

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 10 月 11 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21173

研究課題名(和文)血清中自己抗体を用いる新しい甲状腺乳頭癌検出システムの開発

研究課題名(英文)A New Diagnostic System Detecting Serum Autoantibodies to Papillary Thyroid Carcinoma

研究代表者

伊澤 正一郎 (IZAWA, Shoichiro)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30572599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：甲状腺癌の大部分を占める乳頭癌(PTC)は多くが生命予後良好であるが、一部に治療抵抗性症例が存在する。PTCは超音波所見に基づく細胞診により診断され、病期に応じて治療方針を決定する。低い病期では経過観察も選択肢となるが、早期に進行性の病変を検出する方法はない。本研究では先行研究で得たWD repeat domain 1およびFibronectin 1に対する自己抗体をこれらのアミノ酸配列を参考に作成したペプチドライブラリーにて検出する方法を確立した。さらにこれを活用して進行性PTCの検出に優れるペプチドを決定し、病理組織診断や病期との関連性を検証することで候補ペプチドのセットを決定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は血清中に検出しにくい不溶性の細胞内たんぱく質をバイオマーカーとして活用する新たな手法開発につながる可能性があり、甲状腺癌以外の悪性腫瘍をはじめとする他の疾患の治療や経過観察へ応用が期待できる。また本研究内容が実用化されれば、現在超音波診断や穿刺吸引細胞診が中心で、早期に治療の必要性が高い症例の抽出が困難な甲状腺癌の診断において、治療の必要性が高い患者の早期診断治療、経過観察への活用が期待される。さらに自己抗体の抗体価測定に必要な検体は患者血清であることから、本研究が実用化は多数の対象者へ安価かつ簡便に検査を提供可能となり、健康診断等へ活用することも期待される。

研究成果の概要(英文)：Papillary thyroid carcinoma (PTC) is the most frequent histopathological subtype of thyroid carcinoma. Most of the patients with PTC has a good clinical course after surgery. However, small part of PTC is resistant to conventional therapy. PTC is diagnosed by ultrasound manifestation and fine-needle aspiration cytology. Therapeutic plan is determined by the tumor staging system. There is no method to differentiate PTC with the potential to be advanced disease, though active surveillance is an option for patients with low stage disease. We previously demonstrated autoantibodies to WD repeat domain 1 (WDR1) and Fibronectin 1 (FN1) in the sera. This project established a new diagnostic system for detecting autoantibodies to WDR1 and FN1 by using synthetic peptides originated from their amino acid sequences. We finally determined a set of synthetic peptides that were suitable for detecting advanced PTC. The titer of the autoantibodies were verified by histopathology and tumor staging.

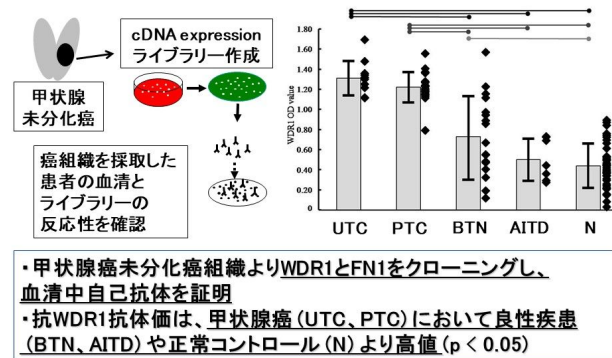
研究分野：臨床内分泌代謝学

キーワード：甲状腺乳頭癌 自己抗体 エピトープマッピング WD repeat domain 1 Fibronectin 1

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は予後不良甲状腺乳頭癌 (PTC) の診断を想定し、癌組織に対する自己免疫反応の結果産生される患者血清中の自己抗体を利用する SEREX 法にて、WD repeat family の 1 つである WD repeat domain 1 (WDR1) および Fibronectin 1 (FN1) をクローニングした。この方法では、癌組織を採取した患者の血清中に存在する自己抗体をクローニングに利用するため、癌組織において抗体産生などの免疫系の誘導に關与する蛋白の同定に適している。我々は、クローニングした WDR1 isoform 1 の C 末端フラグメントを大腸菌にて発現させ、精製した蛋白と患者血清の反応性を ELISA にて解析した。その結果、抗 WDR1 抗体価は PTC および未分化癌において良性甲状腺疾患患者や健康者と比較して有意に高く、甲状腺癌を検出するための感度と特異度に優れたマーカーとなりうることを報告した (図 1)¹⁾。

(2) 甲状腺結節 (TN) の診断において超音波検査 (US) と穿刺吸引細胞診 (FNAC) は必須であるが、TN は健康診断の US で約 10~30%に認める高頻度な病態である。従って US により、FNAC の対象となる癌を疑う病変をいかに抽出するかが重要である。一方で甲状腺癌の 90%を占める PTC において、US の B モード所見は有用であるが、感度が特異度に比して低い点が問題である。診断精度を向上させる方法として組織弾性評価等の US における定量的方法²⁾に加え、FNAC 検体の遺伝子解析³⁾が検討されるが、いずれも US や FNAC の技術が必要である。さらに PTC の多くは予後良好だが、一部に治療抵抗例や予後不良例が存在し、病態を反映するバイオマーカーの開発も重要課題である。



Izawa S et al, Clinical Endocrinology, 2013

図1. 甲状腺癌特異的自己抗体の証明

(3) 抗 WDR1 抗体を臨床応用するためには、抗体を血清中に検出するための抗原である WDR1 の安定した供給が重要である。我々は大腸菌や酵母等を用いてエピトープの存在が予想される WDR1 の C 末端側のリコンビナント蛋白の大量精製を試みた。しかしいずれにおいても蛋白の収量が少なくかつ安定性に問題があった。そこでアミノ酸配列をもとに bioinformatics より解析することで得られる 2 次元構造を再検討した結果、WDR1 は疎水性でありリコンビナント蛋白としての大量精製は非常に困難であると判断した。以上を踏まえ我々は、WDR1 のアミノ酸配列をもとに予測される 2 次元構造からエピトープ候補領域を設計し、その領域をカバーするペプチドライブラリーを作成した。本研究課題では、ライブラリーと患者およびコントロール血清の反応性を ELISA 法にて検討し、エピトープを含むペプチドを用いた診断システムの開発を行うこととした。

2. 研究の目的

- (1) 抗 WDR1 抗体のエピトープ同定とその臨床的意義の確立
- (2) FN1 のアミノ酸配列を反映したペプチドライブラリー作成とエピトープの決定
- (3) 合成ペプチドを用いた自己抗体検出システムの基盤設計

3. 研究の方法

(1) 抗 WDR1 抗体のエピトープ同定とその臨床的意義の確立

先行研究にて作成したペプチドライブラリーと甲状腺未分化癌 (3 例) および良性甲状腺腫瘍血清 (3 例) を用いて甲状腺未分化癌血清に特異的な反応を示すペプチドの絞り込みを行った。合成ペプチドは WDR1 以外の蛋白質との交差性が少なく、高純度 (純度 90 %以上) が確実に得られる 12 アミノ酸からなるペプチドを使用した。まず、WDR1 全アミノ酸配列をもとに off-set 数 6 でペプチドを合成した。このペプチドライブラリーと血清の反応性を ELISA で評価し、高い反応性が得られるペプチドにエピトープが含まれる可能性が高いと判断した。

エピトープを含むと考えられる領域については、bioinformatics の知見により親水性の coil 構造と予測される領域を中心に off-set 数 2 でペプチドを合成し、同様に ELISA による 2 次精査を行った。さらに 2 次精査にて有力と思われるペプチドを対象として、本学倫理審査委員会の承認を得て 2017 年 9 月に新たに開始した臨床研究により提供を受けた進行甲状腺癌 17 例、非進行甲状腺癌 7 例、良性甲状腺腫瘍 14 例、自己免疫性甲状腺疾患 15 例、コントロール 7 例の臨床情報の詳細を把握可能な血清を用いて ELISA の反応性を検討し、進行甲状腺癌の診断に有用なペプチドを検討した。

(2) FN1 のアミノ酸配列を反映したペプチドライブラリー作成とエピトープの決定

先行研究において WDR1 と同時にクローニングした FN1 の C 末端側領域について、WDR1 同様

に検討を行った。FN1 は分子量が大きく全アミノ酸配列を対象に血清学的なスクリーニングを行うことが予算や必要血清量の関連で困難であったことから、クローニングした領域のみを対象に評価を行った。まず off-set 数 2 にてクローニングした領域を網羅するペプチドライブラリーを作成した。甲状腺未分化癌 (3 例)、良性甲状腺腫瘍 (3 例) の血清を用いて ELISA における反応性を検討した。この結果と bioinformatics の知見より得られる親水性の coil 構造を示す領域を参考にペプチドライブラリーを作成した。

ペプチドライブラリーと未分化癌血清および良性甲状腺腫瘍血清の反応性を比較することで、未分化癌血清に特異的な反応が認められるペプチドを決定した。さらに (1) と同様に進行甲状腺癌 17 例、非進行甲状腺癌 7 例、良性甲状腺腫瘍 14 例、自己免疫性甲状腺疾患 15 例、コントロール 7 例の臨床情報の詳細を把握可能な血清を用いて ELISA の反応性を検討し、進行甲状腺癌の診断に有用なペプチドを検討した。

(3) 合成ペプチドを用いた自己抗体検出システムの基盤設計

進行甲状腺癌を検出するのに優れるペプチドを決定する際に用いる ELISA の最適な実施条件を決定するため、非特異的反応の少ないペプチド濃度、試薬濃度、アッセイ時間等の検討を行い、多数検体において評価可能な検査キット開発の基盤設計を実施した。

4. 研究成果

(1) 抗 WDR1 抗体のエピトープ同定とその臨床的意義の確立

WDR1 全アミノ酸配列をもとに作成したアミノ酸長 12、off-set 数 6 の条件で作成したペプチドライブラリーを用いて未分化癌血清 (3 例) と良性腫瘍血清 (3 例) にて ELISA で反応性を検討したところ、未分化癌血清に対する高い反応性を示すペプチドは、C 末端領域に由来することが判明した。そこで C

末端領域のターゲットを絞って off-set 数 2 にて追加検討を行ったところ、WDR1 2-33 (アミノ酸配列 VFSVDGYSENN) をはじめとする 12 のペプチドが進行甲状腺癌の検出に優れている可能性が高いと判断され (図 2)、これらについて特許出願を行い (特許願 2018-045806、特開 2019-158606)、2021 年 10 月現在審査請求中である。

さらにこれら 12 ペプチドについて臨床情報の詳細な把握が可能な進行甲状腺癌 17 例、非進行甲状腺癌 7 例、良性甲状腺腫瘍 14 例、自己免疫性甲状腺疾患 15 例、コントロール 7 例の血清を用いて ELISA による反応性を検討したところ、WDR1 2-33 が進行甲状腺癌の検出に最も優れていることが判明した (図 3)。

WDR1 2-33 に対する抗体価は、性差、年齢差、甲状腺機能や血中サイログロブリン値などの臨床指標に相関関係はなく、甲状腺癌の Stage のみを反映するバイオマーカーとしての活用が期待された。本検討では進行甲状腺癌を検出するための Cut-off 値を 0.514 とすると感度 0.706、特異度 0.930 (AUC 0.865, 95% CI: 0.759-0.971, $p < 0.001$) であった。

WDR1 の 3 次元構造はヒトにおい

て未解明であるが、ヒトとのアミノ酸配列一致率 41.0 % の線虫においては解明されている⁴⁾。WDR1 2-33 が相当する領域は、線虫における P517 から N530 に相当し親水性の coil 構造を呈することから、本アミノ酸配列は抗 WDR1 抗体のエピトープとして有力と考えられた (図 4)。また近年 WDR1 の過剰発現と癌の進展、増殖、悪性度との関連性を示唆する報告が乳癌、非小細胞

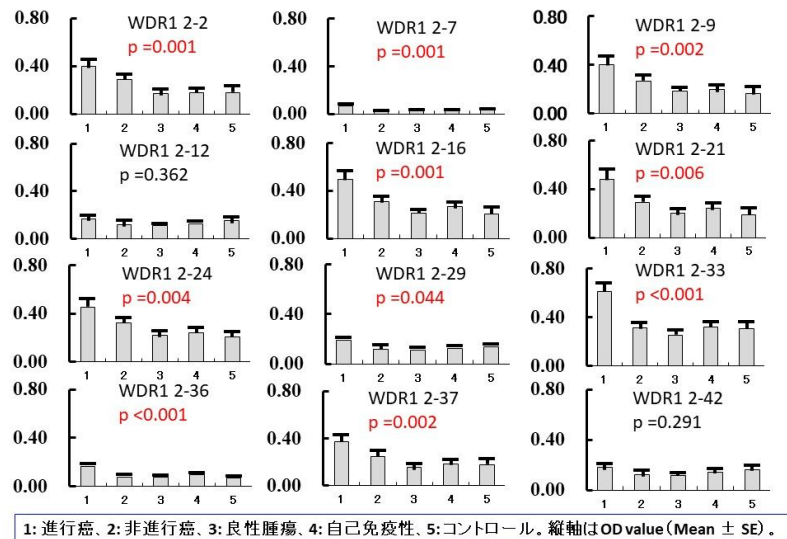


図2. 進行性PTCの識別に有用なペプチド

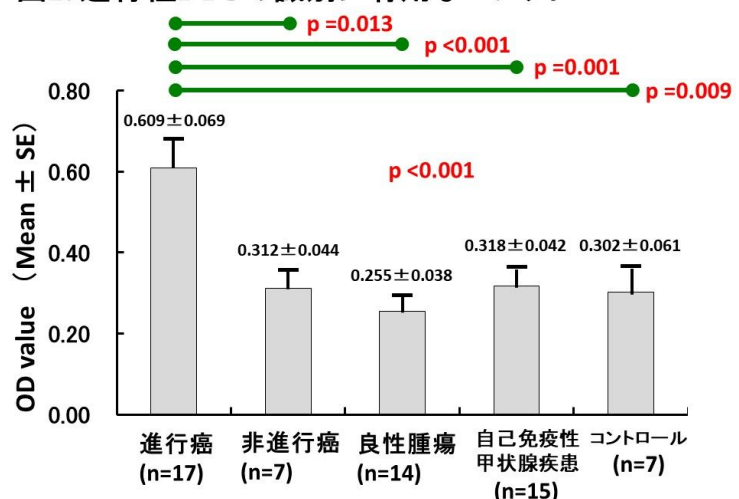


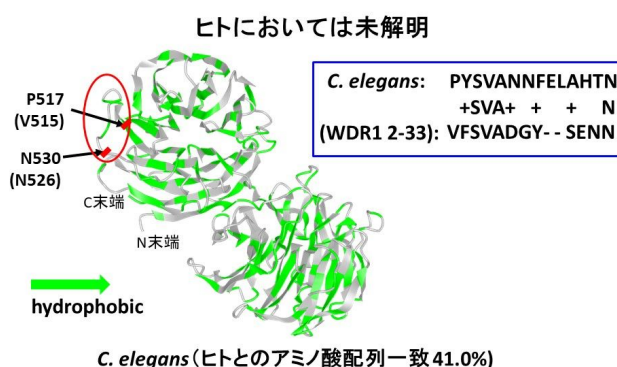
図3. WDR1 2-33に対する血中自己抗体価

肺癌、神経膠芽腫、卵巣癌でも発表されており⁵⁾、癌の診断マーカーとして WDR1 が有力なターゲットとなりうることを示唆された。

(2) FN1 のアミノ酸配列を反映したペプチドライブラリー作成とエピトープの決定

WDR1 同様にクローニングされた FN1 の C 末端領域について甲状腺未分化癌 (3 例)、良性甲状腺腫瘍 (3 例) の血清を用いて ELISA における反応性を検討したところ、FN1 に由来するアミノ酸配列を有する 12 アミノ酸のペプチド 9 種類において進行甲状腺癌の診断に有用なバイオマーカーとして期待できることが判定したため、(1) に関する知見と同様に特許出願を行い (特許願 2018-045806、特開 2019-158606) 2021 年 10 月現在審査請求中である。さらにこれら 9 ペプチドについて臨床情報の詳細な把握が可能な進行甲状腺癌 17 例、非進行甲状腺癌 7 例、良性甲状腺腫瘍 14 例、自己免疫性甲状腺疾患 15 例、コントロール 7 例の血清を用いて ELISA による反応性を検討したが、(1) における WDR1 2-33 を上回る診断精度は得られなかった。

従って FN1 に由来するアミノ酸配列を有する合成ペプチドは、進行甲状腺癌の検出に有用な可能性を残すが WDR1 における意義を上回る成果が得られる可能性は低いと判断し、WDR1 に関する検討を優先的に実施することとした。しかしヒトにおける FN1 の 3 次元構造は既に解析されている⁶⁾ 利点があり、エピトープの探索やそれに基づく抗 FN1 抗体の検出システムの開発は比較的容易と考えられる。今後抗 WDR1 抗体の検出システムの実現が難しい場合は、再検討が必要である。



(3) 合成ペプチドを用いた自己抗体検出システムの基盤設計

抗 WDR1 抗体及び抗 FN1 抗体を高い再現性で検出し、多数の検体での測定を可能にする必要性から、検討に用いるプレート、ペプチドの溶解方法および濃度、固相化方法、ブロッキング剤、血清の希釈倍率、二次抗体として使用する抗ヒト IgG 抗体の選定をエピトープマッピングに関する検討を実施した。その結果(1)および(2)の検討に用いたアッセイ方法が妥当であることが判明したが、本測定方法においては抗原であるペプチドの濃度や血清の希釈倍率に関連しない非特異的な抗原抗体反応が少なからず存在することも判明した。

非特異的な抗原抗体反応を減らすためのアッセイ方法の改良を試みたが、現時点では達成できていない。今後の研究の実用化に向けての課題として、非特異的な抗原抗体反応を抑制できる新たな抗原の設計、固相化方法の開発が必要である。

図4. WDR1立体構造との関連

< 引用文献 >

- Izawa S, Okamura T, Matsuzawa K, Ohkura T, Ohkura H, Ishiguro K, Noh JY, Kamijo K, Yoshida A, Shigemasa C, Kato M, Yamamoto K, Taniguchi S-I. Autoantibody against WD repeat domain 1 is a novel serological biomarker for screening of thyroid neoplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 79, 2013, 35-42
- Trimboli P, Guglielmi R, Monti S, Misischi I, Graziano F, Nasrollah N, Amendola S, Morgante SN, Deiana MG, Valabrega S, Toscano V, Papini E. Ultrasound sensitivity for thyroid malignancy is increased by real-time elastography: a prospective multicenter study. *J Clin Endocrinol Metab* 97, 2012, 4524-30
- Labourier E, Shifrin A, Busseniers AE, Lupo MA, Manganelli ML, Andruss B, Wylie D, Beaudenon-Huibregtse S. Molecular Testing for miRNA, mRNA, and DNA on Fine-Needle Aspiration Improves the Preoperative Diagnosis of Thyroid Nodules With Indeterminate Cytology. *J Clin Endocrinol Metab* 100, 2015, 2743-50
- Mohri K, Vorobiev S, Fedorov AA, Almo SC, Ono S. Identification of Functional Residues on *Caenorhabditis elegans* Actin-interacting Protein 1 (UNC-78) for Disassembly of Actin Depolymerizing Factor/Cofilin-bound Actin Filaments. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 279, 2004, 31697-707
- Ono S. Functions of actin-interacting protein 1 (AIP1)/WD repeat protein 1 (WDR1) in actin filament dynamics and cytoskeletal regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 506, 2018, 315-22
- Amit Sharma¹ A, Askari JA, Humphries MJ, Jones EY, Stuart DI. Crystal structure of a heparin- and integrin-binding segment of human fibronectin. *The EMBO Journal* 18, 1999, 1468-79

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1件)

Izawa S, Matsuzawa K, Matsumoto K, Fukaya K, Fukuhara T, Wakahara M, Koga A, Hino T, Yamamoto K. A novel method for detecting autoantibody to WD repeat domain 1: Clinical application for differentiating papillary thyroid carcinoma with poor clinical outcome. Endocrine Abstracts 70 AEP957, 2020 DOI: 10.1530/endoabs.70.AEP957

〔学会発表〕(計 5件)

伊澤 正一郎、松本 和久、深谷 健二、松澤 和彦、谷口 晋一、山本 一博. 進行甲状腺乳頭癌において検出される癌特異的自己抗体の産生機序解明、第 93 回日本内分泌学会学術総会、2020 年

Izawa S, Matsuzawa K, Matsumoto K, Fukaya K, Fukuhara T, Wakahara M, Koga A, Hino T, Yamamoto K. A novel method for detecting autoantibody to wd repeat domain 1: Clinical application for differentiating papillary thyroid carcinoma with poor clinical outcome. 22nd European Congress of Endocrinology (eECE 2020), 2020

伊澤 正一郎、深谷 健二、松本 和久、松澤 和彦、石井 有李子、伊藤 祐一、中村 理沙、角啓佑、大倉 毅、小谷 昌広、谷口 晋一、山本 一博. 病勢進行に Lenvatinib の再増量が有用であった甲状腺乳頭癌の 1 例、日本内分泌学会第 29 回臨床内分泌代謝 Update、2019 年

伊澤 正一郎、松本 和久、松澤 和彦、福原 隆宏、三宅 成智、藤原 和典、若原 誠、高木 雄三、古賀 敦朗、日野 智也、大倉 毅、谷口 晋一、山本 一博. 合成ペプチドを用いた癌特異的自己抗体検出による進行甲状腺癌の血清学的診断法、第 92 回日本内分泌学会学術総会、2019 年

伊澤 正一郎、甲状腺乳頭癌患者血清が特異的に反応する合成ペプチドを用いた診断システムの開発、第 4 回 TR 推進合同フォーラム、2016 年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1件)

名称：がんの判定法

発明者：伊澤 正一郎

権利者：国立大学法人鳥取大学

種類：特許 (通常)

番号：特許願 2018-045806

出願年：2018 年

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

鳥取大学医学部循環器・内分泌代謝内科学分野 (第一内科) 研究紹介

www2.hosp.med.tottori-u.ac.jp/medicine1/1448/8771.html

6. 研究組織

(2)研究協力者

研究協力者氏名：松澤 和彦

ローマ字氏名：(MATSUZAWA, kazuhiko)

研究協力者氏名：松本 和久

ローマ字氏名：(MATSUMOTO, kazuhisa)

研究協力者氏名：深谷 健二

ローマ字氏名：(FUKAYA, kenji)

研究協力者氏名：福原 隆宏

ローマ字氏名：(FUKUHARA, takahiro)

研究協力者氏名：藤原 和典

ローマ字氏名：(FUJIWARA, kazunori)

研究協力者氏名：三宅 成智
ローマ字氏名：(MIYAKE, naritomo)

研究協力者氏名：若原 誠
ローマ字氏名：(WAKAHARA, makoto)

研究協力者氏名：高木 雄三
ローマ字氏名：(TAKAGI, yuzo)

研究協力者氏名：古賀 敦朗
ローマ字氏名：(KOGA, atsuro)

研究協力者氏名：山岸 大輔
ローマ字氏名：(YAMAGISHI, daisuke)

研究協力者氏名：日野 智也
ローマ字氏名：(HINO, tomoya)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。