

201137007A

厚生労働省科学研究費補助金

難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業
(肝炎関係研究分野)

肝疾患病態指標血清マーカーの開発と迅速、簡便かつ
安価な測定法の実用化
(H23-実用化(肝炎) - 一般-007)

平成 23 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 成松 久

平成 24 (2012) 年 5 月

目 次

I. 総括研究報告	1
肝疾患病害指標血清マーカーの開発と迅速、簡便かつ 安価な測定法の実用化	
〈研究代表者〉 成松 久	
(資料) 班会議議事録(抜粋)	
II. 分担研究報告	
1. 糖タンパク質マーカーを用いた肝線維化迅速評価系の開発	9
久野敦、梅谷内晶、佐藤隆、梶裕之、田中靖人、伊藤浩美	
2. 肝細胞がんの血清糖鎖バイオマーカーの開発	12
梅谷内晶、久野敦、佐藤隆、梶裕之、田中靖人、伊藤浩美	
3. 新規肝疾患病態指標マーカーの簡易測定系開発	14
久野敦、梅谷内晶、佐藤隆、梶裕之、田中靖人、伊藤浩美	
4. 臨床検体収集体制の構築	18
溝上雅史、伊藤清顕、八橋弘、坂元亨宇、武富紹信	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	19
IV. 研究成果の刊行物・別刷	23

I. 統括研究報告

I. 総括研究報告

肝疾患病害指標血清マーカーの開発と迅速、簡便かつ安価な測定法の実用化

研究代表者：成松 久 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター長

研究要旨

【研究目的】

C型慢性肝炎患者の多くは、肝線維化が進展し、肝硬変を経て、やがて肝がんを発症する。この慢性肝炎の治療には抗ウイルス療法が適用されるが、その効果判定や肝硬変、肝がんハイリスク群のエンリッチには肝線維化の程度を知ることが重要である。しかしその判定は高侵襲性の生検によるため、臨床上の隘路となっている。また、現行の肝がんマーカーでは、早期発見は難しい。我々はこれまでに肝臓由来血清糖タンパク質の糖鎖構造が、肝疾患の進展に伴って変化することに着目し、肝線維化および肝がんマーカーの候補糖タンパク質を多数見いだした。そこで本研究では、肝線維化マーカーについては血清を用いた測定法を確立し、多施設・多検体での有効性検証を行って実用化を図る一方、並行して新たな肝がんマーカーの探索とその正当性検証を目的とする。

【研究方法】

肝線維化進展の指標となるマーカーの実用化には、臨床的有効性の検証が必須であるので、多数の臨床機関が参画する共同研究体制を確立する。この体制は国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センターを中核機関とし、参画機関からは、適切な手順と情報管理のもと、試料（血清）や臨床情報を収集し、規格化された方法で多検体測定を実施する。新規肝がんマーカーの開発は、肝がん細胞培養液や患者血清より、糖鎖プロファイル分析およびグライコプロテオミクス技術によってスクリーニング、選別した糖タンパク質群から、有望な候補糖タンパク質を選定し、患者血清を用いた正当性検証を進める。

【結果と考察】

線維化マーカーの正当性検証は、まず肝生検・病理診断済み HCV 感染患者血清 125 検体を対象に線維化の進展評価や肝硬変検出に有効なレクチンを絞り込み、さらに別の血清 275 検体を用いて正当性検証試験を行った。その結果、線維化の中期（線維化ステージ F2-3-4）から線維化後期（F3-4）の診断に関して、既存の線維化マーカーであるヒアルロン酸、IV型コラーゲン、及び FIB-4 よりも優れていることが判明した。また、新規がんマーカー候補の1つについて、抗体・レクチンのサンドイッチ ELISA 系を構築し、100 検体の肝疾患患者血清を用いて検証した結果、肝がん患者群は肝炎患者群よりも有意に値が上昇している事が確認された。

【結論】線維化マーカーの成績は良好で、さらに検体数を拡張することで実用化が加速されるであろう。

研究分担者：溝上雅史（国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター長）、田中靖

人（名古屋市立大学大学院 医学研究科 教授）、伊藤浩美（福島県立医科大学 助教）、伊藤清顕（国立国際医療研究センター 肝炎・免疫研究センター）、八橋弘（長崎医療センター 治療研究部長）、坂元亨宇（慶應義塾大学 医学部 教授）、武富紹信（北海道大学大学院 医学研究科 教授）、梶裕之、久野敦、梅谷内晶、佐藤隆（以上 産業技術総合研究所 糖鎖医工学研究センター）

A. 研究背景・目的

本邦には約 300 万人の B・C 型肝炎患者が存在し、年間約 3 万人が肝癌で死亡している。C 型慢性肝炎患者では肝線維化の進行につれ肝硬変を経て肝癌に進展する。現時点では慢性 C 型肝炎の根治療法はインターフェロン・リバビリン療法であるが、その効果予測因子としては肝線維化が大きな指標になる。このため肝の線維化を知ることは臨床上重要であるが生検に頼らざるを得ない点が臨床上大きな隘路となっている。現在肝癌は早期発見できれば 5 年生存率は 6 割を超えているが、現時点での肝癌マーカーである AFP, AFP-L3, PIVKA-II を駆使した早期癌検出の正診率は 7-8 割に留まり、高価な CT, MRI, 超音波機器を駆使しているのが現状である。申請者らは生体における各種糖タンパク質は、組織の分化度や障害の程度により付加される糖鎖が異なることを、各種糖鎖特異的測定法を開発することで明らかにしてきた。その中で、肝臓については、肝の線維化に相関する複数の糖タンパク質と新規肝癌血清マーカーになりうる糖タンパク質を見出してきた。本研究はこれらマーカー群を活用した迅速、簡便かつ安価な測定法を開発し、実用化することが最終目標である。本年度は、

- 1)肝線維化を血清で測定可能な糖タンパク質血清マーカーの簡便測定系を開発し、肝生検組織との比較、現在他マーカーとの比較や最適な組み合わせを探り、身体的負担が大きいとされる肝生検に代わる新たな検査方法の実用化をはかる
- 2)新規糖鎖肝がんマーカーについては、取得した候補分子群の正当性検証試験を実施すると同時に、その用途とは異なる新たなマーカー候補分子の探索し、充実化をはかることを目的とする。

B. 研究方法

1) 肝線維化を血清で測定可能な糖タンパク質血清マーカー簡便測定系の開発

申請者はこれまで肝線維化に伴う糖鎖変化を有する血清バイオマーカー候補分子（ProteinX）を見だし、そのサンドイッチアッセイ系の構築に成功している。そこで、初年度は抗体オーバーレイ・レクチンアレイ法及びシスメックス社の全自動免疫測定装置（HISCL）を用い、肝生検・病理診断済み HCV 感染患者血清 125 検体を対象に線維化モニタリングや肝硬変検出に有効なレクチンの絞り込み、さらに別の血清 275 検体を用いて正当性検証試験を行った。また、次年度以降有効性検証試験に活用する 5000 以上の検体を収集のための事前準備を行った。なお、これらの検証に用いるすべての血清サンプルは、

インフォームド・コンセントにより研究対象者から同意の得られたものである。またすべてサンプル収集機関および研究実施機関の各倫理審査委員会で承認されたものを用いている。

2) 新規糖鎖肝がんマーカー開発

先に同定済みのがんマーカー候補分子群について、レクチンクロマトグラフィー、免疫組織学的解析、レクチンアレイ解析等の糖鎖解析技術を応用し、血清マーカー候補分子を絞り込んだ。さらに、絞り込んだ HCC 関連血清糖タンパク質を検出するためのサンドイッチアッセイ系を開発し、100 検体レベルでの、血清を用いた正当性検証試験を行った。また、分化度や AFP 生産性の異なる複数種の肝がん細胞株の培養液、および膜画分の糖鎖プロファイルレクチンマイクロアレイ法により分析し、特定の特性（分化度や AFP 産生量）に関連した糖鎖プロファイルの特徴を抽出し、マーカー捕獲に有効なレクチンを選択した。選択したレクチンに結合する糖タンパク質を同定するため、注目する特性をよく示す細胞株 2 種と、示さない対象株 2 種を培養し、培養液、細胞膜画分、および細胞可溶性画分を調製した。プローブレクチンに特異的な糖タンパク質捕集に先立って、各試料のタンパク質組成（プロテオーム）および糖鎖構造非特異的に捕集した糖ペプチド群をグライコプロテオミクス技術によって分析した。

C. 結果と考察

1) 肝線維化を血清で測定可能な糖タンパク質血清マーカー簡便測定系の開発

レクチンアレイによる比較糖鎖プロファイリングから、線維化モニタリングに有効なレクチンを統計学的に絞り込むことができ、これをもとに迅速サンドイッチアッセイ系を構築した。使用する各反応試薬は、HISCL のために最適化された。測定値の妥当性を評価するために、レクチンアレイおよび HISCL で測定した結果、各レクチン-抗体サンドイッチの測定値はレクチンアレイのシグナル値と強い相関を示した。これにより、これまで手動（レクチンアレイ解析）で 17 時間を要していた測定を、自動測定装置を用い、17 分で取得できるようになった。次に、線維化マーカー Protein X の測定値の、線維化進展度（ステージ）との相関を検討した。その結果、線維化の中期（線維化ステージ F2-3-4）から線維化後期（F3-4）の診断に関して、既存の線維化マーカーであるヒアルロン酸、IV 型コラーゲン、及び FIB-4 よりも優れていた。

2) 新規糖鎖肝がんマーカー開発

既存のマーカー候補分子からバイオインフォマティクス技術などにより、有望と思われる分子種を絞り込んだ。レクチン分画した健常者血清、肝炎患者血清、肝硬変患者血清および肝細胞がん患者血清をウエスタンブロット解析に供し、各画分の検出強度から肝細胞がん依存的な糖鎖変化が見られる分子を 1 つ選抜した。抗体オーバーレイ・レクチンアレイ解析の結果などをもとに、特定した分子に対する抗体とレクチンとのサンドイッチ ELISA 系を構築し、100 検体レベルの肝疾患患者の血清を用いたバリデーションを行った。統計解

析の結果、肝細胞がん患者群は肝炎患者群よりも有意に値が上昇している事が確認された。新規がんマーカー候補分子の探索に関しては、8種の肝がん細胞株を培養し、それぞれの培養液、細胞膜画分、および可溶性画分を調製し、レクチンマイクロアレイ分析した。得られた糖鎖プロファイルを統計解析した結果、特に培養上清の解析結果でAFP産生が低い細胞株群との相関の高いレクチンが検出された。そこで、7種の培養細胞の膜画分および可溶性画分のプロテオーム分析およびグライコプロテオーム分析を行い、約5,000種のタンパク質と約1,000種の糖タンパク質を同定した。

D. 結論および展望

糖タンパク質マーカーを標的とした線維化進展度迅速測定系の構築に成功した。正当性検証試験により、その検出力は線維化中期から後期の定量化において既存マーカーを凌駕するものであることが判明した。次年度以降5000検体クラスの有効性検証試験を実施する。測定効率化のために、検体をテーマごとに分類し重複を無くすことを心掛け、かつ測定の意味のあるもの、本事業として成果の出やすいものから優先順位をつけ、検討を行う。

一方新規がんマーカー開発に関しては、既存肝疾患病態指標マーカー候補分子群から背景肝疾患と肝細胞がんを区別しうる糖鎖関連マーカー1分子を見出し、そのサンドイッチアッセイの構築、および正当性試験を実施した。次年度以降有効性検証を実施する。また、あらたにがんの分化度やAFPの発現性を識別するがんマーカー分子の開発を立ち上げ、AFP非生産性がん細胞株に固有のレクチンプローブを選抜した。次年度はプローブレクチン結合タンパク質の同定、リスト化の後、マーカー候補を選別し、患者血清を用いた正当性検証を行う予定である。また、選別されたレクチンの病態における生物学的意義を検証するために、肝がん組織のレクチン組織染色なども行う予定である。さらに疾患関連糖鎖構造の解析を試みる。

E. 健康危険情報

- ・特になし。

(資料) 班会議議事録 (抜粋)

以下に、本事業推進に当たり実施した班会議の議事録 (抜粋) を記す。

平成 23 年度第一回班会議議事録

日時：平成 23 年 10 月 15 日 (土)

会場：東京コンベンションルーム AP 品川 N+O 会議室

出席者

研究代表者：成松久 (産業技術総合研究所)

研究分担者：溝上雅史、伊藤清顕 (以上、国立国際医療研究センター)、田中靖人 (名古屋市立大)、伊藤浩美 (福島県立医大)、八橋弘 (長崎医療センター)、坂元亨宇 (慶應義塾大)、武富紹信 (九大病院)、梶裕之、久野敦、榎谷内晶、佐藤隆 (以上、産業技術総合研究所)

研究協力者：髭修平 (北大病院)、上野義之 (東北大大学院)、杉山真也 (国立国際医療研究センター)、池田均 (東大大学院)、泉並木 (武蔵野赤十字病院)、田中榮司 (信州大)、松本晶博 (信州大付属病院)、市田隆文 (順天堂大医学部附属静岡病院)、熊田卓 (大垣市民病院)、松浦健太郎 (名古屋市立大)、原裕一 (川崎医科大)、阿部雅則 (愛媛大大学院)、本村貴志 (九大大学院)、池原譲、雄長誠、後藤雅式 (以上、産業技術総合研究所)

オブザーバー：三島果子 (厚生労働省)、三代俊治 (東芝病院)

会議内容：

1. 研究代表者 (成松) 挨拶、オブザーバー挨拶、参加者自己紹介

2. 糖鎖、糖鎖マーカーについての概要説明

参加者の糖鎖に関する知識を深めるため、最初に成松 研究代表者から糖鎖についてのレクチャー並びに糖鎖 (糖タンパク質) をマーカーにすることの意義について説明を行った。

3. 事業の概要、予定の説明

続いて、梶 分担研究者より本事業の概要を説明した。具体的には、(1)サンプル調製とレクチンプロファイル、(2)キャリアタンパク質の同定、(3)マーカー候補の絞り込みを培養細胞、肝癌サンプルを用いて実施することになる。

4. 産総研での倫理委員会についての説明

榎谷内研究員から産総研における倫理委員会と現状で承認されている試料について説明した。現在のところ、国際医療研究センターと名市大から試料を受け入れることは可能になっている。来年度以降は、他の機関の試料受け入れも可能にする予定である。

5. 研究開発の進捗状況説明

久野 分担研究者および伊藤清顕 分担研究者から、肝線維化マーカーの開発状況の説明を行った。現在、マーカー候補は 2 分子に絞られており、最初の分子に関して多施設多サン

プルを用いた評価を終了している。既存のどのマーカーよりも優れていることが実証済みである。ただし、1番目の分子の場合、前処理が必要になるので、結果が出るまでに数時間かかってしまう。そこで、第2の候補分子を用いた開発を進めている。本分子も既存のマーカーよりも優れている上に、前処理が必要ないため17分で結果をだすことができる。

6. 臨床サンプル収集についての説明

医療機関の取りまとめをお願いしている溝上 分担研究者より、臨床サンプル収集についての説明があった。まずは、各機関で倫理委員会を通すこと、サンプルは国際医療セに集約し、一括管理する。産総研では匿名化されたサンプルを用いて、マーカー探索や評価を行う。

7. 質疑応答と連絡事項

サンプルの保存法について → 糖鎖は凍結融解を加えても安定なので、凍結したものを送って欲しい。

どのようなサンプルを集めればよいか → 肝線維化、肝がんとともに、集めるサンプルにより診断対象を変えることができるため、各機関でアイデアを出してもらいたい。基本的にはHBV、HCV、がん早期診断、PIVKA-IIやAFP陰性サンプル、NASHなどを対象にしたい。

平成23年度第二回班会議議事録

日時：平成24年3月10日（土）13時～16時

会場：東京コンベンションルーム AP 東京八重洲通り F ルーム

出席者

研究代表者：成松久（産業技術総合研究所）

研究分担者：溝上雅史、伊藤清顕（以上、国立国際医療研究センター）、伊藤浩美（福島県立医科大学）、坂元亨宇（慶應義塾大学）、武富紹信（北海道大学大学院）、梶裕之、久野敦、梅谷内晶、佐藤隆（以上、産業技術総合研究所）

研究協力者：髭修平（北海道大学病院）、上野義之（山形大学）、池田均（東京大学大学院）、是永匡昭（国立国際医療研究センター）、黒崎雅之（武蔵野赤十字病院）、松本晶博（信州大学）、市田隆文（順天堂大学医学部附属静岡病院）、飯尾 悦子（名古屋市立大学大学院）、米田政志（愛知医科大学）、熊田卓（大垣市民病院）、今井康陽、澤井良之、倉橋知英（以上、市立池田病院）、日野啓輔、原裕一（以上、川崎医科大学）、阿部雅則（愛媛大学大学院）、調憲（九州大学）、池原譲、後藤雅式、雄長誠（以上、産業技術総合研究所）

会議内容：

1. 成松 研究代表者挨拶

はじめて参加する研究協力者もいるため、糖鎖および糖鎖マーカーに関するイントロを含

め、産業技術総合研究所の技術を紹介した。

2. 臨床の代表者である溝上 研究分担者の挨拶

厚労科研費に応募するにいたったきっかけから、ヒアリングでの質疑応答の内容など、臨床の先生に向けた説明を行った。

3. 初めて参加される研究協力者の挨拶

4. マーカー探索の現状

(1) 倫理委員会での承認状況についての説明（榎谷内 研究分担者）

すでに、産総研と国際医療研究センター、名市大間で検体の授受が可能になっているが、24年4月からは、外部から国際医療研究センターに持ち込んだ検体も利用できるかたちで、倫理承認を得ていることを説明した。

(2) 肝疾患病態指標マーカー I（久野 研究分担者）

マーカー探索に関するこれまでの成果を紹介した。最初に、前回説明した糖鎖バイオマーカーと、前処理なしで測定できる線維化マーカー（proteinX）について説明した。本マーカーの測定キットは準備済みであるため、検体が揃い次第測定は開始できる。測定したい検体についてのアイデアを溝上 研究分担者に相談し、承認を得た後、国際医療研究センターで匿名化を行う。産総研に検体を送り、2週間程度で結果を返す。その結果を各機関で分析し、次回の班会議で報告することになった。なお、次回は8月24日（金）に決まったため、6月中に各機関で測定したい検体についての情報を国際医療研究センターに連絡することになった。

なお、検体は自動化装置にのせるため、最低 100 μ l 必要となる。血清が分注されていない場合には、凍結状態のまま送ってもらい、残りを返却することになる（凍結融解の回数を最小限に抑えるため）。

(3) 肝疾患病態指標マーカー II（榎谷内 研究分担者）

肝硬変や肝細胞がんなど線維化とは異なる切り口のマーカー開発も行っている。まだ、論文発表前なので物質名は示さなかったが、これまでに見つかったマーカー候補について説明した。必要に応じて、本マーカーも測定することは可能である。なお、使用する血清量は 10 μ l と少量で済むため、リクエストがあれば、マーカー I と II を同時に測定することも可能である。

(4) 新規マーカー探索状況（梶 研究分担者）

新たに、培養細胞を用いて肝細胞がんマーカーの探索を開始した。現在、レクチンの選択まで進んでいる。今後も、新たな切り口の肝疾患病態指標マーカーの探索を継続する。

5. 臨床検体の収集について（溝上 研究分担者）

国際医療研究センターより、検体の収集について説明があった。6月に新規施設が完成し、ディープフリーザー40台が納入される。検体及び臨床情報はコンピューター管理される予定である。ただし、検体はそれ以前にも受け入れることは可能である。4月以降は是永 研究協力者が、検体管理の責任者になる。

また、結果をまとめる場合、検体を収集し、実験を提案した先生がファーストオーサーになり、関与した先生が共著者となることを確認した。

Ⅱ. 分担研究報告

II. 分担研究報告

1. 糖タンパク質マーカーを用いた肝線維化迅速評価系の開発

研究分担者氏名（所属研究機関名）：

久野敦、梅谷内晶、佐藤隆、梶裕之（産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター）、田中靖人（名古屋市立大学）、伊藤浩美（福島県立医科大学）

A. 背景・研究目的

C型慢性肝炎患者(HCV)において、肝線維化の進達度を定量化することは、ペグインターフェロン+リバビリン(PEG-IFN/RBV)などの抗ウイルス薬療法の治療効果判定、および肝細胞がん予防という観点から重要である。しかしながら、現在 Gold standard となっている診断法は肝生検・病理組織診断であり、侵襲的で身体的負担が大きいため、血清診断のような非侵襲的な手法が求められている。我々はこれまでに特定の糖タンパク質上の糖鎖変化を高精度・高感度に捉える技術を活用して、線維化定量的に評価できる血清バイオマーカーを開発している。本研究では、その迅速測定系の構築を目的とした。

B. 研究方法

2つの血清バイオマーカー候補分子（AGP および ProteinX）について、抗体オーバーレイ・レクチンアレイ法及びシスメックス社の全自動免疫測定装置（HISCL）を用い、肝生検・病理診断済み HCV 感染患者血清 125 検体を対象に線維化モニタリングや肝硬変検出に有効なレクチンの絞り込み、さらに別の血清 275 検体を用いて検証を行った。なお、上述の検証に用いたすべての血清サンプルは、インフォームド・コンセントにより研究対象者から同意の得られたものである。またすべてサンプル収集機関および研究実施機関の各倫理審査委員会で承認されたものを用いている。

C. 結果および考察

線維化モニタリングに有効なレクチンを統計学的に絞り込むことができ、これをもとに迅速サンドイッチアッセイ系を構築した。使用する各反応試薬は、HISCL のために最適化された。測定値の妥当性を評価するために、レクチンアレイおよび HISCL で測定した結果、各レクチン-抗体サンドイッチの測定値はレクチンアレイのシグナル値と強い相関を示した。これにより、これまで手動で 17 時間を要していた測定を、17 分での各レクチン測定値を自動で取得できるようになった。そこで、2つの線維化マーカーの測定値を利用したそれぞれの判別式を作成し、線維化の程度（ステージ）との相関を検討した。その結果、両者ともに線維化の中期（線維化ステージ F2-3-4）から線維化後期（F3-4）の診断に優れ、この2つのマーカーの肝硬変の検出力を検討したところ、それぞれ感度 94%、特異度 86%、AUC 0.95 および、感度 100%、特異度 86%、AUC 0.97 であった。一方、既存の線維化マ

ーカーおよびインデックスは、ヒアルロン酸（感度 94%、特異度 74%、AUC 0.92）、IV 型コラーゲン（感度 100%、特異度 70%、AUC 0.92）、及び FIB-4（感度 78%、特異度 83%、AUC 0.88）であった。

D. 結語

2つの糖タンパク質マーカーを標的としてそれぞれの迅速測定系の構築に成功した。その検出力はともに線維化中期から後期の定量化において既存マーカーを凌駕するものであった。次年度以降 5000 検体クラスの有効性検証試験を実施する。AGP の場合、血清から免疫沈降による簡易精製工程が前処理として必要となり、操作が煩雑になるだけでなく結果が出るまでに数時間を要し、On-site fibrosis assay としては実用的でない。一方、第 2 の候補分子である ProteinX は、既存のマーカーより優れている上に、前処理が必要ないため開始から 17 分で結果を得ることができる。したがって、今後は ProteinX を中心に検証を進めていく予定である。

E. 研究発表

1. 論文発表

・ Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Saito K, Ito K, Tsuruno C, Nagai S, Takahama Y, Mizokami M, Hirabayashi J, and Narimatsu H. LecT-Hepa: a triplex lectin-antibody sandwich immunoassay for estimating the progression dynamics of liver fibrosis assisted by a bedside clinical chemistry analyzer and an automated pretreatment machine. *Clinica Chimica Acta* 412, 1767-1772 (2011).

・ 久野敦、池原譲、成松久、「グライコプロテオミクスを基軸とした腫瘍マーカー開発技術」、カレントセラピー特集「分子腫瘍マーカー：治療標的と経過指標」、ライフメディコム、pp.56-60、(2011)

2. 学会発表

・ 久野敦、池原譲、田中靖人、溝上雅史、成松久、「Clinical implementation of a fibrosis-related glycoprotein biomarker」、JHUPU サテライトシンポジウム、新潟、2011/07/30

・ 成松久：肝線維化、肝臓癌糖鎖バイオマーカーの中日共同研究、第 70 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、2011/10/4

・ 久野敦：グライコプロテオミクスを基軸とした肝線維化レベル定量評価系開発戦略、第 6 回糖鎖産業技術フォーラム、パシフィコ横浜、2011/10/5

・ 久野敦：肝臓・胆管疾患マーカー開発に鑑みるレクチンアレイの実力、産総研オープンラボ、産業技術総合研究所 つくばセンター、2011/10/14

・ Hisashi Narimatsu : Clinical Implementation of a Glycoprotein Biomarker for

Estimating the Progression of Liver Fibrosis Dynamics, The 3rd ACGG Conference, Shanghai, China, 2011/10/28

・久野敦、池原譲、田中靖人、伊藤清顕、溝上雅史、平林淳、成松久、「LecT-Hepa: a triplex lectin-antibody sandwich automated immunoassay for estimating the progression dynamics of liver fibrosis」, The Liver Meeting 2011, サンフランシスコ、2011/11/04

・伊藤清顕、久野敦、池原譲、田中靖人、成松久、溝上雅史、「EVALUATION OF NEW GLYCO-MARKER USING MULTIPLE LECTINS AS PREDICTOR OF LIVER FIBROSIS IN CHRONIC LIVER DISEASES PATIENTS」, The Liver Meeting 2011, サンフランシスコ、2011/11/04

・久野敦、池原譲、田中靖人、溝上雅史、成松久、「新規糖タンパク質マーカーを用いた肝線維化迅速評価系の開発」, 第 39 回日本肝臓学会西部会, 岡山、2011/12/09

II. 分担研究報告

2. 肝細胞がんの血清糖鎖バイオマーカの開発

研究分担者氏名（所属研究機関名）：

梅谷内晶、久野敦、佐藤隆、梶裕之（産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター）、田中靖人（名古屋市立大学）、伊藤浩美（福島県立医科大学）

A. 背景・目的

肝細胞がんのスクリーニングや予後診断の為に、AFP (alpha-fetoprotein)、PIVKA-II (protein induced by vitamin K absence or antagonists, factor)、と AFP-L3 (lens culinaris agglutinin reactive fraction of alpha-fetoprotein) といった優れた腫瘍マーカが実用化されているが、全ての肝細胞がんについて診断することは難しいのが現状である。特に肝細胞がんの早期診断に繋がるような肝疾患バイオマーカが求められている。この臨床的現状をふまえて、既存マーカの診断能を補足しうる新規血清マーカの開発に着手した。血中の微量糖タンパク質を高感度に同定する為に、以前梶、久野らによって報告された IGOT 法を用いて同定された候補分子の中から、レクチンクロマトグラフィー、免疫組織学的解析、レクチンアレイ解析等の糖鎖解析技術を応用し、血清マーカ候補分子を絞り込んだ。さらに、絞り込んだ HCC 関連血清糖タンパク質を検出するためのサンドイッチアッセイ系を開発し、100 検体レベルでの、血清を用いた検証試験を行った。

B. 結果

レクチン-IGOT-LC/MS 法によって同定した数百種類のマーカ候補分子からバイオインフォマティクス技術などにより、有望と思われる分子種を絞り込んだ。レクチン分画した健常者血清、肝炎患者血清、肝硬変患者血清および肝細胞がん患者血清をウエスタンブロット解析に供し、各画分の検出強度から肝細胞がん依存的な糖鎖変化が見られる分子を選抜した。その後、各肝疾患患者血清より免疫沈降法を用いて調製した候補分子をレクチンアレイ解析に供して、肝細胞がん患者を区別しうる最適なレクチンを特定した。特定したレクチンが認識する糖鎖は、肝細胞がん組織において候補分子と共発現している事、血清中の候補分子を修飾している事を明らかにした。我々はその後特定した分子に対する抗体とレクチンとのサンドイッチ ELISA 系を構築し、100 検体レベルの肝疾患患者の血清を用いたバリデーションを行った。統計解析の結果、肝細胞がん患者群は肝炎患者群よりも有意に値が上昇している事が確認された。

C. 考察

以上、我々は背景肝疾患と肝細胞がんを区別しうる糖鎖関連マーカを見出し、これら分

子の疾患特異的な糖鎖変化を捉えるレクチンプローブを選抜した。開発したサンドイッチアッセイ系で小規模な検証試験を行った結果、本分子は新たな肝疾患糖鎖バイオマーカーである可能性が示された。

D. 研究発表

1. 学会発表

- ・雄長誠、成松久ほか：肝細胞がんの血清糖鎖バイオマーカーの開発，第 31 回日本分子腫瘍マーカー研究会，名古屋国際会議場，2011/10/2
- ・雄長誠、成松久ほか：肝細胞がん糖鎖マーカーの探索と検証，第 70 回日本癌学会学術総会，名古屋国際会議場，2011/10/3-5
- ・榎谷内晶、ほか：グライコプロテオミクス技術による疾患糖鎖バイオマーカーの探索と開発，産総研オープンラボ，産業技術総合研究所 つくばセンター，2011/10/14

II. 分担研究報告

3. 新規肝疾患病態指標マーカーの簡易測定系開発

研究分担者氏名（所属研究機関名）：

久野敦、梅谷内晶、佐藤隆、梶裕之（産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター）、田中靖人（名古屋市立大学）、伊藤浩美（福島県立医科大学）

A. 研究目的

肝疾患病態指標マーカー候補分子群より、肝線維化の進行を見積もるマーカー、発がん高リスク群を囲い込むマーカー、および肝がん早期発見など、各種肝疾患マーカーに最適な糖タンパク質を実験的に選抜し、その簡易測定系を確立することを目的とする。特に、特定分子上の糖鎖変化をモニタリングすることにより、既存の（タンパク質）バイオマーカー群とは異なる疾患状態（肝疾患の進展、ステージ）をモニタリングできるような、新たなマーカーの開発を試みる。

B. 研究方法

肝疾患病態指標マーカーは、肝疾患、すなわち肝線維化や肝がんの出現によって肝細胞が産生するタンパク質上の糖鎖構造が変化することを基盤として探索する。発見フェーズでは、はじめに複数種の肝がん細胞株の培養液、および膜画分の糖鎖プロファイルをレクチンマイクロアレイ法によって分析し、特定の特性、たとえば分化度やAFP産生量に関連した糖鎖プロファイルの特徴を見だし、同時にこの特徴の相違を最も反映するレクチンプローブを数種、選別した。なお、より多くのレクチンを対象として最適なプローブの選抜を行うため、当センターが通常用いている43種レクチンが固定されたレクチンアレイだけでなく、舘野らにより開発された高密度レクチンアレイ(96レクチンが固定)を用いた解析も同時に実施した。今年度はAFP産生量に注目し、AFPの検出による診断が困難な肝がんに対するマーカーの取得を目的として、レクチンを選別した。次いで、選択したレクチンに結合する糖タンパク質（実験的には糖ペプチド）を同定するため、注目する特性をよく示す細胞株2種と、示さない対象株2種を培養し、培養液、細胞膜画分、および細胞可溶性画分を調製した。プローブレクチンに特異的な糖タンパク質捕集に先立って、各試料のタンパク質組成（プロテオーム）および糖鎖構造非特異的に捕集した糖ペプチド群をグライコプロテオミクス技術によって分析した。

C. 研究結果

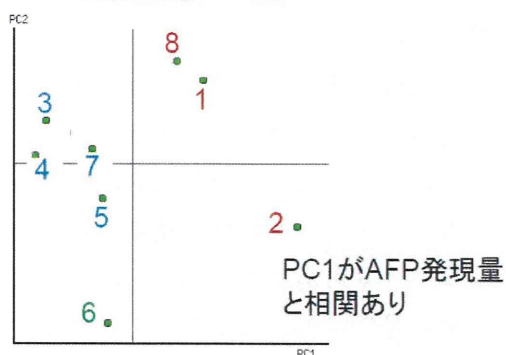
8種の肝がん細胞株を培養し、それぞれの培養液、細胞膜画分、および可溶性画分を調製し、レクチンマイクロアレイ分析した。得られた糖鎖プロファイルを統計解析した結果、

特に培養上清（レクチンアレイにアプライしたタンパク質濃度 0.2 ug/mL）の解析結果で AFP 産生が低い細胞株群との相関の高いレクチンがいくつか検出され、より明瞭に分けることのできる 5 種を選抜した。（培養上清の結果を図 1 に示した）このうち 7 種の培養細胞の膜面分および可溶性画分のプロテオーム分析およびグライコプロテオーム分析を行い、約 5,000 種のタンパク質と約 1,000 種の糖タンパク質を同定した。（図 2）

A. ウェスタンブロットによる AFP 発現量の比較

Cell ID	AFPバンド強度
1	+++
2	+++
3	—
4	—
5	—
6	±
7	—
8	+++

B. レクチンアレイデータを主成分解析した結果



C. AFP 発現量と負の相関あるレクチン

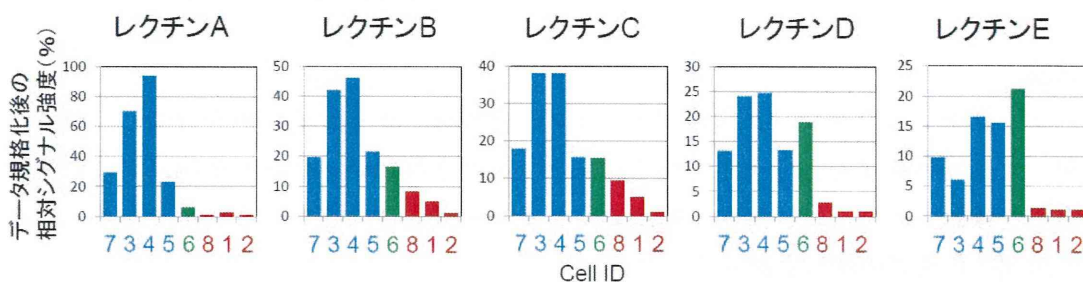


図 1 糖鎖プロファイルを取得した肝がん細胞株 8 種の特性 (A)、糖鎖プロファイルの統計解析の結果（主成分解析結果、B）、および AFP 発現量と相関するレクチン 5 種（=候補選別のためのプローブレクチン）のシグナル強度比 (C)

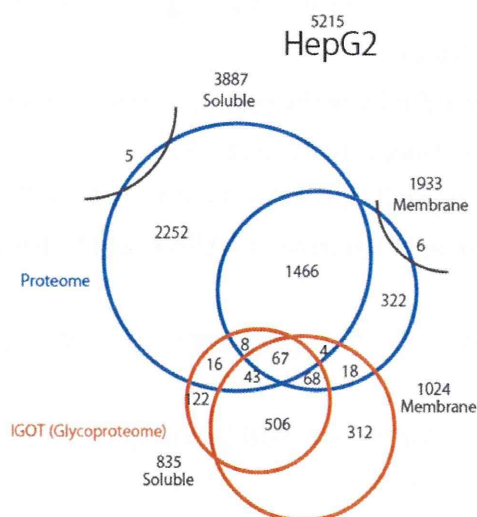


図 2 肝がん細胞株 (HepG2) 可溶性画分と膜面分のプロテオームおよびグライコプロテオーム分析結果：タンパク質約 4,000、糖タンパク質約 1,100 種を同定した。この他 6 種の細胞株についても同様に分析し、各タンパク質の存在量を示唆する基礎情報とした。

D. 考察

各肝がん細胞株の培養上清を SDS-PAGE した際には、バンドパターンに AFP の産生・非産生で明瞭な差が見出されなかったにもかかわらず、レクチンアレイで取得したデータの統計解析により、AFP の産生量に相関するレクチンを容易に選抜することができた。レクチンアレイ上の結合シグナルの差は、細胞から分泌された糖タンパク質上の糖鎖構造の差を意味し、これは AFP の産生・非産生で細胞の糖鎖合成マシナリーが明確に異なることを意味し、糖鎖ががんの出現だけでなく種類を区別するバイオマーカーとなりうることを強く示唆している。

肝がん細胞株 7 種について、プロテオームおよびグライコプロテオームを質量分析技術によって分析、同定した。プロテオームとグライコプロテオームの同定数やタンパク質 1 種あたりに検出されたペプチド数の比較から、糖タンパク質の存在量は比較的少なく、全タンパク質のおよそ 5% 程度と見積もられた。今後同様に、培養液に分泌されたタンパク質や糖タンパク質の分析も実施することにより、正当性検証へと進める候補タンパク質の選別のための基礎情報になると考えられる。さらに、膜画分から多くの糖タンパク質が同定できたため、マーカーおよび将来的には分子標的薬の開発のための候補選定の判断材料として有用と考えられる。

E. 結論

プローブレクチン結合タンパク質の同定、リスト化の後、マーカー候補を選別し、患者血清を用いた正当性検証を行う予定である。また、選別されたレクチンの病態における生物学的意義を検証するために、肝がん組織のレクチン組織染色なども行う予定である。さらに疾患関連糖鎖構造の解析を試みる。

F. 研究発表

1. 学会発表

- ・成松 久：グライコプロテオミクス技術を駆使したバイオマーカー探索，臨床応用を目指した最前線セミナーPart.12，品川コクヨホール，2011/4/27
- ・[Hisashi Narimatsu](#)：Development of diagnosis kit for liver fibrosis and liver cancer, The 2011 Glycobiology Gordon Research Conference, Lucca, Italy, 2011/5/9
- ・[Hisashi Narimatsu](#)：GLYCOPROTEOMICS APPROACH TOWARD DISCOVERY OF GLYCOBIOMARKERS, Human Glycomics/Proteome Initiative (HUPO 2011 10th World Congress) , Geneva, Switzerland, 2011/9/5
- ・成松 久：イントロダクション：第 6 回糖鎖産業技術フォーラム 開催に寄せて，第 6 回糖鎖産業技術フォーラム，パシフィコ横浜，2011/10/5
- ・成松 久：糖鎖疾患バイオマーカー探索の戦略と肝線維化マーカー開発の成功，日本臨床検査自動化学会 第 43 回大会，パシフィコ横浜，2011/10/8