



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	胆道癌診断のための新規腫瘍マーカーに関する研究
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16438
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/95975
Type	doctoral thesis
File Information	TAKAHASHI_Mizuna.pdf



学 位 論 文

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)

2025 年 3 月

北 海 道 大 学

高橋瑞奈

学 位 論 文

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)

2025 年 3 月

北 海 道 大 学

高橋瑞奈

目次

発表論文目録および学会発表目録	1	頁
要旨	2	頁
略語表	5	頁
緒言	6	頁
材料と方法	10	頁
結果	19	頁
考察	33	頁
結論	37	頁
謝辞	39	頁
利益相反	40	頁
引用文献	41	頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

Mizuna Takahashi, Takahiro Tsuchikawa, Takaki Hiwasa, Toru Nakamura, Koji Hontani, Toshihiro Kushibiki, Kazuho Inoko, Hironobu Takano, Yutaka Hatanaka, Kazuyuki Matsushita, Hisahiro Matsubara, Tyuji Hoshino, Masayuki Ohtsuka, Hideaki Shimada, Kimitaka Tanaka, Yoshitsugu Nakanishi, Toshimichi Asano, Takehiro Noji, Keisuke Okamura, Toshiaki Shichinohe and Satoshi Hirano.

Identification of antibody against wingless-type MMTV integration site family member 7B as a biliary cancer tumor marker.

Oncology Reports, 49, 34 (2023)

本研究の一部は以下の学会に発表した。

高橋瑞奈、土川貴裕、本谷康二、猪子和穂、高野博信、中村 透、七戸俊明、日和佐隆樹、平野 聡

Wingless - type MMTV integration site family, member 7B (WNT7B) に対する血清抗体価高値は胆道癌腫瘍マーカーになり得る

日本免疫治療学会 (第 17 回 日本免疫治療学会学術集会)、2020 年 2 月 22 日・東京

要旨

【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 ファージを用いて、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 に対する血清抗体価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。

略語表

AlphaLISA	Amplified luminescence proximity homogeneous assay-linked immunosorbent assay
AUC	Area under the curve
BLAST	Basic local alignment search tool
BRAP	BRCA1-associated protein
CA15-3	Carcinoma antigen 15-3
CA19-9	Carbohydrate antigen 19-9
CA125	Carbohydrate antigen 125
CEA	Carcinoembryonic antigen
CFAP53	Cilia- and flagella-associated protein 53
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-linked immuno-sorbent assay
ESCA	Esophageal carcinoma SEREX antigen
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GST	Glutathione S-transferase
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
IRB	Institutional Review Board
NACA	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha
PCR	Polymerase chain reaction
ROC	Receiver operating characteristics curve
PSA	Prostate-specific antigen
RT - qPCR	Reverse transcription-quantitative PCR
SEREX	Serological identification of antigens by recombinant expression cloning
TBS	Tris-buffered saline
TBS - T	Tris-buffered saline with Tween-20
TNM 分類	Tumor-node-metastasis classification
WNT7B	Wingless-type MMTV integration site family, member 7B
ZSCAN18	Zinc finger and SCAN domain-containing 18

緒言

胆道癌は胆道組織から発生する悪性腫瘍であり、発生した部位により細分化される（図1）。本邦において、肝門部領域胆管癌および胆嚢癌、胆嚢管癌、遠位胆管癌、十二指腸乳頭部癌は胆道癌取扱い規約で、肝内胆管癌は肝臓取扱い規約で扱われるが、本研究ではいずれも胆道癌として研究対象とした。

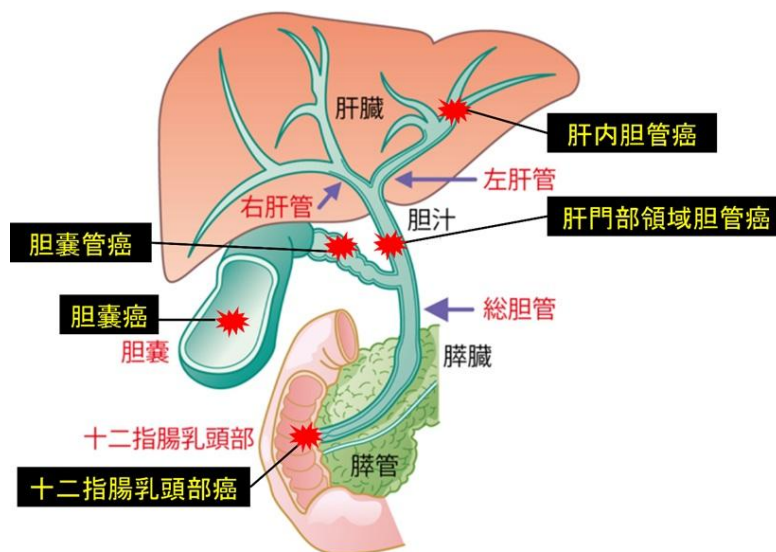
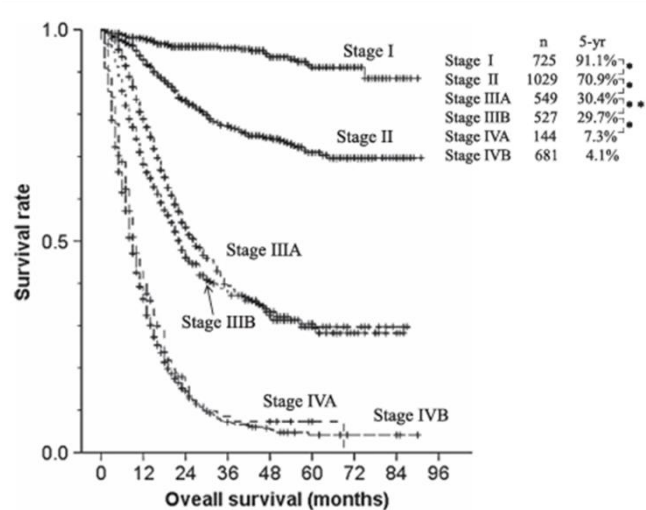
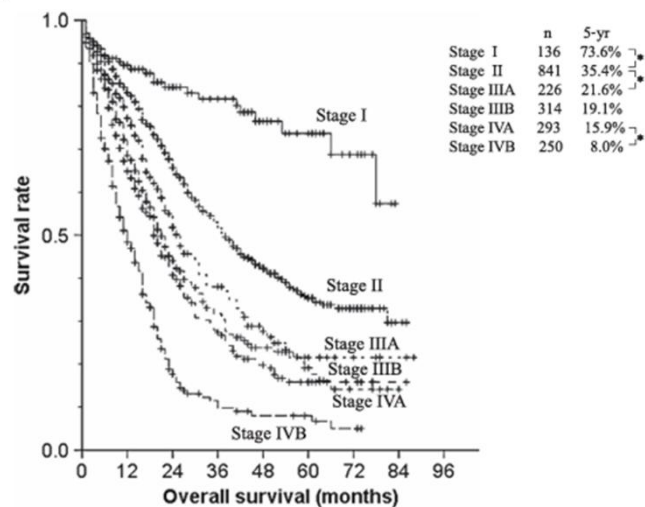


図 1. 胆道癌の分類（日本消化器外科学会 HP より引用、改変）

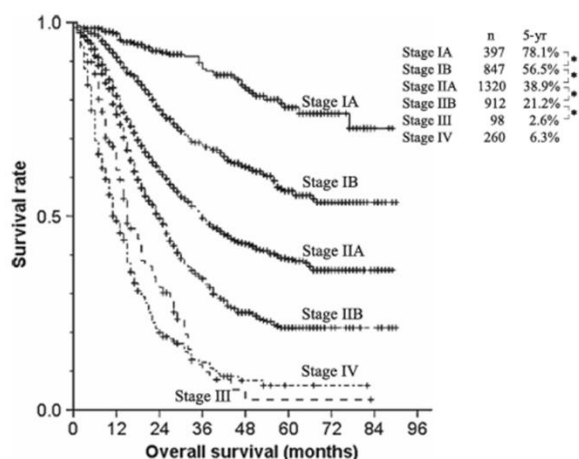
胆道癌の唯一の根治治療は外科切除である。しかし、切除可能であっても進行癌の状態であったり、切除不能の状態で見られることが多い。High-volume center では、血管合併切除や肝膵同時切除などの拡大切除も行われ、切除率は胆嚢癌 69 %、胆管癌 70 %、乳頭部癌 89%、胆道癌全体で 73 %と比較的高率であるが、切除術後の再発が高率である（植木ほか, 2018）。そのため、胆道癌の 5 年生存率は 24.2 ~ 61.3 %（胆嚢癌 39.8 %、肝門部胆管癌 24.2 %、遠位胆管癌 39.1 %、乳頭部癌 61.3 %）で、予後不良である。その一方で、他癌腫と同様に、胆道癌においても病期が早いほど、長い全生存期間を得られることが示されている（Ishihara et al, 2016）（図2）。



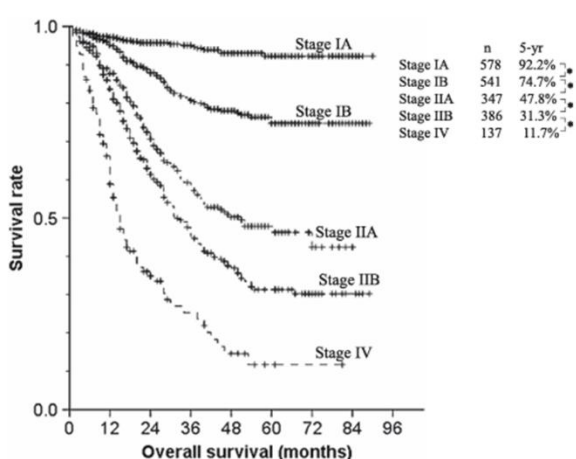
胆嚢癌



肝門部領域胆管癌



遠位胆管癌



十二指腸乳頭部癌

図2. 胆道癌における病期別の全生存期間

* は $p < 0.001$ を、** は $p = 0.030$ を示す。

(Ishihara et al, 2016 より引用)

そこで、胆道癌の予後を改善するためには、胆道癌を早期に発見するための簡便な診断手段を開発する必要があると考える。その方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。

腫瘍マーカーは、腫瘍細胞などから産生され、患者の血液などに検出される物質であり、腫瘍の検出や鑑別診断、治療効果判定や治療後のモニタリングなど、臨床の場で広く利用されている（本田ほか, 2011）。実臨床で利用されている腫瘍マーカーと、その用途を表1に示す。

表 1. 腫瘍マーカーとその臨床応用の一例

(Ludwig et al, 2005 Table 1 より引用、改変)

腫瘍マーカー	癌腫	用途
ヒト絨毛性ゴナドトロピン- β	精巣癌	病期分類
CA19-9: carbohydrate antigen 19-9	膵癌	モニタリング
CA125: carbohydrate antigen 125	卵巣癌	モニタリング
CEA: carcinoembryonic antigen	大腸癌	モニタリング
PSA: prostate-specific antigen	前立腺癌	スクリーニング、モニタリング
CA15-3: carcinoma antigen 15-3	乳癌	モニタリング

これらのうち、Prostate-specific antigen (PSA) は前立腺から分泌されるセリンプロテアーゼで、その発現は前立腺組織に特異的である。そのため、血中濃度のわずかな上昇であっても前立腺疾患の存在が示唆され (本田ほか, 2011)、欧州で行われた無作為化比較試験によって、死亡率低下効果が確実であることが証明され (Schröder et al, 2014)、本邦においては任意型検診において PSA 測定による前立腺癌スクリーニングが行われている。このような、疾患特異的であり、スクリーニングに利用可能な腫瘍マーカーが胆道癌の早期発見および予後改善に必要である。

胆道癌に用いられる腫瘍マーカーとして carbohydrate antigen 19-9 (CA19-9) が知られているが、これは主に胆道癌においては傍大動脈リンパ節転移および局所リンパ節転移の診断などの進行癌のモニターに適している (Yamada et al, 2018)。また、CA 19-9 上昇は表 1 に示す様に膵癌の指標として用いられている他、良性疾患、特に閉塞性黄疸を有する病態でも上昇を認めることが報告されており (Gaetano et al, 2012)、CA19-9 測定による胆道癌の診断能には限界がある。CA19-9 の他、肝外胆管癌の腫瘍マーカーとして血清抗 p53 抗体の有用性も報告されている (Okada et al, 2017)。しかし、Zhang ら (Zhang et al, 2014) により血清抗 p53 抗体は乳癌、大腸癌、肺癌、卵巣癌など様々な癌腫で腫瘍マーカーとなる可能性が報告されており、Shimada ら (Shimada et al, 2003) により食道癌や子宮癌における高発現も確認されている。これより、血清抗 p53 抗体上昇も胆道癌特異的ではないと考えられ、その診断能にはやはり限界がある。

そのため、胆道癌を特異的に診断するための新規腫瘍マーカーの同定は重要である。

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、1995 年に Sahin ら (Sahin et

al, 1995) によって報告された遺伝子の網羅的探索方法であり、抗原抗体反応を利用して 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、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。これまで、SEREX 法によって、腫瘍抗原を含めた数多くの抗原が同定されてきた。SEREX 法は、高力価の IgG 反応を誘発するタンパクを単離する効果的なスクリーニング法であり、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可能である。これまで SEREX 法は、食道癌 (Nakashima et al, 2004; Shimada et al, 2009)、胃癌 (Obata et al, 2000; Linē et al, 2002)、大腸癌 (Song et al, 2011; Garifulin et al, 2015)、膀胱癌 (Nakatsura et al, 2001; Heller et al, 2010)、肝細胞癌 (Wang et al, 2009; Song et al, 2012) などの様々な悪性腫瘍に用いられてきたが、胆道癌において SEREX 法が施行された過去の報告は認めない。

本研究では、胆道癌患者血清を用いて SEREX 法を行い、同定された抗原に対する血清抗体価を、amplified luminescence proximity homogeneous assay-linked immunosorbent assay (AlphaLISA) で測定することによって、胆道癌における新規腫瘍マーカーを探索することを目的とした。

材料と方法

[1] 血清サンプル

胆道癌の定義は肝内胆管癌、肝門部領域胆管癌、遠位胆管癌、胆嚢癌、胆嚢管癌、十二指腸乳頭部癌とした。胆道癌以外の悪性腫瘍および自己免疫性疾患を併存する患者は除外した。胆道癌の進行度は tumor-node-metastasis classification (TNM 分類) 第 7 版に従って分類した。全患者は根治術、姑息的手術、または試験開腹術が施行された。2014 年から 2016 年の間に、北海道大学病院 消化器外科 II において、手術検体または生検組織で病理組織学的に胆道癌と診断された患者 56 例より血液を採取した。血液の採取および使用は、インフォームドコンセントのうえ書面で同意書を取得またはオプトアウトとした。採取した血液はエチレンジアミン四酢酸を含まない試験管に採取し、3000 x g で 10 分間、室温で遠心分離し、上清を血清として -80 °C で保存した。健常者血清 30 例を東京未来スタイルより購入した。東京未来スタイルより購入したすべての血清は、Institutional Review Board (IRB) の規定に基づき、ドナーにインフォームドコンセントを行ったうえで採取されたものである (東京未来スタイルホームページより)。さらに、健常者 114 例および胆道癌 14 例、食道癌 87 例、胃癌 92 例、大腸癌 93 例、膵癌 39 例、乳癌 91 例の血清を、共同研究施設である千葉大学大学院医学研究院 遺伝子生化学教室および参画する千葉大学医学部附属病院の診療科において同意を取得のうえ使用した。本研究は、北海道大学病院および千葉大学医学部附属病院の倫理委員会の承認を得て施行した (北海道大学病院 承認番号; 015-0098、千葉大学医学部附属病院 承認番号; 2014-44)。

[2] SEREX 法による cDNA ライブラリー のスクリーニング

ヒト精巣 cDNA ライブラリーが挿入された λ ZAPII フェージ (Stratagene; La Jolla, CA, USA) と、*E.coli* XL1-Blue MRF⁺ (Stratagene) を混合し、NZY agar プレート上で 4~5 時間、37 °C でプラークが出現するまで培養した。Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) に 30 分間浸したニトロセルロース膜を NZY agar プレート上に置き、さらに 2 時間培養して発現したタンパクをニトロセルロース膜に転写させた。プレートから剥がしたニトロセルロース膜は tris-buffered saline with Tween-20 (TBS-T; 0.05% Tween 20, 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) で 3 回洗浄した後、2000 倍希釈した胆道癌血清を一次抗体として tris-buffered saline (TBS; 150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.5) に添加し、転写したタンパクと室温で 1 時間、反応させた。血清と反応させたニトロセルロース膜を TBS-T で 3 回洗浄し、5000 倍希釈した alkaline

phosphatase-conjugated AffiniPure goat anti-human IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories; West Grove, PA, USA) を二次抗体として反応させた。二次抗体と結合したプラークを発色剤 (0.3 mg/ml nitroblue tetrazolium chloride; 0.15 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl₂; 100 mM Tris-HCl, pH 9.5) で発色させることで可視化し、陽性プラークを回収した。陽性プラークをさらに 2 回、SEREX 法でスクリーニングし、モノクローナル化した。SEREX 法の流れを図 3 に示す。SEREX 法は過去の報告に基づいて施行した (Sahin et al, 1995; Nakashima et al, 2004; Shimada et al, 2009; Kagaya et al, 2011; Machida et al, 2015)

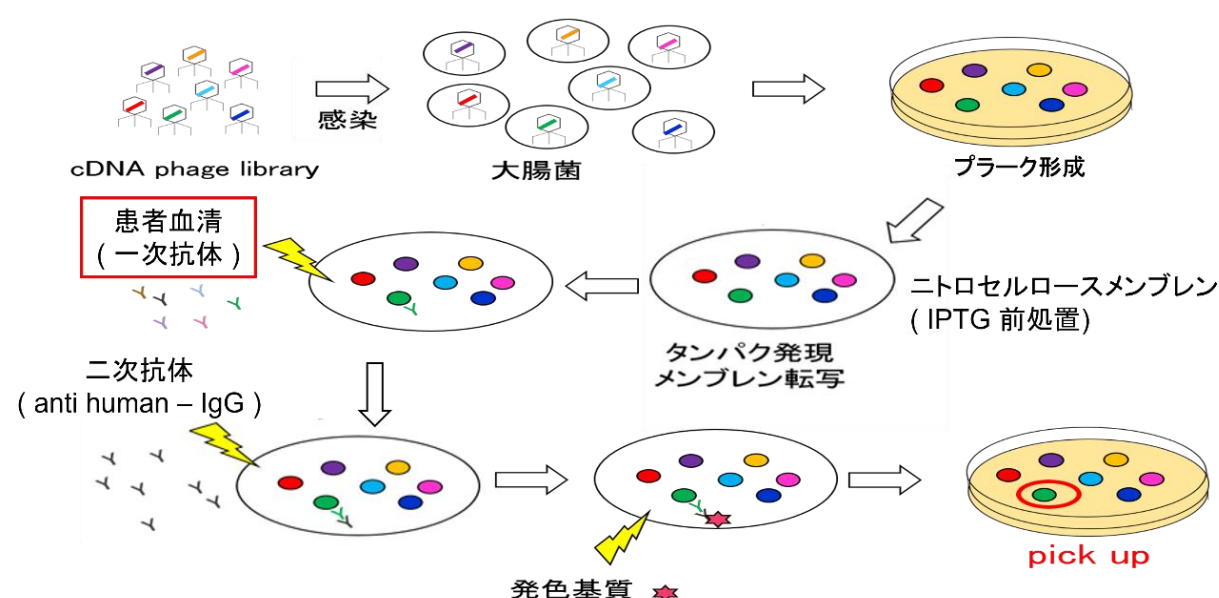


図 3. SEREX 法 (日和佐, 2014 図 3 より引用、改変)

【3】 同定した抗原タンパクの遺伝子解析

スクリーニングしたモノクローナルファージ cDNA を ExAssist helper phage (Stratagene) と同時に *E.coli* XL1-Blue MRF[®] に感染させ、インサート cDNA を含む pBluescript ファージミドに変換した。これを *E.coli* SOLR (Stratagene) に導入し、プラスミド DNA を単離した。プラスミド DNA の塩基配列解析は、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems; Thermo

Fisher Scientific, Inc.; Foster City, CA, USA) を規定プロトコールに従って使用し、ABI PRISM 3130-Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems; Thermo Fisher Scientific, Inc.) で解析した。得られた塩基配列は、Basic Local Alignment Search Tool (BLAST; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) で照合し、遺伝子の同定を行った。

[4] Glutathione S-transferase (GST) 融合タンパクの発現と精製

pBluescript に挿入された抗原遺伝子の塩基配列と、pGEX-4T-1 ベクタープラスミド (GE Healthcare Life Sciences; Pittsburgh, PA, USA) を融合させ、組み換え GST 融合タンパクを作成した。pGEX-4T-1 ベクターは制限酵素 EcoRI および XhoI (Nippon Gene Co. Ltd.; Tokyo, Japan) で処理した。pBluescript に挿入された cDNA は PrimeSTAR HS (premix; Takara Bio, Inc.; Shiga, Japan) を使用し、polymerase chain reaction (PCR) で増幅させた。断片化した cDNA と pGEX-4T-1 ベクターを、QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen GmbH; Hilden, Germany) で分離し、In-Fusion HD Cloning Kit (Takara Bio, Inc.) を規定プロトコールどおり使用し融合させた。融合タンパクを ECOS competent *E.coli* JM109 (Nippon Gene Co. Ltd.) に形質転換し、50 μ g/ml のアンピシリンを含む Luria-Bertani Agar プレートで、37 °C で一晚培養し、得られた融合タンパクの確認は塩基配列解析で行った。融合したプラスミドを ECOS competent *E.coli* BL21 (DE3; Nippon Gene Co. Ltd.) に導入し、0.5mM IPTG を添加して室温で 4 時間培養し、GST 融合タンパクを発現させた。GST 融合タンパクは GSTrap FF column (GE Healthcare Life Sciences) を規定プロトコールに従って使用して精製した。緩衝液は Amicon Ultra-15 Centrifugal Filters (MilliporeSigma; Billerica, MA, USA) を規定プロトコールに従って使用し、リン酸緩衝生理食塩水とした。

[5] 不溶性タンパクの可溶化

不溶性 GST 融合タンパクは 8 M urea in TED buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0; 1 mM ethylenediaminetetraacetic acid; and 1 mM dithiothreitol) で可溶化し、4M urea in TED buffer, 2M urea in TED buffer と段階的に透析し、最終的に 50mM NaCl in TED buffer とした。

[6] 抗原タンパクおよびペプチドの調整

Wingless-type MMTV integration site family, member 7 (WNT7B) が候補抗原として同定された。WNT7B₂₄₅₋₃₅₃ (GST + WNT7B 残基 245-353, 以下同様に記載) は Abnova (Taipei, Taiwan) より購入した。その他 4 種の WNT7B 欠失変

異体（WNT7B₋₉₂₋₂, -92-260, 2-260, 184-260）は KOD-Plus-Mutagenesis Kit（Toyobo Life Science; Osaka, Japan）を規定プロトコールに従って使用し、ECOS competent *E.coli* BL21（DE3）で形質転換した。7 種の N 末端ビオチン標識ペプチド（WNT7B₁₈₄₋₂₀₃, ₁₉₄₋₂₁₃, ₂₀₄₋₂₂₃, ₂₁₄₋₂₃₃, ₂₂₄₋₂₄₃, ₂₃₄₋₂₅₃, ₂₄₄₋₂₆₀）の精製は Peptide 2.0, Inc.（Chantilly, VA, USA）に受託して精製した。GST 融合タンパクと N 末端ビオチン標識ペプチドの各々の名称とシェーマを図 4 に示す。

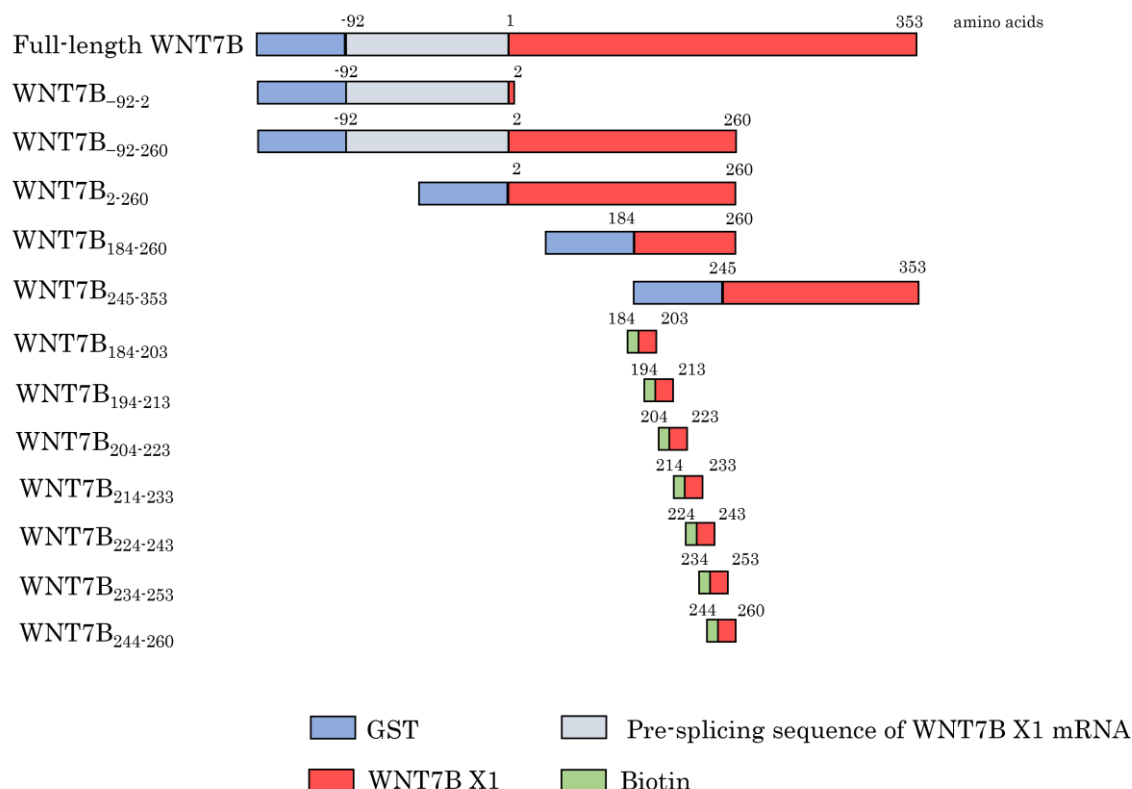


図 4. 単離した WNT7B、欠失変異体、ペプチドのシェーマ

SEREX 法によって単離した cDNA クローンは、WNT7B cDNA の 5' 末端に WNT7B mRNA の pre-splicing 配列を 276 塩基（92 アミノ酸）含んでおり、同部位を“ -92”と記載した。

[7] AlphaLISA による血清抗体価の測定

候補抗原に対する血清抗体価を AlphaLISA で測定し、患者血清と健常者血清のグループで比較した。100 倍希釈した 2.5 μ l の血清と、10 μ g/ml に調整した GST または GST 融合タンパク、400 ng/ml に調整したビオチンまたは N 末端ビオチン標識ペプチドを 2.5 μ l ずつ、384 well microtiter plates (white opaque

OptiPlate; PerkinElmer, Inc.; Waltham, MA, USA) にセットし、室温暗所にて 3 時間以上インキュベートした。その後、AlphaLISA anti-human IgG Acceptor Beads と Glutathione-Donor Beads または Streptavidin-Donor Beads を各々 2.5 μ l ずつ加え、1 ~ 14 日間インキュベートした。希釈にはすべて AlphaLISA ImmunoAssay Buffer (PerkinElmer, Inc.) を用いた。抗原抗体反応の強度を評価する Alpha count を血清抗体価とし、EnSpire Alpha microplate reader (PerkinElmer, Inc.) で測定した。GST で標識化したタンパクの Alpha count は、GST 融合タンパクの Alpha count から GST の Alpha count を差し引くことで評価した。同様に、ビオチン標識したペプチドの Alpha count は、N 末端ビオチン標識ペプチドの Alpha count からビオチンの Alpha count を差し引くことで評価した。各測定は 3 回施行した。AlphaLISA による測定は過去の文献報告 (Hiwasa et al, 2021) を参考に施行した。

[8] AlphaLISA による血清抗体価測定に用いた血清を採取した健常者および患者の背景

WNT7B に対する血清抗体価を、表 2 に示すコホート 1 ~ 3 を用いて測定した。コホート 1 は 30 例の健常者血清 (東京未来スタイル) と 44 例の胆道癌患者血清 (北海道大学病院 消化器外科 II)、コホート 2 は 44 例の健常者血清 (東京未来スタイルより購入; 30 例、共同研究施設; 14 例) と 44 例の胆道癌患者血清 (北海道大学病院 消化器外科 II) とした。コホート 3 は 114 例の健常者 (共同研究施設) と 70 例の胆道癌患者 (北海道大学病院 消化器外科 II; 56 例、共同研究施設; 14 例) および、402 例の他癌腫患者 (全て共同研究施設; 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。解析に使用した健常者および患者の内訳を表 2 に示す。

表 2. AlphaLISA の解析対象とした健常者と癌患者の内訳

	コホート1 n=74		コホート2 n=88		コホート3 n=586						
	健常者 n=30	胆道癌 n=44	健常者 n=44	胆道癌 n=44	健常者 n=114	胆道癌 n=70	食道癌 n=87	胃癌 n=92	大腸癌 n=93	膵癌 n=39	乳癌 n=91
性別											
男性	20 (66.7)	29 (65.9)	25 (56.8)	29 (65.9)	64 (56.1)	47 (67.1)	76 (87.4)	62 (67.4)	55 (59.1)	23 (59.0)	0 (0)
女性	10 (33.3)	15 (34.1)	19 (43.2)	15 (34.1)	50 (43.9)	23 (32.9)	11 (12.6)	30 (32.6)	38 (40.9)	16 (41.0)	91 (100)
年齢											
<65	7 (23.3)	11 (25.0)	22 (50.0)	11 (25.0)	95 (83.3)	20 (28.6)	25 (28.7)	24 (26.1)	24 (25.8)	10 (25.6)	62 (68.1)
≥65	23 (76.7)	33 (75.0)	22 (50.0)	33 (75.0)	19 (16.7)	50 (71.4)	62 (71.3)	68 (73.9)	69 (74.2)	29 (74.4)	29 (31.9)
Stage											
0		3 (6.8)		3 (6.8)		3 (4.3)	4 (4.6)		3 (3.2)		23 (25.3)
I		1 (2.3)		1 (2.3)		3 (4.3)	6 (6.9)	47 (51.0)	19 (20.4)	2 (5.1)	28 (30.8)
II		19 (43.2)		19 (43.2)		22 (31.4)	12 (13.8)	15 (16.3)	28 (30.1)	0 (0)	22 (24.2)
III		15 (34.1)		15 (34.1)		20 (28.6)	25 (28.7)	5 (5.4)	25 (26.9)	4 (10.3)	2 (2.2)
IV		5 (11.4)		5 (11.4)		20 (28.6)	21 (24.1)	17 (18.5)	15 (16.1)	28 (71.8)	2 (2.2)
X		1 (2.3)		1 (2.3)		2 (2.9)	19 (21.8)	8 (8.7)	3 (3.2)	5 (12.8)	14 (5.4)
占拠部位											
胆嚢		8 (18.2)		8 (18.2)		9 (12.9)					
胆嚢管		0 (0)		0 (0)		1 (1.4)					
肝内胆管		1 (2.3)		1 (2.3)		7 (10.0)					
肝門部胆管		24 (54.4)		24 (54.4)		36 (51.4)					
遠位胆管		10 (22.7)		10 (22.7)		15 (21.4)					
乳頭部		1 (2.3)		1 (2.3)		2 (2.9)					

() 内は、% を示す。

[9] WNT7B の三次構造の解析

WNT7B₂₃₄₋₂₅₃ および WNT7B₂₄₄₋₂₆₀ の三次構造の解析は、computational modeling (I-TASSER: Iterative Threading ASSEmbly Refinement, <https://zhanggroup.org/I-TASSER/>) を使用し、過去の文献報告 (Yang et al, 2015) を参考に施行した。解析には 20 アミノ酸残基から構成されるペプチドを適用したため、234-253 アミノ酸残基および 244-263 アミノ酸残基で三次構造の解析を行った。

[10] 血清抗体価のカットオフ値の設定

WNT7B₂₃₄₋₂₅₃ に対する血清抗体価のカットオフ値は receiver operating characteristic (ROC) 曲線で決定した。CA19-9 のカットオフ値は当院の基準値である 37 U/ml とした。

[11] 感度および特異度の検討

WNT7B₂₃₄₋₂₅₃ に対する血清抗体価の単独の感度は胆道癌 70 例を解析対象とし、CA19-9 単独および CA19-9 と WNT7B₂₃₄₋₂₅₃ に対する血清抗体価の組み合わせ (and / or) による感度は、CA19-9 のデータを入手できた 55 例を解析対象とした。WNT7B₂₃₄₋₂₅₃ に対する血清抗体価の特異度は 114 例の健常者を解析対象とした。

[12] 細胞株の培養

ヒト胆道癌細胞株である G-415, HuCCT1, TFK-1, YSCCC を RIKEN より入手した。正常ヒト皮膚線維芽細胞株である NHDF を Takara Bio, Inc. より入手した。培養液には胆道癌細胞株には RPMI-1640, NHDF には DMEM を、10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA) と 1 % penicillin / streptomycin (Thermo Fisher Scientific, Inc.; Waltham, MA, USA) を添加して用いた。いずれも 37 °C で培養した。

[13] 定量的逆転写 PCR (Reverse transcription-quantitative PCR; RT - qPCR) による遺伝子発現の評価

RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen) を使用して細胞株から RNA を抽出し、PrimeScript RT Master Mix (Takara Bio, Inc.) を使用して cDNA とした。いずれも規定プロトコールどおり施行した。cDNA は遺伝子特異的プライマーと SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Inc.) で標的配列を増幅した。PCR 反応とその結果は StepOne Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を使用し、2 - $\Delta\Delta C_t$ method で解析した。2 - $\Delta\Delta C_t$ method は過去の文献

(Livak et al, 2001) を参考に施行した。ハウスキーピング遺伝子には glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) を用いた。PCR の設定条件は、95 °C で 20 秒間、ついで 95 °C で 3 秒間の変性と 60 °C で 30 秒間の増幅と伸長を 40 サイクル繰り返した。各々のプライマーの遺伝子特異性は melting curve のピークにより評価した。すべての反応は 3 回施行した。本研究で使用した遺伝子特異的プライマーは次のとおりである。

GAPDH forward;	5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'
GAPDH reverse;	5'-GAAGATGGTGATGGGATTTC-3'
WNT7B forward;	5'-TGGCGTCCTGTACGTGAA-3'
WNT7B reverse;	5'-TCTTGTTGCAGATGATGTTGG-3'

[14] Western blotting によるタンパク発現の評価

細胞を phenyl - methylsulfonyl fluoride を添加した radioimmunoprecipitation buffer で溶解した。タンパクサンプルを各々 10 µg に調整し、4 ~ 20 % の Mini-PROTEAN TGX Precast Gels (Bio - Rad Laboratories, Inc.; Hercules, CA, USA) に流し、polyvinylidene difluoride membrane (Merck Millipore) に転写した。ローディングコントロールは β - actin とした。転写膜は抗原特異的一次抗体と反応させたのちに、二次抗体と反応させ、免疫反応は Enhanced Chemiluminescence Detection System (GE Healthcare Life Sciences) で評価した。本研究で使用した抗体と反応条件は次のとおりである。

WNT7B

一次抗体; cat. no. ab155313 (Abcam; Cambridge, UK), 5000 倍希釈、室温、1 時間

二次抗体; horseradish peroxidase HRP - conjugated AffiniPure Goat Anti - Rabbit IgG (H + L), cat. no. 111 - 035 - 003 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), 30000 倍希釈、室温、1 時間

β -actin

一次抗体; cat. no. MAB1501 (Merck Millipore), 5000 倍希釈、室温、16 時間

二次抗体; HRP - conjugated AffiniPure Goat Anti - Mouse IgG (H + L), cat. no. 115 - 035 - 003 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.), 30000 倍希釈、室温、1 時間

【15】統計解析

統計解析は JMP Pro 14 (SAS Institute Inc.; Cary, NC, USA) で行った。健常者と各種癌患者の血清抗体価の有意差、性別および年齢と血清抗体価の相関関係は Wilcoxon rank-sum test で解析した。血清 CA19-9 値と WNT7B₂₃₄₋₂₅₃ に対する血清抗体価の相関を Spearman's rank correlation coefficient で評価した。全生存期間は Kaplan - Meier 法で解析し、log - rank test で比較検討した。 $p < 0.05$ を有意差ありと定義した。

結果

[1] SEREX 法による胆道癌関連抗原の同定

ヒト精巣 cDNA ライブラリーから合計 1×10^6 個のクローンが得られ、10 例の胆道癌血清で免疫反応を評価したところ 7 個の免疫反応陽性クローンが単離された。塩基配列解析と BLAST 検索により 6 種類の異なる抗原、zinc finger and SCAN domain-containing 18 (ZSCAN18), WNT7B, cilia- and flagella-associated protein 53 (CFAP53), GAPDH, nascent polypeptide-associated complex alpha subunit (NACA), BRCA1-associated protein (BRAP) が同定された。SEREX 法による陽性クローンの同定を図 5 に、同定された 6 種類の抗原と単離されたヌクレオチド領域を表 3 に示す。



図 5. SEREX 法によるスクリーニング

一次スクリーニングの矢印が示す濃い紫色は、陽性クローンを示す。二次スクリーニング、三次スクリーニングにおいても同様に、濃い紫色が陽性クローンである。三次スクリーニングまで施行することにより、モノクローナル化した。

表 3. 胆道癌患者血清による SEREX 法で同定された遺伝子

クローン名	遺伝子名	NCBI Accession no.	ヌクレオチド 領域
BC1B1A2-3	Zinc finger and SCAN domain-containing 18 (ZSCAN18)	XM_017027170.2	82-2596
BC2H1C2-3	Wingless-type MMTV integration site family, member 7B (WNT7B)	XM_011530366.1	164-3683
BC3B1-3	Cilia- and flagella-associated protein 53 (CFAP53)	NM_145020.4	47-1828
BC6D1-3	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)	NM_002046.6	77-1084
BC8A1-3	Nascent polypeptide-associated complex subunit alpha (NACA)	NM_001320193.1	311-1038
BC9C1	BRCA1-associated protein (BRAP)	NM_006768.4	799-2035
BC9E1			286-2100

[2] ヒト細胞株における WNT7B の mRNA およびタンパク発現

WNT7B の mRNA は、非胆道癌細胞株である NHDF では発現を認めず、胆道癌細胞株である G-415, HuCCT1, TFK-1, YSCCC で発現を認めた。タンパク発現についても同様の結果であった。これらの結果を図 6-1, 6-2 に示す。

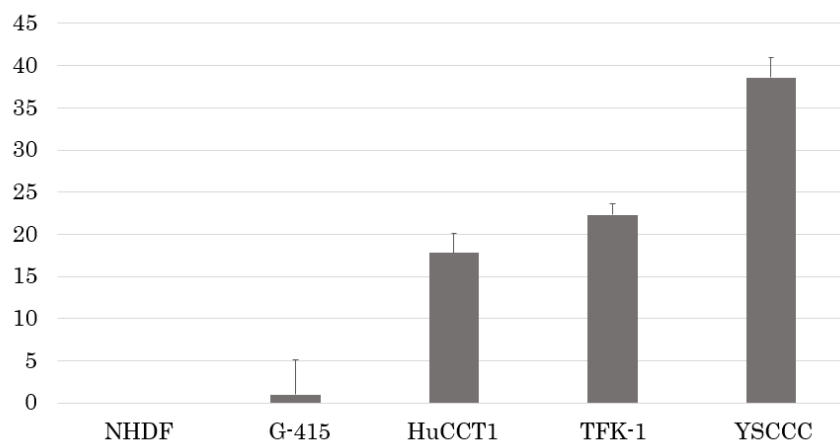


図 6-1. ヒト細胞株における WNT7B の mRNA 発現

縦軸は NHDF における WNT7B の mRNA 発現を 1 とした時の相対発現量を示す。

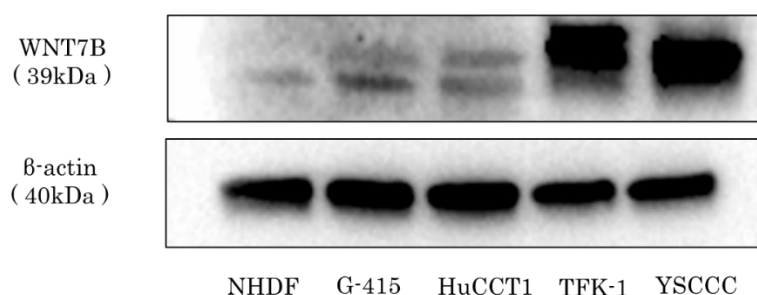


図 6-2. ヒト細胞株における WNT7B のタンパク発現

NHDF および胆道癌細胞株における WNT7B のタンパク発現量を評価した。

[3] WNT7B に対する血清抗体の定量化

1) 単離した WNT7B の全長 (Full-length WNT7B) における血清抗体価の評価

SEREX 法で得られた Full-length WNT7B (WNT7B₉₂₋₃₅₃) における血清抗体価を AlphaLISA を用いて解析したところ、健常者と胆道癌患者で有意差を認めなかった ($p=0.9649$)。この結果を図 7-1 に示す。

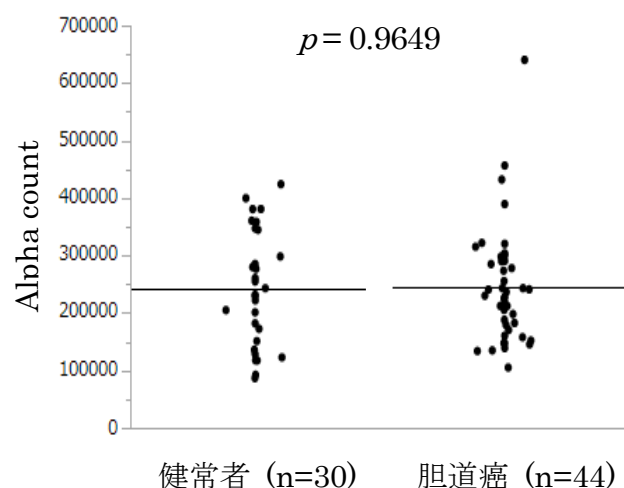


図 7-1. SEREX 法で単離された Full-length WNT7B における血清抗体価

コホート 1 の血清を使用して健常者と胆道癌患者の血清抗体価を比較した。
表中の横線は中央値を示す。

2) WNT7B の欠失変異体 WNT7B₉₂₋₂, WNT7B₉₂₋₂₆₀, WNT7B₂₄₅₋₃₅₃ における血清抗体価の評価

WNT7B₉₂₋₂, WNT7B₉₂₋₂₆₀, WNT7B₂₄₅₋₃₅₃ に対する血清抗体価を評価したところ、WNT7B₉₂₋₂ および WNT7B₂₄₅₋₃₅₃ では健常者と胆道癌患者血清の抗体価に有意差を認めなかった (WNT7B₉₂₋₂; $p = 0.5704$, WNT7B₂₄₅₋₃₅₃; $p = 0.5089$) が、WNT7B₉₂₋₂₆₀ では有意差を認めた ($p = 0.0369$) (図 7-2)。

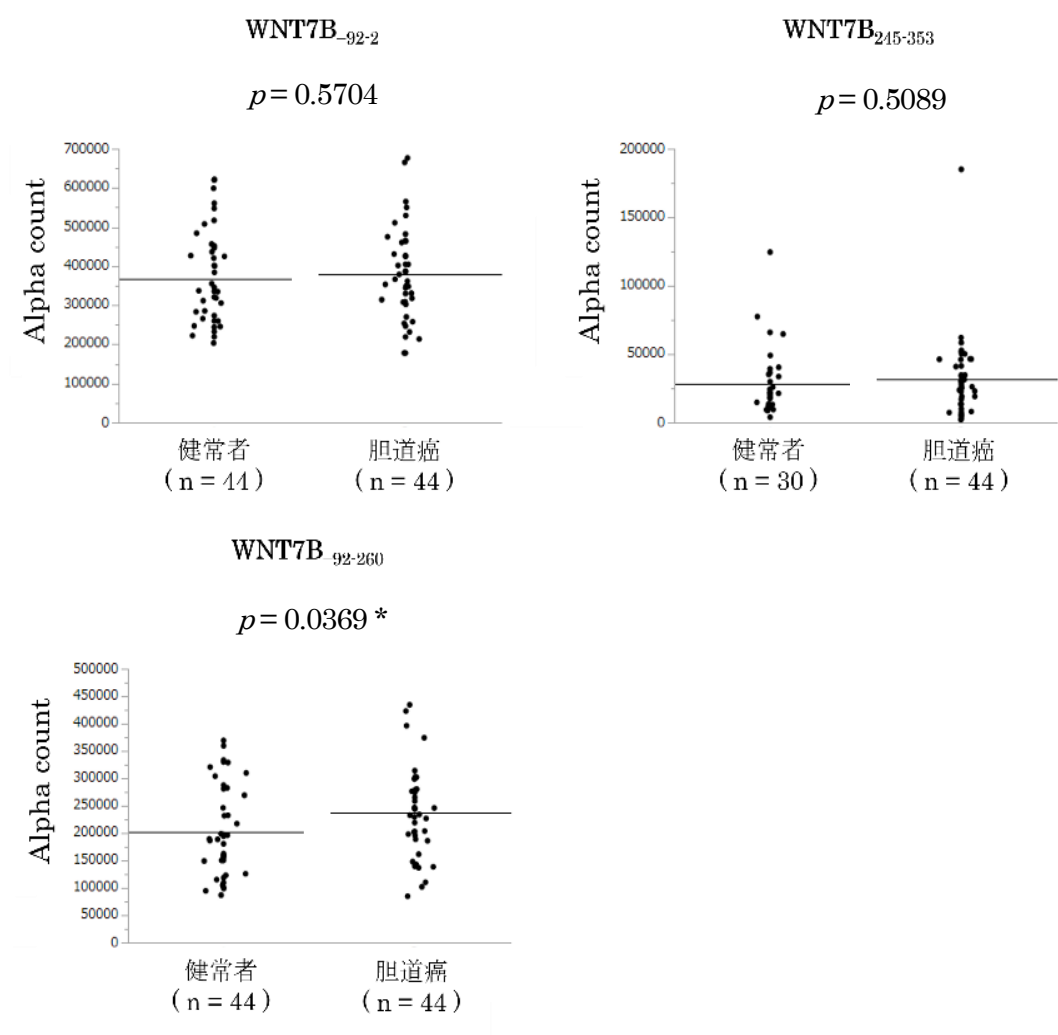


図 7-2. 欠失変異体 WNT7B₉₂₋₂, WNT7B₉₂₋₂₆₀, WNT7B₂₄₅₋₃₅₃ における血清抗体価

WNT7B₉₂₋₂ および WNT7B₉₂₋₂₆₀ はコホート 2、WNT7B₂₄₅₋₃₅₃ はコホート 1 の血清で解析した。表中の横線は中央値を、* は $p < 0.05$ を示す。

3) WNT7B の欠失変異体 WNT7B₂₋₂₆₀ および WNT7B₁₈₄₋₂₆₀ における血清抗体価

WNT7B₂₋₂₆₀, WNT7B₁₈₄₋₂₆₀ に対する血清抗体価を評価したところ、WNT7B₂₋₂₆₀ では健常者と胆道癌患者血清の抗体価に有意差を認めなかった ($p = 0.6949$) が、WNT7B₁₈₄₋₂₆₀ では有意差を認めた ($p = 0.0056$) (図 7-3)。

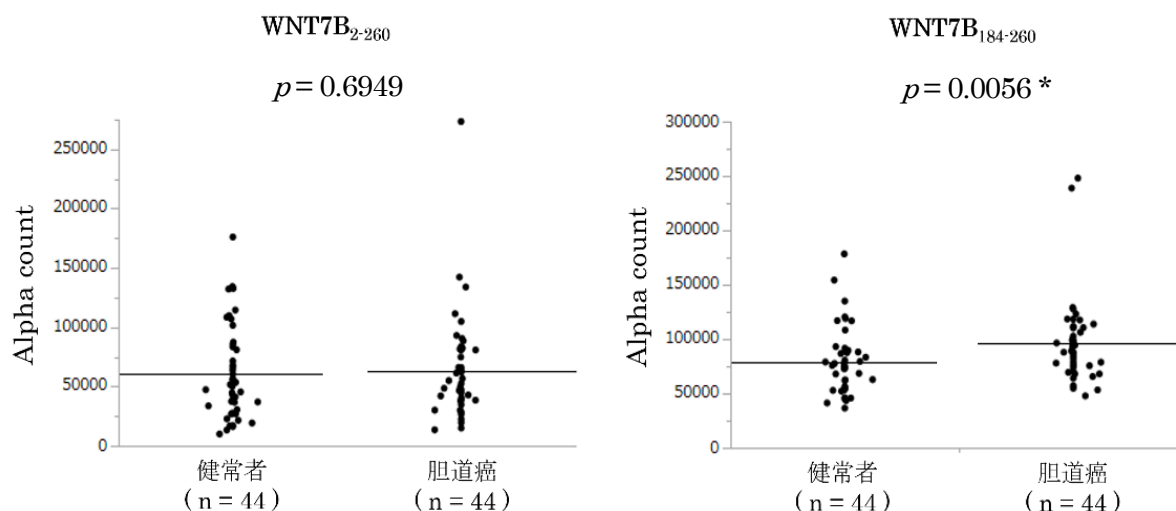


図 7-3. 欠失変異体 WNT7B₂₋₂₆₀ および WNT7B₁₈₄₋₂₆₀ における血清抗体価

いずれもコホート 2 の血清で解析した。表中の横線は中央値を、* は $p < 0.05$ を示す。

4) WNT7B のペプチド WNT7B₁₈₄₋₂₀₃, WNT7B₁₉₄₋₂₁₃, WNT7B₂₀₄₋₂₂₃, WNT7B₂₁₄₋₂₃₃, WNT7B₂₂₄₋₂₄₃, WNT7B₂₃₄₋₂₅₃, WNT7B₂₄₄₋₂₆₀ に対する血清抗体価の評価

7 つの N 末端ビオチン標識ペプチド WNT7B₁₈₄₋₂₀₃, WNT7B₁₉₄₋₂₁₃, WNT7B₂₀₄₋₂₂₃, WNT7B₂₁₄₋₂₃₃, WNT7B₂₂₄₋₂₄₃, WNT7B₂₃₄₋₂₅₃, WNT7B₂₄₄₋₂₆₀ に対する血清抗体価を評価したところ、WNT7B₁₈₄₋₂₀₃, WNT7B₂₀₄₋₂₂₃, WNT7B₂₂₄₋₂₄₃ では健常者と胆道癌患者で血清抗体価に有意差を認めなかった (WNT7B₁₈₄₋₂₀₃; $p = 0.0595$, WNT7B₂₀₄₋₂₂₃; $p = 0.5579$, WNT7B₂₂₄₋₂₄₃; $p = 0.0628$)。一方、WNT7B₁₉₄₋₂₁₃, WNT7B₂₁₄₋₂₃₃, WNT7B₂₃₄₋₂₅₃, WNT7B₂₄₄₋₂₆₀ は、健常者と比較して胆道癌患者で血清抗体価は有意に高値であった (WNT7B₁₉₄₋₂₁₃; $p = 0.0310$, WNT7B₂₁₄₋₂₃₃; $p < 0.0001$, WNT7B₂₃₄₋₂₅₃; $p = 0.0009$, WNT7B₂₄₄₋₂₆₀; $p = 0.0005$) (図 7-4)。

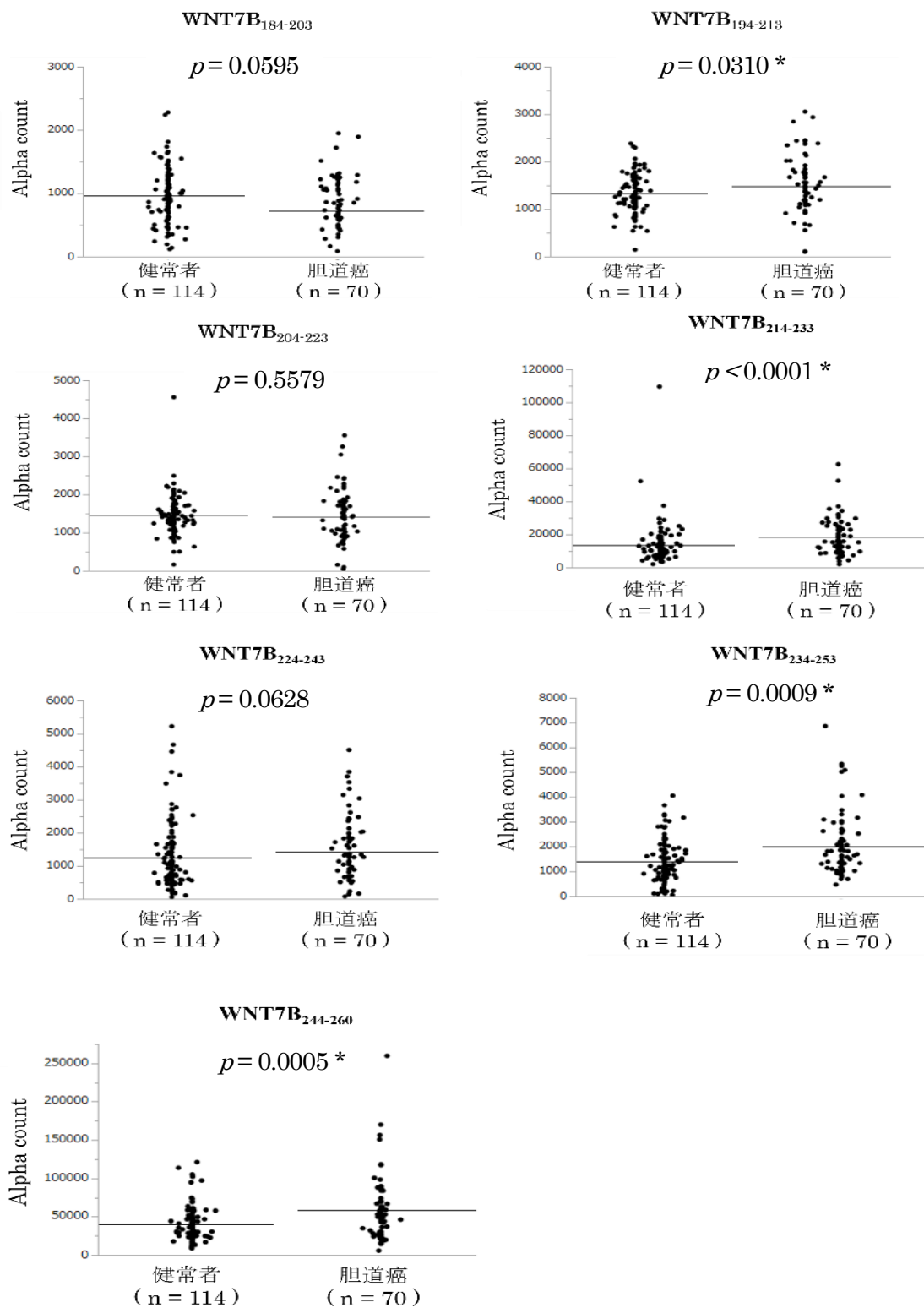


図 7-4. N 末端ビオチン化ペプチドにおける血清抗体価

いずれもコホート 3 の血清で解析した。表中の横線は中央値を、* は $p < 0.05$ を示す。

5) WNT7B のペプチド WNT7B₂₃₄₋₂₅₃, WNT7B₂₄₄₋₂₆₀ に対する血清抗体価の胆道癌特異性の評価

胆道癌における特異性を検討するため、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃ および WNT7B₂₄₄₋₂₆₀ に対する血清抗体価 WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs, WNT7B₂₄₄₋₂₆₀-Abs を他癌腫（食道癌、胃癌、大腸癌、膵癌、乳癌）と健常者と比較検討した。その結果、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs は胆道癌患者以外では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; $p = 0.0503$ ）。一方、WNT7B₂₄₄₋₂₆₀-Abs は胆道癌の他、食道癌、胃癌、大腸癌においても健常者と比べ有意に高値であった（食道癌; $p < 0.0001$, 胃癌; $p < 0.0001$, 大腸癌; $p < 0.0001$, 膵癌; $p = 0.0715$, 乳癌; $p = 0.3295$ ）。この結果を図 7-5 に示す。

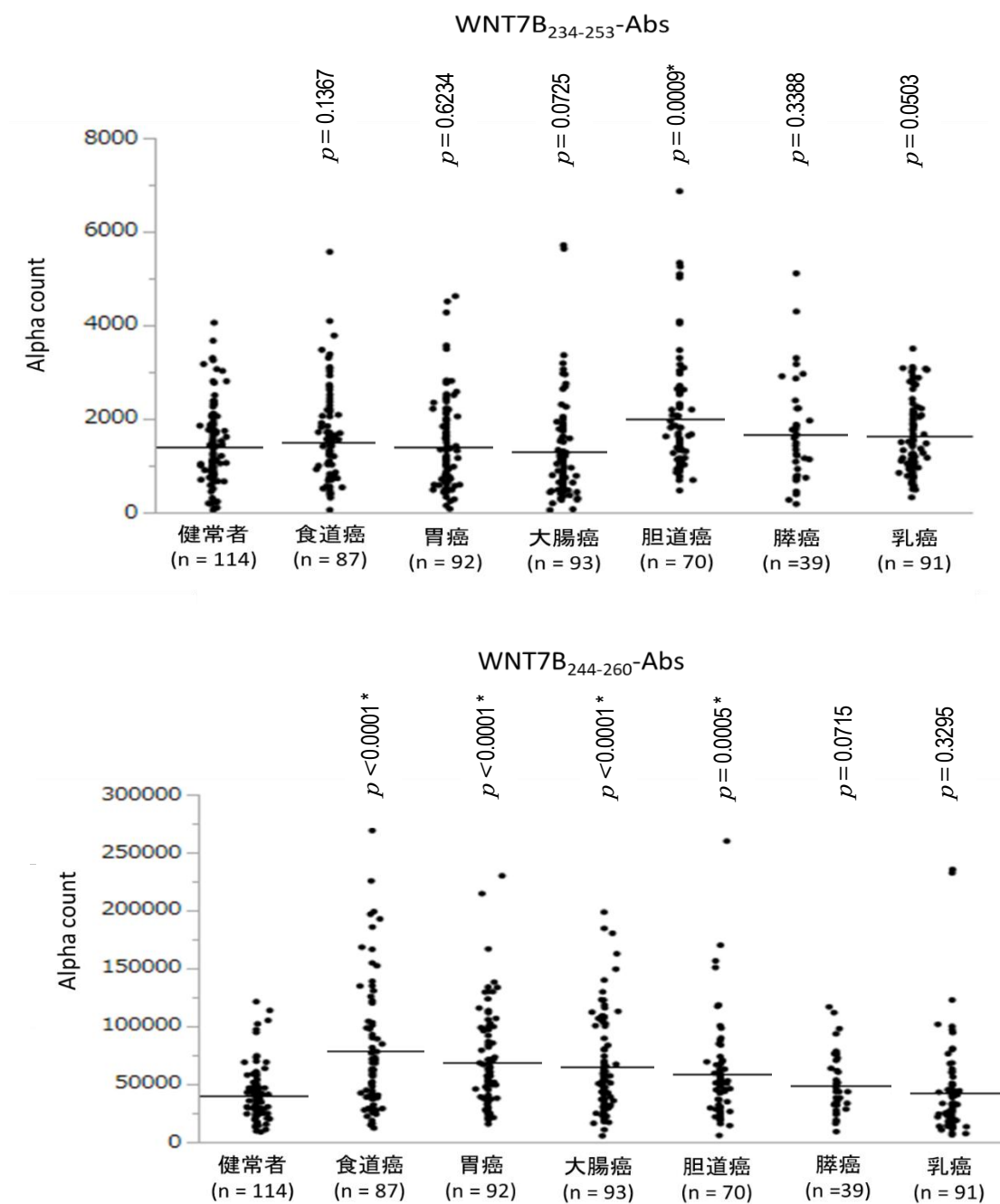


図 7-5. N 末端ビオチン化ペプチドにおける血清抗体価

コホート 3 の血清で解析した。表中の横線は中央値を、* は $p < 0.05$ を示す。

[4] WNT7B₂₃₄₋₂₅₃ と WNT7B₂₄₄₋₂₆₃ の三次構造の解析

解析には 20 アミノ酸残基から構成されるペプチドを適用したため、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃ および WNT7B₂₄₄₋₂₆₃ で三次構造の解析を行った。WNT7B₂₃₄₋₂₅₃ および WNT7B₂₄₄₋₂₆₃ はいずれもらせん構造であるが、WNT7B₂₄₄₋₂₆₃ ではアミノ酸配列 ‘RQP’ の部位で屈曲を有することが判明した (図 8)。

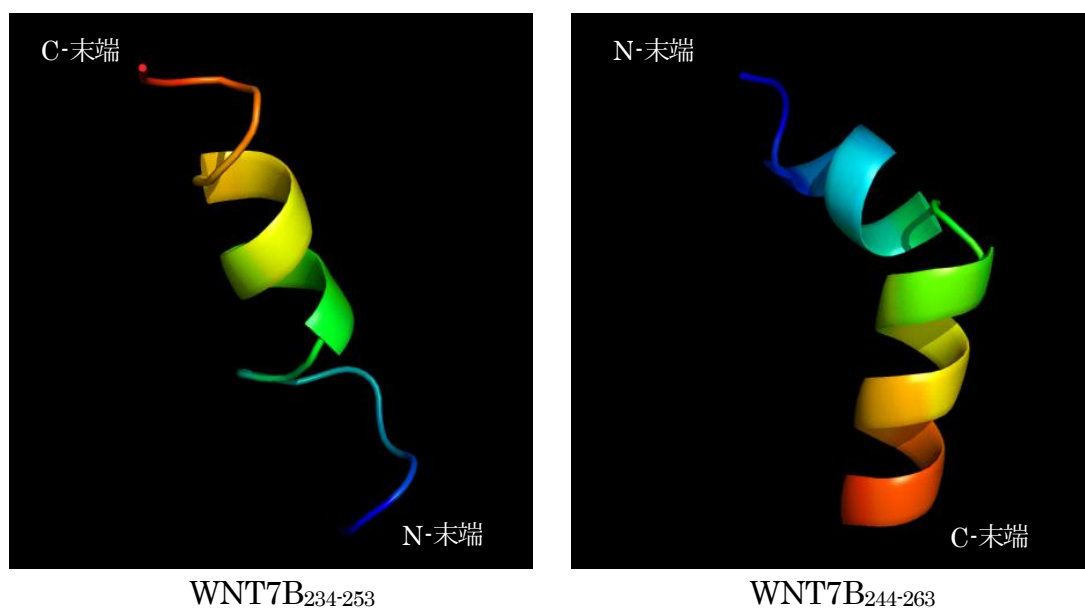


図 8. WNT7B₂₃₄₋₂₅₃ および WNT7B₂₄₄₋₂₆₃ の三次構造

WNT7B₂₃₄₋₂₅₃ および WNT7B₂₄₄₋₂₆₃ の三次構造を、computational modeling を用いて解析した。

[5] WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs と胆道癌患者背景の相関

胆道癌患者 70 例について、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs と性別、年齢との相関を解析したところ、男女間で WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs に有意差を認めなかった ($p = 0.0549$)。また、65 歳以上と 65 歳未満の 2 つの年齢群間でも、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs に有意差を認めなかった ($p = 0.8585$)。さらに、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs と CA19-9 値の相関を、CA19-9 測定値を確認できた 55 例で解析したところ、相関を認めなかった ($\rho = -0.0029$, $p = 0.9831$)。これらの結果を図 9 に示す。

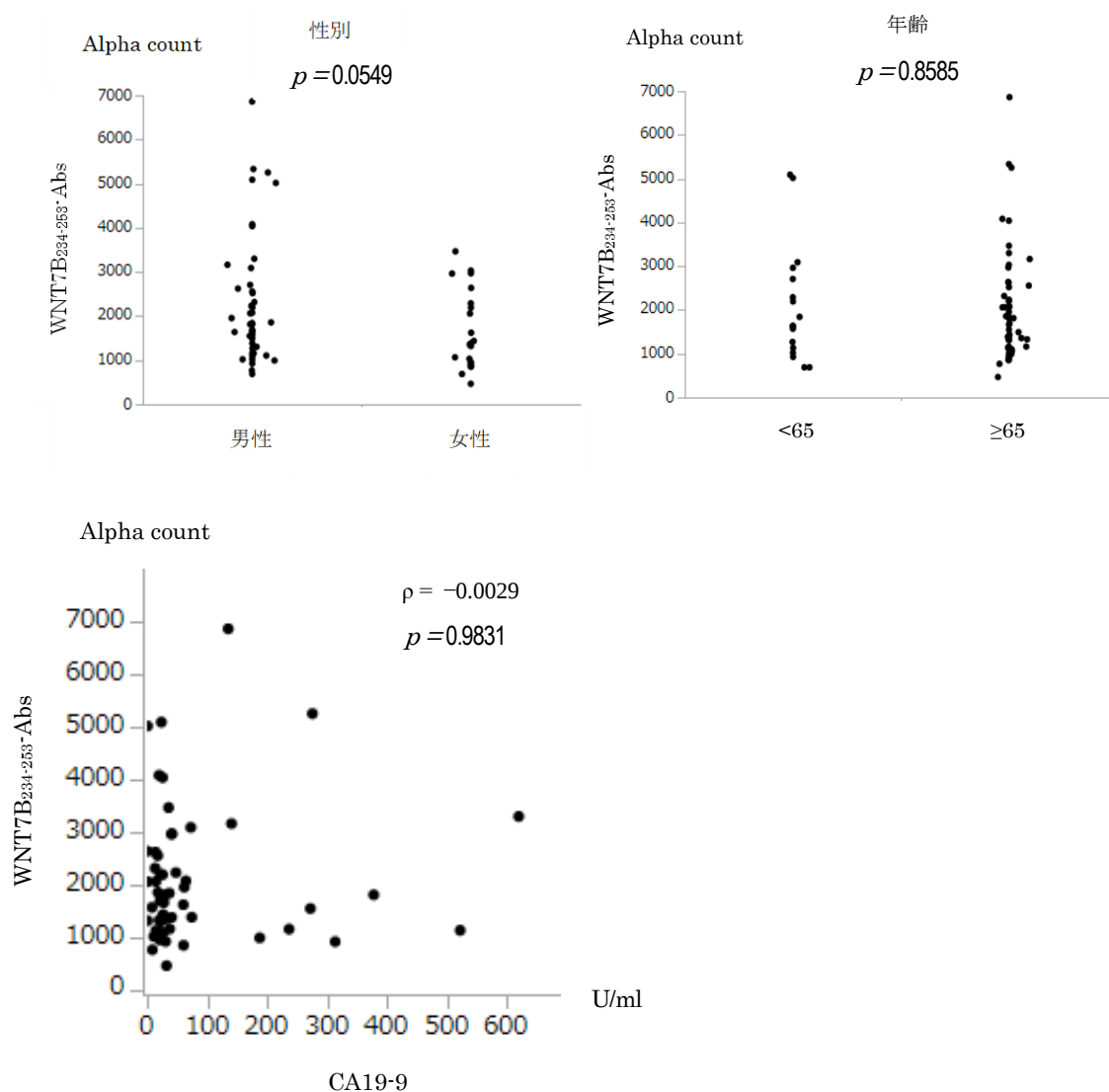


図 9. WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs における性別、年齢、CA19-9 値との相関関係の評価

年齢および性別は胆道癌患者 70 例で評価、CA19-9 値は 55 例で評価した。

[6] WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs のカットオフ値の設定

WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs のカットオフ値は、ROC 曲線による解析で 1271 Alpha count (area under the curve (AUC) = 0.646, 図 10) と設定し、1271 Alpha count 以上を陽性、1271 Alpha count 未満を陰性と定義した。その結果、胆道癌患者における陽性率は、Stage 0 で 66.7% (2/3 例), Stage I で 33.3% (1/3 例), Stage II で 81.8% (18/22 例), Stage III で 70% (14/20 例), Stage IV で 70% (14/20 例) であった。

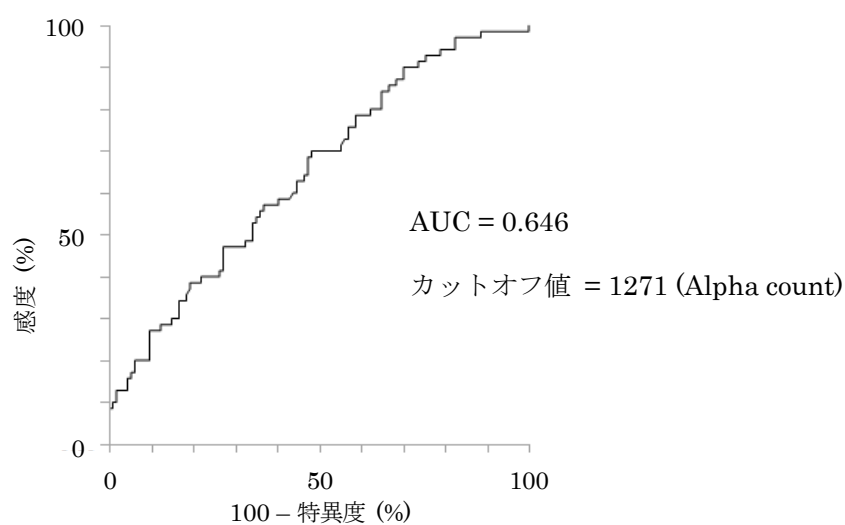


図 10. ROC 曲線 による WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs のカットオフ値の設定

健常者血清 114 例、胆道癌血清 70 例による解析結果を用いてカットオフ値を設定した。

[7] 胆道癌における CA19-9 と WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs の検出力

胆道癌患者における CA19-9 単独の感度は 40 % (22 / 55 例)、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs 単独の感度は 70 % (49 / 70 例)、CA19-9 と WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs のいずれか一方または両方が陽性となる感度は 83.6 % (46 / 55 例) であった。この結果を図 11 に示す。また、比較的早期の胆道癌 (Stage 0 - II) における WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs の感度は 75 % (21 / 28 例) であった。WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs の特異度は 51.8 % (59 / 114 例) であった。

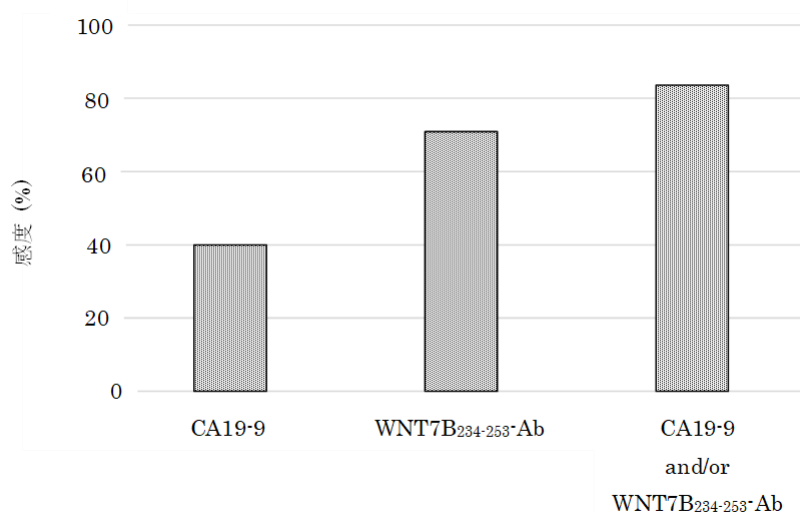


図 11. CA19-9 および WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs の感度の評価

CA19-9 は 55 例で解析、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs は 70 例で解析した。
CA19-9 および WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs のいずれか一方または両方がカットオフ値以上であった症例を “and / or” と記載した。

[8] WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs と胆道癌の予後

予後が判明している胆道癌患者 52 例につき、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs と予後の関連を解析した。52 例のうち WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs 陽性は 36 例、陰性は 16 例であった。全生存期間の分析で、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs 陽性は陰性に比べ生存率が低いことが示されたが、有意差は認めなかった ($p=0.2555$)。この結果を図 12 に示す。

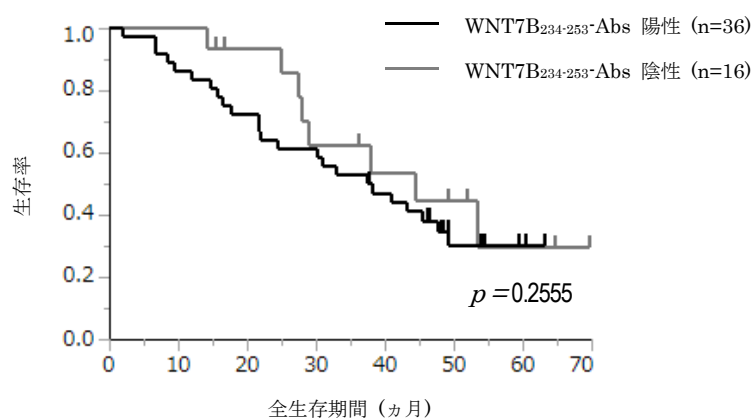


図 12. WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs と予後（全生存期間）の解析

WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs のカットオフ値 (Alpha count; 1271) 以上を陽性、未満を陰性とし、Kaplan-Meier 法により全生存期間を比較した。

考察

本研究の目的は、血清抗体価測定による胆道癌の新規腫瘍マーカーを探索することであり、IgG 抗体型腫瘍マーカーに着目した。IgG 抗体型腫瘍マーカーを探索する方法の一つが SEREX 法の利用である。SEREX 法は、胆癌患者の血清中には腫瘍抗原に対する IgG 抗体が存在することに基づいて癌患者血清をプローブとして使用し、腫瘍細胞から作成した cDNA ライブラリーをスクリーニングする方法で、Sahin ら (Sahin et al, 1995) によって報告された。その後、有用な癌抗原同定の効率をあげるため、cDNA ライブラリーの材料として同種癌細胞株や、癌精巢抗原の効率的な単離を目的とした精巢組織等の使用もされている (岡田ら, 2004)。本研究において、胆道癌細胞から作成した cDNA ライブラリーをスクリーニングすることで胆道癌に特異的に発現している抗原タンパクを効率的に同定できた可能性がある。しかし、SEREX 法の手技獲得に約 1 年と多くの期間を要し、胆道癌腫瘍組織や胆道癌細胞株から cDNA ライブラリーを作成することが困難であり、ヒト精巢 cDNA ライブラリーを使用することにした。これまでも消化器癌患者血清による SEREX 法で同定された抗原に対する抗体価測定により腫瘍マーカーが同定され、その有用性が明らかにされている。その例として、食道癌細胞株より作成された cDNA ライブラリーを用いた SEREX 法で同定された makorin1 は食道扁平上皮癌の新規 SEREX 抗原として同定され、これに対する血清抗体価は食道扁平上皮癌の診断マーカーとなりうることが報告されている (Shimada et al, 2009)。同様に、SEREX 法により新規の遺伝子 family として esophageal carcinoma SEREX antigen (ESCA) が同定され、ESCA family の conserved domain に対する血清抗体価は、食道扁平上皮癌の腫瘍マーカーとなり得る可能性が示唆されている (Kagaya et al, 2011)。これらの研究報告をもとに、本研究では胆道癌患者血清を使用した SEREX 法により候補となる抗原タンパクの同定を行った。同定した候補抗原のうち、RT-qPCR で mRNA の高発現を認め、Western blotting でタンパクの高発現も認めた WNT7B を本研究における標的抗原タンパクとした。

血清抗体価の評価法としては AlphaLISA の他、Enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA) がある。ELISA は抗原タンパクが自然にポリカーボネートのプレートに疎水結合することが前提となっているが、抗原タンパクによって疎水性は大きく異なり、正確な抗体価を測定することが困難である。この問題点を解消した技術が AlphaLISA である。AlphaLISA はブロッキングやプレート洗浄の必要がないため非特異的反応が抑えられることや、384 穴プレートを用いて多検体の評価が可能であるという利点も存在する (日和佐, 2014)。これらの利点を踏まえ、本研究では AlphaLISA による血清抗体価測定を施行した。AlphaLISA は ELISA と同様に抗

原抗体反応を利用したものであり、抗原抗体反応の強度を数値化して評価する。まず、donor beads に抗原を結合させ、抗ヒト IgG 抗体を結合させた acceptor beads に血清を混ぜると IgG 抗体が結合する。その IgG 抗体が donor beads に結合している抗原タンパク（ペプチド）を認識して結合すると、donor beads と acceptor beads が接近する。ここに 680 nm の光を照射すると、donor beads から活性酸素が放出され、励起された acceptor beads から 520 ~ 620 nm の光が放出され、その強度を Alpha count として測定する。AlphaLISA の原理を図 13 に示す。

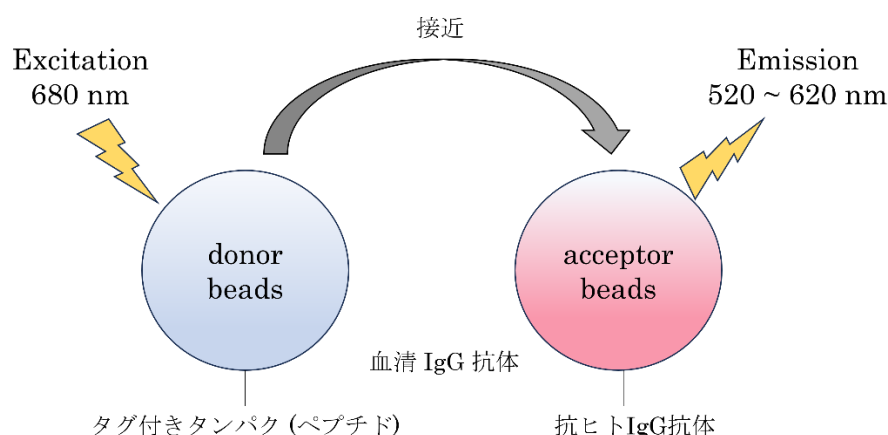


図 13. AlphaLISA の原理 （日和佐, 2014 図 4 より引用、改変）

Full-length WNT7B における AlphaLISA による血清抗体価評価では、健常者と胆道癌患者に有意差は認めなかった（図 7-1, $p=0.9649$ ）が、SEREX 法で WNT7B が抗原として同定されたことから、胆道癌患者血清中に WNT7B に対する抗体が存在することが示されている。Full-length WNT7B の GST 融合タンパクは分子量が大きく可溶性が不良であったことが、有意差を得られなかった一因と考えた。そこで、より低分子量とした 3 つの欠失変異体（WNT7B₉₂₋₂, WNT7B₉₂₋₂₆₀, WNT7B₂₄₅₋₃₅₃）に対する血清抗体価を評価したところ、WNT7B₉₂₋₂₆₀ において胆道癌患者で有意に高い抗体価を示した（図 7-2, $p=0.0369$ ）。尚、WNT7B₉₂₋₂₆₀ には pre-splicing 配列を含んでおり、この pre-splicing 配列に血清抗体価が影響している可能性を考慮し、WNT7B₉₂₋₂ として解析した。その結果、pre-splicing 配列は、健常者と胆道癌患者血清で有意差を認めなかったことから、血清抗体価に影響を与えておらず、WNT7B₂₋₂₆₀ にエピトープ部位があると考えた。この結果を受け、段階的に欠失変異体や N 末端ビオチン標識ペプチドにて抗体価測定を繰り返すことで、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃ および WNT7B₂₄₄₋₂₆₀ の連続した 2 つのペプチドにおいて血清

抗体価が健常者に比べ胆道癌患者で有意に高値であり(図7-4, WNT7B₂₃₄₋₂₅₃; $p=0.0009$, WNT7B₂₄₄₋₂₆₀; $p=0.0005$)、エピトープを絞り込むことに成功した。

血清抗体価測定による胆道癌腫瘍マーカーとしての不可欠な要素は、高い感度を有することと、胆道癌において特異性を有することである。現在、胆道癌の腫瘍マーカーとして頻用されている CA19-9 および Carcinoembryonic antigen (CEA) について、過去の報告によると CA19-9 の感度は 71~72 %、特異度は 84~96 % と報告されている (Liang et al, 2015; Wang et al, 2014)。一方、CEA の感度は 12% と低く、CA19-9 に比べ有用性は低いとされている (Wang et al, 2014)。本研究における胆道癌患者の CA19-9 の感度は 40 %であり過去の報告より低い結果となったが、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs の感度は単独で 70 %であり、CA19-9 の一般的な感度と比較し劣らないと思われた。さらに、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs と CA19-9 を組み合わせることで胆道癌における感度は 83.6 %と、CA19-9 の一般的な感度より高くなることが示された。また、本研究では WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs は、他癌腫において有意に高値とはならず、胆道癌において特異的に有意に高値を示すことが判明した (図7-5, 他癌腫; $p>0.05$, WNT7B₂₃₄₋₂₅₃; $p=0.0009$)。これより、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs と CA19-9 の組み合わせを利用したスクリーニングは、胆道癌の診断の一助となる可能性があると考えられる。また、Stage 0~II の比較的早期の胆道癌においても高感度 (75 %) で同定可能であったことから、早期発見および早期治療介入による予後改善が期待できると推測する。

WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs と WNT7B₂₄₄₋₂₆₀-Abs の胆道癌特異性の相違は、両者の三次構造の違いに由来する可能性があると考えた。そこで computational modeling を用い、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃ と WNT7B₂₄₄₋₂₆₃ の三次構造解析を行ったところ、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃ および WNT7B₂₄₄₋₂₆₃ はいずれもらせん構造であるが、WNT7B₂₄₄₋₂₆₃ ではアミノ酸配列 'RQP' の部位で屈曲を有することが判明した (図8)。WNT7B₂₄₄₋₂₆₀ は屈曲を有するため、抗体は屈曲部位の突出側に対し抗原抗体反応を呈しやすい状態であると考えられる。また、BLAST 検索によって、屈曲部とその前後で同様のアミノ酸配列を有する 5 つのタンパクを認め、その 1 つに発癌との関連が広く研究されているプロテインキナーゼ C があることがわかった (Cacace et al, 1993; Gorin et al, 2009)。Expression Atlas (<https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) によると、プロテインキナーゼ C は多くの消化器癌で高発現を認める。そのため、胆道癌の他、食道癌、胃癌、大腸癌においてもプロテインキナーゼ C に対する抗体が産生されており、WNT7B₂₄₄₋₂₆₀ の 'RQP' 配列に対し交差反応を起こしたことで、WNT7B₂₄₄₋₂₆₀-Abs レベルとして測定され、胆道癌特異性を認めなかった可能性が考えられる。

WNT 1 が 1982 年に Nusse ら (Nusse et al, 1982) によって報告されて以来、WNT7B を含む 19 種の WNT member が同定された。WNT が受容体に結合

すると β -カテニン経路、平面内細胞極性経路、 Ca^{2+} 経路が活性化される (Kikuchi et al, 2008)。そのうち、細胞の増殖と分化を制御する β -カテニン経路は、発癌と関連していると考えられている。実際、 β -カテニンの突然変異と異常蓄積は、大腸癌、肝癌、胃癌、卵巣癌、前立腺癌、膵癌などの様々な癌腫で報告されている (Kikuchi et al, 2003)。Ghosh ら (Ghosh et al, 2013) によって、胆嚢癌における核内の β -カテニン発現が腫瘍の悪性度および浸潤深達度と相関していることが報告され、胆嚢癌の進行に WNT7B が関連していることが示唆されている。

抗 WNT7B 抗体は、診断における腫瘍マーカーとしての有用性以外にも応用できる可能性がある。安定化された β -カテニンは核に入り、癌遺伝子である cyclin D1 や c-myc などの標的遺伝子の転写を刺激し活性化することで、発癌における重要な役割を果たしている (Tetsu et al, 1999; Kikuchi et al, 1999)。胆道癌では、siRNA による β -カテニン経路の抑制により cyclin D1 の発現が阻害され、胆道癌細胞株の生存率低下につながることを示されており、WNT/ β -カテニン経路は胆道癌における細胞増殖に寄与していると考えられる (Loilome et al, 2014)。本研究で血清中の WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs は胆道癌患者で健常者より有意に高値であったことは、胆道癌細胞の増殖を反映していると思われ、胆道癌の検出のみならず、治療効果判定にも寄与する可能性があると考えられる。

本研究の主な limitation は、解析した症例の多くが Stage II 以上であったことであり、これは、Stage 0, Stage I で診断された胆道癌症例が少なかったことに由来する。したがって、今後は Stage 0, Stage I の早期胆道癌における WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs を、症例数を増加して検討することが望ましい。また、現段階では WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs の特異度が低いことより、臨床での腫瘍マーカーとしての使用は困難であるが、より適切なカットオフ値を設定することで、臨床において胆道癌の診断に主要な役割を果たすことが期待できると考える。

本研究の特筆すべき点は、胆道癌患者において血清中の WNT7B に対する抗体保有率が高いことを同定し、さらに胆道癌特異的エピトープをアミノ酸残基 234~253 に絞り込めたことである。また、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs は CA19-9 より高い胆道癌検出力を有することが証明され、さらに WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs と CA19-9 の組み合わせでは 83.6 % という高い感度を示し、胆道癌における新規腫瘍マーカーとしての有用性が示唆された。また、Stage 0~II の比較的早期の胆道癌においても高感度 (75 %) で同定可能であり、早期診断および治療による予後改善を期待できる。

結論

① 本研究から得られた新知見

- ・胆道癌血清を用いた SEREX 法により、胆道癌血清中に抗 WNT7B 抗体が存在することが明らかとなった。
- ・WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs は、健常者に比べ胆道癌患者で有意に高値であった。
- ・WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs は、健常者に比べ胆道癌以外の癌腫（食道癌、胃癌、大腸癌、膵癌、乳癌）では有意差を認めなかった。
- ・ROC 曲線によって定義したカットオフ値による胆道癌における感度の検討で、WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs は CA19-9 よりも高い感度を示した。

② 新知見の意義

- ・WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs は、健常者と比較し胆道癌で特異的に高値を示し、さらに高感度であることから、胆道癌診断のための腫瘍マーカーとしての有用性が示唆された。

③ 本研究で得られた新知見に基づく今後の研究の展開

- ・早期発見の意義は主に全生存期間の延長にある。本研究で WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs の陽性、陰性の群別で有意差は認められなかった。今後、Stage 0, I を中心に症例を増やし、より適切なカットオフ値を定めることができた場合、予後改善に直結する、さらに意義ある腫瘍マーカーとして臨床応用できる可能性があると考ええる。
- ・また、本研究における SEREX 法で同定された WNT7B 以外のタンパク（ZSCAN18、CFAP53、GAPDH、NACA、BRAP）についても、胆道癌患者血清を使用して同定したものであり、WNT7B と同様に胆道癌の腫瘍マーカーとなり得る可能性を有すると考える。

④ 今後の課題

- ・WNT7B₂₃₄₋₂₅₃-Abs を臨床応用するにあたって、本研究の最大の問題点は特異度の低さにあると考える。今後、胆道癌、健常者ともに症例数を増やし、より適切なカットオフ値を設定することが望ましいと考える。
- ・SEREX 法は血清中に抗体の存在が証明されているという大きなメリットがある一方で、無数のクローンのうちの大多数を占める陰性クローンから、ごく少数の陽性クローンを色調の違いのみで見極め採取する方法であり、採取には経験が必要であることや、過剰採取や見逃しが発生しやすいという limitation があると思われた。
- ・IgG 抗体型腫瘍マーカーの探索方法として、SEREX 法の他にプロテインアレイ法もあげられる。プロテインアレイ法は高コストであるが短時間で多量の抗原スクリー

ニングが可能であり、プロテインアレイ法を利用した IgG 抗体型腫瘍マーカーの探索も視野に検討したい。

謝辞

本研究の機会を与えて頂いた、北海道大学大学院医学研究院 消化器外科学教室 II 平野聡 教授に深く感謝致します。また、本研究において直接ご指導頂いた北海道大学大学院医学研究院 消化器外科学教室 II 土川貴裕 助教および、千葉大学大学院医学研究院 脳神経外科学 非常勤講師 日和佐隆樹 先生に深く感謝致します。さらに、本研究に共同研究頂いた千葉大学医学部附属病院 検査部 松下一之 診療教授、千葉大学大学院医学研究院 先端応用外科学 松原久裕 教授、千葉大学大学院薬学研究院 星野忠次 准教授、千葉大学大学院医学研究院 臓器制御外科学 大塚将之 教授、東邦大学大学院 臨床腫瘍学講座 島田英昭 教授に深く感謝いたします。最後に、本研究を支えてくださった、北海道大学大学院医学研究院 消化器外科学教室 II、千葉大学大学院医学研究院 遺伝子生化学教室の皆様にも深く感謝いたします。

利益相反

開示すべき利益相反はありません。

引用文献

CacaceAM, GuadagnoSN, KraussRS, FabbroD and Weinstein IB (1993) The epsilon isoform of protein kinase C is an oncogene when overexpressed in rat fibroblasts. *Oncogene* 8, 2095-2104.

Gaetano La Greca, Maria Sofia, Rosario Lombardo, Saverio Latteri, Agostino Ricotta, Stefano Puleo, Domenico Russello (2012) Adjusting CA19-9 values to predict malignancy in obstructive jaundice: Influence of bilirubin and C-reactive protein. *World J Gastroenterol* 18, 4150-4155.

Garifulin OM, Kykot VO, Gridina NY, Kiyamova RG, Gout IT and Filonenko VV (2015) Application of serex-analysis for identification of human colon cancer antigens. *Exp Oncol* 37, 173-180.

Ghosh M, Sakhuja P, Singh S and Agarwal AK (2013) p53 and beta-catenin expression in gallbladder tissues and correlation with tumor progression in gallbladder cancer. *Saudi J Gastroenterol* 19, 34-39.

Gorin MA and Pan Q (2009) Protein kinase C epsilon: An oncogene and emerging tumor biomarker. *Mol Cancer* 8, 9.

Heller A, Zörnig I, Müller T, Giorgadze K, Frei C, Giese T, Bergmann F, Schmidt J, Werner J, Buchler MW, et al (2010) Immunogenicity of SEREX-identified antigens and disease outcome in pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother* 59, 1389-1400.

Hiwasa T, Wang H, Goto KI, Mine S, Machida T, Kobayashi E, Yoshida Y, Adachi A, Matsutani T, Sata M, et al (2021) Serum anti-DIDO1, anti-CPSF2, and anti-FOXJ2 antibodies as predictive risk markers for acute ischemic stroke. *BMC Med* 19, 131.

Ishihara S, Horiguchi A, Miyakawa S, Endo I, Miyazaki M and Takada T (2016) Biliary tract cancer registry in Japan from 2008 to 2013. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 23, 149-157.

Kagaya A, Shimada H, Shiratori T, Kuboshima M, Nakashima-Fujita K, Yasuraoka M, Nishimori T, Kurei S, Hachiya T, Murakami A, et al (2011) Identification of a novel SEREX antigen family, ECSA, in esophageal squamous cell carcinoma. *Proteome Sci* 9, 31.

Kikuchi A (1999) Roles of Axin in the Wnt signalling pathway. *Cell Signal* 11, 777-788.

Kikuchi A (2003) Tumor formation by genetic mutations in the components of the Wnt signaling pathway. *Cancer Sci* 94, 225-229.

Kikuchi A and Yamamoto H (2008) Tumor formation due to abnormalities in the beta-catenin-independent pathway of Wnt signaling. *Cancer Sci* 99, 202-208.

Liang B, Zhong L, He Q, Wang S, Pan Z, Wang T, Zhao Y (2015) Diagnostic accuracy of serum CA19-9 in patients with cholangiocarcinoma : a systematic review and meta-analysis. *Med Sci Monit* 21, 3555-3563.

Linē A, Stengrēvics A, Slucka Z, Li G, Jankevics E and Rees RC (2002) Serological identification and expression analysis of gastric cancer-associated genes. *Br J Cancer* 86, 1824-1830.

Livak KJ and Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* 25, 402-408.

Loilome W, Bungkanjana P, Techasen A, Namwat N, Yongvanit P, Puapairoj A, Khuntikeo N and Riggins GJ (2014) Activated macrophages promote Wnt/ β -catenin signaling in cholangiocarcinoma cells. *Tumour Biol* 35, 5357-5367.

Ludwig JA, Weinstein JN (2005) Biomarkers in cancer staging, prognosis and treatment selection. *Nat Rev Cancer* 5, 845-856.

Machida T, Kubota M, Kobayashi E, Iwadate Y, Saeki N, Yamaura A, Nomura F, Takiguchi M and Hiwasa T (2015) Identification of stroke-associated-antigens via screening of recombinant proteins from the human expression cDNA library (SEREX). *J Transl Med* 13, 71.

Nakashima K, Shimada H, Ochiai T, Kuboshima M, Kuroiwa N, Okazumi S, Matsubara H, Nomura F, Takiguchi M and Hiwasa T (2004) Serological identification of TROP2 by recombinant cDNA expression cloning using sera of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 112, 1029-1035.

Nakatsura T, Senju S, Yamada K, Jotsuka T, Ogawa M and Nishimura Y (2001) Gene cloning of immunogenic antigens overexpressed in pancreatic cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 281, 936-944.

Nusse R and Varmus HE (1982) Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31, 99-109.

Obata Y, Takahashi T, Sakamoto J, Tamaki H, Tominaga S, Hamajima N, Chen YT and Old LJ (2000) SEREX analysis of gastric cancer antigens. *Cancer Chemother Pharmacol* 46 (Suppl), S37-S42.

Okada R, Shimada H, Otsuka Y, Tsuchiya M, Ishii J, Katagiri T, Maeda T, Kubota Y, Nemoto T and Kaneko H (2017) Serum p53 antibody as a potential tumor marker in extrahepatic cholangiocarcinoma. *Surg Today* 47, 1492-1499.

Sahin U, Türeci O, Schmitt H, Cochlovius B, Johannes T, Schmits R, Stenner F, Luo G, Schobert I and Pfreundschuh M (1995) Human neoplasms elicit multiple specific immune responses in the autologous host. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 11810-11813.

Schröder FH, Hugosson J, Roobol MJ, Tammela TL, Zappa M, Nelen V, Kwiatkowski M, Lujan M, Määttänen L, Lilja H et al (2014) Screening and prostate cancer mortality: results of the European Randomised Study of Screening for Prostate Cancer (ERSPC) at 13 years of follow-up. *Lancet* 384, 2027-2035.

Shimada H, Ochiai T and Nomura F (2003) Titration of serum p53 antibodies in 1,085 patients with various types of malignant tumors: A multiinstitutional analysis by the Japan p53 antibody research group. *Cancer* 97, 682-689.

Shimada H, Shiratori T, Yasuraoka M, Kagaya A, Kuboshima M, Nomura F, Takiguchi M, Ochiai T, Matsubara H and Hiwasa T (2009) Identification of Makorin 1 as a novel SEREX antigen of esophageal squamous cell carcinoma. *BMC Cancer* 9, 232.

Song MH, Ha JC, Lee SM, Park YM and Lee SY (2011) Identification of BCP-20 (FBXO39) as a cancer/testis antigen from colon cancer patients by SEREX. *Biochem Biophys Res Commun* 408, 195-201.

Song MH, Choi KU, Shin DH, Lee CH and Lee SY (2012) Identification of the cancer/testis antigens AKAP3 and CTp11 by SEREX in hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 28, 1792-1798.

Tetsu O and McCormick F (1999) Beta-catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* 398, 422-426.

Wang K, Xu X, Nie Y, Dai L, Wang P and Zhang J (2009) Identification of tumor-associated antigens by using SEREX in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett* 281, 144-150.

Wang YF, Feng FL, Zhao XH, Ye ZX, Zeng HP, Li Z, Jiang XQ, Peng ZH (2014) Combined detection tumor markers for diagnosis and prognosis of gallbladder cancer. *World J Gastroenterol* 20, 4085-4092.

Yamada T, Nakanishi Y, Okamura K, Tsuchikawa T, Nakamura T, Noji T, Asano T, Tanaka K, Kurashima Y, Ebihara Y, et al (2018) Impact of serum carbohydrate antigen 19-9 level on prognosis and prediction of lymph node metastasis in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 33, 1626-1633.

Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J and Zhang Y (2015) The I-TASSER Suite: Protein structure and function prediction. *Nat Methods* 12, 7-8.

Zhang J, Xu Z, Yu L, Chen M and Li K (2014) Assessment of the potential diagnostic value of serum p53 antibody for cancer: A meta-analysis. *PLoS One* 9, e99255.

植木 敏晴, 伊原 諒, 土居 雅宗, 丸尾 達, 永山林太郎, 畑山 勝子, 平塚 裕晃, 田中 利幸, 野間栄次郎, 光安 智子 (2018) 胆道癌化学療法 術前・術後・非切除. *胆道* 32, 209-215.

岡田 勉, 河上 裕 (2004) SEREX 法による癌抗原の単離. *Biotherapy* 18, 205-211.

日和佐 隆樹 (2014) 疾患抗体マーカーの開発. *医学のあゆみ* 251, 953-957.

本田 一文, 山田 哲司 (2011) 腫瘍マーカーとは. *成人病と生活習慣病* 41, 633-636.