

令和 4 年 5 月 19 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09055

研究課題名(和文) 甲状腺細胞診検体を用いた濾胞癌におけるゲノムワイド分子診断マーカーの探索

研究課題名(英文) Exploration of genome-wide molecular diagnostic markers in follicular carcinoma using thyroid cytology specimens.

研究代表者

軸 蘭 智雄 (Tomoo, Jikuzono)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：10465312

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：バイオマーカーや薬剤標的分子の候補を探索する目的でFFPE標本を使用し、ゲノムワイドトランスクリプトーム解析を実施した。また我々がこれまでマーカー候補に挙げたトランスクリプトについて濾胞癌および濾胞腺腫に対し発現解析をリアルタイムPCRで行った。その結果、新たな知見としてあるケモカイン様蛋白質をコードするmRNAのスプライスバリエントが濾胞癌において顕著に上昇することが判った。この特定のスプライスバリエントは濾胞癌において特異的に発現し、乳頭癌や濾胞腺腫ではほとんど発現しないことが示された。このことから、本スプライスバリエントは、濾胞癌特異的バイオマーカーとしての臨床応用が期待されている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、甲状腺濾胞癌から抽出したRNAを用い、臨床応用可能な癌死危険度診断マーカーとしての臨床応用への可能性を追求することを目的とした。その結果、新たな知見として約11 kDaのケモカイン様蛋白質をコードするmRNAのスプライスバリエントが濾胞癌組織において顕著に上昇することを明らかにした。本スプライスバリエントは、濾胞癌特異的バイオマーカーとしての臨床応用が期待されている。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide transcriptome analysis was performed on FFPE specimens to search for candidate biomarkers and drug targets. In addition, we performed real-time PCR expression analysis on follicular thyroid carcinoma(FTC) and follicular adenoma(FA) for the transcripts that we have identified as candidate markers. As a new finding, we found that a splice variant of mRNA encoding a chemokine-like protein is significantly upregulated in FTC tissues. This particular splice variant was shown to be specifically expressed in FTC, while it is rarely expressed in papillary thyroid carcinoma and FA. Therefore, this splice variant is expected to be clinically applicable as a FTC-specific biomarker.

研究分野：内分泌外科

キーワード：甲状腺濾胞癌 甲状腺細胞診 ゲノムワイド分子診断マーカー RNA

1. 研究開始当初の背景

濾胞癌は甲状腺癌の約5%を占める高分化癌であり、乳頭癌に次いで2番目に多い。一般的にその予後は良好であるが、まれに遠隔転移を認めることがあり、その場合の予後はきわめて不良である。しかし、濾胞癌の術前診断は困難であり、また術後の病理診断においても良・悪性の鑑別さえ不可能なこともあり、術後遠隔転移を認めて初めて臨床的に濾胞癌と判明する場合がある。術前細胞診においては、最新の甲状腺癌取扱い規約(第7版)では「濾胞性腫瘍」(旧取扱い規約では良悪が判定困難な「鑑別困難」とされ、濾胞癌と濾胞線種の術前診断はなされない。このように、従来型の組織・細胞病理診断による濾胞癌の診断には限界があり、高感度かつ特異的な分子診断を可能にする濾胞癌バイオマーカーの開発が切望されている。しかし、これまでもその試みはなされてきたにも関わらず、十分な感度や精度を有する候補はいまだに発見されていない。

そこで我々は、先行研究として、術後遠隔転移を認めた、臨床的に見ても「明らかに」濾胞癌である6サンプル(3症例、各々癌部と非癌部)のホルマリン固定パラフィン包埋組織(FFPE)由来RNAにおけるトランスクリプト(非蛋白質コードRNAを含む)の発現変動について、次世代型アレイであるAffymetrix社Clariom Dを用いて網羅的に解析した。その結果、癌部・非癌部間の発現強度が有意に異なる685種類のトランスクリプトがリストアップされ、その上位にはいくつかのマイクロRNA(miRNA)も含まれていた。また、有意な発現低下を示すトランスクリプトの中には、濾胞線種(良性)と比較して濾胞癌で発現が低下することが報告されているTFF3も含まれており、本解析結果の妥当性を示すものと考えている。

以上のこれまでの知見を総合し、申請者は、「病理診断結果の信頼性が高い検体から十分な質および量のRNAを抽出することができれば、細胞診検体でも分子診断を可能とするバイオマーカーを同定できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

本研究では、術前細胞診検体から抽出したRNAを用いて、マイクロRNA等の非蛋白質コードRNAも対象に含めたゲノムワイドトランスクリプト解析を実施し、臨床応用可能な甲状腺濾胞癌の癌死危険度診断マーカーとしての臨床応用への可能性を追求することを目的とした。

3. 研究の方法

既に先行研究として、ホルマリン固定パラフィン標本(FFPE標本)を用いて、濾胞癌(悪性)および濾胞腺腫(良性)の比較解析より診断マーカー候補となるトランスクリプトを得ている。その結果は、Gene Expression Omnibus(GEO)にデータ登録を行った上で、データセット論文として投稿した(BMS Res Notes 13: 241 May, 2020)。また、発現上昇を認めたトランスクリプトの中で上位に挙げた候補について検討を重ねた。

具体的には、1)FFPE標本の解析を重ね、2)公共データベースに登録されている甲状腺腫瘍のトランスクリプトームデータセットの解析を行った。また、3)市販されているRNAサンプルを用いて検討を行い、さらに、4)「コホート・生体試料支援研究」の承認を受け、私共がマーカー候補に挙げたトランスクリプトについて濾胞癌および濾胞腺腫に対し発現解析(リアルタイムPCR解析)を行った。

4. 研究成果

バイオマーカーや薬剤標的分子の候補を探索する目的で、FFPE標本を使用し、高密度マイクロアレイによるゲノムワイドトランスクリプトーム解析を実施した。

また、並行して我々がこれまでマーカー候補に挙げたトランスクリプトについて濾胞癌および濾胞腺腫に対し発現解析をリアルタイムPCRで行った。

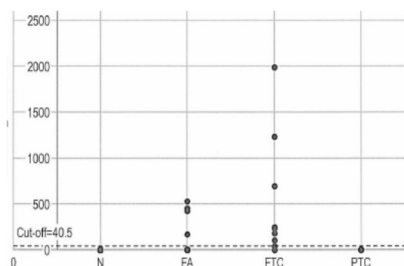


図1 FFPE標本を用いた約11 kDaのケモカイン様蛋白質をコードするmRNAのスプライズバリエーションの発現(N:正常部、FA:濾胞腺腫、FTC:濾胞癌、PTC:乳頭癌)

その結果、新たな知見として、約11 kDaのケモカイン様蛋白質をコードするmRNAのスプライズバリエーションが濾胞癌組織において顕著に上昇することを明らかにした。さらに、その後の解析により、この特定のスプライズバリエーションが濾胞癌において特異的に発現し、乳頭癌や濾胞腺腫ではほとんど発現しないことが示された(「甲状腺濾胞癌特異的マーカー」と題し、2021年3月に特許出願)(図1)。このことから、本スプライズバリエーションは、濾胞癌特異的バイオマーカーとしての臨床応用が期待されている。上記の内容について、2021年11月、日本甲状腺学会にて「甲状腺濾胞癌特異的マーカー

の開発について」と題し講演したが、コスミック研究創成賞・優秀賞を受賞（2回目）することが出来た。

また、科学技術振興機構（JST）による平成3年度知財活用支援事業（権利化支援）に採択されたため、本制度を利用して特許協力条約（PCT）に基づく国際出願を行った。

私共はさらに症例数を増やし、またこのほかにもう一つ有望な甲状腺癌マーカーである LRRK2 と併せた2つのマーカーについて検討している。これらの研究成果は、学会にて順次報告した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tomoo Jikuzono, Tomoko Ishikawa, Mitsuyoshi Hirokawa, Iwao Sugitani, Osamu Ishibashi	4. 巻 13: 241 May
2. 論文標題 Microarray analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded follicular thyroid carcinoma samples from patients who developed postoperative distant metastasis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BMS Res Notes	6. 最初と最後の頁 1-4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13104-020-05080-8.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jikuzono T, Ishibashi O, Kure S, Itoh C, Yamada T, Sugitani I	4. 巻 Jan-Feb;36(1)
2. 論文標題 VsN, a Reliability-index of Shear-wave Measurement in Sonoelastography, Is Useful for the Diagnosis of Thyroid Tumor Malignancy.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 In Vivo	6. 最初と最後の頁 264-273.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/invivo.12700.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Jikuzono T, Suzuki S, Ishibashi O, Kure S, Sakanushi A, Nakamizo M, Kawamoto M, Ohashi R, Yamada T, Sugitani I	4. 巻 2021 Apr 19.
2. 論文標題 Clinical Utility of Fine Needle Aspiration Cytology for Adenoid Cystic Carcinoma of the Trachea with Thyroid Invasion: A Case Report.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Nippon Med Sch.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1272/jnms.JNMS.2022_89-207.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 軸園智雄
2. 発表標題 甲状腺結節におけるShear wave elastographyについて
3. 学会等名 日本内分泌外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 軸園智雄
2. 発表標題 非浸潤性乳管癌の疑似細胞診検体を用いた次世代型アレイ解析について
3. 学会等名 日本内分泌外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 軸園智雄
2. 発表標題 乳管内視鏡を用いたRNA解析の可能性について
3. 学会等名 日本内分泌外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 軸園智雄
2. 発表標題 乳管内視鏡を用いた乳管内腫瘍性病変のRNA解析について
3. 学会等名 第53回日本内分泌外科学会学術大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 軸園智雄
2. 発表標題 Shear Wave Measurementは 甲状腺癌の診断に有用である
3. 学会等名 第33回日本内分泌外科学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 甲状腺濾胞癌特異的マーカー	発明者 軸園 智雄、石橋 宰	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021- 57814	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石橋 宰 (Ishibashi Osamu) (70293214)	大阪公立大学・大学院農学研究科・准教授 (24403)	
研究分担者	杉谷 巖 (Sugitani Iwao) (50465936)	日本医科大学・大学院医学研究科・大学院教授 (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------