

令和 2 年 11 月 27 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2016

課題番号：25870440

研究課題名（和文）SEREX法を応用したハイリスク甲状腺腫瘍の血清学的スクリーニング法の開発

研究課題名（英文）A New Serological Screening Method Developed from SEREX to Differentiate High-risk 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） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、甲状腺癌の90%以上を占める甲状腺乳頭癌（PTC）のうちハイリスクの患者を、超音波検査（US）や穿刺吸引細胞診（FNAC）に依存せず、安価かつ正確に診断する手法を開発するための基礎的研究を行った。我々が甲状腺未分化癌患者の腫瘍組織と患者血清にてクローニングしたWD repeat domain 1（WDR1）とFibronectin 1（FN1）に着目し、患者血清中の自己抗体と特異的に反応し予後不良のPTCを検出する12アミノ酸のペプチドを人工合成した。合成したペプチドにて癌特異的自己抗体の検出を行うことで、予後を反映したPTCの診断マーカー開発を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲状腺癌の多くは自覚症状に乏しく、進行が緩徐な甲状腺乳頭癌である。従来の検査方法では、早期に治療必要性の高い患者さんのみを簡便に発見し、治療することが困難であった。本研究の成果は、簡便な血液検査により治療が必要な甲状腺癌の患者さんを発見することにつながるものである。本研究成果が臨床応用されることにより、超音波検査や細胞診検査をはじめとする従来の検査を要さず病状の予測が可能となり、検査を受ける患者さんおよび検査を実施する医療従事者の負担軽減が期待される。

研究成果の概要（英文）： We promoted a basic research to investigate novel and inexpensive serological biomarkers for differentiating thyroid carcinoma, not dependent on common diagnostic method using ultrasound (US) and fine needle aspiration cytology (FNAC). To differentiate high-risk patients with papillary thyroid carcinoma (PTC), which consisted of more than 90% of thyroid carcinoma, we focused on WD repeat domain 1 (WDR1) and Fibronectin 1 (FN1) isolated from undifferentiated thyroid carcinoma (UTC). We conducted artificially-generated peptides consisted of 12 amino acids originated from WDR1 and FN1, and finally isolated specific peptides interacted to autoantibodies in the sera of PTC with poor prognosis.

We are now developing a new diagnostic method for detecting autoantibodies associated with prognosis of PTC.

研究分野：内分泌学

キーワード：甲状腺癌 SEREX ELISA WD repeat domain 1 Fibronectin 1 autoantibody

1. 研究開始当初の背景

(1) 画像診断の普及と汎用に伴い、甲状腺結節性病変の診療頻度が増加している。これらの良悪性判定には超音波を中心とした画像検査が有用であるが、診断医の経験に左右され易い。また超音波で診断される結節のうち悪性の頻度は5~10%程度と高くなく、健康診断や一般診療におけるスクリーニングではより簡便な方法が求められる。また超音波で指摘された結節の良悪性鑑別において穿刺吸引細胞診(FNA)は最も有用な方法であるが、適応や検査結果の判定には熟練を要す。

一方で非常に高頻度の良性結節を含む全例にFNAを適応することは、実施可能施設、検査侵襲、医療経済面で問題がある。また、甲状腺癌の90%以上は比較的予後の良いとされるPTCであり¹⁾過剰診断の指摘があるが、PTCの一部に認められる予後不良例を早期に鑑別診断する方法がない点は極めて重要な課題である。

(2) 我々は予後不良のPTCを想定し、悪性腫瘍に対する自己免疫反応の結果産生される患者自身の抗体を利用して癌特異抗原を同定する Serological identification of antigens by recombinant expression cloning (SEREX) を応用した血清診断方法の開発を進め、WD repeat family の1つであるWD repeat domain 1 (WDR1) のC末端側をクローニングに成功した²⁾。SEREXは、癌に対する自己免疫反応の結果産生される患者自身の抗体を利用して癌特異抗原を同定するものである。WDR1は細胞骨格の形成、actin重合に関わる機能が証明され、細胞増殖において重要な機能を担っていると考えられている³⁾。ヒトにおける機能については不明な点が多いが、幅広い組織での発現が報告されており、WDR1そのものを応用する場合、抗原に疾患特異性は期待しにくい。しかし抗体に着目した場合は、抗原が検出可能となるより早期に検出可能となりうる⁴⁾ため、非侵襲的に癌の早期発見が期待される。

(3) 我々は、クローニングしたWDR1 isoform 1のC末端フラグメントに対する特異的免疫反応をELISAにて解析した。抗WDR1抗体価をELISA法にて定量した結果、抗体価はPTC、未分化癌(UTC)において良性結節性病変(BTN)、自己免疫性甲状腺疾患(AITD)、健常人(N)と比較して有意に高値($p < 0.001$)であった。ROC曲線でcut off 0.95としたときに、甲状腺癌を健常人から判別するための感度96.7%、特異度91.9% (AUC 0.969, $p < 0.001$)と良好であった²⁾。

本研究は以上の我々の先行研究における知見を踏まえ、SEREX法を応用してクローニングした抗原に対する血清中抗体価をELISAにて定量し、精度の高い血清学的診断マーカーを確立することを目指すものである。

2. 研究の目的

(1) SEREXによりクローニングされたWDR1の全長およびN末端フラグメントの recombinant 蛋白合成

(2) WDR1のアミノ酸配列を参考にして作成した合成ペプチドを用いた抗WDR1抗体検出システムの開発

(3) SEREXによりクローニングされた Fibronectin 1 (FN1) の臨床的意義に関する検討

(4) 抗WDR1抗体と抗FN1抗体を用いた診断システムの開発

3. 研究の方法

(1) WDR1 全長および N 末端フラグメントの recombinant 蛋白作成

GST 結合蛋白として大腸菌にて合成したWDR1のC末端フラグメントを用いて得られた抗WDR1抗体に関する知見²⁾に関連し、WDR1のC末端側に存在するエピトープを証明するために、GSTを含まないWDR1の作成を試みた。大腸菌ベクター-pMK-RQ (kanR) に人工合成した全長WDR1 cDNAを挿入し、プラスミド増幅を行ったうえで、His タグを用いて全長、N末端フラグメント、C末端フラグメントの3種類の recombinant 蛋白を合成することとした。大腸菌を用いた発現系にて抗原蛋白の確保が困難な場合は、酵母を用いた発現系を用いることとした。

(2) WDR1 のアミノ酸配列を参考にして作成した合成ペプチドを用いた抗 WDR1 抗体検出システムの開発

大腸菌や酵母による抗原蛋白の安定した供給が困難であったことから、WDR1の全アミノ酸配列および bioinformatics により予測される2次元構造や3次元構造を参考に患者血清中の自己抗体が認識可能なアミノ酸配列をカバーする12アミノ酸からなるペプチドライブラリーを設計した。合成ペプチドは、比較的安価に高純度なペプチドの合成が可能なPEP screen (Sigma-Aldrich Japan) を使用した。WDR1全長を網羅する約100種類の合成ペプチドをUTCとBTNの患者血清にて1次スクリーニングを実施し、候補領域の絞り込みを行った。さらに候補領域をSigma-Aldrich Japanの高純度ペプチド(純度>90%)にて2次スクリーニングを行い、患者血清の識別に特に優れるペプチドを抗WDR1抗体の検出に用いることとした。

なお患者血清と合成ペプチドの反応性を検討するELISAの条件設定は、フロンティア研究所(北海道石狩市)に委託して実施した。

(3) SEREX によりクローニングされた Fibronectin 1 (FN1) に対する自己抗体の臨床的意義に関する検討

SEREXにてクローニングしたFN-1の意義を

検討するため、進行 PTC の病変部分と正常甲状腺組織よりそれぞれ total RNA を抽出し、発現アレイにて関連する分子の発現状況を確認した。クラスタリング解析、gene ontology 解析を追加し、FN-1 に関連する分子の PTC 病変部における発現を評価した。

(4) 抗 WDR1 抗体と抗 FN1 抗体を用いた診断システムの開発

FN-1 についても大腸菌や酵母を用いた recombinant 蛋白の合成が困難と予想されたことから、抗 WDR1 抗体の検出手法と同様に FN-1 の全アミノ酸配列をもとに 2 次元構造や 3 次元構造を予測し、患者血清中自己抗体の反応性が得られやすい領域を網羅する 12 ペプチドからなるペプチドライブラリーを人工合成した。PTC、UTC、BTN、健常者の血清にてスクリーニングした。

4. 研究成果

(1) SEREX によりクローニングされた WDR1 の全長および N 末端フラグメントの recombinant 蛋白合成

GST 結合 WDR1 を抗原として用いる方法にて抗 WDR1 抗体を検出することで甲状腺癌の血清診断が可能となることが期待される点については、2013 年に Clinical Endocrinology (Oxf) へ発表した⁵⁾。この成果においては抗 WDR1 抗体の検出を GST 結合 WDR1 とコントロールである GST 蛋白を用いて行うことから多数検体を扱う際には煩雑な操作が必要であった。そこで GST を含まない形での WDR1 蛋白の人工合成を試みたが、大腸菌を用いた方法、酵母を用いた方法のいずれにおいても合成効率が極めて悪く、かつ不純物も同時に多く産生され、ELISA にて抗 WDR1 抗体価を測定するために安定性も満足できるものではなかった。2 次元構造、3 次元構造を検討すると、WDR1 は疎水性領域を多く含んでおり、高分子の recombinant 蛋白の人工合成は極めて不利であることが判明したため、新たな研究方法として(2)を用いることとした。

(2) WDR1 のアミノ酸配列を参考にして作成した合成ペプチドを用いた抗 WDR1 抗体検出システムの開発

(1) で得られた知見を踏まえ、WDR1 の全アミノ酸配列をカバーするペプチドライブラリーを PEP screen を利用して合成した。PEP screen により作成した合成ペプチドを文献 5) において用いた UTC および BTN 患者血清との反応性を ELISA にて検出し、UTC に高い反応性が得られるペプチドを選択するための 1 次スクリーニングを行った。

UTC にて高い反応性が得られるペプチドの近傍については WDR1 のアミノ酸配列より予想される 2 次元構造や 3 次元構造も考慮した高純度合成ペプチド(純度 >90%)を作成し、2 次スクリーニングを実施した。

その結果、特に進行性の甲状腺癌である

UTC と進行性 PTC の患者血清中において高い反応性が得られたペプチドについて、2018 年 3 月に特許出願を行った。

(3) SEREX によりクローニングされた Fibronectin 1 (FN1) の臨床的意義に関する検討

文献 5) において、WDR1 以外に FN-1 に対する血清中自己抗体の存在が UTC 患者に予想されたことから、本学倫理委員会の承認を得た方法で提供を受けた進行 PTC 患者の腫瘍組織と付随する正常甲状腺組織より total RNA を抽出し、発現アレイにより関連する分子の発現状況を確認した。その結果、FN-1 をはじめとする細胞骨格形成、遊走等に関連する分子が腫瘍組織特異的に発現していることがクラスタリング解析、gene ontology 解析等にて確認された。

(4) 抗 WDR1 抗体と抗 FN1 抗体を用いた診断システムの開発

(3) の知見を踏まえ、FN-1 に対する自己抗体の意義を検討した。FN-1 は WDR1 と比較しても高分子量であり、全アミノ酸配列を網羅する合成ペプチドの作成は困難であったことから、文献 5) においてクローニングした領域とアミノ酸配列より予想される親水性領域を網羅できるようなペプチド設計を行った。倫理委員会の承認を得た方法で提供を受けた UTC、BTN の血清を用いて 1 次スクリーニングを行った。さらに FN1 のアミノ酸配列より予想される 2 次元構造や 3 次元構造も考慮した高純度合成ペプチド(純度 >90%)を作成し、2 次スクリーニングを実施し、特に UTC および進行性 PTC の患者血清中において高い反応性が得られたペプチドについて、WDR1 同様に 2018 年 3 月に特許出願を行った。

我々は、(2) および (4) の結果を踏まえ、新たに「平成 28 年度 日本医療研究開発機構研究費 橋渡し研究・新規開発シーズ(シーズ A・九州大学公募)」、「平成 28~29 年度 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)、若手研究(B)」、「平成 30~令和 2 年度 科学研究費助成事業(学術研究助成基金助成金)、基盤研究(C)」の採択を得て、本研究課題の実用化、臨床応用を目標に研究を継続している。

(引用文献)

- 1) Davies, L, et al, JAMA, 295: 2164-2167, 2006
- 2) Izawa S, et al, 92nd Annual Meeting & Expo, ENDO 2010 (2010.6.19)
- 3) Kato A, et al, Biochem J, 414: 261-70, 2008
- 4) Tan HT, et al, FEBS Journal, 276: 6880-6904, 2009
- 5) Izawa S, et al, Clin Endocrinol (Oxf) 79, 35-42, 2013

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2件)

Izawa S, Okamura T, Matsuzawa K, Ohkura T, Ohkura H, Ishiguro K, Noh JY, Kamiyo K, Yoshida A, Shigemasa C, Kato M, Yamamoto K, Taniguchi SI. Autoantibody against WD repeat domain 1 is a novel serological biomarker for screening of thyroid neoplasia. Clin Endocrinol (Oxf) 79, 35-42, 2013 DOI: 10.1111/cen.12121 査読有

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 2件)

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. 九州大学医学部百年講堂(福岡県・福岡市), 2016年10月31日

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. 仙台国際センター(宮城県・仙台市), 2019年5月9日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

伊澤 正一郎. がんの判定法(特願2018-045806), 2018年3月13日

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

鳥取大学医学部 病態情報内科(第一内科) 研究紹介

<http://www2.hosp.med.tottori-u.ac.jp/medicine1/1448/8771.html>

6. 研究組織

(1)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

(2)研究分担者

無

(3)連携研究者

無

(4)研究協力者

谷口 晋一(TANIGUCHI, Shin-ichi)

松澤 和彦(MATSUZAWA, Kazuhiko)

大倉 裕子(OHKURA, Hiroko)

石黒 清介(ISHIGURO, Kiyosuke)

野口 仁志(NOGUCHI, Hitoshi)

菊池 唯史(KIKUCHI, Tadashi)

日野 智也(HINO, Tomoya)

古賀 敦朗(KOGA, Atsuro)