータは、血清におけるmiRNAの発現量の値である。miRNAの発現量の値は発現量の定量方法に応じて選択できるが、例えば、miRNAの濃度の値でもよいし、内因性コントロールのmiRNAの発現量に対する相対的な発現量を示す数値であってもよい。以下では、被験者の血清におけるmiRNAの発現量を示すデータを“発現量データ”ともいう。

50

## 【0027】

miRNAは、pri-miRNA、pre-miRNA及び成熟miRNAを含む。好ましくは、miRNAは、成熟miRNAである。miRNAの発現量は公知の方法で測定される。miRNAの発現量の測定方法としては、例えば、ノーザンブロッティング、PCR(Polymerase Chain Reaction)法、リアルタイムPCR法及びマイクロアレイ法が挙げられる。miRNAの発現量の測定では、血清から全RNAを抽出し、全RNAからcDNAを合成し、リアルタイムPCRでmiRNAを定量してもよい。全RNAの抽出、cDNAの合成及びリアルタイムPCRによるmiRNAの定量は、市販のキットでも行うことができる。

## 【0028】

表示装置40は、CPU50による口腔癌に関する判定の結果を出力するためのディスプレイである。CPU50は、記憶部10に記憶された口腔癌判定プログラム11をRAM20に読み出して、口腔癌判定プログラム11を実行することにより、以下に説明する機能を実現する。

## 【0029】

図1(B)は、CPU50が実現する機能を示すブロック図である。口腔癌判定プログラム11は、CPU50に判定部1及び出力部2として機能させる。

## 【0030】

判定部1は、被験者の血清におけるmiRNAの発現量に基づいて被験者の口腔癌を判定する。判定部1は、被験者における口腔癌の有無、口腔癌の状態及び予後等を判定する。口腔癌の有無とは、被験者が口腔癌に罹患しているか否かである。特に、口腔癌の有無とは、口腔癌に係る腫瘍を被験者が有しているか否かである。口腔癌の状態とは、口腔癌の悪性度及びステージ等である。口腔癌の予後とは、口腔癌の将来的な状態又は状態に関する見込みであって、特に、腫瘍切除後の状態である。好適には、口腔癌の予後は、口腔癌の後発リンパ節転移の有無である。

## 【0031】

下記実施例に示すように、所定のmiRNAの血清における発現量は、健常者と比較して口腔癌の患者で増加又は減少している。より詳細には、口腔癌患者と健常者とで比較した場合、表5に示すmiRNAは健常者よりも口腔癌患者での発現量が高い。表5に示すmiRNAを亢進miRNA群とする。なお、IDはmiRNAのデータベースであるmiRBaseにおける識別情報を示す。

## 【0032】

10

20

30

【表 5】

ID	Accession	ID	Accession
hsa-miR-144-3p	MIMAT0000436	hsa-miR-151a-3p	MIMAT0000757
hsa-miR-19a-3p	MIMAT0000073	hsa-let-7f-5p	MIMAT0000067
hsa-miR-451a	MIMAT0001631	hsa-miR-8080	MIMAT0031007
hsa-miR-130a-3p	MIMAT0000425	hsa-miR-205-5p	MIMAT0000266
hsa-miR-18b-5p	MIMAT0001412	hsa-miR-27a-3p	MIMAT0000084
hsa-miR-106b-5p	MIMAT0000680	hsa-miR-181d-5p	MIMAT0002821
hsa-miR-19b-3p	MIMAT0000074	hsa-miR-93-5p	MIMAT0000093
hsa-miR-126-5p	MIMAT0000444	hsa-miR-3660	MIMAT0018081
hsa-miR-424-5p	MIMAT0001341	hsa-miR-146b-5p	MIMAT0002809
hsa-miR-29c-3p	MIMAT0000681	hsa-miR-7515	MIMAT0029310
hsa-miR-208a-5p	MIMAT0026474	hsa-miR-126-3p	MIMAT0000445
hsa-miR-3194-3p	MIMAT0019218	hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	hsa-miR-527	MIMAT0002862
hsa-let-7i-5p	MIMAT0000415	hsa-miR-518a-5p	MIMAT0005457
hsa-miR-30e-5p	MIMAT0000692	hsa-miR-15b-5p	MIMAT0000417
hsa-miR-106a-5p	MIMAT0000103	hsa-miR-7156-3p	MIMAT0028223
hsa-miR-143-3p	MIMAT0000435	hsa-miR-29a-3p	MIMAT0000086
hsa-miR-363-3p	MIMAT0000707	hsa-miR-3678-3p	MIMAT0018103
hsa-miR-324-5p	MIMAT0000761	hsa-miR-185-5p	MIMAT0000455
hsa-miR-525-5p	MIMAT0002838	hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082
hsa-miR-452-5p	MIMAT0001635	hsa-miR-1180-5p	MIMAT0026735
hsa-miR-142-5p	MIMAT0000433	hsa-miR-4658	MIMAT0019725
hsa-miR-5093	MIMAT0021085	hsa-miR-33b-3p	MIMAT0004811
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	hsa-miR-132-3p	MIMAT0000426
hsa-miR-20b-5p	MIMAT0001413	hsa-miR-195-5p	MIMAT0000461
hsa-miR-4800-3p	MIMAT0019979	hsa-miR-7-1-3p	MIMAT0004553
hsa-miR-4289	MIMAT0016920	hsa-miR-1284	MIMAT0005941
hsa-miR-22-3p	MIMAT0000077	hsa-miR-6503-5p	MIMAT0025462
hsa-miR-15a-5p	MIMAT0000068	hsa-miR-617	MIMAT0003286
hsa-miR-3170	MIMAT0015045	hsa-miR-4306	MIMAT0016858
hsa-miR-591	MIMAT0003259	hsa-let-7a-5p	MIMAT0000062
hsa-miR-194-5p	MIMAT0000460	hsa-miR-23a-3p	MIMAT0000078

## 【 0 0 3 3 】

一方、表 6 に示す m i R N A は健常者よりも口腔癌患者での発現量が低い。表 6 に示す m i R N A を低下 m i R N A 群とする。

## 【 0 0 3 4 】

10

20

30

40

【表6】

ID	Accession	ID	Accession
hsa-miR-4745-3p	MIMAT0019879	hsa-miR-6739-3p	MIMAT0027380
hsa-miR-5195-5p	MIMAT0021126	hsa-miR-7-2-3p	MIMAT0004554
hsa-miR-7153-5p	MIMAT0028216	hsa-miR-4419a	MIMAT0018931
hsa-miR-5100	MIMAT0022259	hsa-miR-1266-5p	MIMAT0005920
hsa-miR-622	MIMAT0003291	hsa-miR-4470	MIMAT0018997
hsa-miR-6842-3p	MIMAT0027587	hsa-miR-181a-2-3p	MIMAT0004558
hsa-miR-4307	MIMAT0016860	hsa-miR-4448	MIMAT0018967
hsa-miR-7107-3p	MIMAT0028112	hsa-miR-519e-5p	MIMAT0002828
hsa-miR-6718-5p	MIMAT0025849	hsa-miR-3927-5p	MIMAT0022970
hsa-miR-4644	MIMAT0019704	hsa-miR-5684	MIMAT0022473
hsa-miR-3666	MIMAT0018088	hsa-miR-550a-5p	MIMAT0004800
hsa-miR-1285-5p	MIMAT0022719	hsa-miR-4717-5p	MIMAT0019829
hsa-miR-4502	MIMAT0019038	hsa-miR-4317	MIMAT0016872
hsa-miR-4784	MIMAT0019948	hsa-miR-4446-5p	MIMAT0019233
hsa-miR-766-5p	MIMAT0022714	hsa-miR-4421	MIMAT0018934
hsa-miR-7112-3p	MIMAT0028122	hsa-miR-6074	MIMAT0023699
hsa-miR-363-5p	MIMAT0003385	hsa-miR-517a-3p	MIMAT0002852
hsa-miR-6864-3p	MIMAT0027629	hsa-miR-517b-3p	MIMAT0002857
hsa-miR-3976	MIMAT0019361	hsa-miR-566	MIMAT0003230
hsa-miR-6809-5p	MIMAT0027518	hsa-miR-125b-2-3p	MIMAT0004603
hsa-miR-423-5p	MIMAT0004748	hsa-miR-183-5p	MIMAT0000261
hsa-miR-24-3p	MIMAT0000080		

10

20

## 【0035】

詳細には、判定部1は、miRNAの発現量を基準値と比較して、被験者の口腔癌を判定する。好ましくは、判定部1は、亢進miRNA群に含まれる少なくとも1つのmiRNAの発現量を基準値と比較する。判定部1は、亢進miRNA群に含まれる少なくとも1つのmiRNAの発現量が基準値より高い場合に被験者が口腔癌を有していると判定し、亢進miRNA群に含まれる少なくとも1つのmiRNAの発現量が基準値より低い場合に被験者が口腔癌を有していないと判定する。また、判定部1は、低下miRNA群に含まれる少なくとも1つのmiRNAの発現量を基準値と比較する。判定部1は、低下miRNA群に含まれる少なくとも1つのmiRNAの発現量が基準値より高い場合に被験者が口腔癌を有していると判定し、低下miRNA群に含まれる少なくとも1つのmiRNAの発現量が基準値より低い場合に被験者が口腔癌を有していると判定する。ここでの基準値は、例えば、健常者における当該miRNAの発現量の平均値又は中央値である。

30

## 【0036】

好ましくは、被験者における口腔癌の有無を判定するために、判定部1は、hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-183-5p、hsa-miR-423-5p、hsa-miR-5100及びhsa-miR-144-3pの少なくとも1つの発現量を基準値と比較する。より詳細には、判定部1は、hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-19b-3p及びhsa-miR-144-3pの少なくとも1つの発現量を基準値と比較し、発現量が基準値より高い場合に被験者が口腔癌を有していると判定し、発現量が基準値より低い場合に被験者が口腔癌を有していないと判定する。一方、判定部1は、hsa-miR-183-5p、hsa-miR-423-5p、hsa-miR-5100の少なくとも1つの発現量を基準値と比較し、発現量が基準値より高い場合に被験者が口腔癌を有していないと判定し、発現量が基準値より低い場合に被験者が口腔癌を有していると判定する。

40

50

## 【0037】

好ましくは、被験者における口腔癌の予後、例えば口腔癌の後発リンパ節転移の有無を判定するために、判定部1は、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-24-3p及びhsa-miR-5100の少なくとも1つの発現量を基準値と比較する。より詳細には、判定部1は、hsa-miR-19b-3p及びhsa-miR-24-3pの少なくとも1つの発現量を基準値と比較し、発現量が基準値より高い場合に口腔癌の後発リンパ節転移が有ると判定し、発現量が基準値より低い場合に口腔癌の後発リンパ節転移が無いと判定する。一方、判定部1は、hsa-miR-5100の発現量を基準値と比較し、発現量が基準値より高い場合に口腔癌の後発リンパ節転移が無いと判定し、発現量が基準値より低い場合に被験者に口腔癌の後発リンパ節転移が有ると判定する。

10

## 【0038】

判定部1は、複数のmiRNAの発現量を組み合わせて、被験者における口腔癌を判定してもよい。例えば、判定部1は、hsa-miR-19b-3pの発現量が第1の基準値より高く、かつhsa-miR-183-5pの発現量が第2の基準値より低い場合に被験者に口腔癌が有ると判定してもよい。

## 【0039】

判定部1は、miRNAの発現量と基準値との比較だけではなく、1つ以上のmiRNAの発現量から算出される指標に基づいて被験者における口腔癌を判定してもよい。例えば、判定部1は、公知のデータマイニングの手法を用いて構築されたモデルから得られる指標に基づいて、miRNAの発現量から被験者における口腔癌を判定してもよい。好ましくは、当該モデルは教師あり学習で構築されたモデルである。

20

## 【0040】

教師あり学習とは、説明変数とそれに付随する目的変数との組み合わせの集合を学習用データとして、学習用データに対するフィッティングを行うことにより学習を行う機械学習の一手法である。フィッティングは、学習用データに含まれる説明変数の特徴量を抽出して目的変数ごとの特徴量を選んだり、その目的変数に属するデータの特徴を抽出したり、目的変数を識別する判断基準を生成したりすることで行う。フィッティングによって、入力された説明変数からその説明変数に対応するべき目的変数を出力するモデルが構築される。モデルによって、学習用データに含まれない説明変数に対応する目的変数を出力することができる。

30

## 【0041】

口腔癌の有無を判定する場合、学習用データにおける説明変数は1つ以上のmiRNAの発現量データであって、目的変数は当該発現量データが示すmiRNAの発現量に対応する口腔癌の有無を示す情報である。例えば、健常者の血清中における3つのmiRNAの各発現量が $E_1$ 、 $E_2$ 及び $E_3$ とすると、説明変数“ $E_1, E_2, E_3$ ”に、口腔癌が無いことを示す情報である目的変数“0”が対応付けられる。一方、口腔癌患者の血清中における同じ3つのmiRNAの各発現量が $E_4$ 、 $E_5$ 及び $E_6$ とすると、説明変数“ $E_4, E_5, E_6$ ”に、口腔癌が有ることを示す情報である目的変数“1”が対応付けられる。好ましくは、学習用データは、複数のmiRNAの発現量データと当該発現量に対応する口腔癌の有無を示す情報との組み合わせの集合である。

40

## 【0042】

口腔癌の後発リンパ節転移の有無を判定する場合であれば、学習用データにおける説明変数は上記と同様に各miRNAの発現量データであって、目的変数は当該発現量に対応する口腔癌の後発リンパ節転移の有無を示す情報である。

## 【0043】

教師あり学習の方法には、公知の任意の方法を採用すればよい。教師あり学習の方法としては、例えば、判別分析、正準判別分析、線形分類、重回帰分析、ロジスティック回帰、サポートベクターマシン、決定木、ニューラルネットワーク、畳み込みニューラルネットワーク、パーセプトロン及びk近傍法等が挙げられる。

## 【0044】

50

下記実施例に示すように、表5の亢進miRNA群に含まれるmiRNAの他に、hsa-miR-20a-5p(MIMAT0000075)、hsa-miR-26b-5p(MIMAT0000083)、hsa-miR-21-5p(MIMAT0000076)及びhsa-miR-122-5p(MIMAT0000421)は健常者よりも口腔癌患者での発現量が高い。また、下記実施例に示すように、表6の低下miRNA群に含まれるmiRNAの他にhsa-miR-29c-5p(MIMAT0004673)及びhsa-miR-150-3p(MIMAT0004610)は健常者よりも口腔癌患者での発現量が低い。したがって、判定部1は、これらのmiRNAと亢進miRNA群のmiRNA又は低下miRNA群を組み合わせて、被験者における口腔癌を判定してもよい。

10

**【0045】**

例えば、被験者のmiRNAの発現量から被験者における口腔癌の有無を判定する場合、判定部1は、表1から選択されるhsa-miR-24-3p、hsa-miR-4419a及びhsa-miR-5100に加え、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-122-5p及びhsa-miR-150-3pの発現量が説明変数であって、目的変数が該発現量に対応する口腔癌の有無を示す情報であるモデルによって判定してもよい。

**【0046】**

また、被験者のmiRNAの発現量から被験者における口腔癌の後発リンパ節転移の有無を判定する場合、判定部1は、表1から選択されるhsa-miR-423-5p及びhsa-miR-5100に加え、hsa-miR-150-3pの発現量が説明変数であって、目的変数が該発現量に対応する口腔癌の後発リンパ節転移の有無を示す情報であるモデルによって判定すればよい。

20

**【0047】**

構築されたモデルは、記憶部10に記憶されている。判定部1は、被験者のmiRNAの発現量を、記憶部10に記憶されたモデルに入力することで、被験者における口腔癌の判定結果を示す情報を出力として得る。

**【0048】**

判定部1は、被験者における口腔癌の判定結果を示す情報を出力部2に入力する。例えば、口腔癌の有無を示す情報は、被験者が口腔癌を有することを示す情報又は被験者が口腔癌を有していないことを示す情報である。出力部2は、判定部1によって入力された判定結果を示す情報を表示装置40に表示する。

30

**【0049】**

続いて、口腔癌判定装置100による判定処理を図2に示すフローチャートを参照して説明する。なお、当該フローチャートでは、判定部1は、hsa-miR-19a-3pの発現量を用いて被験者における口腔癌の有無を判定する。hsa-miR-19a-3pの発現量と比較する基準値は、あらかじめ記憶部10に記憶されているものとする。

**【0050】**

判定部1は、使用者によって被験者のhsa-miR-19a-3pの発現量データが入力装置30を介して入力されるのを待つ(ステップS1; No)。被験者のhsa-miR-19a-3pの発現量データが入力されると(ステップS1; Yes)、判定部1は、記憶部10を参照し、基準値とhsa-miR-19a-3pの発現量とを比較し、被験者における口腔癌の有無を判定する(ステップS2)。hsa-miR-19a-3pの発現量が基準値より高い場合(ステップS2; Yes)、出力部2は、被験者が口腔癌を有することを示す情報を、表示装置40を介して表示する(ステップS3)。一方、hsa-miR-19a-3pの発現量が基準値より低い場合(ステップS2; No)、出力部2は、被験者が口腔癌を有していないことを示す情報を、表示装置40を介して表示する(ステップS4)。そして、判定部1は判定処理を終了する。

40

**【0051】**

以上詳細に説明したように、本実施の形態に係る口腔癌判定装置100は、血清におけ

50

る m i R N A の発現量に基づいて被験者における口腔癌を判定する。血清は採血することで得られるため、組織を採取する生検よりも低侵襲で被験者の負担が軽減される。上述の m i R N A は、口腔癌の腫瘍マーカーであるため、高い精度で被験者における口腔癌を判定することができる。

【 0 0 5 2 】

また、血清は比較的簡便に取得できるため、迅速に口腔癌を判定することができる。採血は低侵襲であるため、被験者の血清の m i R N A を任意のタイミングで適宜定量することができ、口腔癌をリアルタイムに監視できるため、最適治療においても有用である。

【 0 0 5 3 】

本実施の形態に係る m i R N A は、早期の口腔癌にも関連が見られる腫瘍マーカーである。このため、口腔癌判定装置 1 0 0 は、早期の口腔癌の有無等についても精度よく判定することができる。

【 0 0 5 4 】

また、口腔癌判定装置 1 0 0 は、口腔癌の後発リンパ節転移の有無を高い精度で判定することができる。後発リンパ節転移は、口腔癌の予後を決定する最も大きな術後イベントである。このため、口腔癌判定装置 1 0 0 は、口腔癌の予後を予測することができる。また、口腔癌判定装置 1 0 0 は、口腔癌の転移を予測すること、又は転移リスクを評価することもできる。したがって、口腔癌判定装置 1 0 0 は、治療法、術後の補助療法及び術後の検査頻度を決定に寄与することができる。

【 0 0 5 5 】

なお、判定部 1 は、血清において定量された m i R N A の発現量の値に対して任意の値を加減乗除した値で判定してもよく、発現量を公知の変換方法、例えば、指数変換、対数変換、角変換、平方根変換、プロビット変換、逆数変換、B o x - C o x 変換又はべき乗変換等で変換した値で判定してもよい。判定部 1 は、血清において定量された m i R N A の発現量の値を男女別又は年齢別に重み付けをして変換して得られる値で判定してもよい。また、判定部 1 は、第 1 の m i R N A の発現量と第 1 の m i R N A とは異なる第 2 の m i R N A の発現量との比を基準値等と比較して判定してもよい。

【 0 0 5 6 】

なお、C P U 5 0 は、上記モデルを構築するモデル構築部として機能してもよい。モデル構築部は、記憶部 1 0 に記憶された学習用データを用いた教師あり学習によってモデルを構築する。より詳細には、モデル構築部は、1 つ以上の m i R N A の発現量及び当該発現量に対応する口腔癌の有無を示す情報をそれぞれ説明変数及び目的変数とした学習用データを用いて教師あり学習を実行する。モデル構築部は、構築したモデルを記憶部 1 0 に記憶させる。これにより、判定部 1 は、被験者の m i R N A の発現量を、記憶部 1 0 に記憶されたモデルに入力することで、被験者が口腔癌を有するか否かを判定する。

【 0 0 5 7 】

なお、判定部 1 は、年齢差、性別、喫煙習慣及び飲酒習慣等の因子による m i R N A の発現量の差を考慮して、被験者に関するこれら因子の影響を補正した m i R N A の発現量に基づいて、口腔癌について判定してもよい。

【 0 0 5 8 】

なお、口腔癌判定装置 1 0 0 は、通信インターフェイスを備え、ネットワークに接続されてもよい。判定部 1 は、当該ネットワークに接続する外部の装置等から通信手段を介して送信された発現量データを受信し、被験者が口腔癌を有するか否か、又は被験者の口腔癌の予後を判定してもよい。さらに出力部 2 は、通信インターフェイスを介して被験者が口腔癌を有することを示す情報等を外部の装置に送信してもよい。

【 0 0 5 9 】

なお、別の実施の形態では、口腔癌判定キットが提供される。口腔癌判定キットは、被験者の血清における亢進 m i R N A 群及び低下 m i R N A 群から選択される少なくとも 1 つの m i R N A を定量する試薬を備える。好適には、当該試薬は、m i R N A をリアルタイム P C R で定量するためのプライマー及びプローブである。プライマーは、上記表 1 に

10

20

30

40

50

記載されたmiRNAをPCR産物の塩基配列中に含むように設計されたものであれば特に限定されない。

【0060】

プライマー及びプローブの塩基配列としては、上記表1に挙げたmiRNAに加え、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-26b-5p、hsa-miR-21-5p及びhsa-miR-122-5p、hsa-miR-29c-5p及びhsa-miR-150-3p、又は当該miRNAをコードするcDNAの全体の塩基配列若しくは部分配列、あるいは当該全体の塩基配列若しくは部分配列に相補的な塩基配列が挙げられる。

【0061】

プローブは、PCR産物とハイブリダイゼーションするものである。ハイブリダイゼーションの条件は、例えば、プローブが、塩基配列が相補的な核酸とはハイブリダイズするが、相補的ではない塩基配列の核酸にはハイブリダイズしないストリンジェントな条件である。ストリンジェントな条件は、例えば、モレキュラークローニング・ア・ラボラトリーマニュアル第3版(2001年)等に基づき適宜決定でき、例えば、0.2×SSC、0.1%SDS、65℃で保温、である。プライマー及びプローブは、例えば、市販の自動核酸合成機を用いて化学的に合成することができる。

【0062】

プローブは、蛍光物質等で標識されていてもよい。標識として、シアン、フルオレサミン、ローダミン、Cy3、Cy5、FITC(fluorescein isothiocyanate)、TRITC等の蛍光標識を用いることができる。口腔癌判定キットは、内在性コントロールとするmiRNAに対するプライマー及びプローブを備えてもよく、さらには緩衝液、miRNAの定量に使用するその他の試薬を備えてもよい。

【0063】

また、別の実施の形態では、被験者における口腔癌の有無を判定するためのデータを得るために、当該被験者の血清中の上記miRNAを検出する検出ステップを含む方法が提供される。また、他の実施の形態では、被験者の体液試料におけるmiRNAの発現量に基づいて被験者の口腔癌の判定を補助する方法が提供される。

【実施例】

【0064】

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、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【0065】

(対象)

対象は、2015年から2018年に鹿児島大学口腔外科を受診し、病理組織学的検査により口腔扁平上皮癌と診断された治療前の口腔癌患者40例と、ボランティアとして協力を得た健常者40例とした。臨床的背景因子として、年齢、性別、部位、腫瘍の大きさ、リンパ節転移の有無、遠隔転移の有無、病理組織型をカルテより取得した。口腔癌の解剖学的部位及びTNM分類は(TNM classification of malignant tumours)第8版(2017年)の規定に従った。リンパ節転移の有無は、画像診断および頸部郭清術におけるリンパ節の病理組織学的所見により診断した。遠隔転移の有無は画像診断にて診断した。上記の口腔癌患者40例及び健常者40例の臨床的背景を表7に示す。

【0066】

10

20

30

40



【表 7】

	平均年齢	性別		TMN分類				部位			
		男性	女性	I	II	III	IV	舌	歯肉	口腔底	頬粘膜
口腔癌群 (n=40)	67.3	21	19	3	14	8	15	21	14	4	1
健常者群 (n=40)	63.7	20	29								

## 【0067】

(血液の採取)

口腔癌患者40例及び健常者40例から血清サンプルを採取した。口腔癌患者からは治療の前後にサンプル採取を行った。口腔癌患者の血清サンプルは、治療開始約2週間前に採取し、術後1カ月以内にも同様にサンプルを採取した。全症例で、採血管に血液10mLを採取し室温で30分静置し凝固させた後に1900g、4分、30分間遠心分離を行い、上清を採取した。さらに細胞性の浮遊物を除去するために、1600g、4分、10分間遠心分離を行いその上清を血清サンプルとし、解析まで-80℃で保存した。

10

## 【0068】

(miRNAの網羅的解析)

口腔癌群と健常者群の血清プール(各10例ずつ)から、3D-Gene RNA extraction reagent(東レ社製)を用いて全RNAを抽出し、3D-Gene miRNA labeling kit(東レ社製)を用いてラベル化後、3D-Gene Mouse miRNA Oligo chip(東レ社製)に対してハイブリダイゼーションした。シグナルは3D-Gene Scanner(東レ社製)を用いてスキャンし、3D-Gene Extraction software(東レ社製)を用いて数値化した。各スポットのシグナル値からブランクスポットの平均値を引くことによって補正を行なった。さらに、シグナル強度の平均値が25となるようにグローバルノーマライゼーションを用いて正規化を行った。

20

## 【0069】

(結果)

健常者群に対して口腔癌群で2倍以上又は1/2以下の発現量を示したmiRNAをマーカーとして同定した。健常者群に対して口腔癌群で2倍以上の発現量を示した68種を表8に示す。健常者群に対して口腔癌群で1/2以下の発現量を示した45種を表9に示す。miRNAをマーカーとして同定した。マーカーの中でも特に癌患者と健常者との間で差の大きかった表10に示す16種のmiRNAについて、以下でさらに検討した。

30

## 【0070】

【表 8】

ID	Accession	ID	Accession
hsa-miR-144-3p	MIMAT0000436	hsa-miR-194-5p	MIMAT0000460
hsa-miR-19a-3p	MIMAT0000073	hsa-miR-122-5p	MIMAT0000421
hsa-miR-20a-5p	MIMAT0000075	hsa-miR-151a-3p	MIMAT0000757
hsa-miR-451a	MIMAT0001631	hsa-let-7f-5p	MIMAT0000067
hsa-miR-26b-5p	MIMAT0000083	hsa-miR-8080	MIMAT0031007
hsa-miR-130a-3p	MIMAT0000425	hsa-miR-205-5p	MIMAT0000266
hsa-miR-18b-5p	MIMAT0001412	hsa-miR-27a-3p	MIMAT0000084
hsa-miR-106b-5p	MIMAT0000680	hsa-miR-181d-5p	MIMAT0002821
hsa-miR-19b-3p	MIMAT0000074	hsa-miR-93-5p	MIMAT0000093
hsa-miR-21-5p	MIMAT0000076	hsa-miR-3660	MIMAT0018081
hsa-miR-126-5p	MIMAT0000444	hsa-miR-146b-5p	MIMAT0002809
hsa-miR-424-5p	MIMAT0001341	hsa-miR-7515	MIMAT0029310
hsa-miR-29c-3p	MIMAT0000681	hsa-miR-126-3p	MIMAT0000445
hsa-miR-208a-5p	MIMAT0026474	hsa-miR-146a-5p	MIMAT0000449
hsa-miR-3194-3p	MIMAT0019218	hsa-miR-527	MIMAT0002862
hsa-miR-16-5p	MIMAT0000069	hsa-miR-518a-5p	MIMAT0005457
hsa-let-7i-5p	MIMAT0000415	hsa-miR-15b-5p	MIMAT0000417
hsa-miR-30e-5p	MIMAT0000692	hsa-miR-7156-3p	MIMAT0028223
hsa-miR-106a-5p	MIMAT0000103	hsa-miR-29a-3p	MIMAT0000086
hsa-miR-143-3p	MIMAT0000435	hsa-miR-3678-3p	MIMAT0018103
hsa-miR-363-3p	MIMAT0000707	hsa-miR-185-5p	MIMAT0000455
hsa-miR-324-5p	MIMAT0000761	hsa-miR-26a-5p	MIMAT0000082
hsa-miR-525-5p	MIMAT0002838	hsa-miR-1180-5p	MIMAT0026735
hsa-miR-452-5p	MIMAT0001635	hsa-miR-4658	MIMAT0019725
hsa-miR-142-5p	MIMAT0000433	hsa-miR-33b-3p	MIMAT0004811
hsa-miR-5093	MIMAT0021085	hsa-miR-132-3p	MIMAT0000426
hsa-miR-17-5p	MIMAT0000070	hsa-miR-195-5p	MIMAT0000461
hsa-miR-20b-5p	MIMAT0001413	hsa-miR-7-1-3p	MIMAT0004553
hsa-miR-4800-3p	MIMAT0019979	hsa-miR-1284	MIMAT0005941
hsa-miR-4289	MIMAT0016920	hsa-miR-6503-5p	MIMAT0025462
hsa-miR-22-3p	MIMAT0000077	hsa-miR-617	MIMAT0003286
hsa-miR-15a-5p	MIMAT0000068	hsa-miR-4306	MIMAT0016858
hsa-miR-3170	MIMAT0015045	hsa-let-7a-5p	MIMAT0000062
hsa-miR-591	MIMAT0003259	hsa-miR-23a-3p	MIMAT0000078

【 0 0 7 1 】

40

【表 9】

ID	Accession	ID	Accession
hsa-miR-4745-3p	MIMAT0019879	hsa-miR-6739-3p	MIMAT0027380
hsa-miR-5195-5p	MIMAT0021126	hsa-miR-7-2-3p	MIMAT0004554
hsa-miR-7153-5p	MIMAT0028216	hsa-miR-4419a	MIMAT0018931
hsa-miR-5100	MIMAT0022259	hsa-miR-1266-5p	MIMAT0005920
hsa-miR-622	MIMAT0003291	hsa-miR-4470	MIMAT0018997
hsa-miR-6842-3p	MIMAT0027587	hsa-miR-181a-2-3p	MIMAT0004558
hsa-miR-4307	MIMAT0016860	hsa-miR-4448	MIMAT0018967
hsa-miR-7107-3p	MIMAT0028112	hsa-miR-519e-5p	MIMAT0002828
hsa-miR-6718-5p	MIMAT0025849	hsa-miR-3927-5p	MIMAT0022970
hsa-miR-4644	MIMAT0019704	hsa-miR-5684	MIMAT0022473
hsa-miR-3666	MIMAT0018088	hsa-miR-550a-5p	MIMAT0004800
hsa-miR-1285-5p	MIMAT0022719	hsa-miR-4717-5p	MIMAT0019829
hsa-miR-4502	MIMAT0019038	hsa-miR-150-3p	MIMAT0004610
hsa-miR-4784	MIMAT0019948	hsa-miR-4317	MIMAT0016872
hsa-miR-766-5p	MIMAT0022714	hsa-miR-4446-5p	MIMAT0019233
hsa-miR-7112-3p	MIMAT0028122	hsa-miR-4421	MIMAT0018934
hsa-miR-29c-5p	MIMAT0004673	hsa-miR-6074	MIMAT0023699
hsa-miR-363-5p	MIMAT0003385	hsa-miR-517a-3p	MIMAT0002852
hsa-miR-6864-3p	MIMAT0027629	hsa-miR-517b-3p	MIMAT0002857
hsa-miR-3976	MIMAT0019361	hsa-miR-566	MIMAT0003230
hsa-miR-6809-5p	MIMAT0027518	hsa-miR-125b-2-3p	MIMAT0004603
hsa-miR-423-5p	MIMAT0004748	hsa-miR-183-5p	MIMAT0000261
hsa-miR-24-3p	MIMAT0000080		

10

20

【 0 0 7 2 】

【表 10】

ID	miRNAの塩基配列	配列番号	
hsa-miR-19a-3p	UGUGCAAUUCUAUGCAAACUGA	1	
hsa-miR-19b-3p	UGUGCAAUCCAUGCAAACUGA	2	
hsa-miR-20a-5p	UAAAGUGCUUAUAGUGCAGGUAG	3	
hsa-miR-22-3p	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	4	
hsa-miR-23a-3p	AUCACAUUGCCAGGGAUUUCC	5	10
hsa-miR-24-3p	UGGCUCAGUUCAGCAGGAACAG	6	
hsa-miR-122-5p	UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG	7	
hsa-miR-125b-2-3p	UCACAAGUCAGGCUCUUGGGAC	8	
hsa-miR-183-5p	UAUGGCACUGGUAGAAUUCACU	9	
hsa-miR-208a-5p	GAGCUUUUGGCCCGGGUUAUAC	10	
hsa-miR-451a	AAACCGUUACCAUUACUGAGUU	11	
hsa-miR-150-3p	CUGGUACAGGCCUGGGGGACAG	12	20
hsa-miR-423-5p	UGAGGGGCAGAGAGCGAGACUUU	13	
hsa-miR-4419a	UGAGGGAGGAGACUGCA	14	
hsa-miR-5100	UUCAGAUCCCAGCGGUGCCUCU	15	
hsa-miR-144-3p	UACAGUAUAGAUGAUGUACU	16	

## 【0073】

( 口腔癌判定マーカーの同定 )

次のように、表10に示すマーカーを標的としたリアルタイムRT-PCRによってmiRNAを定量し、口腔癌群と健常者群とを比較検討した。血清サンプルよりmiRNAeasy serum/plasma kit (QIAGEN社製)とMS2 (Roche Diagnostics社製)を用いてmiRNAを含む全RNAを抽出した。続いて、TaqMan (商標) MicroRNA RT kit (Applied Biosystems社製)を用いてcDNAを合成した。

## 【0074】

miRNAの発現量は、TaqMan (商標) MicroRNA Assays (Applied Biosystems社製)を用いたリアルタイムPCRシステムで3回ずつ定量した。PCR反応は、熱変性95 で10分間を1サイクル行い、2サイクル目以降は熱変性95 で15秒、アニーリング/伸長反応は60 で60秒を60サイクル行った。リアルタイムPCRにおいては内因性コントロールにはmiR16を用いた。各miRNAの発現量はCT法にて相対的に定量した。なお、以下の統計解析は、すべてJMP13及びRを用いた。統計解析では、両側検定 $p < 0.05$ を有意差ありとみなした。

## 【0075】

( 結果 )

図3に示すように、リアルタイムPCRによる定量において、口腔癌群と健常者群との間でhsa-miR-19a-3p (A)、hsa-miR-19b-3p (B)、hsa-miR-20a-5p (C)、hsa-miR-122-5p (D)及びhsa-miR-5100 (E)の発現量に有意差を認めた。口腔癌群において、hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-19b-3p及びhsa-miR-20a-5pに発現

上昇を認めた。また、口腔癌群において、hsa-miR-122-5p及びhsa-miR-5100に発現低下を認めた。

【0076】

(口腔癌判定マーカーによる口腔癌の判定精度)

次に、各miRNAについて「腫瘍の存在」をエンドポイントにして受信者動作特性曲線(ROC)解析を行い、口腔癌の存在の判定に最適な発現量の基準値としてのカットオフ値を設定した。口腔癌群及び健常者群について、カットオフ値より低い発現量を“低発現グループ”、高い発現量を“高発現グループ”の2グループに整理し、低発現グループと高発現グループとの間に統計学的有意差を認める8種のmiRNAを決定した(表11及び表12)。

10

【0077】

8種のmiRNAうち、hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-20a-5p及びhsa-miR-144-3pでは口腔癌群における有意な発現上昇を、hsa-miR-122、hsa-miR-183、hsa-miR-423-5p及びmiR-5100は口腔癌群における有意な発現低下を認めた。hsa-miR-19a-3p、hsa-miR-19b-3p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-144-3p、hsa-miR-122、hsa-miR-183、hsa-miR-423-5p及びmiR-5100のカットオフ値は、それぞれ4.9857、4.127、4.962、9.218、4.915、12.002、6.352及び4.021で、その際のAUCは、それぞれ0.659、0.571、0.637、0.588、0.608、0.616、0.579及び0.706であった。

20

【0078】

【表11】

	has-miR-19a-3p			has-miR-19b-3p			hsa-miR-20a-5p			hsa-miR-122-5p		
	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p
口腔癌群 (n=40)	15	25	0.013	24	16	0.01	10	30	0.021	9	31	0.014
健常者群 (n=40)	27	13		35	5		21	19		1	39	

【0079】

【表12】

	hsa-miR-144-3p			hsa-miR-183-5p			hsa-miR-423-5p			hsa-miR-5100		
	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p
口腔癌群 (n=40)	22	18	0.031	18	22	<0.0001	35	5	0.0188	20	20	0.0002
健常者群 (n=40)	32	8		2	38		25	15		4	36	

30

【0080】

miRNAの発現量を用いた口腔癌の存在を判定するモデルを構築するため、線形分析を行ったところ、hsa-miR-24-3p、hsa-miR-20a-5p、hsa-miR-122-5p、hsa-miR-150-3p、hsa-miR-4419a及びhsa-miR-5100が因子として選定された。モデルとして、口腔癌の存在を判定する指標(miRNA index-A)を算出する下記の式1が得られた。なお、式1で[miRNAのID]は、当該miRNAの発現量を示す。

40

$$miRNA\ index - A = -0.31567 + (0.09049 \times [hsa - miR - 24 - 3p]) + (0.21063 \times [hsa - miR - 20a - 5p]) - (0.04705 \times [hsa - miR - 122 - 5p]) - (0.08418 \times [hsa - miR - 150 - 3p]) + (0.14492 \times [hsa - miR - 4419a]) - (0.22962 \times [hsa - miR - 5100]) \quad (式1)$$

【0081】

50

式 1 を用いた場合、図 4 に示すように口腔癌及び健常者群の *microRNA index - A* には両群間に著明な差がみられた ( $p < 0.0001$ )。式 1 についての ROC 曲線を図 5 に示す。*miRNA index - A* のカットオフ値は 0.517 であり、その際の AUC は 0.849、感度は 67.5%、特異度は 87.5%、陽性適中率 (PPV) は 27.1%、陰性適中率 (NPV) は 15.6% であった。当該モデルは、口腔癌の有無の判定に有用であることが示された。なお、上記式 1 による口腔癌の有無の判定は、TMN 分類で I 及び II の早期の患者でも有意に判定することができた。

【0082】

(治療前後のリアルタイムモニタリングと予後判定マーカーの同定)

口腔癌患者の治療前後に経時的に液体生検し、上記マーカーと臨床病理学的事項との関連性を統計学的に検討した。口腔癌症例の予後を決定する最も大きな術後イベントは治療後の後発リンパ節転移である。そこで、各 *miRNA* について「後発リンパ節転移」をエンドポイントにして ROC 解析を行い、後発リンパ節転移の判定に最適な発現量の基準値としてのカットオフ値を設定した。

10

【0083】

上記と同様に口腔癌群及び健常者群を低発現グループ及び高発現グループに整理し、低発現グループと高発現グループとの間に統計学的有意差を認める *hsa-miR-19b-3p*、*hsa-miR-24-3p* 及び *hsa-miR-122-5p*、並びに高発現と後発リンパ節転移との間に負の相関の傾向がみられる *hsa-miR-5100* を決定した (表 13)。*hsa-miR-19b-3p*、*hsa-miR-24-3p*、*hsa-miR-122-5p* 及び *hsa-miR-5100* のカットオフ値は、それぞれ 4.0129、5.0007、7.236 及び 3.997 で、その際の AUC は、それぞれ 0.683、0.607、0.660 及び 0.656 であった。

20

【0084】

【表 13】

	hsa-miR-19b-3p			hsa-miR-24-3p			hsa-miR-122-5p			hsa-miR-5100		
	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p	低発現	高発現	p
後発転移なし (n=30)	24	6	0.0065	24	6	0.0411	22	8	0.0068	4	26	0.089
後発転移あり (n=10)	3	7		4	6		2	8		4	6	

30

【0085】

図 6 に各 *miRNA* についての無病生存率における Kaplan-Meier 曲線を示す。当該 *miRNA* はすべて統計学的有意差を示し、治療後の予後予測に有用であることが示された。

【0086】

*miRNA* の発現量を用いた口腔癌の後発リンパ節転移の有無を判定するモデルを構築するため、線形分析を行ったところ、*hsa-miR-423-5p*、*hsa-miR-150-3p* 及び *hsa-miR-5100* が因子として選定された。モデルとして、口腔癌の後発リンパ節転移の有無を判定する指標 (*miRNA index - B*) を算出する下記の式 2 が得られた。

40

$$miRNA\ index - B = -1.36744 + (0.84173 \times [hsa-miR-423-5p]) + (0.27273 \times [hsa-miR-150-3p]) - (0.30080 \times [hsa-miR-5100]) - (0.13447 \times [hsa-miR-423-5p] / [hsa-miR-150-3p]) + (0.07004 \times [hsa-miR-150-3p] / [hsa-miR-5100]) \quad (式 2)$$

【0087】

式 2 を用いた場合、図 7 に示すように口腔癌及び健常者群の *microRNA index - B* には両群間に著明な差がみられた ( $p < 0.0001$ )。式 2 についての ROC 曲線を図 8 に示す。*miRNA index - B* のカットオフ値は 0.608 であり、そ

50

の際のAUCは0.860、感度は83.3%、特異度は80.0%、PPVは38.5%、NPVは7.4%であった。当該モデルは、口腔癌の後発リンパ節転移の有無の判定に有用であることが示された。

【0088】

上述した実施の形態は、本発明を説明するためのものであり、本発明の範囲を限定するものではない。すなわち、本発明の範囲は、実施の形態ではなく、特許請求の範囲によって示される。そして、特許請求の範囲内及びそれと同等の発明の意義の範囲内で施される様々な変形が、本発明の範囲内とみなされる。

【産業上の利用可能性】

【0089】

本発明は、口腔癌の検出、特に被験者における口腔癌の有無の判定及び予後の予測又は判定に好適である。

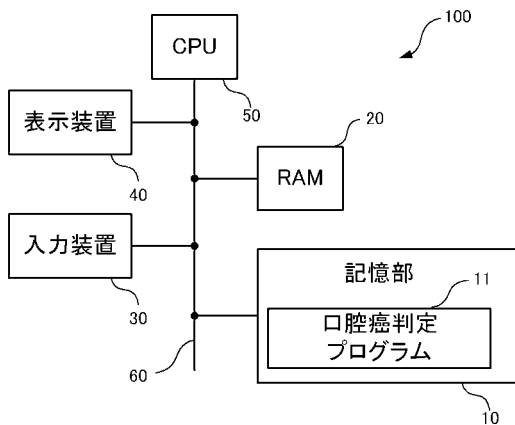
【符号の説明】

【0090】

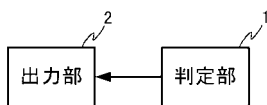
1 判定部、2 出力部、10 記憶部、11 口腔癌判定プログラム、20 RAM、30 入力装置、40 表示装置、50 CPU、60 バス、100 口腔癌判定装置

【図1】

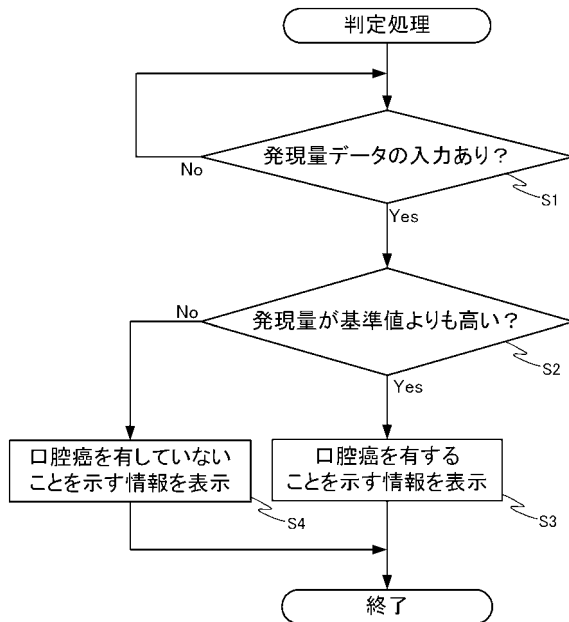
(A)



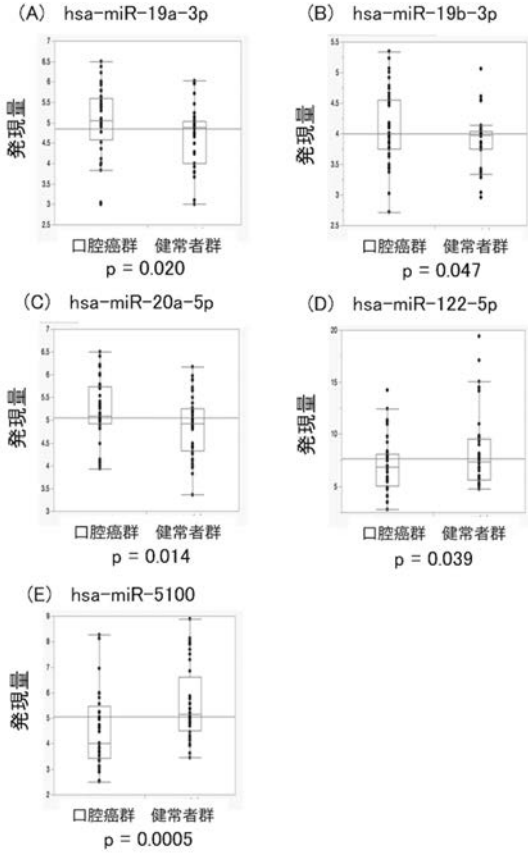
(B)



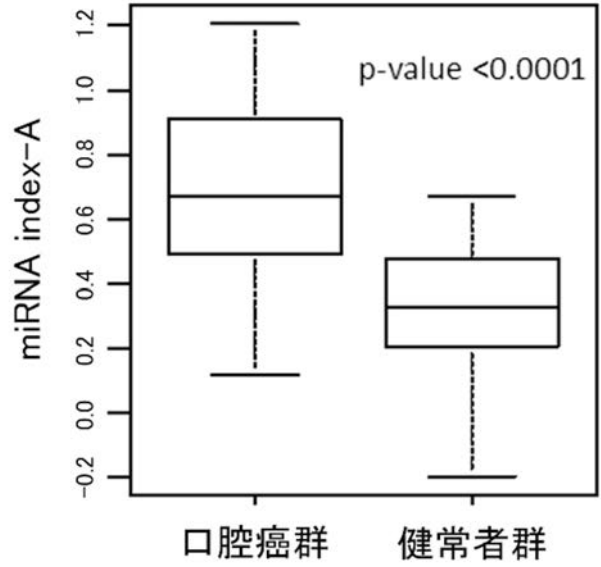
【図2】



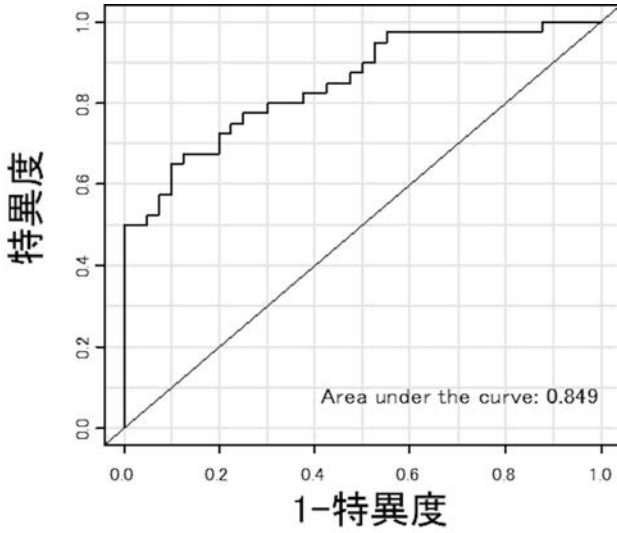
【 図 3 】



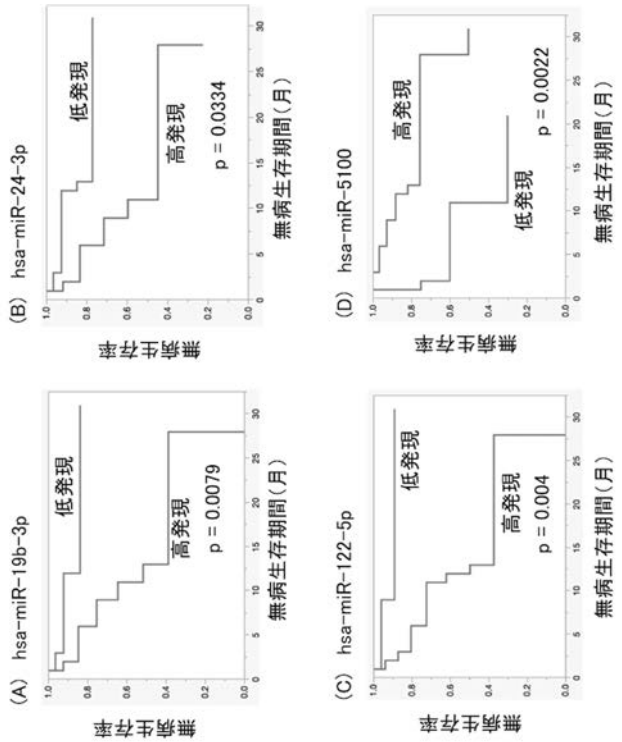
【 図 4 】



【 図 5 】

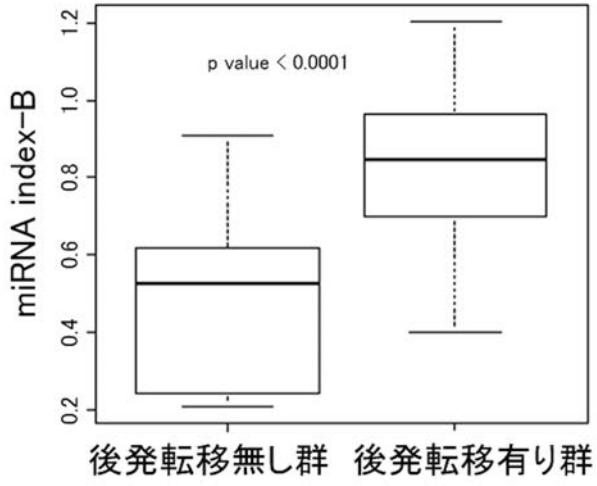


【 図 6 】

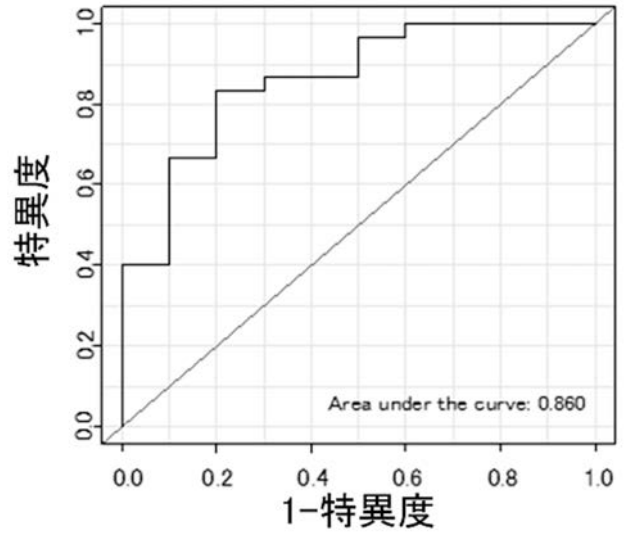




【 図 7 】



【 図 8 】



【 配列表 】

2020068673000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 杉浦 剛

鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人 鹿児島大学内

(72)発明者 浜田 倫史

鹿児島県鹿児島市郡元一丁目2番24号 国立大学法人 鹿児島大学内

Fターム(参考) 4B029 AA07 BB11 CC01 CC02 CC08 CC11 FA01 FA15

4B063 QA01 QA13 QA18 QA19 QQ02 QQ03 QQ08 QQ52 QQ53 QR32

QR35 QR55 QR62 QS25 QS32 QX02