



Title	胆道癌診断のための新規腫瘍マーカーに関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	高橋, 瑞奈
Description	配架番号 : 2884
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第16438号
Issue Date	2025-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95574
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	TAKAHASHI_Mizuna_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称 博士 (医 学) 氏名 高橋 瑞奈

学位論文題名

胆道癌診断のための新規腫瘍マーカーに関する研究

(Research on novel tumor marker for diagnosis of biliary cancer)

【背景と目的】

胆道癌は胆道組織から発生する悪性腫瘍である。初期症状に乏しいことなどから発見が困難であり、診断時には進行していることが多く、唯一の根治治療である外科手術を施行しても再発率が高く、予後不良な疾患である。その一方で、他癌腫と同様に、病期が早期であるほどその予後は良好であることが示されている。そのため、胆道癌の予後改善のためには、簡便な方法によるスクリーニングを可能にすることが喫緊の課題である。簡便なスクリーニング法の一つが腫瘍マーカー測定による診断であり、血液検査であるため低侵襲である。

【材料と方法】

組換え cDNA 発現クローニングによる Serological identification of antigens by recombinant expression cloning (SEREX) 法は、遺伝子の網羅的探索方法であり、cDNA ライブラリーを用いて大腸菌 (*Escherichia coli*; *E.coli*) にタンパクを発現させ、抗原抗体反応を利用して血清 IgG に反応するクローンをスクリーニングする手法である。SEREX 法は、患者血清を用いることで抗体型血清腫瘍マーカーの探索に応用することが可能である。本研究では、胆道癌血清を用いて SEREX 法を行い、同定したタンパクに対する血清抗体価を測定し、新規胆道癌腫瘍マーカーを探索することを目的とした。

候補タンパクを探索するため、ヒト精巣 cDNA ライブラリーが挿入された λ ZAPII フェージを用いて、10 例の胆道癌患者血清で SEREX 法を行った。

腫瘍マーカーとしての有用性は、健常者と胆道癌患者の血清抗体価を比較することで検討した。さらに、他癌腫 (食道癌、胃癌、大腸癌、膵癌、乳癌) の血清抗体価も測定することで、胆道癌特異性を評価した。

研究段階に応じ、コホート 1~3 の血清を用いて血清抗体価の測定を行い、コホート 1 は健常者 30 例と胆道癌患者 44 例、コホート 2 は健常者 44 例と胆道癌患者 44 例、コホート 3 は健常者 114 例と胆道癌患者 70 例および他癌腫 402 例 (食道癌 87 例、胃癌 92 例、大腸癌 93 例、膵癌 39 例、乳癌 91 例) とした。

血清抗体価の測定には amplified luminescence proximity homogeneous assay-linked immunosorbent assay (AlphaLISA) を用いた。

【結果】

SEREX 法にて 7 個のクローンを採取し、6 種類の抗原遺伝子を同定した。SEREX 法で同定されたことより、これらの抗原に対する血清抗体の存在が示唆された。これら 6 種類の抗原のうち、polymerase chain reaction (PCR) および Western blotting による解析で、Wingless-type MMTV integration site family, member 7 (WNT7B) が胆道癌細胞株において高発現であった。これより、本研究では WNT7B を対象とし、WNT7B に対する血清抗体価が腫瘍マーカーとなり得るかを検討した。

単離した WNT7B の全長 (Full-length WNT7B) に対する健常者血清および胆道癌患者血清の抗体価測定では有意差を認めなかった ($p = 0.9649$)。これは、Full-length WNT7B の分子量が大きく、可溶性が低いため正確な抗体価が計測できなかったことが原因と考えられた。そこで、WNT7B 欠失変異体 (WNT7B^{-92-2, -92-260, 2-260, 184-260, 245-353}) における健常者血清および胆道癌患者血清の抗体価を測定した。その結果、WNT7B¹⁸⁴⁻²⁶⁰ に対する胆道癌患者血清における抗体価は健常者と比較して有意に高値であった ($p = 0.0056$)。これより、WNT7B¹⁸⁴⁻²⁶⁰ にエピトープ部位があることが示唆されたため、WNT7B¹⁸⁴⁻²⁶⁰ をさらに細分化して 7 つのペプチド (WNT7B^{184-203, 194-213, 204-223, 214-233, 224-243, 234-253, 244-260}) に対する血清抗体価を測定した。その結果、WNT7B²³⁴⁻²⁵³ と WNT7B²⁴⁴⁻²⁶⁰ に対する血清抗体価は、健常者に比べて胆道癌患者で有意に高かった (WNT7B²³⁴⁻²⁵³ ; $p = 0.0009$, WNT7B²⁴⁴⁻²⁶⁰ ; $p = 0.0005$)。さらに、WNT7B²³⁴⁻²⁵³ に対する血清抗体価は、食道癌、胃癌、大腸癌、膵癌、乳癌患者では健常者と比較して有意差を認めなかった (食道癌; $p = 0.1367$ 、胃癌; $p = 0.6234$ 、大腸癌; $p = 0.0725$ 、膵癌; $p = 0.3388$ 、乳癌; $p = 0.0503$)。これより、WNT7B²³⁴⁻²⁵³ に対する血清抗体価上昇は胆道癌特異的であることが示された。

receiver operating characteristics curve (ROC) で定義した WNT7B²³⁴⁻²⁵³ のカットオフ値による解析では、胆道癌患者において感度 70 %、特異度は 51.8 %であった。

【考察】

本研究の注目すべき点は、胆道癌患者においては WNT7B に対する抗体を有し、その特異的エピトープが WNT7B²³⁴⁻²⁵³ に存在することを見出したことである。WNT7B²³⁴⁻²⁵³ に対する血清抗体価は carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) よりも胆道癌の検出感度が高く、CA19-9 の組み合わせでは 83.6 %という高い感度が得られ、新規腫瘍マーカーとして有用であることが示唆された。また、Stage 0 ~ II の比較的早期の胆道癌についても WNT7B²³⁴⁻²⁵³ に対する血清抗体価は 75 % と高い感度で同定でき、早期発見および早期治療による予後改善が期待できると考える。胆道癌発見のための WNT7B²³⁴⁻²⁵³ に対する血清抗体価測定の問題点は、特異度が低いことである。今後、症例数を増やして解析し、より適切なカットオフ値を設定することで臨床応用も視野に入れられると推察する。

【結論】

胆道癌患者血清を用いた SEREX 法を施行し、WNT7B を標的抗原として同定した。さらに、WNT7B の欠失変異体およびペプチドに対する健常者血清、胆道癌患者血清、他癌腫血清の抗体価測定により、WNT7B²³⁴⁻²⁵³ に対する抗体価は胆道癌患者血清で特異的に高いことが示された。したがって、WNT7B²³⁴⁻²⁵³ に対する血清抗体価は、胆道癌発見のための新規腫瘍マーカーとして有用であると考えられる。