

した。なお、減量後、減量理由の有害事象が軽快・消失した場合は、治験担当医師の判断で、投与量を初回投与量に復帰させることができることとした。

#### (5) リバピリンの減量

投与期間中、表3の減量規定に該当した場合、表5の投与量に減量した。さらに、投与中止規定に該当した場合は、速やかに投与を中止した。なお、減量後にHbが10g/dL以上に改善しても、初回投与量への復帰は行わなかった。

#### (6) 休薬

休薬は、最大14日間実施できることとした。ただし、14日間の休薬をもっても休薬理由の有害事象が軽快・消失しなかった場合は両薬剤の投与を中止した。なお、休薬期間については両薬剤の投与を休薬した。

### 3. 観察・検査項目および実施時期

#### 1) HCV関連マーカー

Genotypeについては、投与開始前の採血によりRT-PCR法により判定した。HCV RNAの測定は、投与直前、投与2, 4, 12, 24週目、投与終了後4, 12, 24週目に、定量的にはアンプリコアHCVモニター法により、定性的にはアンプリコアHCV法により実施した。すべての測定は三菱化学ピーシーエルにより一括測定した。

#### 2) ALT (alanine aminotransferase)

肝機能評価の指標としてALTを用いた。投与前、投与1, 2, 3, 4, 8, 12, 16, 20, 24週、投与終了後4, 8, 12, 24週に採血し、三菱化学ピーシーエルにて一括測定した。

#### 3) 臨床検査

白血球数、赤血球数、ヘモグロビン、ヘマトクリット、血小板数、白血球分画、網赤血球比率、AST、 $\gamma$ -GTP、ALP、LDH、総ビリルビン、総タンパク、アルブミン、クレアチニン、尿酸、BUN、空腹時血糖、HbA1C、総コレステロール、CRP、 $\gamma$ -グロブリン、ヒアルロン酸を上記のALTと同じ時期に測定した。さらに、甲状腺機能検査として、TSH、FT3、FT4、TRAb、TPOAbを投与前、投与2, 4, 12, 24週、投与終了後4, 8, 12, 24週に実施した。また、女性においては、投

与前、投与2, 4, 12, 24週、投与終了後4, 8, 12, 24週に妊娠検査を行った。

#### 4) 肝組織標本の読影

投与開始前に実施された肝生検時の肝組織標本について一括読影を実施した（読影者：川崎病院肝臓・消化器病センター長 山田剛太郎）

#### 5) 被験者日誌

治験担当医師は、有害事象調査のため、投与期間中は患者に「被験者日誌」を記録するよう指導した。患者は投与期間中、自覚症状を感じた場合、当該症状の内容を日誌に記録した。治験担当医師は、診察ごとに、患者によって記録された「被験者日誌」について記載内容を確認し、必要に応じて記載内容についての追記・訂正を行った。

### 4. 有効性・安全性の評価

#### 1) 有効性評価

HCV RNA 持続陰性化 [投与期間終了24週後の血中HCV RNA 定性値が陰性：以下、SVR] を主要評価項目とした。副次的に、HCV RNA の投与終了時点における定性陰性化の有無を評価した。また、肝機能については、投与終了時点および投与終了後24週目時点におけるALT正常化の有無を評価した。

#### 2) 安全性評価

治験担当医師が、投与期間中および経過観察期間中を通じて、問診などにより自覚症状・他覚所見（臨床検査値異常を含む）の有無を調査した。

### 5. 統計解析

有効性解析の対象は、最大解析対象集団 (Full Analysis Set; FAS) を用いた。患者背景については、名義尺度データはFisherの直接確率で、順序分類尺度データおよび計数尺度データはWilcoxon-Mann Whitney testで均衡性を検討した。治療薬群間の有効性・安全性の比較は、Fisherの直接確率、あるいはExtended Mantel Haenszel testを用いた。また、主要評価項目(SVR)に影響を与える因子、あるいは投与終了後のウイルス再燃因子の探索にはロジスティック回帰分析を用いた。有意水準は両側5%とした。

表6 参加施設一覧

医療機関名	所属	治験責任医師
JA 北海道厚生連札幌厚生病院	第三消化器科	豊田 成司
医療法人翰林会稲積公園病院	内科	後藤賢一郎
自治医科大学付属大宮医療センター	消化器科	井廻 道夫
埼玉医科大学付属病院	第三内科	藤原 研司
千葉大学医学部附属病院	第一内科	横須賀 収
順天堂大学医学部付属順天堂医院	消化器内科	佐藤 信紘
国家公務員共済組合連合会		
虎の門病院 本院・分院	消化器科	熊田 博光
静山会 清川病院	内科	安田 清美
武蔵野日赤病院	消化器科	泉 並木
新潟大学歯学総合病院	第三内科	市田 隆文
金沢大学医学部付属病院	感染症病態学	本多 政夫
静岡県立総合病院	消化器科	小島 紘一
名古屋大学医学部付属病院	第三内科	吉岡健太郎
岐阜市民病院	消化器内科	富田 栄一
大垣市民病院	消化器科	熊田 卓
国立病院機構大阪医療センター	消化器科	加藤 道夫
大阪労災病院	消化器内科	吉原 治正
岡山大学医学部・歯学部付属病院	第一内科	下村 宏之
川崎医学振興財団 川崎病院	肝臓・消化器病センター	山田剛太郎
福岡大学病院	消化器科	向坂彰太郎

### 3 成績

#### 1. 患者背景

##### 1) 症例登録および症例構成

本研究は、表6に示した20施設の協力のもと、2002年9月から2004年7月にかけて実施された。試験開始にあたっては、各施設における治験審査委員会の承認を得たのち、治験参加について自発的に文書による同意を治験担当医師に提出した患者のみを症例登録の対象とした。患者からの同意は214例から取得したが、スクリーニングにおける患者選択基準に不適、同意撤回、同意取得後のスクリーニング未完了、パートナーが妊娠との理由により87例は試験対象外となり、無作為化された被験者数は127例であった。そのうちから、PEG-IFN $\alpha$ -2b + リバビリリン（以下、PEG/R）群に64例、IFN $\alpha$ -2b + リバビリリン（以下、IFN/R）群に63例が割り付けられた。ただし、IFN/R群

中の1例が投与開始前の臨床検査で血小板数が10万/mm<sup>3</sup>未満となったため治験中止とし、実際に治験薬剤の投与が開始された症例数は、PEG/R群：64例、IFN/R群が62例となった。治療を開始した症例中、PEG/R群で15例、IFN/R群の12例が治験薬剤投与期間中に投与中止となり、治験薬剤の投与が完了したのはPEG/R群：49例（76.6%）、IFN/R群：50例（80.6%）であった。なお、安全性に関連する中止は、Hb/血小板数/好中球数減少（PEG/R群：3例、IFN/R群：4例）、有害事象（倦怠感、食欲不振、発熱、精神症状、筋痛、頭痛、など）（PEG/R群：10例、IFN/R群：5例）の計22例であった。その他の理由として、治験実施計画書違反（PEG/R群：1例、IFN/R群：2例）、および治験薬投与終了後の経過観察期間中に来院せず、あるいはパートナーの妊娠により、PEG/R群：1例、IFN/R群：1例が治験中止となった。なお、有効性の解析対象集団はFASとしたが、治験薬が割

表7 患者背景 (1)

項目	事項	PEG/R群 (n=63)		IFN/R群 (n=61)		検定結果
		人数	割合 (%)	人数	割合 (%)	
性別	男	40	63.5%	37	60.7%	P = 0.853
	女	23	36.5%	24	39.3%	
年齢 (歳)	平均値	49.37		48.62		P = 0.747
	標準偏差	10.58		11.65		
	65歳未満	59	93.7%	55	90.2%	P = 0.526
	65歳以上	4	6.3%	6	9.8%	
体重 (kg)	平均値	65.15		64.99		P = 0.685
	標準偏差	13.13		10.71		
	40 kg 超 60 kg 以下	26	41.3%	20	32.8%	P = 0.887
	60 kg 超 80 kg 以下	26	41.3%	39	63.9%	
	80 kg 超 100 kg 以下	11	17.5%	2	3.3%	
合併症の有無	なし	4	6.3%	8	13.1%	P = 0.237
	あり	59	93.7%	53	86.9%	
インターフェロン治療歴	未治療例	49	77.8%	48	78.7%	P = 0.902
	既治療	14	22.2%	13	19.7%	
肝生検 (国際分類) staging	no fibrosis	0	0.0%	0	0.0%	P = 0.643
	mild fibrosis	26	41.3%	25	41.0%	
	moderate fibrosis	26	41.3%	30	49.2%	
	severe fibrosis	9	14.3%	5	8.2%	
	cirrhosis	1	1.6%	0	0.0%	
	読影不能	1	1.6%	1	1.6%	
肝生検 (国際分類) grading	None	0	0.0%	0	0.0%	P = 0.707
	Minimal chronic hepatitis	9	14.3%	11	18.0%	
	Mild chronic hepatitis	18	28.6%	16	26.2%	
	Moderate chronic hepatitis	31	49.2%	30	49.2%	
	Severe chronic hepatitis	4	6.3%	3	4.9%	
	読影不能	1	1.6%	1	1.6%	
HCV-Genotype	1a	0	0.0%	0	0.0%	P = 0.584
	1b	5	7.9%	4	6.6%	
	2a	34	54.0%	38	62.3%	
	2b	24	38.1%	18	29.5%	
	混合型*	0	0.0%	1	1.6%	

表7 患者背景 (2)

項目	事項	PEG/R群 (n=63)		IFN/R群 (n=61)		検定結果
HCV-RNA 定量 (KIU/mL) [RT-PCR 法]	平均値	366.96		451.36		P = 0.154
	標準偏差	317.95		311.46		
	100 未満	20	31.7%	13	21.3%	P = 0.193
	100 以上 300 未満	12	19.0%	9	14.8%	
	300 以上 500 未満	10	15.9%	12	19.7%	
	500 以上 850 未満	8	12.7%	15	24.6%	
	850 以上	13	20.6%	12	19.7%	
血清中 ALT (IU/L)	平均値	118.73		121.82		P = 0.874
	標準偏差	71.49		81.81		
	45 以下	5	7.9%	11	18.0%	P = 0.991
	46 以上 100 未満	26	41.3%	16	26.2%	
	100 以上 200 未満	26	41.3%	27	44.3%	
	200 以上	6	9.5%	7	11.5%	

表8 Genotype 別ウイルス量別有効性

	Genotype	PEG/R群	IFN/R群	検定
低ウイルス量	1b	4/5 (80%)	4/5 (80%) *	P = 1
	2a	11/12 (91.7%)	8/8 (100%)	P = 1
	2b	2/3 (66.7%)	—	—
高ウイルス量	2a	20/22 (90.9%)	20/30 (66.7%)	P = 0.051
	2b	18/21 (85.7%)	15/18 (83.3%)	P = 1
合計	—	55/63 (87.3%)	47/61 (77.0%)	P = 0.208

\* genotype 1b + 2a を含む

付けられた被験者の中で、PEG/R群では有効期限切れの薬剤が投与された1例、IFN/R群ではリバビリン初回投与後に投与開始前のHbが中止基準に抵触した1例を除く、PEG/R群：63例、IFN/R群：61例で患者背景比較および有効性の検討を行った。

2) 患者背景の比較

PEG/R群：63例、IFN/R群：61例の患者背景は表7に示した。両群とも約60%が男性で、平均年齢は約49歳、体重平均は約65kgであった。IFN治療歴別では、未治療例が97例、既治療例が27例と約80%はIFN未治療例であった。

Genotype別の分布はIFN/R群のgenotype 1b + 2a混合型をgenotype 1の症例として取り扱うと、genotype 1bが計10例、genotype 2aが72例、genotype 2bが42例となった。2群間に症例分布の偏りは認められなかった。

2. 有効性

1) ウイルス学的有効性

(1) 非劣性の検証、およびgenotype別・ウイルス量別SVR率

FAS解析においては、判定不能(欠測を含む)は分母に含めて集計した。この場合のHCV RNA持続陰性化(SVR)率は、PEG/R群：87.3%

表9 主要な背景因子ごとの HCV-RNA 持続陰性化

背景因子		PEG/R 群 (n = 63)	IFN/R 群 (n = 61)	M-H test
性別	男	38/40	32/37	P = 0.417
	女	17/23	15/24	
年齢 (歳)	65 歳以上	1/4	5/6	P = 0.167
	65 歳未満	54/59	42/55	
体重 (kg)	40 kg 超 60 kg 以下	20/26	12/20	P = 0.079
	60 kg 超 80 kg 以下	25/26	33/39	
	80 kg 超 100 kg 以下	10/11	2/2	
インターフェロン治療歴	未治療例	43/49	39/48	P = 0.133
	既治療例	12/14	8/12	
肝生検 (国際分類) staging	no fibrosis	0/0	0/0	P = 0.199
	mild fibrosis	23/26	21/25	
	moderate fibrosis	22/26	23/30	
	severe fibrosis	8/9	3/5	
	cirrhosis	1/1	0/0	
肝生検 (国際分類) grading	読影不能	1/1	0/1	P = 0.120
	None	0/0	0/0	
	Minimal chronic hepatitis	9/9	9/11	
	Mild chronic hepatitis	16/18	13/16	
	Moderate chronic hepatitis	25/31	22/30	
HCV-RNA 定量 (KIU/mL) [RT-PCR 法]	Severe chronic hepatitis	4/4	3/3	P = 0.267
	読影不能	1/1	0/1	
	100 未満	17/20	12/13	
	100 以上 300 未満	11/12	9/9	
	300 以上 500 未満	9/10	8/12	
血清中 ALT (IU/L)	500 以上 850 未満	7/8	9/15	P = 0.186
	850 以上	11/13	9/12	
	45 以下	5/5	7/11	
血清中 ALT (IU/L)	46 以上 100 未満	22/26	14/16	P = 0.186
	100 以上 200 未満	23/26	20/27	
	200 以上	5/6	6/7	

M-H test : Extended Mantel- Haenszel test

\* : 分子 ; SVR 例, 分母 : 総例数

(55/63), IFN/R 群 : 77.0% (47/61) であった。SVR 率における群間の差の 95% 両側信頼区間は -3.1 ~ 23.6% であり, 信頼区間の下限が下測同等限界値 ( $-\Delta = -15\%$ ) を大きく上回っており PEG/R 群の IFN/R 群に対する非劣性が検証された。また, genotype 別・ウイルス量別に 2 群

間の SVR 率を比較して表 8 に示した。例数の関係で有意とはならなかったが, genotype 2 かつ高ウイルス量例における SVR 率は, PEG/R 群で 90.9% に対して IFN/R 群は 66.7% と差がみられた。ただし, この SVR 率の差は IFN/R 群の判定不能例が 6 例と PEG/R 群の 2 例に比べて多かつ

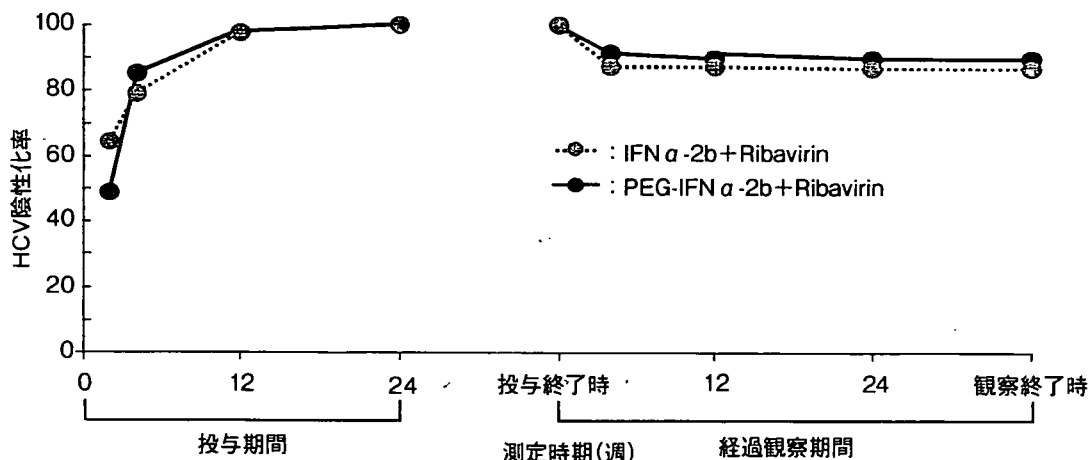


図2 投与期間および経過観察期間中のウイルス陰性化の推移

表10 ウイルス測定時期別効果予測性

測定時期	予測性	PEG/R群		IFN/R群**	
		例数	確率	例数	確率
2週	PPV	28/31	90.3%	35/38	92.1%
	NPV	5/32	15.6%	5/17	29.4%
4週	PPV	49/53	92.5%	41/46	89.1%
	NPV	3/9	33.3%	3/9	33.3%
12週	PPV	52/53	94.5%	45/52	86.5%
	NPV	1/1	100%	1/1	100%
24週	PPV	44/48	91.7%	44/51	86.3%
	NPV	- / 0	—	- / 0	—

\* 判定不能：1例，判定なし：1例

\*\* 判定不能：6例，判定なし：1例

たことが関連しており，プロトコールベースで検討すると2群間に有意差は認められなかった。

### (2) 層別 SVR 率

Genotype を除く患者背景要因による層別 SVR 分布を表9に示した。IFN 治療歴別に検討すると，IFN 未治療例での SVR 率は PEG/R 群で 87.8% (43/49)，IFN/R 群で 81.3% (39/48)，IFN 既治療例においては PEG/R 群 85.7% (12/14)，IFN/R 群 66.7% (8/12) と有意差は認められなかった。その他の患者背景について層別に区分しても，PEG/R 群および IFN/R 群の SVR 率に有意な差は認められなかった。

### (3) ウイルス陰性化時期別有効性

投与期間および経過観察期間における HCV RNA の累積陰性化率を図2に示した。IFN/R 群では，初期2週間は IFN α-2b 6 MIU を週6回投与したため，この期間における HCV RNA の陰性化率は IFN/R 群においてやや高率であった。しかし，PEG-IFN α-2b の血中濃度の定常化にともない投与4週目におけるウイルス陰性化率は両群ではほぼ同等となり，投与24週時点においては，PEG/R 群および IFN/R 群とも全例が HCV RNA 陰性となっていた。次に，ウイルス陰性時期別にウイルス学的有効性の予測を行い表10に示した。

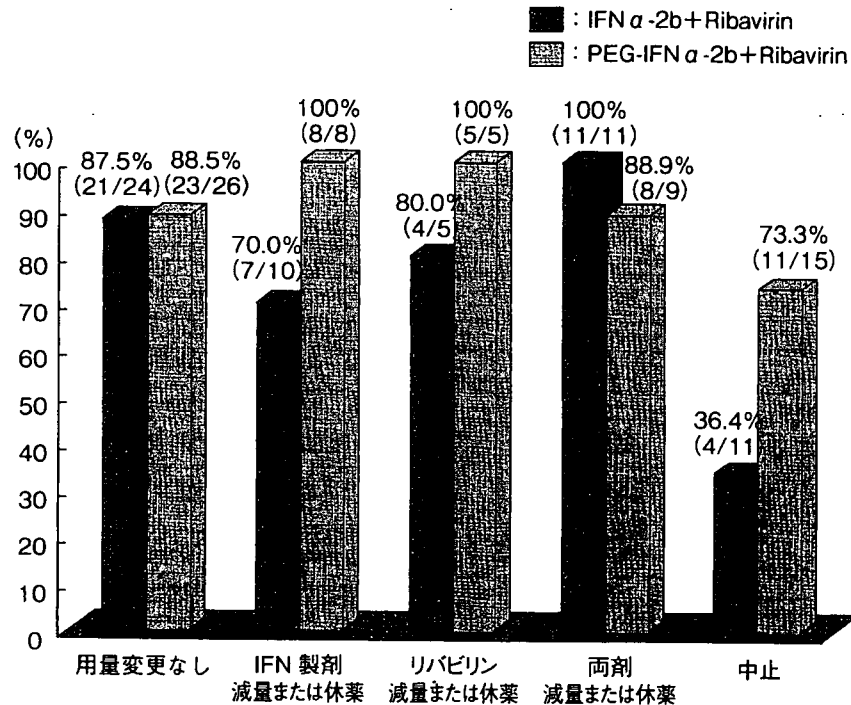


図3 投与中における治験薬剤の処置別のSVR率

表11 治療薬の処置時期とHCV-RNA持続陰性化

治験薬の処置時期	PEG/R群				IFN/R群			
	減量・休薬	投与中止	減量・休薬	投与中止	減量・休薬	投与中止	減量・休薬	投与中止
投与開始～投与2週以内	3/3	100%	0/0	—	7/7	100%	0/2	0.0%
投与2週以降～投与4週以内	3/3	100%	0/1	0.0%	4/5	80.0%	0/1	0.0%
投与4週以降～投与8週以内	4/4	100%	2/3	66.7%	5/6	83.3%	2/4	50.0%
投与8週以降～投与12週以内	7/8	87.5%	1/2	50.0%	1/2	50.0%	0/1	0.0%
投与12週以降～投与24週以内	4/4	100%	8/9	88.9%	5/6	83.3%	2/3	66.7%
合計	21/22	95.5%	11/15	73.3%	22/26	84.6%	4/11	36.4%

PPV (所定の時点でHCV RNAが陰性化した症例がSVRとなる確率) およびNPV (所定の時点でHCV RNAが陰性化せず、SVR判定でSVRとならない確率) を用いて有効性の予測を行うと、投与2週目では、PEG/R群およびIFN/R群ともPPVは90%を超えるが、NPVが15.6%あるいは29.4%とNPVの感度は不十分であった。投与4週目におけるPPVは両群ともほぼ90%を確保し、NPVも両群で33.3%に上昇していた。投与12週目におけるPPVはほぼ90%でNPVも100%と

なったが、HCV RNAが12週までに陰性化しない症例は各群わずか1例ということで、NPVを判定するには時期としては遅すぎると考えられた。

#### (4) 治験薬剤減量・中止の影響

治験薬剤の処置の有無別にSVR率を検討した結果を図3に示した。投与期間を通じて減量・休薬・投与中止の処置を要さなかった症例におけるSVR率は、PEG/R群で88.5% (23/26)、IFN/R群で87.5% (21/23) と有意差は見られなかった。

表 12 累積服薬率別 SVR 率

		PEG/R群				IFN/R群			
		IFN製剤服薬率							
		≥ 95%	≥ 50% < 95%	< 50%	計	≥ 95%	≥ 50% < 95%	< 50%	計
Riba 服 薬 率	≥ 95%	26/29 (90%)	8/8 (100%)	-	34/37 (92%)	24/27 (89%)	8/11 (73%)	-	32/38 (84%)
	≥ 50% -< 95%	4/5 (80%)	11/11 (100%)	2/3 (67%)	17/19 (89%)	4/5 (80%)	9/9 (100%)	-	13/14 (93%)
	< 50%	-	1/1 (100%)	3/6 (50%)	4/7 (57%)	-	0/1 (0%)	2/8 (25%)	2/9 (33%)
	計	30/34 (88%)	20/20 (100%)	5/9 (56%)	55/63 (87%)	28/32 (88%)	17/21 (81%)	2/8 (25%)	47/61 (77%)

表 13 SVR に関連する要因の検討 (Logistic 回帰分析)

要因	Odds比	P値
性 (男→女)	0.213 (0.058-0.781)	0.0197
HCV RNA 量 (< 300/-499/-848/ > 850)	0.430 (0.2350-0.785)	0.0060
白血球数 (5000 未満→ 5000 以上)	4.903 (1.180-20.367)	0.0287
血小板数 (16 万未満→ 16 万以上)	7.211 (1.623-32.035)	0.0094
IFN 製剤減量 (有→無)	0.208 (0.041-1.047)	0.0568
IFN 製剤投与期間 (12 週以上→ 12 週未満)	0.029 (0.006-0.154)	< 0.0001

PEG/R 群では、PEG-IFN  $\alpha$ -2b あるいはリバビリンの減量を行っても SVR 率の低下はみられなかったが、IFN/R 群では IFN  $\alpha$ -2b あるいはリバビリンの減量により SVR 率がやや低下していた。また、両剤の投与を中止しても、PEG/R 群の SVR 率は 73.3% (11/15) とわずかな低下にとどまったが、IFN/R 群では 34.6% (4/11) までに低下していた。IFN/R 群では治験薬剤の減量により SVR 率が低下傾向にあったことから、減量・休薬が必要となった時点別に SVR 率を検討し表 11 に示した。IFN/R 群では投与 2 週目以降に減量・休薬が必要となった症例での SVR 率が PEG/R 群に比べてやや低下していた。同じく表 11 に、投与中止時期別の SVR 率を示したが、両群とも投与開始 4 週以内に投与を中止した症例から SVR となった症例は認められなかった。なお、これら

投与 4 週以内に投与を中止した症例中、PEG/R 群の 1 例、IFN/R 群の 1 例では投与終了時には HCV RNA が陰性化していた。

次に、服薬率が SVR 率に与える影響を検討した (表 12)。ほぼプロトコールどおりに服薬が可能であった症例を既定の 95% 以上服用例とし、服薬不十分を 50% 未満とした。服薬率を群別に検討しても、2 群間の SVR 率に有意差は認められなかったが、両群とも IFN 製剤あるいはリバビリンの服薬率が 50% 未満に低下すると服薬率が 50% 以上であった症例に比べて SVR 率は明らかに低下していた。ただし、低下の程度は IFN/R 群で大きかった。両剤の投与がほぼ完全 (95% 以上) に実施された症例中、両群とも 3 例でウイルス学的に無効となった症例が存在した。6 例中 5 例は女性で、いずれも genotype 2 の症例であっ



表 14 Genotype 2 症例での再燃要因 (Logistic 回帰分析)

要因	Odds Ratio	P値
性 (男→女)	> 999.999 (3.346 > 999)	0.0240
F stage (F0-1 → F2-4)	0.048 (0.002-0.906)	0.0428
HCV RNA 量 (< 300/-499/-848/ > 850)	6.383 (1.237-32.007)	0.0242
好中球数 (200 未満→2000 以上)	0.023 (< 0.001-0.751)	0.0340
リンパ球数 (2000 未満→2000 以上)	0.100 (0.007-1.459)	0.0923
IFN 製剤減量 (有→無)	14.013 (0.831-236.379)	0.0671
リバビリン休薬 (有→無)	0.012 (< 0.001-0.824)	0.0404

た。4例ではHCV RNAが4週目までに陰性化しており、高ウイルス量であった1例の陰性化は24週目であった。残りの1例はgenotype 1/低ウイルス量の症例で、投与早期にウイルスが陰性化した。終了後早期にウイルスの再燃がみられた。これら症例では多くが女性で体重も60 kg未満であったという以外、特に無効要因は認められていない。なお表には示さないが、各薬剤とも服薬率がプロトコルの80%以上、投与期間が80%以上の症例におけるSVR率を比較すると、PEG/R群では92% (35/38)、IFN/R群は87% (39/45)と大差なかった。一方、いずれかが80%未満となっていた症例におけるSVR率は、PEG/R群で80% (20/25)に対してIFN/R群では50% (8/16)と有意差(P = 0.095: Fisher)はないもののPEG/R群でややSVR率が高くなっていた。

### 2) SVRに対する影響因子

SVRに影響を与える患者要因を検討した。要因としては、投与群(PEG/R, IFN/R)、性、年齢(65歳以上、未満)、体重(60 kg以上、未満)、IFN治療歴(未治療、既治療)、Stage (F0-1, F2-4)、Grade (A0-2, A3-4)、Genotype (1, 2)、ウイルス量(300 KIU/mL未満、300～500 KIU/mL未満、500～850 KIU/mL未満、850 KIU/mL以上)、ALT (100 IU/L以上、未満)、WBC (5,000/mm<sup>3</sup>以上、未満)、好中球数(2,000/mm<sup>3</sup>以上、未満)、血小板数(16万/mm<sup>3</sup>以上、未満)、Hb (14 g/dL以上、未満)、リバビリン減量の有無、IFN製剤減量の有無、リバビリンおよびIFN製剤中止の有無、リバビリン投与期間(12週以上、未満)、

IFN製剤投与期間(12週以上、未満)、リバビリン服薬率(80%以上、未満)、IFN製剤服薬率(80%以上、未満)とした。Stepwiseに変数を選択した後の多変量Logistic回帰分析による結果を表13に示した。治療法およびgenotypeは有意な独立因子とは選択されなかった。最も大きな影響要因はIFN製剤投与期間であり、その他にHCV RNA量、血小板数、性、白血球数が独立因子として選択された。また、SVRとならなかった症例の多くは女性、高齢、体重が60 kg未満、クレアチニン低値とリバビリンの血中濃度が上昇しやすい症例であった。

### 3) ウイルス学的再燃要因

Genotype 2の症例ではHCV RNAが早期に陰性化するにもかかわらず投与終了後早くにウイルスが再燃する症例が少数ではあるが存在することが知られている。IFN/R群の1例で、投与2週目にウイルスが陰性化し、しかも投与が24週間完了したにも関わらず投与終了後にウイルスの再燃がみられた。さらに、投与4週目までにHCV RNAが陰性化し、投与が完了した症例中、PEG/R群で1例、IFN/R群の2例で投与後にウイルスの再燃をみた。これら4例中2例では治験薬の両剤が減量されていたが、他の2例は減量・休薬もなされていなかった。なお、上記4例および投与2週以内にウイルスが陰性化した早期投与中止のためウイルスの再燃をみた2例も含めてすべてgenotype 2aの症例であったことから、genotype 2の症例に限定して投与終了後のウイルス再燃要因を検討した。検討要因としては、上記のSVR

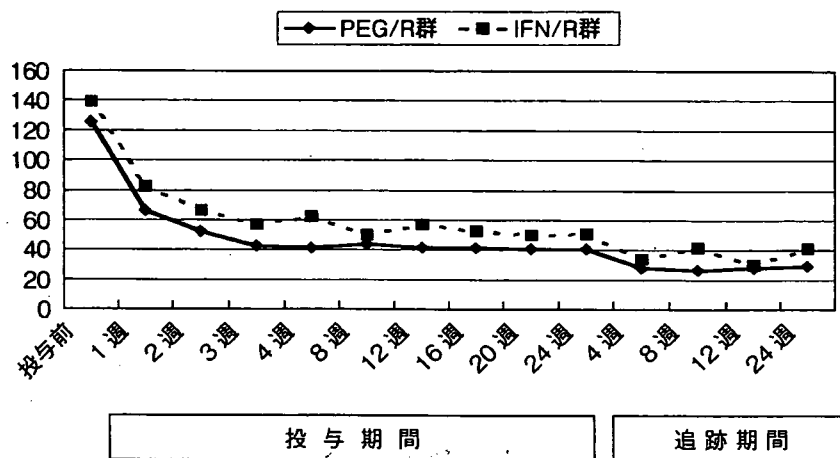


図4 投与中および経過観察期間中のALT平均値の推移

に対する検討と同じ項目を用い、多変量 Logistic 回帰分析の結果を表14に示した。女性、F0-1、HCV RNA 高値、好中球数  $2,000/\text{mm}^3$  未満、リバビリン休薬ありが独立した影響要因と選定された。

#### 4) 肝機能改善度

FAS 集団を対象とした場合の投与終了後 24 週目の ALT 正常化率は、PEG/R 群で 81.0% (51/63)、IFN/R 群で 57.4% (35/61) であった。ただし、PEG/R 群で 8 例、IFN/R 群では 19 例が判定不能であったことがこの有効率に大きく影響していた。このため、ALT に関する有効性について ALT 平均値を用いて検討し、図4に示した。IFN/R 群では各ポイントにおける ALT 変動幅が特に大きく、両群の ALT 推移は統計学的には有意とはならなかった。なお、SVR と ALT 持続正常化との関連を ALT 持続正常化判定不能を除いて検討すると、PEG/R 群では 50 例中 48 例 (96%) [SVR 例中残り 5 例は判定不能]、IFN/R 群では 40 例中 35 例 (87.5%) [SVR 例中残り 7 例は判定不能] で ALT が持続正常化していた。SVR にもかかわらず ALT が持続正常化しない 7 例の症例背景に一定の傾向はみられなかったが、体重は 53.8 ~ 97.5 kg と 70 kg 以上の症例が 5 例存在していた。

### 3. 安全性

#### 1) 減量・休薬・中止率

安全性に関わる治験薬剤の投与中止率は、

PEG/R 群: 20.6% (13/63)、IFN/R 群: 14.8% (9/61) と有意な差は見られなかった。IFN 製剤あるいはリバビリンの減量率は、PEG/R 群で 39.7% (25/63)、IFN/R 群で 39.7% (24/61)、また両剤の休薬率は PEG/R 群で 7.9% (5/63)、IFN/R 群で 9.8% (6/61) であり、ともに両群間に有意差は認められなかった。

#### 2) 副作用発現頻度

PEG/R 群および IFN/R 群の安全性のプロファイルは、これまでの報告の範囲内であった。いずれかの投与群において、50%以上の症例で認められた有害事象は、悪心、倦怠感、発熱、悪寒、胃腸障害、食欲不振、白血球数減少、好中球数減少、赤血球数減少、Hb 減少であった。投与期間中、注射部位の有害事象を除き大部分の有害事象は IFN/R 群において PEG/R 群よりも高頻度に発現した。特に、IFN/R 群においてインフルエンザ様症状、消化器症状および呼吸器系の有害事象が多く認められた。臨床検査値では主に、PEG/R 群で白血球数減少、好中球数減少および溶血に関連する検査値の異常が多く認められ、IFN/R 群では ALT の上昇が認められた。

投与期間中に認められた自覚症状、他覚所見および臨床検査値異常変動は、いずれも投与終了とともに観察期間中に改善すると考えられた。血液学的検査項目である Hb、好中球数、血小板数については投与期間中に減少し経過観察期間中に投与前値への回復が認められた。なお、観察期間中

に消化器症状および感染症（主に咽頭炎）が認められていたがこれらは通常の観察時にもよく認められるものであった。

## 4 考察

今回の試験から genotype 1 かつ低ウイルス量の症例、あるいは genotype 2 の症例における PEG-IFN  $\alpha$ -2b 1.5  $\mu$ g/kg/週とリバビリン 600～1,000 mg/日 (PEG/R) を 24 週間併用投与した場合の極めて高い有効性が確認された。試験の目的が非劣性の証明であったため IFN  $\alpha$ -2b とリバビリン (IFN/R) の 24 週間併用投与に比べて有意とはならなかったが、症例数設定によるものであり、SVR 率では 10% 上回っていた。確かに、今回の成績からは PEG/R の極めて高率な有効性が示されたが、この強力な治療法を抗ウイルス薬の有効性が比較的高い genotype 1/低ウイルス量および genotype 2 の治療に導入する意義を検証してみた。これら症例に対する国内における初期の IFN 単独療法の検討はほとんどが初回治療と想定される。しかも、それらの大規模検討成績はほとんどが retrospective な調査であり、prospective な研究と比較するには問題を残すが、SVR 率としては約 60% と報告<sup>13-16)</sup> されている。一方、prospective に IFN 再治療例のみを対象とした豊田らの検討<sup>17)</sup> では SVR 率は約 30% と低下している。2001 年からはリバビリン併用療法が主流となったことから、豊田ら<sup>17)</sup> の同一検討集団において研究された IFN  $\alpha$ -2b とリバビリン併用投与の SVR 率は 70% であり、今回の検討における IFN 既治療例における IFN  $\alpha$  + リバビリン投与群の SVR 率 67% とよく一致している。今回の検討における IFN 既治療例に対する PEG-IFN  $\alpha$ -2b + リバビリン併用投与の SVR 率は 86% となっており、IFN 既治療例では PEG-IFN  $\alpha$ -2b をリバビリンと併用すべきと考えられる。IFN 未治療の genotype 1/低ウイルス量あるいは genotype 2 症例に対する IFN  $\alpha$ -2b + リバビリン併用療法の有効性に関するまとまった国内臨床研究はまだ報告されていない。海外における検討では genotype

2/3 を対象としたものであるが投与期間が 24 週あるいは 48 週に関わらず 64～69% と報告<sup>18-19)</sup> されている。今回の検討では SVR 率 81% という結果であり、有効性がやや低いとされる genotype 3 を含まないことを考慮すると近似した結果とも考えられる。今回の PEG-IFN  $\alpha$ -2b + リバビリン併用投与を用いた IFN 未治療例に対する SVR 率はさらに上昇して 88% という結果であり、海外における 24 週投与で 93%<sup>20)</sup> という結果とよく一致していた。PEG-IFN 単独投与における genotype 2 の症例に対する国内臨床検討も PEG-IFN  $\alpha$ -2a で報告<sup>21)</sup> されているが 180  $\mu$ g 投与で 71% (24/34)、低用量の 90  $\mu$ g 投与では 50% (9/18) であり、多くの症例では 180  $\mu$ g から 90  $\mu$ g への減量が必要であることから従来型の IFN 製剤投与時の有効性と大きく異なっていない。したがって、PEG-IFN  $\alpha$ -2b とリバビリン併用療法は IFN 未治療の genotype 2 や genotype 1 かつ低ウイルス量の症例においても最強の治療法と考えられる。

次に genotype 別・ウイルス量別に今回の有効性を FAS 解析でみると、genotype 2 で高ウイルス量の症例では PEG/R 群が IFN/R 群に比べて有効性が優っていた。Zeuzem<sup>20)</sup> らの検討においても genotype 2/高ウイルス量例に対する SVR 率は 91% と今回の検討とほぼ一致している。国内での genotype 1/高ウイルス量例における検討ではリバビリンを併用投与すると投与前のウイルス量は有意な影響因子とはされていない<sup>9)</sup> が、Weiland ら<sup>22)</sup> と同じく今回の検討では genotype 2 に限定（データは示さない）してもウイルス量が SVR に対する寄与因子と選択されていた。このため、genotype 2 の症例でも高ウイルス量の症例においてはやはり PEG/R を第一選択とすべきと考える。Genotype 1 かつ低ウイルス量に限定した臨床検討は少ない。飯野は全国アンケート調査の結果<sup>13)</sup> からウイルス排除率は 39% と報告している。PEG-IFN  $\alpha$ -2a の国内検討<sup>21)</sup> では 48 週投与ということもあり 50～57% とされている。これら症例に対する IFN  $\alpha$ -2b + リバビリンの報告は少ないが、今回の検討では少数例ではあった

が80%のSVR率が認められた。なお、genotype 1/低ウイルス量例に対するPEG-IFN $\alpha$ -2b + リバビリンの6カ月投与の成績として、海外ではZeuzemら<sup>23)</sup>が50%と報告している。Mannsら<sup>24)</sup>の48週投与時の71%に比べて投与期間短縮のため再燃率が37%にも上昇している結果がSVR率の差に関係していると発表している。今回の成績は少数例であるが80%と高率であった。なお、Zeuzemら<sup>23)</sup>の検討では投与16週未満と投与期間が不十分であった症例が有効性の低下原因となっており、さらに投与4週以内にウイルスが陰性化していた症例でのSVR率は89%であったことから、24週間投与できればわれわれの成績に近づくものと考えられる。いずれにしても、genotype 1で低ウイルス量の症例にはリバビリンの24週間併用投与が勧められる。

Genotype 2の症例では上記のようにPEG-IFN + リバビリン併用療法の導入により極めて高い有効性が期待できることから、最近の研究は投与期間の短縮化および低投与量の可能性にターゲットが移ってきている。Mangiaら<sup>4)</sup>は、PEG-IFN $\alpha$ -2b 1.0  $\mu$ g/kg にリバビリンを1,000 ~ 1,200 mg/日併用して、至適投与期間の検討を行っている。Genotype 2の症例にPEG-IFN $\alpha$ -2bの1.0  $\mu$ g/kg にリバビリンを併用投与した場合の24週間投与時のSVR率は76%とZeuzemら<sup>20)</sup>のPEG-IFN $\alpha$ -2bを1.5  $\mu$ g/kg投与したときの93%に比べてやや低率となっていた。今回の検討におけるPEG-IFN $\alpha$ -2b + リバビリン併用時ではPEG-IFN $\alpha$ -2bの投与量を減量しても有効性の低下はなかったが、初期は1.5  $\mu$ g/kg投与していたことから、初期投与量の差がこのSVRの低下に関連している可能性も考えられる。なお、PEG-IFN $\alpha$ -2b 1.0  $\mu$ g/kgを12週投与した場合のSVR率は82%と24週投与時と大差なく、特に投与開始4週以内にウイルスが陰性化していた症例に限定するとSVR率は89%にまで上昇することから、投与4週以内にウイルスが陰性化した場合は投与期間が12週でも十分有効性が期待できると報告している。別に、投与4週目のウイルス陰性化例を対象に投与期間を14週、あるいは

16週とする試験が進行中<sup>25,26)</sup>である。また、PEG-IFNの投与量を減量する検討はPEG-IFN $\alpha$ -2aでも行われている<sup>27)</sup>。Genotype 2あるいはgenotype 1で低ウイルス量の症例において投与期間の短縮という観点から今回の成績を検討した。4週以内の投与中止例ではSVR例が見られないことから、少なくとも4週以上の投与は必要で、中止時期が12週以降であれば有効性の低下は低いことから12週以上の投与があれば有効性はある程度確保されると考えられた。服薬率の点からもリバビリンあるいはPEG-IFN $\alpha$ -2bが50%以上投与されておれば90%を超える症例でSVRが得られていることから、12週以上の投与があれば有効性の低下は低いと想定される。ただし、SVRに対する影響因子として、IFN製剤の投与期間および減量の有無が選択されていた。また、genotype 2症例における投与終了後のウイルス再燃要因の検討から、リバビリンの投与期間が短くなると再燃リスクが上昇することも示された。したがって、安易な投与期間の短縮化は避けるべきである。ただし、服薬率が80%未満の症例におけるSVR率は有意ではないもののPEG-IFN $\alpha$ -2b投与時が高率であり、服薬率が50%を割ってもPEG-IFN $\alpha$ -2b投与時の有効性の低下はIFN $\alpha$ -2b投与時に比べて低かった。この結果は両製剤の血中残存性の差を示すものと考えられた。投与量については、減量・休薬時期とSVR率との関係からPEG-IFN $\alpha$ -2bとリバビリン併用投与では有効性の低下がほとんどないことから、PEG-IFN $\alpha$ -2bあるいはリバビリン投与量を減量しても有効である症例の存在が予測され、今後の検討課題と考える。

海外における検討で4週目のウイルス陰性化例では投与期間を短縮できる可能性があることから、ウイルス陰性化時期と効果予測性を検討すると、2週、4週、12週ともPPVはほぼ90%であり、陰性化する症例頻度から考えると海外報告と同じく4週目までのウイルス陰性化が投与期間の短縮を考える上で重要なポイントと判断された。しかしながら、投与4週目におけるNPVは低い。投与早期にウイルスが陰性化した

症例、あるいは服薬率がほぼ100%であった症例からの再燃も確認されている。さらに、投与期間の短縮で再燃率が上昇したと考察されていることから、投与期間の短縮化が期待できるのは特定の集団であり、原則は24週投与が望ましい。

今回の試験期間中に有害事象のため投与が中止となった症例は、PEG-IFN $\alpha$ -2b + リバビリン併用で約20%、IFN $\alpha$ -2b + リバビリン併用で約15%とPEG-IFN $\alpha$ -2b投与例でやや多い傾向にあった。さらに、genotype 1/高ウイルス量例を対象とした試験<sup>9)</sup>における初期24週間の中止率(約12%)と比較しても高率になっていたが、統計学には有意差はなかった。中止原因となった有害事象および中止後の転帰もいずれの群と比較しても差は認められないことから、中止率のわずかな上昇はみかけの数字と考えた。有害事象の発現率もPEG-IFN $\alpha$ -2b投与例での注射部位反応を除いて両群に差はなかった。ただし、好中球数および血小板数減少については、飯野らが既に報告<sup>9)</sup>しているようにPEG/Rでやや強いことから、血球系の有害事象発現が危惧されるような症例に関しては、慎重な薬剤選択が必要である。

## 5 結論

Genotype 1かつ低ウイルス量、あるいはgenotype 2の症例に対してはIFN単独投与でも一定の有効性が報告されている。今回これらの症例を対象として、世界的にC型慢性肝炎に対する標準的治療とされているPEG-IFN $\alpha$ -2bとリバビリン併用療法の有効性・安全性を、国内ではIFN既治療例に限って承認されているIFN $\alpha$ -2bとリバビリン併用療法と比較した。研究の目的が非劣性の証明にあったため、症例数の関連からウイルス学的有効性(SVR率)は有意とはならなかったが、PEG-IFN $\alpha$ -2b投与が優れるという結果が示された。治験薬剤減量例でも有効性の低下はほとんど認められず、投与中止例でも12週以降であれば有効性の低下は低いことから、安全性を考えると投与期間の短縮、あるいは少量からの投与開始も考えられるが、PEG-IFN $\alpha$ -2bあるいはリ

バビリンの投与期間がSVRや投与終了後の再燃に影響を与えること、投与4週目のNPVは低率であることから、これらは今後の検討課題である。今回の結果からは、短期の週1回投与で十分な有効性を確保することが可能という点から、抗ウイルス剤の有効性が高いとされるgenotype 1/低ウイルス量やgenotype 2の症例に対してもPEG-Intron 1.5  $\mu$ gとリバビリン併用療法が推奨される。

## 文献

- 1) EASL international Consensus Conference on Hepatitis C. Paris 26–28 Feb. 1999 Consensus Statement. *J Hepatol* 30: 956–961, 1999
- 2) National Institutes of Health. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement—Management of Hepatitis C. *Hepatology* 36: S3–S20, 2002
- 3) Strader DS, Wright T, Thomas DL et al: AASLD practice guideline. Diagnosis, management, and treatment of hepatitis C. *Hepatology* 39: 1147–1171, 2004
- 4) Mangia A, Santoro R, Minerva N et al: Peginterferon alfa-2b and ribavirin for 12 vs. 24 weeks in HCV genotype 2 or 3. *N Engl J Med* 352: 2609–2617, 2005
- 5) Zeuzem S, Pawlotsky JM, Lukasiewicz E et al: International, multicenter, randomized, controlled study comparing dynamically individualized versus standard treatment in patients with chronic hepatitis C. *J Hepatol* 43: 250–257, 2005
- 6) Buti M, Lurie Y: Extending combination therapy with Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for genotype 1 chronic hepatitis C late responders: a report of 9 cases. *Hepatology* 37: 1226–1227, 2003
- 7) Sanchez-Tapias JM, Diago M, Escartin P et al: Longer treatment duration with Pegintron alfa-2a (40KD) (Pegasys) and ribavirin (Copegus) in naïve patients with chronic hepatitis C and detectable HCV RNA by week 4 of therapy; Final results of the randomized, multicenter TERAVID-4 study. *Hepatology* 40 (suppl. 1): 218A, 2004: abstract 126.
- 8) Payen C, Roudot-Thoraval F, Marcellin P et al: Changing of hepatitis C virus genotype patterns in France at the beginning of the third millenium: the GEMHEP GenoCII study. *J Viral Hepatitis* 12: 405

-413, 2005

- 9) 飯野四郎, 沖田 極, 小俣政男, 他: Genotype 1 かつ高ウイルス量の C 型慢性肝炎に対する PEG-インターフェロン  $\alpha$ -2b とリバビリン 48 週併用投与の有効性—インターフェロン  $\alpha$ -2b とリバビリン 6 カ月併用療法との retrospective な比較. 肝胆膵 49 : 1099-1121, 2004
- 10) 林 紀夫, 熊田博光: 肝疾患における recommendation 1. C 型肝炎. コンセンサス肝疾患 治療 2004, アークメディア, pp11-18
- 11) 熊田博光: B 型及び C 型肝炎ウイルスの感染者に対する治療の標準化に関する臨床的研究. 総括研究報告. 厚生科学研究費補助金肝炎等克服緊急対策研究事業 (肝炎分野). 平成 16 年度 総括・分担研究報告書, 2005, pp1-12
- 12) Ikeda K, Saitoh S, Kobayashi M et al : Distinction between chronic hepatitis and liver cirrhosis in patients with hepatitis C virus infection. Practical discriminant function using common laboratory data. Hepatol Res 18 : 252-266, 2000
- 13) 飯野四郎: C 型慢性肝炎に対するインターフェロン療法の効果に関するアンケート調査. 厚生省非 A 非 B 型肝炎研究班 平成 7 年度研究報告書, 1996, pp72-73
- 14) Akuta N, Suzuki F, Tsubota A et al : Efficacy of interferon monotherapy to 394 consecutive naïve cases infected with hepatitis C virus genotype 2a in Japan: therapy efficacy as consequence of tripartite interaction of viral, host and interferon treatment-related factors. J Hepatol 37 : 831-836, 2002
- 15) Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K et al : Risk factors for hepatocellular carcinoma and its incidence after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. Hepatology 27 : 1394-1402, 1998
- 16) Yabuuchi I, Imai Y, Kawata S et al : Long-term responders without eradication of hepatitis C virus after interferon therapy: characterization of clinical profiles and incidence of hepatocellular carcinoma. Liver 20 : 290-295, 2000
- 17) 豊田成司, 妻神重彦, 安田清美, 他: インターフェロン無効または再燃した C 型慢性肝炎に対するインターフェロン  $\alpha$ -2b と SCH10908 (リバビリン) の併用投与とインターフェロン  $\alpha$ -2b 単独投与の比較—二重盲検群間比較法を用いた併用効果の検討. 臨床医薬 18 : 539-563, 2002
- 18) Poynard T, Marcellin P, Lee SS et al : Randomised trial of interferon  $\alpha$  2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon  $\alpha$  2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. Lancet 352 : 1426-1432, 1998
- 19) McHutchison JG, Gordon ST, Schiff ER et al : Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. N Engl J Med 1485-1492, 1998
- 20) Zeuzem S, Hultcrantz R, Bourliere M et al : Peginterferon alfa-2b plus ribavirin for treatment of chronic hepatitis C in previously untreated patients infected with HCV genotypes 2 or 3. J Hepatol 40 : 993-999, 2004
- 21) 堺 隆弘, 小俣政男, 飯野四郎, 他: Ro25-8310 (ペグインターフェロンアルファ-2a) の C 型慢性肝炎に対する第 II 相臨床試験. 医学と薬学 50 : 655-672, 2003
- 22) Weiland O, Freid MW, Hadzyannis SJ et al : Peginterferon  $\alpha$ -2a (40kD) plus ribavirin in treatment-naïve patients with chronic hepatitis C and genotype 2 or 3 infection: individual estimated probability of sustained virological response. J Hepatol 42 (suppl.2) : 226-227, 2005: abstract 619
- 23) Zeuzem S, Esteban-Mur R, Ferenci P et al : Efficacy of 6 months treatment with PEG-Interferon  $\alpha$ -2b plus ribavirin (P/R) in patients infected with hepatitis C with genotype 1 of low viral load (G1LVL) . J Hepatol 42 (suppl.2) : 229, 2005: abstract 625
- 24) Dalgard O, Bjoro K, Hellum K et al : Short (14 weeks) treatment with pegylated interferon alpha-2b and ribavirin in patients with hepatitis C genotype 2/3 virus infection and early virological response. Hepatology 40 (suppl.1) : 252A, 2004: abstract 197
- 25) Von Wagner M, Huber M, Berg T et al : Randomized multicenter study comparing 16 vs. 24 weeks of combination therapy with peginterferon alfa-2a plus ribavirin in patients chronically infected with HCV genotype 2 or 3. Hepatology 40 (suppl.1) : 725A, 2004: abstract LB02
- 26) Bozorg B, Kleiner DE, Pawlotsky JM et al : Early viral kinetics during treatment with low doses of peginterferon alfa-2a and ribavirin in patients with chronic hepatitis C infected with genotype 2 and 3. Hepatology 40 (suppl.1) : 340A, 2004: abstract 404

## Fucosylated haptoglobin is a novel marker for pancreatic cancer: A detailed analysis of the oligosaccharide structure and a possible mechanism for fucosylation

Noriko Okuyama<sup>1,2†</sup>, Yoshihito Ide<sup>1†</sup>, Miyako Nakano<sup>1</sup>, Tsutomu Nakagawa<sup>1</sup>, Kanako Yamanaka<sup>1,2</sup>, Kenta Moriwaki<sup>1,2</sup>, Kohei Murata<sup>3</sup>, Hiroaki Ohigashi<sup>3</sup>, Shigekazu Yokoyama<sup>3</sup>, Hidetoshi Eguchi<sup>3</sup>, Osamu Ishikawa<sup>3</sup>, Toshifumi Ito<sup>4</sup>, Michio Kato<sup>5</sup>, Akinori Kasahara<sup>6</sup>, Sunao Kawano<sup>7</sup>, Jianguo Gu<sup>1</sup>, Naoyuki Taniguchi<sup>1</sup> and Eiji Miyoshi<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

<sup>2</sup>Department of Molecular Biochemistry and Clinical Investigation, Osaka University Faculty of Medicine, School of Allied Health Science, Osaka, Japan

<sup>3</sup>Department of Surgery, Osaka Medical Center for Cancer & CVD, Osaka, Japan

<sup>4</sup>Department of Gastroenterology, Kansai-Rosai Hospital, Osaka, Japan

<sup>5</sup>Department of Gastroenterology, Osaka National Hospital, Osaka, Japan

<sup>6</sup>Department of General Medicine, Osaka University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

<sup>7</sup>Department of Clinical Laboratory Sciences, Osaka University Faculty of Medicine, School of Allied Health Science, Osaka, Japan

Changes in oligosaccharide structures have been reported in certain types of malignant transformations and, thus, could be used for tumor markers in certain types of cancer. In the case of pancreatic cancer cell lines, a variety of fucosylated proteins are secreted into their conditioned media. To identify fucosylated proteins in the serum of patients with pancreatic cancer, we performed western blot analyses using Aleuria Aurantia Lectin (AAL), which is specific for fucosylated structures. An ~40 kD protein was found to be highly fucosylated in pancreatic cancer and an N-terminal analysis revealed that it was the  $\beta$  chain of haptoglobin. While the appearance of fucosylated haptoglobin has been reported in other diseases such as hepatocellular carcinoma, liver cirrhosis, gastric cancer and colon cancer, the incidence was significantly higher in the case of pancreatic cancer. Fucosylated haptoglobin was observed more frequently at the advanced stage of pancreatic cancer and disappeared after an operation. A mass spectrometry analysis of haptoglobin purified from the serum of patients with pancreatic cancer and the medium from a pancreatic cancer cell line, PSN-1, showed that the  $\alpha$  1-3/ $\alpha$  1-4/ $\alpha$  1-6 fucosylation of haptoglobin was increased in pancreatic cancer. When a hepatoma cell line, Hep3B, was cultured with the conditioned media from pancreatic cancer cells, haptoglobin secretion was dramatically increased. These findings suggest that fucosylated haptoglobin could serve as a novel marker for pancreatic cancer. Two possibilities were considered in terms of the fucosylation of haptoglobin. One is that pancreatic cancer cells, themselves, produce fucosylated haptoglobin; the other is that pancreatic cancer produces a factor, which induces the production of fucosylated haptoglobin in the liver.  
© 2005 Wiley-Liss, Inc.

**Key words:** haptoglobin; pancreatic cancer; fucosylation; tumor marker; mass spectrometry; oligosaccharide; lectin; fucosyltransferase

Pancreatic cancer is currently one of the leading causes of cancer-related deaths and the overall 5-year survival has been reported to be less than 5%.<sup>1,2</sup> One of the reasons for its poor prognosis is that an early diagnosis is quite difficult and a high-risk population for pancreatic cancer has not yet been identified. Carbohydrate Antigen 19-9 (CA19-9) and carcinoembryonic antigen (CEA) are commonly used as markers of pancreatic cancer, but false positives are a problem in the diagnosis.<sup>3</sup> To increase the specificity of a diagnosis, a combination of tumor markers would be desirable. To this end, novel markers for pancreatic cancer, which have different characteristics from those of CA19-9 or CEA, are required. Oligosaccharides are known to be one of the most important post-translational modifications, and many studies have shown that changes in oligosaccharide structures occur during inflammation and tumorigenesis.<sup>4</sup> This oligosaccharide heterogeneity has been applied to tumor markers for the differential diagnosis for Hepatocellular Carcinoma (HCC). Alpha-fetoprotein (AFP), a well-known tumor marker for HCC, contains 1 asparagine-linked oligosaccharide.<sup>5</sup> However, serum levels of AFP also increase in certain patients with

chronic hepatitis and liver cirrhosis.  $\alpha$  1-6 fucosylated AFP (AFP-L3 fraction) has been applied to the clinical diagnosis of HCC.  $\alpha$  1-6 fucosylated AFP, which is produced via  $\alpha$  1-6 fucosyltransferase (FUT8), is specifically found in the serum of patients with HCC and can be diagnosed by measuring the Lentil Lectin-(LCA) binding portion of AFP.<sup>6,7</sup> Moreover, AFP-L3 has been reported as a marker for a poor prognosis of HCC.<sup>8</sup> Changes in fucosylation patterns, as the result of different levels of expression for various fucosyltransferases, have been reported in certain diseases including various types of cancers.<sup>9–12</sup>

To identify potentially novel tumor markers of pancreatic cancer, we conducted a search for fucosylated proteins that are increased in the serum of patients with pancreatic cancer. The findings showed that the haptoglobin  $\beta$  chain was highly fucosylated and the oligosaccharide structures of haptoglobin purified from the serum of patients with pancreatic cancer were examined in detail. Furthermore, we investigated the mechanisms associated with the increased levels of fucosylated haptoglobin in pancreatic cancer.

### Material and methods

#### Serum samples

Serum samples of patients with pancreatic cancer ( $n = 49$ , male 31, female 18, mean age 62 years), HCC ( $n = 23$ , male 17, female 6, mean age 69 years), liver cirrhosis ( $n = 12$ , male 9, female 3, mean age 63 years), gastric cancer ( $n = 10$ , male 5, female 5, mean age 59 years) and colon cancer ( $n = 17$ , male 10, female 7, mean age 61 years) were obtained from Osaka National Hospital, Osaka University Hospital and Osaka Medical Center for Cancer and CVD. The present project was approved by the ethics committees of the participating hospitals. Serum samples of healthy vol-

**Abbreviations:** AAL, Aleuria Aurantia Lectin; AFP,  $\alpha$ -Fetoprotein; AOL, Aspergillus Oryzae Lectin; CA19-9, Carbohydrate Antigen 19-9; CBB, Coomassie Brilliant Blue; CEA, Carcinoembryonic Antigen; ConA, Concanavalin A; FUT8,  $\alpha$  1-6 Fucosyltransferase; HCC, Hepatocellular Carcinoma; LC-ESI-MS, Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry; LCA, Lentil Lectin; MALDI-TOF-MS, Matrix assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight-Mass Spectrometry; PBS, Phosphate Buffered Saline; TBS, Tris-Buffered Saline.

<sup>†</sup>These authors equally contributed to this work.

Grant sponsor: Scientific Research on Priority Area 10178104 and 16590245; Grant sponsor: the 21st Century COE program from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan; Grant sponsor: Japan Science and Technology Agency (JST).

\*Correspondence to: Department of Biochemistry, Osaka University Graduate School of Medicine, 2-2 Yamada-oka, Suita 565-0871, Japan. Fax +81-6-6879-3429. E-mail: miyoshi34@biochem.med.osaka-u.ac.jp

Received 23 June 2005; Accepted 31 October 2005

DOI 10.1002/ijc.21728

Published online 29 December 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

unteers ( $n = 30$ , male 16, female 14, mean age 34 years) were obtained in our laboratory.

#### Cell culture

Human pancreatic carcinoma cell lines (PK8, PANC-1, PSN-1, KMP4, KLM-1 and MIA PaCa2) and a human hepatoma cell line, Hep3B, were grown in RPMI-1640 (Nacalai Tesq, Kyoto, Japan) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 50 U/ml penicillin and 100  $\mu$ g/ml kanamycin at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. These cell lines were obtained from the ATCC (American Type Culture Collection), or the Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University.

#### Identification of fucosylated proteins in the serum of patients with pancreatic cancer

A 0.5  $\mu$ l aliquot of serum proteins from patients with pancreatic cancer and normal controls were electrophoresed on 8% polyacrylamide gels in duplicate. One gel was used for the aleuria aurantia lectin (AAL) blot analysis, which preferentially recognized  $\alpha$  1-3/  $\alpha$  1-6 fucosylated proteins.<sup>13</sup> The other was stained with Coomassie Brilliant Blue (CBB) after transferring onto a PVDF membrane. All procedure of AAL lectin blot analyses was described previously.<sup>14</sup> Bands strongly stained with AAL were subjected to N-terminal amino-acid sequence.

#### Western blot analysis of haptoglobin and immunoprecipitation

A 0.5  $\mu$ l aliquot of serum was electrophoresed on an 8% polyacrylamide gel and transferred onto a nitrocellulose membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). The membranes were incubated with 5% skim milk in phosphate buffered saline (PBS) overnight and then incubated with 1/1,000 diluted anti human haptoglobin antibody (Dako Cytomation Kyoto, Japan) for 2 hr. After washing 3 times with Tris-buffered saline-T (TBS) (136 mM NaCl, 2.6 mM KCl, 24 mM Tris, 0.05% Tween 20, pH 7.4) for 10 min each, the membrane was incubated with peroxidase-conjugated rabbit IgG for 1 hr. After washing the membrane 3 times with TBS-T for 10 min each, development was performed using an ECL<sup>TM</sup> Western Blotting Detection Reagents (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), according to standard protocols. The same membrane was used in an AAL lectin blot analysis.<sup>14</sup> In all AAL lectin blotting experiments, 1 pair of a negative control (a healthy control) and a positive control (a case of pancreatic cancer) was used in the same gel. For the immunoprecipitation of haptoglobin, 5  $\mu$ l samples of serum from patients with pancreatic cancer and from controls were used. Serum samples were preincubated with normal rabbit serum and proteinG-sepharose (Amersham Bioscience) followed by incubation with anti-human haptoglobin antibody for 2 hr. Immunoprecipitated haptoglobin was analyzed by AAL lectin blot, as described earlier.

#### Purification of the haptoglobin $\beta$ chain

To purify the haptoglobin  $\beta$  chain, 80  $\mu$ l of sera in which albumin was depleted by a Montage Albumin Deplete kit (Millipore Corp.) or 2.5 ml of 100-fold concentrated conditioned media from PSN-1 cells were applied to an anti-haptoglobin affinity column that was coupled with 300  $\mu$ l of anti human haptoglobin antibody, according to standard protocols of HiTrap NHS-activated HP (Amersham Biosciences). The haptoglobin bound to the column was eluted with 5 ml of elution buffer (100 mM Glycine, 0.5 M NaCl, pH 3.0). Thirty microliters of 50-fold concentrated fraction was subjected to SDS-PAGE under reducing conditions and stained with CBB or blotted onto a nitrocellulose membrane followed by lectin blot analyses using AAL or aspergillus oryzae lectin (AOL).<sup>15</sup>

#### Mass spectrometry

Mass spectrometry was used to identify the structure of the oligosaccharide in haptoglobins. The gels that contained purified haptoglobin were cut into smaller sizes and collected in a 1.5-ml microtube. To remove CBB, 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (SIGMA, Tokyo

Japan) in 30% acetonitrile (MERCK, Darmstadt Germany) was added, followed by washing at room temperature for 20 min using Bio shaker (TAITEC). The samples were then added with 300  $\mu$ l of acetonitrile and incubated at room temperature for 10 min. After removing the extra acetonitrile, a reduction solution consisting of 10 mM DTT, 10 mM EDTA and 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> was added, followed by incubation at 65°C for 60 min. Samples were then alkylated in a solution consisting of 40 mM iodoacetamide, 10 mM EDTA and 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in the dark for 30 min. After washing twice with 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> for 10 min, an additional 300  $\mu$ l of acetonitrile was added and the sample was then incubated at room temperature for 10 min. For trypsin digestion, the samples were incubated at 37°C overnight with 0.5  $\mu$ g of sequencing grade-modified trypsin (Promega, Madison, WI USA) in 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>. After the gels were removed, the sample was concentrated and taken to dryness with a Speed Vac (CENTRIFUGAL EVAPORATOR CVE-2000, EYELA). The residues were dissolved in 20  $\mu$ l of water. A 2- $\mu$ l aliquot of this solution was used in the Mascot research. The other sample was incubated at 100°C for 10 min with 32  $\mu$ l of a 20 mM phosphate solution. The samples were then treated with *N*-Glycosidase F rec. [*E. coli*] (Roche, USA) and incubated at 37°C overnight. After boiling at 100°C for 10 min, PA (pyridylamino) modification was performed using a Glyco TAG<sup>TM</sup> Reagent Kit (TaKaRa, Otsu Japan), according to the standard protocols. The samples were filtered with Sephadex LH-20 and *N*-glycans derived with the PA fraction were collected. The samples were dried with a Speed Vac and then dissolved in 100  $\mu$ l of water. Liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry (LC-ESI-MS) and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) were then performed.

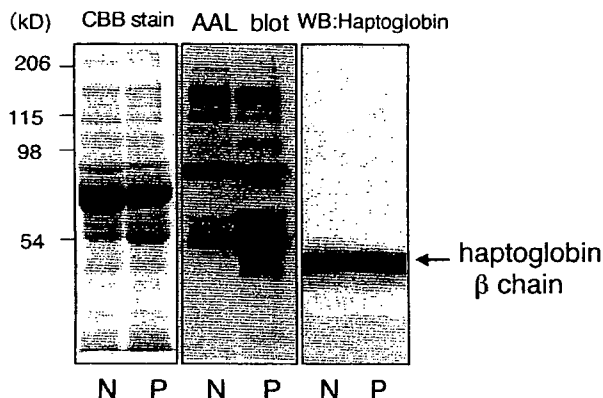
#### RNA extraction and RT-PCR

A human hepatoma cell line (Hep3B) and human pancreatic carcinoma cell lines (PSN-1, KLM-1, MiaPaCa-2, PK8, PK59, PANC-1) were cultured as described earlier. Trizol (1 ml) was added to each 10-cm dish and collected in a 2-ml microtube. After 15 min, 200  $\mu$ l of chloroform was added to the samples followed, by vortexing for 15 sec. After standing at room temperature for 10 min, the samples were centrifuged at 15,000 rpm for 15 min, and an equal amount of 2-propanol was then added to the supernatant. After an additional 15 min, the samples were centrifuged at 15,000 rpm at 4°C for 15 min and the pellets were washed with 0.5 ml of 75% ethanol twice. The pellets were dried and dissolved in 50  $\mu$ l of DEPC (diethylpyrocarbonate) treated water. The concentration of RNAs was measured at an absorbance of 260 nm.

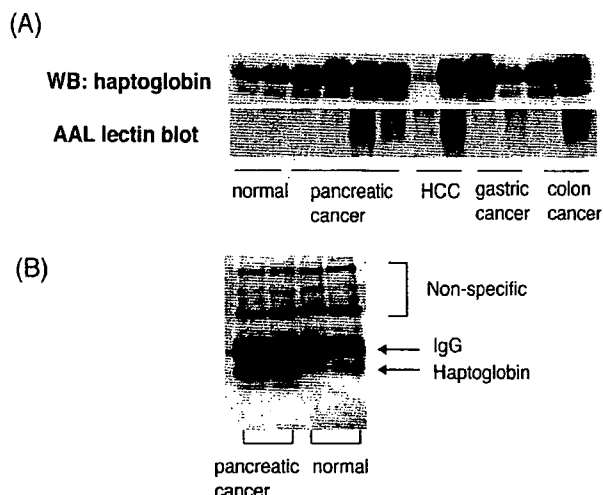
According to the SuperScript<sup>TM</sup>(III) Reverse Transcriptase (Invitrogen Corp. Carlsbad, CA USA) protocol, 5  $\mu$ g of total RNA was incubated with 1  $\mu$ l of Oligo dT at 70°C for 10 min. The samples were incubated at 42°C for 5 min with a 1st strand cDNA synthesis buffer consisting of 10  $\mu$ l of 5 $\times$  First Strand Buffer, 10  $\mu$ l of dNTP Mixture, 5  $\mu$ l of 0.1 M DTT and 13  $\mu$ l of DEPC, at 42°C for 50 min with 1  $\mu$ l of Reverse Transcriptase, at 99°C for 5 min and at 37°C for 20 min with 1  $\mu$ l of RNaseH.

The samples served as a template DNA for 30 rounds of amplification using the GeneAmp PCR System 2700. PCR was performed in a standard 100  $\mu$ l reaction mixture consisting of 10  $\mu$ l of 10 $\times$  Ex taq Buffer, 8  $\mu$ l of dNTP Mixture, 1  $\mu$ l of sense and antisense primer, 0.5  $\mu$ l of Ex taq (TaKaRa), 1  $\mu$ l of cDNA, PCR primers for haptoglobin cDNA were as follow, forward primer, 5'-TTCCCTGGCAGGCTAAGATG-3'(position 562-581); and reverse primer, 5'-GCA-CCCATCAGCTTCAAACC-3'(position 1363-1382). Amplification was performed at 95°C for 30 sec, at 66°C for 30 sec, at 72°C for 1 min. Finally, an additional extension step was performed at 72°C for 10 min. The amplified PCR products were run on a 1.5% agarose gel containing 0.005% ethidium bromide. To estimate the amount of total cDNA, glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase with the same cDNA was used as an internal control under identical conditions.





**FIGURE 1** – Identification of AAL-binding proteins in serum of pancreatic cancer. 0.5 µl of sera was electrophoresed on 8% acrylamide gels, and stained with CBB after blotting onto a PVDF membrane. An AAL blot analysis was performed using the same samples. An approximately 40 kD protein was excised from the membrane and identified as the haptoglobin β chain by its N-terminal amino-acid sequence. N indicates normal controls and P indicates pancreatic cancer. Western blot of haptoglobin in the right panel indicated the approximate position of haptoglobin.



**FIGURE 2** – Fucosylation of haptoglobin in the serum of patients with various cancers. (a) 0.5 µl of sera was electrophoresed on 8% acrylamide gels, and western blot analyses were performed using anti human haptoglobin antibody and AAL lectin. (b) Haptoglobin was immunoprecipitated from the serum of patients with pancreatic cancer and healthy controls followed by AAL lectin blot analysis.

*Induction of production of fucosylated haptoglobin in hep3B cells*

A human hepatoma cell line (Hep3B) and human pancreatic carcinoma cell lines (PSN-1, MiaPaCa-2) were grown in low glucose D-MEM (Nacalai Tesq, Kyoto, Japan) supplemented with 10% FBS, 50 U/ml penicillin and 100 µg/ml kanamycin at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. The cells, at sub confluent conditions in 10-cm dishes, were washed twice with PBS and cultured in 10 ml of serum free D-MEM. After 2 days, the media from each run were collected and added to the other cells. After an additional incubation for 2 days, the media were collected. The media were concentrated 100 times and used in a western blot analysis of haptoglobin.

**TABLE I** – FUCOSYLATION OF HAPTOGLOBIN IN SERUM OF PATIENTS WITH VARIOUS DISEASES

	n	Negative	Positive (%)
Normal	30	29	1 (3) <sup>1</sup>
Pancreatic cancer <sup>2</sup>	49	20	29 (59)
HCC <sup>2,3</sup>	23	18	5 (22)
Liver cirrhosis <sup>2,3</sup>	12	9	3 (25)
Gastric cancer <sup>3</sup>	10	8	2 (20)
Colon cancer <sup>2</sup>	17	10	7 (41)

Statistic analysis was performed according to the program for Stat-view software.

<sup>1</sup>Values in parentheses indicate percentages. <sup>2</sup>p < 0.05 vs. normal. <sup>3</sup>p < 0.05 vs. pancreatic cancer (χ<sup>2</sup> test).

**TABLE II** – RELATIONSHIP BETWEEN THE INCIDENCE OF FUCOSYLATED HAPTOGLOBIN AND THE CLINICAL STAGE OF PANCREATIC CANCER

Clinical stage	n	Positive	Negative
Stage I, II	12	4	8
Stage III, IV	22	15	7

p = 0.05, compared with stage I, II and stage III, IV (χ<sup>2</sup> test). Statistic analysis was performed according to the program of Stat-view software.

**Results**

*Haptoglobin, as a target protein for fucosylation in the serum of patients with pancreatic cancer*

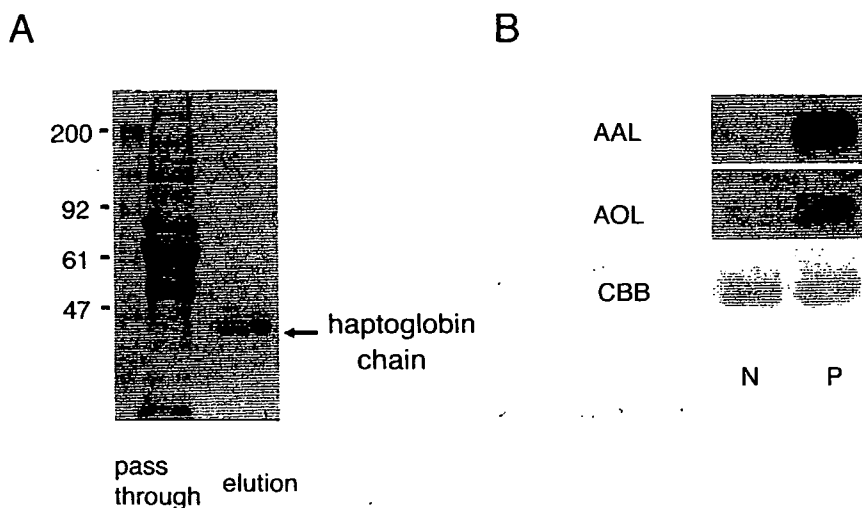
A preliminary study suggested that pancreatic cancer cells produce a variety of fucosylated proteins into the condition medium. To identify fucosylated proteins in the serum of patients with pancreatic cancer, AAL blot analyses were performed. The total binding of serum proteins to AAL was increased in pancreatic cancer as compared with healthy controls. In these proteins, increases in the fucosylation of the ~40 kD band were observed with a high frequency in the serum of patients with pancreatic cancer. The N-terminal amino-acid sequences revealed that the sequence was ILG-GHLDAKG, corresponding to the haptoglobin β chain (Fig. 1). A similar approach was performed in 4 cases of pancreatic cancer and all of the fucosylated proteins of 40 kD identified were the haptoglobin β chain (data not shown). Furthermore, a western blot analysis of haptoglobin was performed to confirm the position of haptoglobin molecular size (Fig. 1).

*The appearance of fucosylation of haptoglobin in serum of patients with various cancers*

To evaluate the levels of fucosylation of haptoglobin in the serum of patients with pancreatic cancer compared with those of other various cancers, an AAL blot analysis was performed (Fig. 2a). The results showed that fucosylated haptoglobin was also increased in HCC, liver cirrhosis (date not shown), gastric cancer and colon cancer. Interestingly, the appearance of the fucosylation was not correlated with total amount of haptoglobin. The immunoprecipitation of haptoglobin, followed by an AAL lectin blot showed more clearly that haptoglobin was strongly fucosylated in patients with pancreatic cancer. The incidence of increase in fucosylated haptoglobin in the serum of patients with various diseases is summarized (Table I). Appearance of fucosylated haptoglobin in the case of pancreatic cancer was significantly higher compared with that of healthy controls and patients with HCC, liver cirrhosis and gastric cancer.

*Relationship between fucosylation of haptoglobin and the clinical stage in pancreatic cancer*

The appearance of fucosylation in pancreatic cancer was investigated in terms of the clinical background of the subjects (Table II). The fucosylation of haptoglobin was observed in 4/12 cases at stage I and II, and 15/22 cases at stage III and IV, respectively, suggesting that the incidence of haptoglobin fucosylation tended to increase in advanced stages. Interestingly, fucosylated haptoglobin



**FIGURE 3** – Purification of haptoglobin  $\beta$  chain and analysis of its oligosaccharide structures. (a) Haptoglobin was purified from 80  $\mu$ l of sera with pancreatic cancer and normal individuals by using an anti-haptoglobin affinity column. (b) Equal amounts of purified haptoglobin purified from normal controls (N) and pancreatic cancer (P) were electrophoresed on 8% polyacrylamide gels, and stained with CBB and analyzed by lectin blot analyses by using AAL and AOL.

globin disappeared after an operation in 2 cases in which it was possible to follow-up.

#### *Analysis of oligosaccharide structures of haptoglobin by lectin blot and mass spectrometry*

To determine the oligosaccharide structures, haptoglobin was purified from 80  $\mu$ l of sera of pancreatic cancer and healthy individuals. The detailed procedure is described in "Material and methods". Five microliters of a 50-fold concentrated fraction was subjected to SDS-PAGE and then stained with CBB. A major band was detected at the expected molecular weight (Fig. 3a). To determine the oligosaccharide structures in the purified haptoglobin  $\beta$  chain, lectin blot analyses using AAL and AOL were performed (Fig. 3b). AOL specifically interacts with core fucosylation. The results indicate that  $\alpha$  1-3 fucosylation as well as core fucosylation were both increased in the haptoglobin  $\beta$  chain of pancreatic cancer patients.

Thirty microliters of 50-fold concentrated haptoglobin was subjected to SDS-PAGE and the 40 kD band was excised from the gel. This purified protein was confirmed to be the haptoglobin  $\beta$  chain by MALDI-TOF mass spectrometry (data not shown). To determine the oligosaccharide structures of haptoglobin  $\beta$  chain in more detail, LC-ESI-MS was performed (Figs. 4a–4c). A high level of fucosylation was observed in the case of haptoglobin associated with pancreatic cancer. Furthermore, biantennary chains with disialic acid, which are considered to be the major oligosaccharide structures, were analyzed by MS/MS. This analysis showed that a high level of core fucosylation is associated with pancreatic cancer (data not shown).

To determine the oligosaccharide structures of triantennary structures with trisialic acid, MALDI-TOF-MS was performed. In this experiment, fucose was found to be attached to the  $\alpha$  1-3/ $\alpha$  1-4 position to GlcNAc or  $\alpha$  1-2 position to Galactose. As the result of the mass spectrometry analysis, core fucosylation as well as  $\alpha$  1-3/ $\alpha$  1-4 fucosylation was confirmed to be increased in the haptoglobin  $\beta$  chain purified from serum of patients with pancreatic cancer (Fig. 4d).

#### *Mechanisms responsible for the increases in fucosylated haptoglobin*

While most haptoglobin is secreted from the liver, the expression of FUT8 in a normal liver is quite low.<sup>16</sup> Therefore, a normal liver does not produce  $\alpha$  1-6 fucosylated haptoglobin. There are 2 possible mechanisms underlying the increased levels of fucosylated haptoglobin in the serum of patients with pancreatic cancer.

One is that pancreatic cancer cells, themselves, produce fucosylated haptoglobin. To investigate this possibility, we performed a RT-PCR analysis of haptoglobin using 6 types of pancreatic cancer cells (Fig. 5a). The expression of haptoglobin mRNA was observed only in PSN-1 cells. After the purification of haptoglobin from conditioned media of these cells, the oligosaccharide structures were analyzed. Expectedly, binding to AAL and AOL was increased in haptoglobin purified from PSN-1 cells (Fig. 5b). Moreover, an LC-ESI-MS analysis indicated that core fucosylation as well as the  $\alpha$  1-3/ $\alpha$  1-4 fucosylation of haptoglobin were observed in the conditioned media of PSN-1 cells (data not shown). The other possibility is that pancreatic cancer produces a factor which induces the production of fucosylated haptoglobin from the liver. To examine this hypothesis further, media from pancreatic cancer cells such as PSN-1 and MIA PaCa-2 were added to a hepatoma cell line, Hep3B. Increase of haptoglobin production was observed in Hep3B cells after addition of the conditioned media of these pancreatic cancer cells (Fig. 6).

#### **Discussion**

To find a novel marker for cancers, it is important to identify a protein that is secreted exclusively from cancer cells or to identify a specific modification of a protein that is produced by cancer cells. The best way for the former analysis would be a DNA micro array, and for the latter analysis would be of the detection of modified sugar chains. In the present study, we found that fucosylated haptoglobin was a good serum marker for pancreatic cancer, analyzed the oligosaccharide structure in detail and investigated the mechanism underlying why fucosylated haptoglobin is increased in the serum of patients with pancreatic cancer.

As a result of analyses of various serum samples, we found that fucosylated haptoglobin was observed at high levels in the serum of patients with pancreatic cancer. Haptoglobin is heterotetramer consisting of 2  $\alpha$  subunits and 2  $\beta$  subunits joined by inter-chain disulfide bonds.<sup>17</sup> There are 4 distinct asparagine residues (Asn 23, 46, 50, 80) in each  $\beta$ -chain and they display oligosaccharide heterogeneity. Recent studies of haptoglobin showed that certain oligosaccharide structures predominate in different diseases. For example, a highly-fucosylated structure is found in breast cancer and ovarian cancer, highly-sialylated structures in Crohn's disease and highly branched structures in alcoholic liver disease.<sup>18–23</sup> Furthermore, the aberrant glycosylation of haptoglobin was found to increase during mouse hepatocarcinogenesis, by our group.<sup>24</sup> In our study, we reported that increases in core fucosylation as well as  $\alpha$  1-3/ $\alpha$  1-4 fucosylation

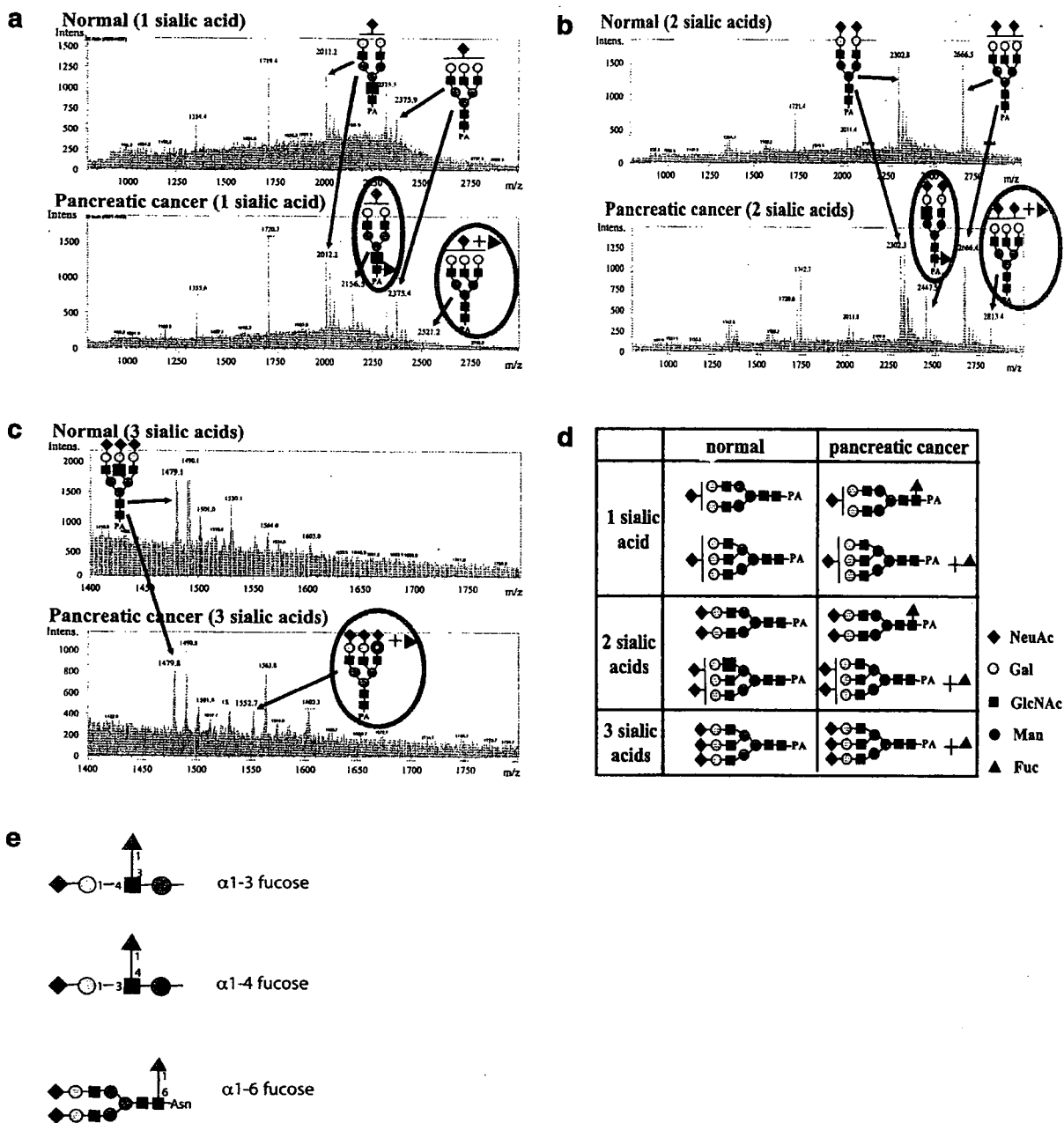
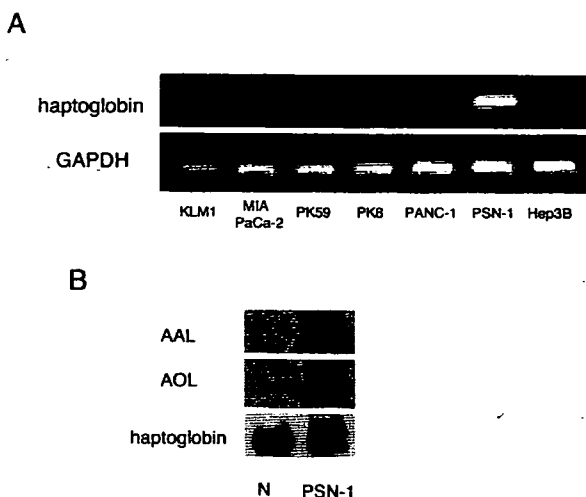


FIGURE 4 – Oligosaccharide structures of haptoglobin by mass spectrometry analysis. (a) Biantennary and triantennary chains with 1 sialic acid structure of haptoglobin were examined by LC-ESI-MS. (b) Biantennary and triantennary chains with disialic acid structures of haptoglobin were examined by LC-ESI-MS. (c) Triantennary chains with tri-sialic acid structures of haptoglobin were examined by LC-ESI-MS. (d) Oligosaccharide structures of haptoglobin in the serum of patients with pancreatic cancer were compared with those of normal individuals. Increases in fucosylation levels in haptoglobin were observed in the case of pancreatic cancer. (e) Linkages of a fucose residue are indicated.

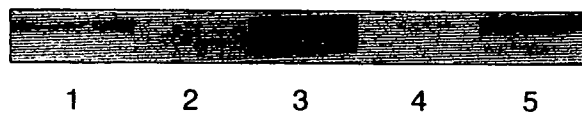
was found in the haptoglobin  $\beta$  chain purified from serum of patients with pancreatic cancer compared to normal controls by LC-ESI-MS and MALDI-TOF-MS. Furthermore, we described 2 possibilities for the fucosylation of haptoglobin found in the serum of patients with pancreatic cancer. A pancreatic cancer cell line, PSN-1 actually produced fucosylated haptoglobin, suggesting that pancreatic cancer itself produces fucosylated (especially  $\alpha$  1-6 fucosylated) haptoglobin. To prove this possibility,

the immunohistochemistry of haptoglobin was undertaken. Infiltrating lymphocytes could express ectopic haptoglobin in pancreatic cancer tissues. Secondly, pancreatic cancer produces a factor that induces the production of fucosylated (especially  $\alpha$  1-3 fucosylated) haptoglobin from the liver. To demonstrate this hypothesis, it will be necessary to identify a factor produced by pancreatic cancer. As shown in Figure 6, it would be difficult to know whether or not fucosylated haptoglobin is increased in a normal



**FIGURE 5** – Expression of haptoglobin mRNA and its oligosaccharide structure of pancreatic cancer cells. (a) The expression of haptoglobin mRNA was investigated RT-PCR. (b) Haptoglobin was purified from the conditioned media of PSN-1 cells and its oligosaccharide structure was analyzed by lectin blot analysis. As expected, binding to AAL and AOL was increased in haptoglobin purified from PSN-1 cells.

liver, because Hep3B is a cancer cell line and secretes high levels of fucosylated haptoglobin. Fucosylated haptoglobin disappeared after an operation, indicating that both of these 2 possibilities could exist *in vivo*.



**FIGURE 6** – Pancreatic cancer cells induce haptoglobin production in Hep3B cells. Hep3B, PSN-1 and MIA PaCa-2 cells were cultured in serum-free medium for 2 days. After collecting the medium, media from PSN-1 or MIA PaCa-2 cells were added to Hep3B cells and the suspension was further incubated for 2 days. Each sample was electrophoresed on 8% acrylamide gels, and a western blot analysis using an anti-human haptoglobin antibody was performed. Lane 1, Hep3B cells with no treatment, lane 2, PSN-1 cells with no treatment, lane 3, Hep3B cells after addition of the conditioned medium from PSN-1 cells, lane 4, MIA PaCa-2 cells with no treatment and lane 5, Hep3B cells after addition of the conditioned medium from MIA PaCa-2 cells. Increases in haptoglobin production were observed in Hep3B cells when cultured with conditioned media from pancreatic cancer cells.

In conclusion, we reported on the potential use of haptoglobin as a target protein for fucosylation in the serum of patients with pancreatic cancer. We also found that the  $\alpha$  1-3/ $\alpha$  1-4 fucosylation as well as the  $\alpha$  1-6 fucosylation of haptoglobin was specifically detected in pancreatic cancer, as evidenced by mass spectrometry. We conclude that there are 2 possibilities for the fucosylation of haptoglobin in pancreatic cancer. Further studies will be required to verify the clinical use of fucosylated haptoglobin as a tumor marker in terms of comparison with inflammatory diseases such as chronic pancreatitis (a preliminary study in the cases of chronic pancreatitis showed 25% positive (1/4 cases) for fucosylated haptoglobin in their serum).

#### References

- Greenlee RT, Murray T, Boldon S, Wingo PA. Cancer statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000;50:7-33.
- Friess H, Kleeff J, Kulli C, Wagner M, Sawhney H, Buchler MW. The impact of different types of surgery in pancreatic cancer. *Eur J Surg Oncol* 1999;25:124-31.
- Rosty C, Goggins M. Early detection of pancreatic carcinoma. *Hematol Oncol Clin North Am* 2002;16:37-52.
- Hakomori S. Aberrant glycosylation in tumors and tumor-associated carbohydrate antigen. *Adv Cancer Res* 1989;52:257-331.
- Morinaga T, Sakai M, Wegmann TG, Tamaoki T. Primary structures of human alpha-fetoprotein and its mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:4604-8.
- Sato Y, Nakata K, Kato Y, Shima M, Ishii N, Koji T, Taketa K, Endo Y, Nagataki S. Early recognition of hepatocellular carcinoma based on altered profiles of alpha-fetoprotein. *N Engl J Med* 1993;328:1802-6.
- Taketa K, Endo Y, Sekiya C, Tanikawa K, Koji T, Taga H, Satomura S, Matsuura S, Kawai T, Hirai H. A collaborative study for the evaluation of lectin-reactive alpha-fetoproteins in early detection of hepatocellular carcinoma. *Cancer Res* 1993;53:5419-23.
- Yamashita F, Tanaka M, Satomura S, Tanikawa K. Prognostic significance of Lens culinaris agglutinin A-reactive alpha-fetoprotein in small hepatocellular carcinomas. *Gastroenterology* 1996;111:996-1001.
- Tatsumura T, Sato H, Mori A, Komori Y, Yamamoto K, Fukatani G, Kuno S. Clinical significance of fucose level in glycoprotein fraction of serum in patients with malignant tumors. *Cancer Res* 1977;37:4101-3.
- Saitoh O, Wang WC, Lotan R, Fukuda M. Differential glycosylation and cell surface expression of lysosomal membrane glycoproteins in sublines of a human colon cancer exhibiting distinct metastatic potentials. *J Biol Chem* 1992;267:5700-11.
- Goupille C, Hallouin F, Meflah K, Le Pendu J. Increase of rat colon carcinoma cells tumorigenicity by alpha (1-2) fucosyltransferase gene transfection. *Glycobiology* 1997;7:221-9.
- Martin-Saue M, Marrugat R, Cancelas JA, Blanco J. Enhanced expression of alpha (1,3)-fucosyltransferase genes correlates with E-selectin-mediated adhesion and metastatic potential of human lung adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 1998;58:1544-50.
- Yamashita K, Kochibe N, Ohkura T, Ueda I, Kobata A. Fractionation of L-fucose-containing oligosaccharides on immobilized Aleuria aurantia lectin. *J Biol Chem* 1985;260:4688-93.
- Noda K, Miyoshi E, Gao C-X, Nakahara S, Kitada T, Honke K, Suzuki K, Yoshihara H, Yoshikawa K, Kawano K, Tonetti M, Taniguchi N, et al. Relationship between elevated FX expression and increased production of GDP-L-fucose, a common donor substrate for fucosylation in human hepatocellular carcinoma and hepatoma cell lines. *Cancer Res* 2003;63:6282-9.
- Ishida H, Moritani T, Hata Y, Kawato A, Suginami K, Abe Y, Imayasu S. Molecular cloning and overexpression of fucA gene encoding a fucose-specific lectin of *Aspergillus oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem* 2002;66:1002-8.
- Miyoshi E, Uozumi N, Noda K, Hayashi N, Hori M, Taniguchi N. Expression of alpha 1-6 fucosyltransferase in rat tissues and human cancer cell lines. *Int J Cancer* 1997;72:1117-21.
- Turner GA. Haptoglobin. A potential reporter molecule for glycosylation changes in disease. *Adv Exp Med Biol* 1995;376:231-8.
- Thompson S, Turner GA. Elevated levels of abnormally-fucosylated haptoglobins in cancer sera. *Br J Cancer* 1987;56:605-10.
- Thompson S, Dargan E, Griffiths ID, Kelly CA, Turner GA. The glycosylation of haptoglobin in rheumatoid arthritis. *Clin Chim Acta* 1993;220:107-14.
- Thompson S, Dargan E, Turner GA. Increased fucosylation and other carbohydrate changes in haptoglobin in ovarian cancer. *Cancer Lett* 1992;66:43-8.
- Goodarzi MT, Turner GA. Reproducible and sensitive determination of changed oligosaccharides from haptoglobin by PNGase F digestion and HPAEC/PAD analysis: glycan composition varies with disease. *Glycoconj J* 1998;15:469-75.
- Marta Piva J, Ignacio Moreno, Kathy L. Sharpe-Timms. Glycosylation and over-expression of endometriosis-associated peritoneal haptoglobin. *Glycoconj J* 2002;19:33-41.
- Mann AC, Record CO, Self CH, Turner GA. Monosaccharide composition of haptoglobin in liver diseases and alcohol abuse: large changes in glycosylation associated with alcoholic liver disease. *Clin Chim Acta* 1994;227:69-78.
- Ekuni A, Miyoshi E, Ko JH, Noda K, Kitada T, Ihara S, Endo T, Hino A, Honke K, Taniguchi N. A glycomic approach to hepatic tumors in N-acetylglucosaminyltransferase III (GnT-III) transgenic mice induced by diethylnitrosamine (DEN): identification of haptoglobin as a target molecule of GnT-III. *Free Radic Res* 2002;36:827-33.