

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 6 日現在

機関番号：32651

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24701012

研究課題名(和文) 甲状腺癌抗原の解明と、半導体による癌抗原血液検査法の新規開発

研究課題名(英文) Investigation of thyroid carcinoma specific antigen and developing novel antigen detection system in blood samples.

## 研究代表者

藤岡 宏樹 (Fujioka, Kouki)

東京慈恵会医科大学・医学部・講師

研究者番号：90392381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、甲状腺癌を特異的に認識する抗体(JT95)を用いて、癌抗原の分子構造を解明すると共に、検出感度の高い蛍光物質とJT95抗体を組み合わせた「癌抗原血液検査法」の開発を目的としたものである。本研究期間において、JT95抗体が認識する癌抗原タンパク質の候補の絞り込みを行ない、また、ビオチン化JT抗体によって、癌組織の剥離細胞が認識できることを明らかにした。一方、現行のJT95抗体によるサンドイッチELISA法単独では、血液検査によるスクリーニングに適用することが難しいことも明らかとなった。より高精度の血液検査法を開発するためには癌抗原を同定し、新たな検出法を構築する必要がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the new detection method of thyroid carcinoma antigen by combining fluorescence with the JT 95 antibody for the specific recognition of thyroid cancer. In this study, we discovered several new candidate proteins with immunoprecipitation method. Moreover, in a pilot study, the antigens in the smear cellular sample from papillary carcinoma tissue was detected clearly with biotinylated JT95 antibody and phycoerythrin. However, antigen detection system in blood plasma samples with JT95 sandwich ELISA did not show the specificity against thyroid carcinoma. Therefore, the accurate antigen identification will be needed for developing the new detection system .

研究分野：甲状腺癌の診断法の開発

キーワード：甲状腺癌 癌抗原 診断 抗体

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 原発事故と小児甲状腺癌：

チェルノブイリ原発事故後、近隣のベラルーシにおける小児甲状腺癌（特に甲状腺乳頭癌）は、4年後から増加したという報告がある(Cardis E et al., J Radiol Prot, 2006)。

一方、日本における原発事故では、放射能汚染の状況が異なっているため、チェルノブイリ事故による健康影響の結果から、日本での長期的な健康影響を正確に予測することは難しい。甲状腺への影響を調査するため、福島県では、震災当時18歳未満であった36万人と、平成24年4月1日までに生まれた子を対象とする甲状腺の超音波検査が開始されている。

### (2) 甲状腺癌の血液検査の課題：

上記の検査で採用された超音波検査は、甲状腺を目視でき、腫瘍の発見に効果的であるが、大規模な検査には時間がかかる。

スクリーニングに向いている血液検査に代わり、超音波検査が1次検査に採用された理由の一つとして、甲状腺癌の血液検査の課題が挙げられる。

現行の血液検査では、「甲状腺刺激ホルモン」や「サイログロブリン」が指標とされているが、これらは癌特異的な指標でないため、他の疾患や良性腫瘍でも高値になる、という課題がある。

## 2. 研究の目的

### (1) 目的：

本研究では現行の血液検査法の課題を克服するため、甲状腺癌の「癌抗原」を標的とした新しい血液検査法を開発、現行の指標と併用することで、大規模スクリーニングにも活用できる高精度な血液検査法を開発することを目的としている。

### (2) 甲状腺乳頭癌を認識する JT95 抗体：

癌抗原を取得する方法として、東京慈恵医大・武山らによって構築された JT95 抗体を用いる。この抗体を用いた臨床研究（病理切片を対象）では、JT95 抗体の陽性診断率は、甲状腺乳頭癌に対して 95% であった (Takeyama H et al., Cancer Res, 1996)。この認識特異性を生かして、本研究では甲状腺癌抗原の解析と、JT95 抗体の血液検査への応用を検討する。

### (3) 研究の位置づけ：

国内外において、血液中の癌胎児性フィブロネクチンの「mRNA」を標的とした甲状腺癌検査法の開発が行われている。

一方、本研究で用いる JT95 抗体の抗原は、甲状腺癌に特異的なフィブロネクチンと示唆されている。本研究では、他の検査法と組み合わせやすい「タンパク質」レベルでの検査法を開発を目標としており、本研究では癌抗原の分子構造（糖鎖構造等も含む分子

構造）に焦点を当て、進行度との関連、早期発見につながる知見を得ることを目的とした研究を遂行する。

## 3. 研究の方法

### (1) JT95 抗体が認識する癌抗原の分子構造の解明：

検査法の高精度化を目的として、癌抗原の分子構造を質量分析・生化学手法で解明する。これまでの検討で、甲状腺癌細胞株は2つの抗原構造（細胞型と分泌型）を持ち、また、細胞型はシアル酸糖鎖をもつことが示唆されている。

本研究では、甲状腺癌細胞株(SW1736細胞)の分泌型癌抗原をタンパク質・糖鎖レベルで検討した。

### (2) 甲状腺癌組織を用いた、ビオチン化 JT95 抗体の癌抗原検出能の検証：

微量抗原を精度良く検出する手法を開発する。これまでに構築してきた蛍光半導体ナノ粒子と JT95 抗体による検出法では、甲状腺癌細胞株由来の抗原を約 150 ng/mL の濃度で検出することに成功している (Fujioka K et al., J Nanomater., 2010)。

本検討では、先の科学研究費補助金による研究(研究代表者：藤岡宏樹、課題番号：22700906)で構築した「ビオチン化 JT95 抗体」を癌抗原の検出に用いる。甲状腺癌細胞株の抗原に対する反応を基準にした場合、JT95 抗体に対するスパーサー付きビオチン化試薬量の最適比が 1:100~200 であることを、これまでの研究で見いだしている。

本項では、これまでに行なってきた甲状腺癌細胞株を対象とした研究結果を更に発展させ、甲状腺癌患者の摘出組織に含まれる癌抗原への反応性を確かめる。試料として手術時に摘出した組織を用い、ビオチン化 JT95 抗体で染色、癌抗原の検出能を確かめた。

### (3) 癌抗原血液検査法の開発：

本項では、先の科学研究費補助金により構築された「JT95 抗体によるサンドイッチ ELISA 法」を発展させる。これまでの研究では、甲状腺癌細胞株を用いて癌抗原の検出を行ってきた。本検討では、甲状腺癌患者から採取された血液と対照者から採取された血液を試料に用いて、これまでに構築してきた検査法の精度を確かめた。

### (4) 臨床研究について

本研究の臨床研究を進めるにあたり、東京慈恵会医科大学倫理委員会から研究計画の審査・承認を受けた。また、対象者に対してインフォームドコンセントを行い、同意の得られた対象者からの試料を、本研究で使用させて頂いた。

## 4. 研究成果

### (1) JT95 抗体が認識する癌抗原の分子構造の

説明：

甲状腺癌の分泌型抗原を捕捉するため、SW1736 甲状腺癌細胞株の培地を試料に、ビオチン化 JT95 抗体と磁性ナノ粒子による免疫沈降を行なった。免疫沈降したサンプルをゲル電気泳動し染色したところ、目的の分子量と同じ部位にタンパク質のバンドを検出することができた。このバンドを切り出し、質量分析を行なったところ、2 つのタンパク質が癌抗原候補として挙げられた。

また、糖鎖アレイを用いて JT95 抗体が認識する糖鎖構造を検証したところ、プレリミナリーな結果であるが、シアル酸以外の糖鎖にも反応を示す可能性が示唆されている。

今後、これらのタンパク質と糖鎖構造について、精査を進め、より高精度な診断法の開発に生かしていきたい。

(2) 甲状腺癌組織を用いた、ビオチン化 JT95 抗体の癌抗原検出能の検証：

まず始めに、ビオチン化 JT95 抗体を用いて SW1736 細胞株の染色を行なった(Fujioka K et al., Bioimages, 2013)。検出試薬に HRP-streptavidin、または PE-streptavidin を用いた。これまでに我々が用いてきた酵素染色法(HRP による DAB 染色)に比べ、PE による蛍光染色法の方が視認性に優れており、より高感度に検出できる可能性が示唆された。

次に、穿刺吸引細胞診での癌抗原の検出を想定し、甲状腺乳頭癌患者から摘出された癌組織をスライドガラス上に接触させ、剥離した細胞を検出する方法を試みた(Fujioka K et al., Bioimages, 2013)。

剥離細胞について、甲状腺癌の診断に一般的に用いられているパパニコロウ染色を行なったところ、いくつかの核異型(核溝)が観察され、乳頭癌であることが示唆された。

ビオチン化 JT95 抗体を用いて、従来法である DAB 染色法を行なったところ、灰色のバックグラウンドに一部の細胞が染色されている像が観察された。また、PE 染色でも、いくつかの細胞が染色されていることが示された。この結果、本研究で用いたビオチン化 JT95 抗体が、甲状腺癌細胞株だけでなく甲状腺癌患者の癌組織にも反応を示すことがわかった。

また、癌組織の剥離細胞の観察においても、SW1736 細胞の染色結果と同様に、PE による蛍光染色法の方が視認性に優れている事が示唆された。今回、PE を用いた検討を先行して進めてきたが、今後、本法を発展させ蛍光半導体ナノ粒子を用いることで、更なる癌細胞検出の高感度化や検出法の安定性に貢献できる可能性がある。

(3) 癌抗原血液検査法の開発：

これまでの研究で構築してきたビオチン化 JT95 抗体単独によるサンドイッチ ELISA 法を用いて、甲状腺癌患者の血液中に含まれる癌抗原の検出を試みた。

この結果、甲状腺乳頭癌患者の血液中に含まれる癌抗原を検出できることが示唆された。一方、一部の対照者(乳癌患者)の血液にも甲状腺癌抗原を検出する場合や、甲状腺乳頭癌患者の血液に対して反応を示さない場合があることもわかった。

このため、現行の JT95 抗体単独のサンドイッチ ELISA 法単独では甲状腺癌のスクリーニングに用いることは難しいと考えられる。現在、他の検査指標との組み合わせによる検出精度について検証を行なっている。

(4) 研究成果のまとめ：

以上のように、本研究ではこれまでの研究を発展させ、JT95 抗体が認識する甲状腺癌抗原タンパク質の候補の絞り込みを行ない、また、ビオチン化 JT 抗体によって、癌組織の剥離細胞が認識できることを明らかにした。

一方、現行の JT95 抗体単独によるサンドイッチ ELISA 法のみでは、血液検査によるスクリーニングに適用することが難しいことも明らかとなった。より高い精度の血液検査法を開発するために、現在までに絞り込んだ癌抗原を同定し、JT95 抗体と新たな抗体を組み合わせた検出法の開発、または、新たな抗体同士を組み合わせた検出法の開発が必要であると考えられる。

今後も、本研究を推進し、大規模スクリーニングにも適用できる甲状腺癌の血液検査法の開発を進めていきたい。

<引用文献>

①Cardis E, Howe G, Ron E, Bebesko V, Bogdanova T, Bouville A, Carr Z, Chumak V, Davis S, Demidchik Y, Drozdovitch V, Gentner N, Gudzenko N, Hatch M, Ivanov V, Jacob P, Kapitonova E, Kenigsberg Y, Kesminiene A, Kopecky KJ, Kryuchkov V, Loos A, Pinchera A, Reiners C, Repacholi M, Shibata Y, Shore RE, Thomas G, Tirmarche M, Yamashita S, Zvonova I. Cancer consequences of the Chernobyl accident: 20 years on. J Radiol Prot. 2006, 26(2):127-40.

②Takeyama H, Hosoya T, Sakurai K, Mori Y, Watanabe M, Kisaki H, Ohno T. Production of a novel monoclonal antibody, JT-95, which can detect antigen of thyroid carcinoma. Cancer Res. 1996, 56(8):1817-22.

③Fujioka K, Oikawa T, Takeyama H, Usui R, Nomura M, Tomaru M, Ikeda K, Manome Y. Investigation of the Biotinylation Method for Detecting Thyroid Carcinoma-specific IgM Antibodies and the Detectability of Carcinoma Cells. Bioimages 2013, 21:1-5

④Fujioka K, Manabe N, Nomura M, Watanabe M, Takeyama H, Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K, Manome Y. Detection of Thyroid

Carcinoma Antigen with Quantum Dots and Monoclonal IgM Antibody (JT-95) System, Journal of Nanomaterials. 2010, 2010:937684.

研究者番号 : 70236511

馬目佳信(MANOME, Yoshinobu)  
東京慈恵会医科大学・医学部・教授  
研究者番号 : 30219539

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

①Fujioka K, Oikawa T, Takeyama H, Usui R, Nomura M, Tomaru M, Ikeda K, Manome Y. Investigation of the Biotinylation Method for Detecting Thyroid Carcinoma-specific IgM Antibodies and the Detectability of Carcinoma Cells. Bioimages 2013, 21:1-5. (査読有)  
DOI: 10.11169/bioimages.21.1

[学会発表] (計 4 件)

①Kouki Fujioka, Hiroshi Takeyama, Yoshinobu Manome: "Novel Detection Method of Papillary Thyroid Carcinoma in Tissue Samples". The 19<sup>th</sup> Japan-Korea Cancer Research Workshop (第19回日韓がんワークショップ). (20141128-20141129). 済州島(大韓民国)

②藤岡宏樹、馬目佳信、池田恵一、武山浩: "レクチンを使った甲状腺癌細胞株の糖鎖解析" 第46回日本甲状腺外科学会学術集会. (20130926-20130927). 愛知県産業労働センター (名古屋市)

③藤岡宏樹、池田恵一、武山浩、馬目佳信: "甲状腺癌細胞株の糖構造と浸潤能の比較" 第56回日本甲状腺学会学術集会. (20131114-20131116). 和歌山県民文化会館 (和歌山市)

④藤岡宏樹、池田恵一、武山浩、馬目佳信: "蛍光を使った甲状腺癌細胞検出法の開発と応用" 第55回日本甲状腺学会学術集会. (20121129). アクロス福岡 (福岡市)

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし

[その他]

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

藤岡 宏樹(FUJIOKA, Kouki)  
東京慈恵会医科大学・医学部・講師  
研究者番号 : 90392381

(2)研究協力者

武山 浩 (TAKEYAMA, Hiroshi)  
東京慈恵会医科大学・医学部・教授