

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2019-525160
(P2019-525160A)

(43) 公表日 令和1年9月5日(2019.9.5)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/574 (2006.01)	GO 1 N 33/574 A	4 B 0 6 3
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 O 1 A	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 Q 1/25 (2006.01)	C 1 2 Q 1/25	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-569007 (P2018-569007)
 (86) (22) 出願日 平成29年7月3日 (2017.7.3)
 (85) 翻訳文提出日 平成31年2月28日 (2019.2.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2017/007042
 (87) 国際公開番号 WO2018/004321
 (87) 国際公開日 平成30年1月4日 (2018.1.4)
 (31) 優先権主張番号 10-2016-0083361
 (32) 優先日 平成28年7月1日 (2016.7.1)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関 韓国 (KR)

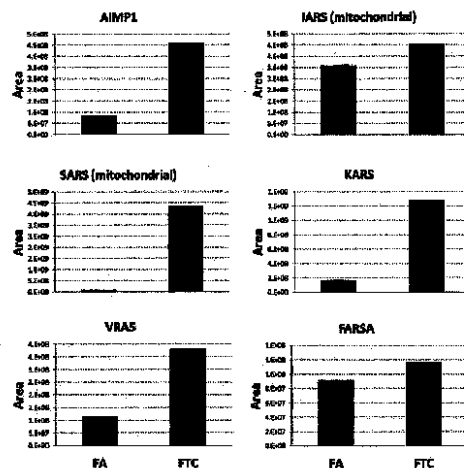
(71) 出願人 514070937
 メディシナル バイオコンバージェンス
 リサーチ センター
 大韓民国 443-270 キョンギド
 スウォンシ ヨントング クァンギ
 ヨーロ 145 アドバンスド インステ
 イチューツ オブ コンバージェンス テ
 クノロジー ビードン 8階 (イウイ
 ドン)
 (71) 出願人 514318677
 ザ アサン ファウンデーション
 大韓民国 138-736 ソウル ソン
 パグ オリピック-ロ 43-ギル
 88 (プンナプ-ドン)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アミノアシル tRNA 合成酵素関連タンパク質発現水準を利用した甲状腺濾胞癌診断用組成物と診断マーカー検出方法

(57) 【要約】

本発明は、アミノアシルtRNA合成酵素関連タンパク質発現水準を利用した甲状腺濾胞癌診断用マーカーの検出方法に関するもので、より具体的には、甲状腺濾胞癌 (follicular thyroid carcinoma) が疑われる患者から甲状腺濾胞癌の診断に必要な情報を提供するために、(a) 甲状腺濾胞癌が疑われる被検体から試料を提供する段階; (b) 前記試料からアミノアシルtRNA合成酵素又はアミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質のタンパク質発現水準を測定する段階; 及び(c) 前記測定されたタンパク質発現水準を対照群と比較して、タンパク質発現水準の変化が確認された被検体を甲状腺濾胞癌にかかったと判定する段階を含む、甲状腺濾胞癌のマーカーを検出する方法に関するものである。具体的には、本発明に開示されているタンパク質の種類は、手術を通じた組織の採取なく、シンプルで明確に甲状腺濾胞癌の診断が可能であり、診断感度及び特異性が高い。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

甲状腺濾胞癌の診断に必要な情報を提供するために、

(a) 甲状腺濾胞癌が疑われる被検体から試料を提供する段階;

(b) 前記試料からアミノアシルtRNA合成酵素又はアミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質のタンパク質発現水準を測定する段階;及び

(c) 前記測定されたタンパク質発現水準を対照群と比較して、タンパク質発現水準の変化が確認された被検体を甲状腺濾胞癌にかかったと判定する段階を含む、甲状腺濾胞癌のマーカーを検出する方法。

【請求項 2】

前記試料は、甲状腺組織、血液、血漿、血清、リンパ液及び尿から選ばれることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

前記対照群は、甲状腺濾胞腺腫が確認された患者であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

前記タンパク質発現水準の変化は、アミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質1(AIMP1)、ミトコンドリア型イソロイシンtRNA合成酵素 (IARS mitochondrial)、ミトコンドリア型セリンtRNA合成酵素(SARS mitochondria)、リジンtRNA合成酵素(KARS)、バリンtRNA合成酵素(VARS)及びフェニルアラニンtRNA合成酵素アルファサブユニット(FARSA)から選ばれた一つ以上のタンパク質の発現水準の増加であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 5】

前記タンパク質発現水準の変化は、アラニンtRNA合成酵素(AARS)、アスパラギン酸tRNA合成酵素(DARS)、二機能性グルタミン酸プロリンtRNA合成酵素(EPRS)、トリプトファンtRNA合成酵素(WARS)、グリシンtRNA合成酵素(GARS)、細胞質型イソロイシンtRNA合成酵素(IARS cytoplasmic)、チロシンtRNA合成酵素(YARS)、アスパラギンtRNA合成酵素(NARS)、グルタミンtRNA合成酵素(QARS)、アルギニンtRNA合成酵素(RARS)、細胞質型セリンtRNA合成酵素(SARS cytoplasmic)及びトレオニンtRNA合成酵素(TARS)から選ばれた一つ以上のタンパク質の発現水準の減少であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 6】

前記タンパク質水準測定は、ウエスタンブロット(western blotting)、ドットブロット(dot blotting)、酵素免疫分析法(enzyme-linked immunosorbent assay、ELISA)、放射免疫分析法(RIA)、放射免疫拡散法、オクタロニー免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動、免疫組織化学染色、免疫沈殿法(immunoprecipitation)、補体固定分析法、フローサイトメトリー分析法(FACS)、タンパク質チップ(chip)及び質量分析(mass spectrometry)法から選ばれるいずれか一つによることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 7】

アミノアシルtRNA合成酵素又はアミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質の発現水準を測定する製剤を含む甲状腺濾胞癌の診断用組成物。

【請求項 8】

前記アミノアシルtRNA合成酵素(ARS)は、ミトコンドリア型イソロイシンtRNA合成酵素(IARS mitochondrial)、ミトコンドリア型セリンtRNA合成酵素 (SARS mitochondrial)、リジンtRNA合成酵素(KARS)、バリンtRNA合成酵素(VARS)、フェニルアラニンtRNA合成酵素アルファサブユニット(FARSA)、アラニンtRNA合成酵素(AARS)、アスパラギン酸tRNA合成酵素(DARS)、二機能性グルタミン酸プロリンtRNA合成酵素(EPRS)、トリプトファンtRNA合成酵素(WARS)、グリシンtRNA合成酵素(GARS)、細胞質型イソロイシンtRNA合成酵素(IARS cytoplasmic)、チロシンtRNA合成酵素(YARS)、アスパラギンtRNA合成酵素(NARS)、グルタミンtRNA合成酵素(QARS)、アルギニンtRNA合成酵素(RARS)及び細胞質型セリンtRNA合成酵素(SARS cytoplasmic)及びトレオニンtRNA合成酵素(TARS)から選ばれる一つ以上であること

10

20

30

40

50

を特徴とする請求項 7 記載の組成物。

【請求項 9】

前記アミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質(AIMP)は、アミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質1(AIMP1)であることを特徴とする請求項 7 記載の組成物。

【請求項 10】

前記の診断は、甲状腺濾胞癌と濾胞腺腫を区別することを特徴とする請求項 7 記載の組成物。

【請求項 11】

前記タンパク質を検出する製剤は、前記タンパク質に特異的な結合ドメインを有するペプチド、抗体、又はアプタマーであることを特徴とする請求項 7 記載の組成物。

【請求項 12】

請求項 7 の組成物を含む甲状腺濾胞癌診断用キット。

【請求項 13】

前記アミノアシルtRNA合成酵素(ARS)は、ミトコンドリア型イソロイシンtRNA合成酵素(IARS mitochondrial、GenBank GI No. 94730583)、ミトコンドリア型セリンtRNA合成酵素(SARS mitochondria、GenBank GI No. 23822219)、リジンtRNA合成酵素(KARS、GenBank GI No. 20178333)、パリンtRNA合成酵素(VARS、GenBank GI No. 1194845281)、フェニルアラニンtRNA合成酵素アルファサブユニット(FARSA、GenBank GI No. 12643946)、アラニンtRNA合成酵素(AARS、GenBank GI No. 115502460)、アスパラギン酸tRNA合成酵素(DARS、GenBank GI No. 20178330)、二機能性グルタミン酸プロリンtRNA合成酵素(EPRS、GenBank GI No. 288558855)、トリプトファンtRNA合成酵素(WARS、GenBank GI No. 135191)、グリシンtRNA合成酵素(GARS、GenBank GI No. 313104283)、細胞質型イソロイシンtRNA合成酵素(IARS cytoplasmic、GenBank GI No. 239938717)、チロシンtRNA合成酵素(YARS、GenBank GI No. 13638438)、アスパラギンtRNA合成酵素(NARS、GenBank GI No. 3915059)、グルタミンtRNA合成酵素(QARS、GenBank GI No. 1351170)、アルギニンtRNA合成酵素(RARS、GenBank GI No. 20178331)及び細胞質型セリンtRNA合成酵素(SARS cytoplasmic、GenBank GI No. 19860217)及びトレオニンtRNA合成酵素(TARS、GenBank GI No. 60267755)から選ばれる一つ以上であることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

【請求項 14】

前記アミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質(AIMP)は、アミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質1(AIMP1、GenBank GI No. 215490009)であることを特徴とする請求項 1 記載の組成物。

【請求項 15】

甲状腺濾胞癌の診断用製剤を製造するための、アミノアシルtRNA合成酵素又はアミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質の発現水準を測定する製剤の使用。

【請求項 16】

被検体試料内のアミノアシルtRNA合成酵素又はアミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質の発現水準を測定することを特徴とする甲状腺濾胞癌を診断する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、アミノアシルtRNA合成酵素関連タンパク質発現水準を利用した甲状腺濾胞癌(follicular thyroid carcinoma)の診断マーカー検出方法に関するもので、より具体的には、甲状腺濾胞癌が疑われる患者から甲状腺濾胞癌の診断に必要な情報を提供するために、(a)甲状腺濾胞癌が疑われる被検体から試料を提供する段階;(b)前記試料からアミノアシルtRNA合成酵素(aminoacyl-tRNA synthetase)又はアミノアシルtRNA合成酵素複合体相

10

20

30

40

50

相互作用多機能タンパク質(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein)のタンパク質発現水準を測定する段階;及び(c)前記測定されたタンパク質発現水準を対照群と比較して、タンパク質発現水準の変化が確認された被検体を甲状腺濾胞癌にかかったものと判定する段階を含む、甲状腺濾胞癌のマーカーを検出する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

本出願は、2016年7月1日に出願された大韓民国特許出願第10-2016-0083361号に基づく優先権を主張し、前記出願の明細書全体は参照により本出願に援用する。

【0003】

甲状腺癌全体の約20%程度を占める甲状腺濾胞癌(follicular thyroid carcinoma)は、女性から多く発生し、予後が良い分化甲状腺癌に属する。甲状腺濾胞癌は、甲状腺癌の殆どを占める甲状腺乳頭癌(papillary thyroid carcinoma)と比較して、年をとった年齢層に主に表われ、甲状腺乳頭癌は主にリンパ節を通じて転移が行われるのに対し、甲状腺濾胞癌は血管を通じて転移が行われることに違いがある。一方、甲状腺乳頭癌は、特徴的な核の形態を観察して比較的容易に微細針吸引検査で診断が可能であるが、甲状腺濾胞癌は明確な基準が確立されていないため、正確な診断に困難が存在する。特に甲状腺の良性腫瘍である濾胞腺腫(follicular adenoma)の20~30%は、微細針吸引検査によって甲状腺濾胞癌との識別が不可能なため、甲状腺濾胞癌が濾胞腺腫に分類される場合も発生する。

【0004】

現在、甲状腺濾胞癌を確診するためには、手術を通じて甲状腺組織を採取して組織内病理を確認する方法が殆どである。このように手術を含む病理検査は、まず結節が発見された甲状腺の半分を手術で切除して組織検査を実施し、その後甲状腺濾胞癌に診断されると、予後が良い初期癌を除いては、再び手術を通じて残りの半分を除去しなければならないため、極めて面倒な方法である。したがって、微細針吸引検査時に得られる甲状腺組織又は血液から、甲状腺濾胞癌と濾胞腺腫とを区別して甲状腺濾胞癌を確診できるバイオマーカーの開発が必要である。特にタンパク質ベースのバイオマーカーを開発すれば、抗体などを利用してそのマーカーの発現水準を測定して、診断に必要な情報を迅速に導出することができ、病理検査のための手術をする必要がない。

【0005】

甲状腺濾胞癌のバイオマーカーとして提案されたことのあるBRAF、RET/PTC、RAS、PAX8/PPAR gamma、P53などの遺伝子の突然変異は、その発生率が低いいため、実際に診断には活用されていない。またELMO1、EMCN、ITIH5、KCNAB1、SLC02A1など5つの遺伝子の発現水準が甲状腺濾胞癌組織において、濾胞腺腫組織と比較して減少したことを確認した研究は、甲状腺濾胞癌と濾胞腺腫を区別できるマーカーとして開発される可能性を提示したが、これは組織からmRNAを抽出する過程を経なければならないなど、マーカーとして活用するには制限が多い(非特許文献1)。甲状腺癌を判別するタンパク質マーカーが組織免疫染色法に活用されているが、甲状腺濾胞癌と濾胞腺腫の区別に活用できる可能性が殆どない程に特異性が低い(非特許文献2)。

【0006】

これにより、甲状腺濾胞癌と濾胞腺腫などの良性腫瘍とを明確に区別できるバイオマーカーの開発が至急な実情である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Pfeifer et al., BMC Medical Genomics, 2013, 6:380

【非特許文献2】Wiseman SM et al., Annals of Surgical Oncology, 2008, 15:2811-28

26

【発明の概要】

【0008】

10

20

30

40

50

[発明の詳細な説明]

[技術的課題]

ここに本発明者らは、甲状腺濾胞癌と濾胞腺腫が確認された患者から病理組織を採取して質量分析で幅広いタンパク質の水準を分析した結果、多数のアミノアシルtRNA合成酵素(aminoacyl-tRNA synthetase)関連タンパク質水準が、甲状腺濾胞癌と濾胞腺腫組織から異なって示されることを確認して本発明を完成した。

【 0 0 0 9 】

したがって本発明の目的は、

甲状腺濾胞癌の診断に必要な情報を提供するために

(a) 甲状腺濾胞癌が疑われる被検体から試料を提供する段階;

10

(b) 前記試料からアミノアシルtRNA合成酵素(aminoacyl-tRNA synthetase、ARS)又はアミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein、AIMP)のタンパク質発現水準を測定する段階;及び

(c)前記測定されたタンパク質発現水準を対照群と比較して、タンパク質発現水準の変化が確認された被検体を甲状腺濾胞癌にかかったと判定する段階を含む、甲状腺濾胞癌のマーカを検出する方法を提供することである。

【 0 0 1 0 】

[技術的解決方法]

前記と同じ目的を達成するために、本発明は、

20

甲状腺濾胞癌の診断に必要な情報を提供するために

(a) 甲状腺濾胞癌が疑われる被検体から試料を提供する段階;

(b)前記試料からアミノアシルtRNA合成酵素又はアミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質のタンパク質発現水準を測定する段階;及び

(c)前記測定されたタンパク質発現水準を対照群と比較して、タンパク質発現水準の変化が確認された被検体を甲状腺濾胞癌にかかったと判定する段階を含む、甲状腺濾胞癌のマーカを検出する方法を提供する。

【 0 0 1 1 】

以下、本発明を詳細に説明する。

【 0 0 1 2 】

30

本発明は、甲状腺濾胞癌の診断に必要な情報を提供するために

(a) 甲状腺濾胞癌が疑われる被検体から試料を提供する段階;

(b)前記試料からアミノアシルtRNA合成酵素又はアミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質のタンパク質発現水準を測定する段階;及び

(c)前記測定されたタンパク質発現水準を対照群と比較して、タンパク質発現水準の変化が確認された被検体を甲状腺濾胞癌にかかったと判定する段階を含む、甲状腺濾胞癌のマーカを検出する方法を提供する。

【 0 0 1 3 】

前記(a)段階は、本発明の方法により、甲状腺濾胞癌が疑われる患者から甲状腺濾胞癌の診断に必要な情報を提供するために、被検体の試料を提供する段階である。

40

【 0 0 1 4 】

本発明で“診断”とは、病理状態の存在又は特徴を確認することを意味する。本発明での診断は、アミノアシルtRNA(ARS)又はアミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質(AIMP)の発現水準を測定して甲状腺濾胞癌が発生したものと判定することであり、特に濾胞腺腫と同じ良性腫瘍と区分して、甲状腺濾胞癌であることを確認することを意味する。

【 0 0 1 5 】

“甲状腺濾胞癌(follicular thyroid carcinoma、FTC)”とは、甲状腺に生じる悪性腫瘍にして、主に甲状腺ホルモンの生成と関連がある腺組織から発症する甲状腺分化癌の一種であり、血液を通じて他の組織に転移される特徴がある。甲状腺濾胞癌は、主に健康検

50

診の超音波検査又は触診などによって、痛症なく偶然、甲状腺結節に発見される場合が多い。甲状腺癌は、甲状腺超音波検査を通じて甲状腺腫瘍のサイズ、位置、形状などが確認され、超音波で甲状腺を観察しながら微細針で甲状腺を刺して甲状腺細胞を採取し、細胞の形状を確認して診断を決めることになるが(微小針吸引細胞検査、fine needle aspiration cytology)、甲状腺濾胞癌の場合には、細胞の形状が濾胞腺腫(follicular adenoma、FA)など良性腫瘍のように区分されない。したがって、現在の診断方法は、病理組織を外科的方法で採取して、組織検査によって最終確認するため、悪性腫瘍であることが確かでないにもかかわらず手術をしなければならず、悪性腫瘍であることが確認されると、腫瘍を完全に除去するために再手術をしなければならない場合も生じるなど効率的でない。

【0016】

ここで、本発明の方法は、甲状腺に腫瘍や結節が発見されて腫瘍の悪性の有無を確認しなければならない患者から、非外科的な方法で、甲状腺濾胞癌を明確に診断することができる新たな診断マーカーと方法を提供するためのものである。

【0017】

一実施例で本発明者らは、甲状腺濾胞癌と濾胞腺腫組織から質量分析とタンパク質シーケンシングで合わせて4000個以上のタンパク質を同定して、両病理組織でのタンパク質水準を比較分析した。遺伝子オントロジー(Gene ontology)分析の結果、濾胞腺腫では、酸化還元(oxidation/reduction)、タンパク質局在(protein localization)、細胞内輸送(intracellular transport)と関連したタンパク質が顕著な反面、甲状腺濾胞癌ではタンパク質分解(proteolysis)、高分子異化過程(macromolecule catabolic process)、RNAプロセッシング(RNA processing)そして細胞周期(cell cycle)と関連したタンパク質が優勢なものと示された。

【0018】

特に前記同定されたタンパク質のうち、アミノアシルtRNA合成酵素と、これと関連したタンパク質について、質量分析ピーク面積(MS peak area)を利用して定量分析を実施した結果、多数のタンパク質が、甲状腺濾胞癌と濾胞腺腫で存在水準が異なることを確認した。具体的に、AARS、DARS、EPRS、WARS、GARS、細胞質型IARS(IARS cytoplasmic)、YARS、NARS、QARS、RARS、細胞質型(SARS cytoplasmic)、TARSは、濾胞腺腫と比較して甲状腺濾胞癌でタンパク質水準が減少したことが観察され、逆にAIMP1、ミトコンドリア型IRS(IRS mitochondrial)、ミトコンドリア型SARS(SARS mitochondrial)、KARS、VARS、FARSAは、甲状腺濾胞癌でタンパク質水準が高いことが確認された。

【0019】

したがって、本発明者らが究明した前記アミノアシルtRNA合成酵素とこれと関連したタンパク質水準の差を利用して、記載された前記タンパク質のうち一つの種類以上を選択して被検体の試料からタンパク質水準を測定することにより、細胞学的には区分が難しい甲状腺濾胞癌と濾胞腺腫を区別できる診断用マーカーに開発することができることを理解することができる。

【0020】

前述した通り、本発明の方法での被検体は、甲状腺濾胞癌が疑われる患者でもある。つまり、甲状腺に腫瘍や結節が発見されて腫瘍や結節が悪性の甲状腺濾胞癌であるのか、良性の濾胞腺腫であるのかの区別が必要な患者が被検体となる。

【0021】

また、本発明の方法を実施するための試料は、甲状腺組織、血液、血漿、血清、リンパ液及び尿から選ばれるものでもある。前記試料は、公知の方法により被検体から適宜採取することができ、タンパク質検出方法によって必要な前処理過程を経ることがある。

【0022】

前記(b)段階は、(a)段階で採取した被検体の試料からアミノアシルtRNA合成酵素又はアミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質のタンパク質発現水準を測定する段階である。

【0023】

10

20

30

40

50

本発明で“タンパク質”とは、“ポリペプチド(poly peptide)”又は“ペプチド(peptide)”と互換性を有して使用され、例えば、天然状態のタンパク質から一般的に発見されるようにアミノ酸残基の重合体を意味する。

【0024】

本発明の“アミノアシルtRNA合成酵素(aminoacyl-tRNA synthetase又はaminoacyl-tRNA ligase、ARS)”とは、アミノ酸を適切なtRNAに連結させるアミノアシル化(aminoacylation)反応を媒介する酵素である。tRNA結合酵素(tRNA ligase)とも称す。20種のアミノ酸のうち、グルタミン酸(glutamic acid)とプロリン(proline)は、細胞質では一つのARSによってtRNAに連結されるが、これを二機能性アミノアシルtRNA合成酵素(bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase)又は二機能性グルタミン酸プロリンtRNA合成酵素(bifunctional glutamyl-prolyl-tRNA synthetase)と称す。ARSは大きくtRNAのアデノシンヌクレオチドの2'-OH末端にアミノアシル化(amino acylation)反応を媒介するClass I系と、3'-OH末端にアミノアシル化(amino acylation)反応を媒介するClass II系に分けられる。Class Iにはアルギニン(arginine)、システイン(cysteine)、グルタミン酸(glutamic acid)、グルタミン(glutamine)、イソロイシン(isoleucine)、ロイシン(leucine)、メチオニン(methionine)、トリプトファン(tryptophan)、バリン(valine)、チロシン(tyrosine)のtRNA合成酵素があり、Class IIにはアラニン(alanine)、アスパラギン酸(aspartic acid)、アスパラギン(asparagine)、グリシン(glycine)、ヒスチジン(histidine)、リジン(lysine)、フェニルアラニン(phenylalanine)、プロリン(proline)、トレオニン(threonine)、セリン(serine)のtRNA合成酵素がある。

10

20

【0025】

また、細胞内分布位置によって、細胞質型(cytoplasmic)又はミトコンドリア型(mitochondrial)で存在し、本明細書では、別の表示がなければ細胞質に存在する形態であることを意味する。

【0026】

本発明の観点から、甲状腺濾胞癌を診断するためのバイオマーカーとしてARSは、より具体的には、ミトコンドリア型イソロイシンtRNA合成酵素(isoleucyl-tRNA synthetase mitochondrial、IARS mitochondrial)、ミトコンドリア型セリンtRNA合成酵素(seryl-tRNA synthetase mitochondrial、SARS mitochondrial)、リジンtRNA合成酵素(lysyl-tRNA synthetase、KARS)、バリンtRNA合成酵素(valyl-tRNA synthetase、VARs)、フェニルアラニンtRNA合成酵素アルファサブユニット(phenylalanyl-tRNA synthetase、FARS alpha subunit(FARSA))、アラニンtRNA合成酵素(alanyl-tRNA synthetase、AARS)、アスパラギン酸tRNA合成酵素(aspartyl-tRNA synthetase、DARS)、二機能性グルタミン酸プロリンtRNA合成酵素(bifunctional aminoacyl-tRNA synthetase又はglutamyl-prolyl-tRNA synthetase、EPRS)、トリプトファンtRNA合成酵素(tryptophanyl-tRNA synthetase、WARS)、グリシンtRNA合成酵素(glycyl-tRNA synthetase、GARS)、細胞質型イソロイシンtRNA合成酵素(isoleucyl-tRNA synthetase cytoplasmic、IARS cytoplasmic)、チロシンtRNA合成酵素(tyrosyl-tRNA synthetase、YARS)、アスパラギンtRNA合成酵素(asparagyl-tRNA synthetase、NARS)、グルタミンtRNA合成酵素(glutamyl-tRNA synthetase、QARS)、アルギニンtRNA合成酵素(arginyl-tRNA synthetase、RARS)、細胞質型セリンtRNA合成酵素(seryl-tRNA synthetase cytoplasmic、SARS cytoplasmic)及びトレオニンtRNA合成酵素(threonyl-tRNA synthetase、TARS)の中から選択された一つ以上のタンパク質でもある。前記ARSは、ヒトからの由来であれば、その具体的配列が特に制限はされないが、本明細書表5に記載された配列情報を参考にすることができる。

30

40

【0027】

本発明で“アミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質”とは、多重tRNA合成酵素複合体(multi-tRNA synthetase complex、MSC)に結合して多重tRNA合成酵素の触媒活性を増進させるものと知られているタンパク質であって、ヒトではAIMP1(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 1)、AIMP2(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 2)、AIMP3(aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 3)

50

l-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein 3)などが知られている。より具体的には、本発明のAIMPは、p43としても知られているAIMP1でもある。前記AIMP(特に、AIMP1)は、ヒト由来のものであれば、その具体的配列が特に制限はされないが、本明細書表5に記載された配列情報を参考にすることができる。

【0028】

本発明で“発現(expression)”とは、細胞からタンパク質又は核酸が生成されることを意味する。本発明でタンパク質発現水準を測定する方法は、公知の方法を適宜選択して実施することができる。例えば、ウエスタンブロット(western blotting)、ドットブロット(dot blotting)、酵素免疫分析法(enzyme-linked immunosorbent assay、ELISA)、放射免疫分析法(RIA)、放射免疫拡散法、オクタロニー免疫拡散法、ロケット免疫電気泳動、免疫組織化学染色、免疫沈殿法(immunoprecipitation)、補体固定分析法、フローサイトメトリー分析法(FACS)、タンパク質チップ(chip)、質量分析(mass spectrometry)法などがあるが、これらに限定されるものではない。最も好ましくは質量分析法で試料からタンパク質水準を測定することができる。

10

【0029】

前記(c)段階は、前記測定されたタンパク質発現水準を対照群と比較して、タンパク質発現水準の変化が確認された被検体を甲状腺濾胞癌にかかったと判定する段階である。

【0030】

甲状腺濾胞癌が疑われる被検体から測定したARS又はAIMPの発現水準を対照群と比較して；

20

アミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質1(AIMP1)、ミトコンドリア型イソロイシンtRNA合成酵素(IARS mitochondrial)、ミトコンドリア型セリンtRNA合成酵素(SARS mitochondria)、リジンtRNA合成酵素(KARS)、バリンtRNA合成酵素(VARS)及びフェニルアラニンtRNA合成酵素アルファサブユニット(FARSA)のうち一つ以上のタンパク質の水準が増加した場合；及び/又は

アラニンtRNA合成酵素(AARS)、アスパラギン酸tRNA合成酵素(DARS)、二機能性グルタミン酸プロリンtRNA合成酵素(EPRS)、トリプトファンtRNA合成酵素(WARS)、グリシンtRNA合成酵素(GARS)、細胞質型イソロイシンtRNA合成酵素(IARS cytoplasmic)、チロシンtRNA合成酵素(YARS)、アスパラギンtRNA合成酵素(NARS)、グルタミンtRNA合成酵素(QARS)、アルギニンtRNA合成酵素(RARS)、細胞質型セリンtRNA合成酵素(SARS cytoplasmic)及びトレオニンtRNA合成酵素のうち一つ以上のタンパク質の水準が減少した場合に；

30

被検体が甲状腺濾胞癌にかかったものと、又は被検体から発見された甲状腺腫瘍又は結節が甲状腺濾胞癌であると判断することができる。

【0031】

前記対照群は、甲状腺に腫瘍又は結節が存在し、前記腫瘍又は結節が、良性腫瘍の濾胞腺腫(FA)と確認された患者であることが好ましい。この場合、被検体から甲状腺濾胞癌のマーカを検出する前に、あらかじめ多数のFA患者についてARS又はアミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質(AIMP)を測定して、FAに確認される患者から期待されるタンパク質水準の範囲又は基準値を導出して、その後の甲状腺濾胞癌が疑われる被検体から測定されたタンパク質水準と比べてその差を判断する方法で本発明の方法を実施するようになる。

40

【0032】

前記甲状腺濾胞癌が疑われる被検体のARS又はAIMPの発現水準を対照群と比較する段階は、本発明によるマーカータンパク質を利用してFTCとFAを明確に判別できる方法であれば、制限なく使用して実施することができる。例えば、本明細書の一実施例に記載した通り、比較対象グループから測定されたARSタンパク質又はAIMPタンパク質発現水準を示す数値、つまり組織試料から測定されたマーカータンパク質の濃度又はMS分析で導出されたマーカータンパク質のイオンピーク面積(ion peak area)などの数値を直接比較することができる。また、“FA患者群対比FTC患者群のARS又はAIMPタンパク質発現水準の比率”のように比較対象グループとの間の相対的な数値を判断の尺度とすることができる。

50

【0033】

さらには、前記列挙したARS又はAIMPマーカータンパク質は、FA又はFTCを区分する特定の発現パターンを示すので、甲状腺濾胞癌を診断するために複数のマーカータンパク質を選択して発現水準を測定し、発現パターンを導出して、これを基礎にFTCを診断することもできる。前記発現パターンとは、多数のマーカータンパク質の発現水準を測定して同時に比較して観察される発現の様相やマーカータンパク質の発現順位などの指標で表現されるものであり、発現の正常的な特徴を示すものである。

【0034】

また、本発明は、アミノアシルtRNA合成酵素又はアミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質の発現水準を測定する製剤が含まれている甲状腺濾胞癌の診断用組成物を提供する。

10

【0035】

また、本発明は、甲状腺濾胞癌の診断用製剤を製造するためのアミノアシルtRNA合成酵素又はアミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質の発現水準を測定する製剤の使用を提供する。

【0036】

前記本発明の甲状腺濾胞癌の診断用組成物は、好ましくは甲状腺濾胞癌と濾胞腺腫の区分用組成物でもあって、具体的なARS及びAIMPの種類、これらの検出特性は、前述したものを参照して理解することができる。

【0037】

本発明のARS及びAIMPの発現水準を測定する製剤は、前述した具体的なタンパク質に特異的に付着するリガンドであればその種類が特に制限されず、例えば前記タンパク質に特異的な結合ドメインを有するペプチド、抗体、又はアプタマーでもあるが、これに制限されない。

20

【0038】

前記“抗体”とは、当該技術分野に公知の用語であって抗原性部位について指示される特異的な免疫グロブリンを意味する。前記言及した一つ以上のタンパク質注入を通じて製造されたもの、又は市販されて購入したものが全て使用可能である。また、前記抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体及びエピトープと結合できる断片などを含む。

30

【0039】

前記“ペプチド”とは、完全な抗体の構造を有してはいないが、抗原性部位について指示される特異的な抗原結合部位(結合ドメイン)を有するポリペプチドを意味する。前記ペプチドは、二つの軽鎖及び二つの重鎖を有する完全な形態の抗体でない抗体分子の機能的断片を含む。抗体分子の機能的断片とは、少なくとも抗原結合機能を保有している断片を意味する。前記ペプチドの長さは、特に制限はされないが、例えば2乃至100個のアミノ酸を含むものでもあって、好ましくは5乃至50個のアミノ酸を含むものでもある。

【0040】

前記“アプタマー”は、所定の標的分子の結合活性を有するオリゴヌクレオチド分子を意味する。前記アプタマーは、RNA、DNA、修飾(modified)核酸又はこれらの混合物でもあり、直鎖状又は環状の形態でもある。

40

【0041】

また、本発明は、前記アミノアシルtRNA合成酵素又はアミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質の発現水準を測定する製剤を含む甲状腺濾胞癌の診断用キットを提供する。

【0042】

本発明の診断用キットには、ARS又はAIMP発現水準を測定するために、選択的に前記タンパク質をマーカーとして認識するペプチド、抗体、アプタマーだけでなく、分析方法に適した一種類又はそれ以上の他の構成組成物(抗体を検出することができる試薬、例えば、表示された2次抗体、発色団(chromophores)、酵素(抗体とコンジュゲートされた形態

50

として)及びその基質又は抗体と結合することができる他の物質、酵素と発色反応する基質及び結合していないタンパク質などを除去して結合されたタンパク質マーカーだけを保有できる洗浄液又は溶離液など)、溶液又は装置が含まれ得る。

【0043】

また、本発明は、被検体試料内のアミノアシルtRNA合成酵素又はアミノアシルtRNA合成酵素複合体相互作用多機能タンパク質の発現水準を測定することを特徴とする甲状腺濾胞癌を診断する方法を提供する。前記甲状腺濾胞癌を診断する方法は、濾胞腺腫患者と前記ARS又はAIMP発現水準を比較して、それらの発現水準が変化した被検体を甲状腺濾胞癌と判定する段階をさらに含めることができる。ARS又はAIMPの具体的種類及び発現様相については前述した通りである。

10

【0044】

本発明の上記被検体とは、動物、好ましくは哺乳動物、特にヒトを含む動物でもあって、より好ましくは診断が必要なヒト又は患者(patient)でもある。被検体については前述した通りである。

【0045】

発明の用語“～を含む(comprising)”とは、“含有する”又は“特徴とする”と同じく使用され、組成物又は方法において、記載されていない追加的な成分要素又は方法段階などを排除しない。用語“～からなる(consisting of)”とは、別に記載されていない追加的な要素、段階又は成分などを除外することを意味する。用語“本質的に～からなる(essentially consisting of)”とは、組成物又は方法の範囲において、記載された成分要素又は段階と共にこれの基本的な特性に実質的に影響を与えない成分要素又は段階などを含むことを意味する。

20

【発明の効果】

【0046】

したがって、本発明は、アミノアシルtRNA合成酵素関連タンパク質発現水準を利用した甲状腺濾胞癌診断マーカー検出方法を提供する。本発明者らは、甲状腺の良性腫瘍の濾胞腺腫と甲状腺濾胞癌組織から多数のアミノアシルtRNA合成酵素と関連タンパク質の水準が異なる点を確認し、具体的に本発明で開示しているタンパク質の種類は、手術を通じた組織採取なく、簡単に明確に甲状腺濾胞癌の診断が可能で、診断感度と特異性が高い。

30

【図面の簡単な説明】

【0047】

【図1】図1は、濾胞腺腫(FA)と甲状腺濾胞癌(FTC)組織のタンパク質体分析結果で同定されたタンパク質の数を示す。

【図2】図2は、濾胞腺腫(FA)と甲状腺濾胞癌(FTC)組織からAIMP1、ミトコンドリア型IARS(IARS mitochondrial)、ミトコンドリア型SARS(SARS mitochondrial)、KARS、VARS、FARSA(FARS alpha subunit)のタンパク質水準を比較するMS(質量分析器)の実験結果を示す。グラフのy軸は該当タンパク質を構成するペプチド(peptide)について質量分析器で検出されたイオンピーク面積(ion peak area)を示し、これは量的数値(quantitative value)に活用することができる。

40

【図3】図3は、濾胞腺腫(FA)と甲状腺濾胞癌(FTC)組織でAARS、DARS、EPRS、WARS、GARS、細胞質型IARS(IARS cytoplasmic)のタンパク質水準を比較するMS(質量分析器)の実験結果を示す。グラフのy軸はそのタンパク質を構成するペプチド(peptide)について質量分析器で検出されたイオンピーク面積(ion peak area)を示し、これは量的数値に活用することができる。

【図4】図4は、濾胞腺腫(FA)と甲状腺濾胞癌(FTC)組織からYARS、NARS、QARS、RARS、細胞質型SARS(SARS cytoplasmic)、TARSのタンパク質水準を比較するMS(質量分析器)の実験結果を示す。グラフのy軸を、該当タンパク質を構成するペプチド(peptide)について質量分析器で検出されたイオンピーク面積(ion peak area)を示し、量的数値に活用することができる。

【図5】図5は、濾胞腺腫と甲状腺濾胞癌組織からAIMP1タンパク質水準をウエスタンブロ

50

ットで比較した結果を示す。

【図6】図6は、濾胞腺腫と甲状腺濾胞癌組織からAIMP1タンパク質水準をウエスタンブロットで確認後、前記ウエスタンブロットによるバンド強度 (Band intensity) を導出して受信者操作特性 (Receiver Operating Characteristic、ROC) 分析を実行して曲線下面積 (Area Under Curve、AUC) を算出した結果を示す。

【図7】図7は、AIMP1タンパク質水準測定による濾胞腺腫 (FA) と甲状腺濾胞癌 (FTC) の区分においてインタラクティブプロット (Interactive plotting) 分析結果を示すもので、AIMP1は甲状腺濾胞癌と濾胞腺腫を感度90%、特異度70%に区別できることを確認した。

【発明を実施するための形態】

【0048】

以下本発明を詳細に説明する。

【0049】

但し、下記実施例は本発明を例示するのみで、本発明の内容が下記実施例に限定されるものではない。

【0050】

< 実験方法 >

1. 臨床試料

甲状腺組織は、ソウル峨山病院細胞組織資源センターに研究のための人体由来物寄贈同意書を作成して寄贈された検体を使用した。研究と関連したプロトコルは、ソウル峨山病院臨床倫理審議委員会 (承認番号：2013-0539) から承認された。本研究では、甲状腺濾胞癌 (FTC) の患者から採取された甲状腺組織10例、濾胞腺腫 (FA) 患者から採取された甲状腺組織10例を組織試料に使用した。対象患者は人工バイアス (artificial bias) を最小化するために患者の年齢と性別をランダムに選択して選定した。

【0051】

2. タンパク質分析

FTCとFA患者から採取した甲状腺組織は、それぞれ組織均質化 (tissue homogenization) して、1%のSDSとプロテアーゼ/ホスファターゼ阻害剤カクテル (protease/phosphatase inhibitor cocktail) が追加されたRIPAバッファー (buffer) に全タンパク質抽出 (protein extraction) を実施した。抽出されたタンパク質は、BCA定量後、各患者の試料100µgずつと混合してプーリングセット (pooling set) を製造した。FASP (Filter-aided sample preparation) 法でペプチド (peptide) を製造し、Nano LC-Q Exactive質量分析とタンパク質分析を行った。具体的な実験方法は、次の通りである：

-20cm C18キャピラリカラム (capillary column) (OD 360µm、ID 75µm) で120分分画し；

-80分グラジエント (gradient) (5~45% アセトニトリル (acetonitrile) 及び0.1% ギ酸溶液 (formic acid solution)) で分画して；

-Top 5 intensity precursorについてデータ依存的取得 (data dependent acquisition、DDA) モードでデータ収集した後；

-収集されたデータは、Proteome discoverer1.4プログラムを利用して配列データベース (sequence data base) と比較して、ピーク面積 (peak area) を分析した。また、DAVID gene ontology分析を行った。

【0052】

3. ウエスタンブロット (Western blot) 分析

FTCとFA患者それぞれ10人から採取した甲状腺組織溶解物 (lysate) 20µgずつをとってSDS PAGE電気泳動を行った。電気泳動されたPAGEゲルをポリフッ化ビニリデン (polyvinylidene difluoride、PVDF) メンブレン (membrane) (Millipore) でタンパク質を移動させた後、ウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin) でブロッキング (blocking) を行った。1次反応は抗 - ヒトAIMP1マウス・モノクローナル抗体 (monoclonal mouse anti-human AIMP1 antibody) (1:500) 及び抗 - ヒトベータアクチンマウス抗体 (mouse anti-human beta actin antibody) (1:1000) で、4℃で6時間反応後、抗 - マウスHRP標識ヤギ (goat

10

20

30

40

50

anti-mouse HRP) 二次抗体(1:4000)を利用してプロット検出を行った。バンド強度 (Band Intensity) はImage J(vesion 1.48)を利用して測定し受信者操作特性 (Receiver Operating Characteristics、ROC)分析及び曲線下面積 (Area Under Curve、AUC)、インタラクティブプロット (Inteactive plot) 分析はMedCalc(vesion 17.6)を利用して行った。

【 0 0 5 3 】

< 実施例 1 >

甲状腺組織タンパク質同定

濾胞腺腫組織で2909個、甲状腺濾胞癌組織から2739個のタンパク質をそれぞれ同定し、合計4162個のタンパク質を同定した(図1)。これは今まで学界に報告されたことのない、最も幅広い甲状腺癌関連タンパク質分析結果である。

10

【 0 0 5 4 】

< 実施例 2 >

遺伝子オントロジー (Gene ontology) 分析

遺伝子オントロジー (Gene ontology) 分析の結果、濾胞腺腫患者群の試料からは、酸化還元 (oxidation/reduction)、タンパク質局在 (protein localization)、細胞内輸送 (intracellular transport) と関連したタンパク質の機能的分類が顕著な一方(表 2)、甲状腺濾胞癌患者群の場合は、タンパク質分解 (proteolysis)、高分子異化過程 (macro molecule catabolic process)、RNAプロセッシング (RNA processing)、そして細胞周期 (cell cycle) に関連したタンパク質の機能的分類が異なって現れた(表 1)。

20

【 0 0 5 5 】

【表 1】

FTC特異的に発現されるタンパク質群
機能注解 (FTC特異的プロテオーム)

ターム	RT	遺伝子	カウント	%	P値	ベンジャミン
タンパク質分解 (proteolysis)	RI	■	65	8.9	4.9E-3	1.9E-1
タンパク質局在 (protein localization)	RI	■	59	8.0	1.3E-3	6.4E-2
タンパク質局在の確立 (establishment of protein transport)	RI	■	56	7.6	2.3E-4	1.6E-2
細胞内輸送 (intracellular transport)	RI	■	55	7.5	6.2E-6	6.2E-4
タンパク質輸送 (protein transport)	RI	■	54	7.4	5.8E-4	3.4E-2
高分子異化過程 (macromolecule catabolic process)	RI	■	54	7.4	1.0E-3	5.3E-2
RNA プロセッシング (RNA processing)	RI	■	50	6.8	1.6E-6	2.1E-4
細胞周期 (cell cycle)	RI	■	50	6.8	6.4E-3	2.1E-1
高分子異化過程の負の調節 (negative regulation of macromolecule catabolic process)	RI	■	49	6.7	3.6E-3	1.5E-1
高分子異化過程の正の調節 (positive regulation of macromolecule catabolic process)	RI	■	49	6.7	4.9E-2	5.9E-1

【 0 0 5 6 】

10

20

30

40

【表 2】

FA特異的に発現されるタンパク質群
機能注解 (FA特異的プロテオーム)

RT	遺伝子	カウント	%	P値	ベンジャミン値
RT		56	7.1	4.0E-6	5.3E-3
	酸化還元 (oxidation reduction)				
RT		54	6.8	2.3E-2	6.2E-1
	タンパク質局在 (protein localization)				
RT		52	6.6	1.4E-4	3.9E-2
	細胞内輸送 (intracellular transport)				
RT		50	6.3	9.1E-3	4.5E-1
	タンパク質輸送 (protein transport)				
RT		50	6.3	1.1E-2	4.7E-1
	タンパク質局在の確立 (establishment of protein transport)				
RT		48	6.1	4.3E-2	7.0E-1
	リン酸化 (phosphorylation)				
RT		45	5.7	1.5E-10	3.9E-7
	翻訳 (translation)				
RT		45	5.7	1.9E-2	5.9E-1
	生体接着 (biological adhesion)				
RT		45	5.7	2.0E-2	5.9E-1
	細胞接着 (cell adhesion)				
RT		44	5.5	1.0E-3	1.5E-1
	ベシクル媒介輸送 (vesicle mediated transport)				

10

20

30

40

【0057】

特に甲状腺濾胞癌甲状腺組織から特異的に発現されるタンパク質中に接着斑 (focal adhesion) と関連したタンパク質が濾胞腺腫甲状腺組織に比べて有意的に増加したことが分かった。また、スプライソソーム (spliceosome) と関連したタンパク質も甲状腺濾胞癌で特異的に増加したことが分かった。

【0058】

< 実施例 3 >

50

ARS (aminoacyl-tRNA synthetase) 関連タンパク質発現傾向分析

分析結果で同定されたタンパク質のうち、ARS関連タンパク質を選別してピーク面積 (peak area) を目安にラベルフリー半定量 (label free semi-quantification) を行った。その結果、濾胞腺腫組織では20個、甲状腺濾胞癌組織では21個のARSとAIMPが確認され、定量分析結果は下段の表に示した通りである(表3、表4)。

【 0 0 5 9 】

【表 3】

FAから発現されるARSとAIMPタンパク質
濾胞腺腫組織のARS

説明	遺伝子名	Uniprot ID	ピーク面積
Alanine-tRNA ligase, cytoplasmic	AARS	SYAC_HUMAN	1125849500
Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1	AIMP1	AIMP1_HUMAN	85053716
Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 2	AIMP2	A8MU58_HUMAN	71773240
Arginine-tRNA ligase, cytoplasmic	RARS	SYRC_HUMAN	661244666
Asparagine-tRNA ligase, cytoplasmic	NARS	SYNC_HUMAN	943432533
Aspartyl-tRNA synthetase, isoform CRA	DARS	D3DP78_HUMAN	796052746
Bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase	EPRS	SYEP_HUMAN	1905052478
Glycine-tRNA ligase	GARS	SYG_HUMAN	289437841
Isoleucine-tRNA ligase, cytoplasmic	IARS	J3KR24_HUMAN	543348221
Isoleucine-tRNA ligase, mitochondrial	IARS2	SYIM_HUMAN	310599507
Lysine-tRNA ligase	KARS	SYK_HUMAN	171681552
Phenylalanine-tRNA ligase alpha subunit	FARSA	B4E363_HUMAN	91568703
QARS protein (断片)	QARS	Q96AW5_HUMAN	382807833
Serine-tRNA ligase, cytoplasmic	SARS	SYSC_HUMAN	13939590732
Serine-tRNA ligase, mitochondrial	SARS2	SYSM_HUMAN	54572943
Threonine-tRNA ligase, cytoplasmic	TARS	SYTC_HUMAN	366450168
Tryptophan-tRNA ligase, cytoplasmic	WARS	SYWC_HUMAN	1005292231
Tyrosine-tRNA ligase, cytoplasmic	YARS	SYYC_HUMAN	2381826769
Tyrosine-tRNA ligase, mitochondrial	YARS2	SYYM_HUMAN	78858264
Valyl-tRNA synthetase (断片)	VARS	A2BEY0_HUMAN	112446540

10

20

30

40

【表 4】

FTCから発現されるARSとAIMPタンパク質

甲状腺濾胞癌組織のARS

説明	遺伝子名	Uniprot ID	ピーク面積
Aspartate-tRNA ligase, cytoplasmic	DARS	SYDC_HUMAN	676501313
Isoleucine-tRNA ligase, mitochondrial	IARS2	SYIM_HUMAN	405032150
Serine-tRNA ligase, cytoplasmic	SARS	Q5T5C7_HUMAN	6841913593
Alanine-tRNA ligase, cytoplasmic	AARS	SYAC_HUMAN	259092335
Asparagine-tRNA ligase, cytoplasmic	NARS	SYNC_HUMAN	699339102
Tryptophan-tRNA ligase, cytoplasmic	WARS	SYWC_HUMAN	488259749
Tyrosine-tRNA ligase, cytoplasmic	YARS	SYYC_HUMAN	289391829
Valine-tRNA ligase	VARSA	B0V043_HUMAN	380930687
Phenylalanine-tRNA ligase alpha subunit	FARSA	SYFA_HUMAN	116709397
Histidine-tRNA ligase, cytoplasmic	HARS	J3KNE5_HUMAN	244441275
Threonine-tRNA ligase, cytoplasmic	TARS	B4DEG8_HUMAN	226134539
FARSB protein (断片)	FARSB	Q9BR63_HUMAN	209463210
Cysteine-tRNA ligase, cytoplasmic	CARS	B4DKY1_HUMAN	64458226
Glutamine-tRNA ligase	QARS	SYQ_HUMAN	293130531
Serine-tRNA ligase, mitochondrial	SARS2	SYSM_HUMAN	3864844815
Glycine-tRNA ligase	GARS	SYG_HUMAN	276263425
Isoleucine-tRNA ligase, cytoplasmic	IARS	J3KR24_HUMAN	229288160
Aminoacyl tRNA synthase complex-interacting multifunctional protein 1	AIMP1	AIMP1_HUMAN	412726062
Lysine-tRNA ligase	KARS	SYK_HUMAN	1278127747
Bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase	EPRS	SYEP_HUMAN	399164615
Arginine-tRNA ligase, cytoplasmic	RARS	SYRC_HUMAN	196971392

10

20

30

40

【0061】

特に、甲状腺濾胞癌組織では、比較対象の濾胞腺腫組織よりAARS(Alanine-tRNA ligase)は減少して、AIMP1とKARS(Lysine-tRNA ligase)、VARSA(valine-tRNA ligase)は増加するものと現れた(図2、図3)。甲状腺濾胞癌組織から良性腫瘍の濾胞腺腫と比較してAIMP1とK

50

ARSが増加するのは、本研究で初めて確認された。

【 0 0 6 2 】

その他に、AARSを初めとしてDARS(aspartate-tRNA ligase)、EPRS(bifunctional glutamate/proline-tRNA ligase)、WARS(tryptophan-tRNA ligase)、GARS(glycine-tRNA ligase)、細胞質型IARS(isoleucine-tRNA ligase cytoplasmic)、YARS(tyrosine-tRNA ligase)、NARS(asparagine-tRNA ligase)、QARS(glutamine-tRNA ligase)、RARS(arginine-tRNA ligase)、細胞質型SARS(serine-tRNA ligase cytoplasmic)、TARS(threonine-tRNA ligase)などは、濾胞腺腫と比べて甲状腺濾胞癌からタンパク質水準が減少したものと観察され(図3、図4)、これとは逆にAIMP1を初めとするミトコンドリア型IARS(isoleucine-tRNA ligase mitochondrial)、ミトコンドリア型SARS(serine-tRNA ligase mitochondrial)、KARS(lysine-tRNA ligase)、VARSA(valine-tRNA ligase)、FARSAアルファサブユニット(phenylalanine-tRNA ligase alpha subunit)などは反対の傾向を示した(図2)。このような差を示すタンパク質は、濾胞腺腫から甲状腺濾胞癌を区別するバイオマーカーとして利用可能であり、本発明で発掘されたバイオマーカーの配列情報を下記表5に示す。

【 0 0 6 3 】

【表 5】

区分	遺伝子名 (Gene symbol)	シーケンス参照 (seq. reference) (GenBank GI No.)
増加 (up)	AIMP1	215490009
	IARS mitochondrial	94730583
	SARS mitochondria	23822219
	KARS	20178333
	VARSA	1194845281
	FARSA	12643946
減少 (down)	AARS	115502460
	DARS	20178330
	EPRS	288558855
	WARS	135191
	GARS	313104283
	細胞質型IARS	239938717
	YARS	13638438
	NARS	3915059
	QARS	1351170
	RARS	20178331
	細胞質型SARS	19860217
TARS	60267755	

【 0 0 6 4 】

< 実施例 4 >

FAとFTCグループからのAIMP1タンパク質定量分析

前記実施例 3 から発掘したFTCとFAを区分するバイオマーカーの中で、代表的にAIMP1を使用してこの検出能力を確認した。濾胞腺腫組織10個と甲状腺濾胞癌組織10個でのAIMP1タンパク質の量をウエスタンブロット (Western blot) で分析し、代表的な分析結果は図5に示した。バンド強度 (Band intensity) を導出して受信者操作特性 (Receiver Operating Characteristic、ROC) 分析を行い、曲線下面積 (Area Under Curve、AUC) を算出した。その結果AUCは0.770で現れ、有意水準 (significance level) は0.0195で現れた (図6参照)。図7に示した通り、インタラクティブプロット (Interactive plotting) 分析の結果、AIMP1は、甲状腺濾胞癌と濾胞腺腫を感度90%、特異度70%で区別できることが分かった。

10

【産業上の利用可能性】

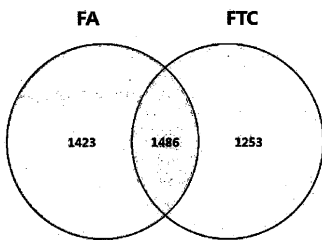
【0065】

以上説明した通り、本発明で開示するARS又はAIMPタンパク質の種類は、簡単で明確な診断方法が存在しない甲状腺濾胞癌について、手術による組織採取なく、濾胞腺腫などの良性腫瘍と区別することができる診断用マーカーとして、体外診断産業などの分野で有用に使用することができる。

20

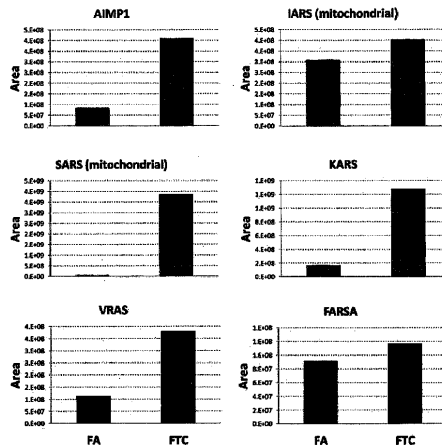
【図 1】

【51】



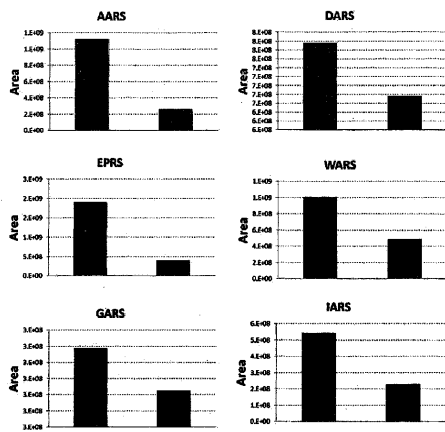
【図 2】

【52】



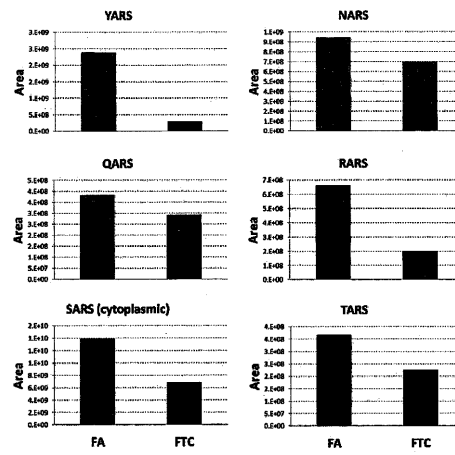
【 図 3 】

【 表 3 】



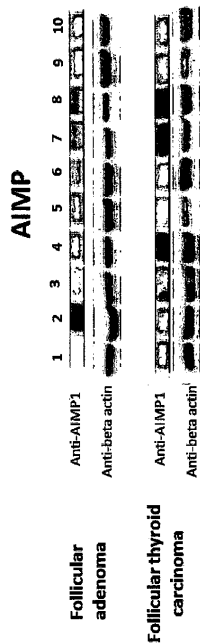
【 図 4 】

【 表 4 】

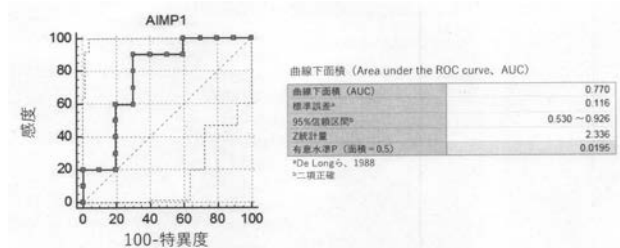


【 図 5 】

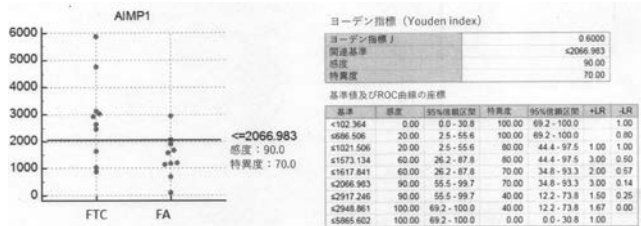
【 表 5 】




【 図 6 】



【 図 7 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2017/007042
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N 33/574(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N 33/574		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: follicular thyroid carcinoma, follicular adenoma, aminoacyl-tRNA synthetase, aminoacyl-tRNA synthetase complex-interacting multifunctional protein		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHAO, J. et al., "Differentiation of Human Follicular Thyroid Adenomas from Carcinomas by Gene Expression Profiling", <i>Oncology Reports</i> , 2008, vol. 19, pages 329-337 See abstract; and pages 330-334.	1-3,6,7,10-12,15 ,16
A		4,5,8,9,13,14
A	KIM, Y.-W. et al., "Cancer Association Study of Aminoacyl-tRNA Synthetase Signaling Network in Glioblastoma", <i>PLoS One</i> , 2012, vol. 7, no. 8, thesis no. e40960, internal pages 1-11 See the entire document.	1-16
A	LEE, H. S. et al., "Chemical Suppression of an Oncogenic Splicing Variant of AIMP2 Induces Tumour Regression", <i>Biochemical Journal</i> , 2013, vol. 454, pages 411-416 See the entire document.	1-16
A	NAM, S. H. et al., "Suppression of Lysyl-tRNA Synthetase, KRS, Causes Incomplete Epithelial-mesenchymal Transition and Ineffective Cell-extracellular Matrix Adhesion for Migration", <i>International Journal of Oncology</i> , February 2016 (published online), vol. 48, pages 1553-1560 See the entire document	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 SEPTEMBER 2017 (18.09.2017)		Date of mailing of the international search report 20 SEPTEMBER 2017 (20.09.2017)
Name and mailing address of the ISA/KR  Korea Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon, 189 Seomsa-ro, Daejeon 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2017/007042

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	PARK, M. C. et al., "Secreted Human Glycyl-tRNA Synthetase Implicated in Defense against ERK-activated Tumorigenesis", PNAS, 2012, vol. 109, pages E640-E647 See the entire document.	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2017/007042

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
NONE			

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/007042

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) G01N 33/574(2006.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) G01N 33/574		
조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC		
국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 갑상선 여포암, 여포 선종, 아미노아실 티알엔에이 중합효소, 아미노아실 티알엔에이 중합효소 복합체-결합 다기능 단백질		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	ZHAO, J. 등, 'Differentiation of human follicular thyroid adenomas from carcinomas by gene expression profiling' Oncology Reports, 2008년, 19권, 페이지 329-337 초록; 및 페이지 330-334 참조.	1-3,6,7,10-12,15,16
A		4,5,8,9,13,14
A	KIM, Y.-W. 등, 'Cancer association study of aminoacyl-tRNA synthetase signaling network in glioblastoma' PloS One, 2012년, 7권, 8호, 논문번호 e40960, 내부페이지 1-11 전체 문헌 참조.	1-16
A	LBE, H. S. 등, 'Chemical suppression of an oncogenic splicing variant of AIMP2 induces tumour regression' Biochemical Journal, 2013년, 454권, 페이지 411-416 전체 문헌 참조.	1-16
A	NAM, S. H. 등, 'Suppression of lysyl-tRNA synthetase, KRS, causes incomplete epithelial-mesenchymal transition and ineffective cell-extracellular matrix adhesion for migration' International Journal of Oncology, 2016년2월(온라인공개), 48권, 페이지 1553-1560 전체 문헌 참조.	1-16
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: "A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 "E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 "L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 "O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 "P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 "T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 "X" 특별한 관련이 있는 문헌 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. "Y" 특별한 관련이 있는 문헌 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. "&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2017년 09월 18일 (18.09.2017)	국제조사보고서 발송일 2017년 09월 20일 (20.09.2017)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소 대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사) 팩스 번호 +82-42-481-8578	심사관 이정철 전화번호 +82-42-481-8611	

서식 PCT/ISA/210 (두 번째 용지) (2015년 1월)

국제조사보고서

국제출원번호
PCT/KR2017/007042

C (계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	PARK, M. C. 등, 'Secreted human glycy1-tRNA synthetase implicated in defense against ERK-activated tumorigenesis' PNAS, 2012년, 109권, 페이지 E640-E647 전체 문헌 참조.	1-16

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2017/007042

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
없음			

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 C 1 2 N 15/115 (2010.01) C 1 2 N 15/115 Z

(81)指定国・地域 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(71)出願人 517301162
 ユニバーシティ オブ ウルサン ファウンデーション フォー インダストリー コーオペレーション

UNIVERSITY OF ULSAN FOUNDATION FOR INDUSTRY COOPERATION

大韓民国, 44610, ウルサン, ナム - グ, テハク - ロ, 93

(74)代理人 110002354

特許業務法人平和国際特許事務所

(72)発明者 キム、スンファン

大韓民国 06269 ソウル、カンナム - グ、365 - ギル ナンプスンファン - ロ、42、#4 - 1005 (ドゴクハンシン アパート、ドゴク - ドン)

(72)発明者 ヤン、ウォン スク

大韓民国 14684 キョンギ - ド、プチョン - シ、ソサ - グ、22ボン - ギル プグアン - ロ、45、#ナ - 508 (テヒョン チョンシル アパート、ケアン - ドン)

(72)発明者 キム、キョンゴン

大韓民国 05505 ソウル、ソンパ - グ、43 - ギル オリンピック - ロ、88

(72)発明者 キム、ウォン グ

大韓民国 05505 ソウル、ソンパ - グ、43 - ギル オリンピック - ロ、88

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA19 QQ40 QR55 QR90 QS32 QX02

专利名称(译)	使用氨酰-tRNA合成酶相关蛋白表达水平和诊断标志物检测方法诊断甲状腺囊性癌的组合物		
公开(公告)号	JP2019525160A	公开(公告)日	2019-09-05
申请号	JP2018569007	申请日	2017-07-03
[标]申请(专利权)人(译)	医药生命融合研究团 财团法人峨山社会福祉财团 蔚山UNIV发现IND合作		
申请(专利权)人(译)	医药生物融合研究中心 峨山基金会		
[标]发明人	キムスンフン		
发明人	キム、スンフン ヤン、ウォンスク キム、キヨンゴン キム、ウォング		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/543 G01N33/53 C12Q1/04 C12Q1/25 C12N15/115		
CPC分类号	G01N33/573 G01N33/57407 G01N33/57488 G01N33/574 G01N33/78		
FI分类号	G01N33/574.A G01N33/543.501.A G01N33/53.D C12Q1/04 C12Q1/25 C12N15/115.Z		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA19 4B063/QQ40 4B063/QR55 4B063/QR90 4B063/QS32 4B063/QX02		
优先权	1020160083361 2016-07-01 KR		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

甲状腺滤泡癌的诊断方法技术领域本发明涉及使用氨酰基-tRNA合成酶相关蛋白的表达水平来检测诊断甲状腺滤泡癌的标志物的方法，更具体地说，涉及怀疑患有滤泡性甲状腺癌患者的甲状腺。为了提供诊断滤泡癌所必需的信息，(a)从疑似患有甲状腺滤泡癌的受试者提供样品；(b)从样品中获得氨酰-tRNA合成酶或氨酰-tRNA合成酶复合物。测量机体相互作用多功能蛋白的蛋白表达水平；和(c)将测得的蛋白表达水平与对照组进行比较，并使已确认蛋白表达水平发生变化的受试者接受甲状腺滤泡癌治疗。本发明涉及一种检测甲状腺滤泡癌标记物的方法，该方法包括确定患者患病的步骤。具体地，本发明公开的蛋白质的类型使得能够简单且明确地诊断甲状腺滤泡癌而无需通过手术收集组织，并且具有高的诊断敏感性和特异性。

