

201240007A

厚生労働科学研究費補助金

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 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 成松 久

平成 25 (2013) 年 5 月

目次

I. 総括研究報告	1
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	
<研究代表者> 成松 久	
<研究分担者> 溝上雅史, 田中靖人, 伊藤浩美, 伊藤清顕, 八橋 弘, 坂元亨宇, 武富紹信, 髭修平, 上野義之, 泉 並木, 松本晶博, 市田隆文, 熊田 卓, 日野啓輔, 阿部雅則, 調 憲, 梶 裕之, 久野 敦, 梅谷内晶, 佐藤 隆	
<研究協力者> 米田政志, 今井康陽, 池田 均, 是永匡紹	
II. 分担研究報告	
1. 新規肝疾患病態指標マーカーの簡易測定系開発	5
成松 久, 梶 裕之, 久野 敦, 梅谷内晶, 佐藤 隆, 伊藤浩美, 池原 譲, 雄長 誠, 後藤雅式	
2. H1-12 に関する基礎的検討	9
田中靖人, 飯尾悦子	
3. WFA+-M2BP と肝線維化・肝発癌の検討	12
八橋 弘, 山崎一美	
4. 肝細胞癌手術症例における術前肝線維化マーカーとしての WFA+-M2BP の診断精度に関する検討	15
武富紹信	
5. 肝発癌例と非発癌例での血中 WFA+-M2BP の検討	
－発癌 3 年前の血清マーカーからの検討－	17
熊田 卓, 豊田秀徳, 多田俊史	
6. C 型肝硬変症例における WFA+-M2BP の経時的変動と肝発癌	23
髭 修平	
7. C 型肝炎からの肝発癌リスク因子の解析	26
泉 並木, 朝比奈靖浩, 黒崎雅之	
8. C 型肝炎患者における非侵襲的線維化診断法の比較	32
市田隆文, 玄田拓哉	

9. 慢性肝疾患における Virtual Touch Tissue Quantification (VTTQ) と 新規糖鎖マーカー(WFA+M2BP)の比較	35
溝上雅史,是永匡紹,杉山真也	
10. NAFLD 症例における肝生検結果と新規線維化マーカーとの関連性	39
日野啓輔,原 裕一	
11. NAFLD における WFA+M2BP の線維化予測に対する有用性	43
阿部雅則,今井康陽,日野啓輔	
12. 原発性胆汁性肝硬変における疾患特異的遺伝子発現の基礎検討	45
上野義之	
Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表	47
Ⅳ. 研究成果の刊行物・別刷	63

I .總括研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
総括研究報告書（平成 24 年度）

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
成松 久 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター・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囲い込み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 WFA⁺M2BP 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、並行して新たな肝疾患病態指標マーカーの探索とその正当性検証を目的とする。

【結果と考察】 線維化マーカー WFA⁺M2BP の正当性検証は、参画する臨床機関・大学から他の非侵襲的肝線維化測定技術との比較や肝細胞がん危険群の囲い込みへの応用など 15 の研究課題が提案され、累計 4095 サンプルを測定した。この結果によりマーカーの有効性・特性が明確になりつつある。新規肝疾患病態指標マーカー開発のうち、がんマーカーは、多種の培養細胞株の糖鎖プロファイル分析の結果から見出された、AFP 非産生肝がんに関連するプロブレクチンを用いて、これに結合する糖タンパク質を系統的に同定し、AFP 非産生細胞株で優先的に見出される候補タンパク質を選出した。

【結論】 新規線維化マーカー WFA⁺M2BP の臨床的有用性が見出された。保険収載へ向けた肝線維化検査のガイドラインの提案が期待できる。

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・医学部・生化学講座・助教
伊藤清頭 愛知医科大学・医学部・准教授

八橋 弘 長崎医療センター・臨床研究センター長

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

髭 修平 札幌厚生病院 第 3 消化器科・主任部長

上野義之 山形大学 内科学第二講座・教授

泉 並木 武蔵野赤十字病院・副院長
 松本晶博 信州大学医学部附属病院・特任
 研究員
 市田隆文 順天堂大学医学部附属静岡病
 院・消化器内科・教授
 熊田 卓 大垣市民病院・副院長
 日野啓輔 川崎医科大学・肝胆膵内科学・
 教授
 阿部雅則 愛媛大学大学院・地域医療学講
 座・准教授
 調 憲 九州大学・肝臓・脾臓・門脈・肝臓
 移植外科・講師
 梶 裕之 産業技術総合研究所・糖鎖医工学
 研究センター・研究チーム長
 久野 敦 産業技術総合研究所・糖鎖医工
 学研究センター・主任研究員
 榎谷内晶 産業技術総合研究所・糖鎖医工
 学研究センター・主任研究員
 佐藤 隆 産業技術総合研究所・糖鎖医工学
 研究センター・研究員
 研究協力者
 米田政志 愛知医科大学・内科学講座・教
 授
 今井康陽 川崎医科大学・肝胆膵内科学・
 教授
 池田 均 東京大学大学院・医学研究科・准
 教授
 是永匡紹 国立国際医療研究センター・肝
 炎・免疫研究センター・肝疾患研
 修室長／第一肝疾患室医長

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临床上重要であるが生検に頼らざるを得ない点が临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、肝の線維化をはじめとする肝疾患の病態指標となりうる血清マーカー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) 新規肝疾患病態指標マーカー開発：昨年度、肝がん患者血清を用いて疾患に伴う糖鎖変化が検証された候補タンパク質 (H1-12：昨年度は分子 B と表記) については、臨床情報の明確な患者血清を用いた小規模な有効性検証を行う。また並行して、AFP 非産生肝がん培養細胞に相関するレクチンに結合する糖タンパク質 (ペプチド) を各種肝がん細胞培養液より捕集し、グライコプロテオミクスの手法で同定する。これを AFP 非産生肝がん早期発見マーカーの一次候補とし、検証に進める有望な候補をバイオインフォマティクスによって選別する。
- 2) 多施設多検体検証：昨年度までに開発した、肝線維化の進展度を血清で測定可能な糖タンパク質血清マーカー(WFA+M2BP)簡便測定系の有効性評価判定試験の位置づけとして、参画大学・臨床機関より集約された 3000 を超える血清サンプルを測定し、肝生検組織との比較、現在の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ことを目的とする。

B. 研究方法

1) 新規肝疾患病態指標マーカー開発：H1-12 に対する抗体と疾患関連糖鎖変化を反映するプローブレクチンを用いて構築したサンドイッチ ELISA システムを利用して、線維化ステージや肝がんの有無など臨床情報の規定された患者血清を対象とした小規模な有効性検証（一部は正当性検証の拡大）を行った。またこの分子の局在と、プローブレクチンの標的糖鎖の局在を患者肝組織切片の染色により検証した。新規 AFP 非産生肝がんマーカーの探索は、AFP 産生性、及び非産生性の肝がん細胞の培養上清より、プローブレクチンにより、これに結合する糖タンパク質あるいは糖ペプチドを捕集し、質量分析法により同定した。糖タンパク質の形状で捕集されたタンパク質画分は SDS ゲル電位泳動による分離の後、検出されたタンパク質バンドより糖タンパク質を抽出し、ペプチドマスフィンガープリント法あるいは LC/MS 法で同定した。また培地タンパク質のトリプシン消化物より、プローブレクチンで捕集された糖ペプチド画分は、IGOT 処理の後、LC/MS 法により同定した。AFP 産生株の試料との比較により、候補タンパク質を選別し、さらにバイオインフォマティクスなどによる有望な候補をさらに選択した。抗体の準備できた候補タンパク質については、培地や少数の患者血清を用いて、正当性検証を行った。

2) 多施設多検体検証

参画臨床機関・大学より提案され、研究代表者および臨床機関統括者により承認された研究課題を対象に、肝線維化マーカー WFA+M2BP の測定を行った。測定は昨年度までに構築した迅

速測定法(Fastlec-Hepa)を用いた。サンプルは各施設より臨床機関統括者へ集約され、連結可能二重匿名化後、測定機関である産業技術総合研究所糖鎖医工学研究センターへ移送された。測定値はカットオフインデックス値に換算され、速やかに提案者へ報告された。提案者は測定値をもとに、各課題における検証作業を行った。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承認されたものを用いている。

C. 研究結果と考察

1) 新規肝疾患病態指標マーカー開発：正当性検証の行われた候補分子 H1-12 については、肝疾患（肝硬変および肝がん）患者組織切片を、H1-12 の抗体およびプローブレクチンを用いて染色した。その結果、H1-12 と、プローブレクチンによる染色領域は、少なくとも結節周辺部にてほぼ重なり、H1-12 と疾患関連糖鎖エピソードは共局在することが判明した。また各種患者血清を用いた正当性検証の結果、この分子は、肝がんの早期発見マーカーというよりは、肝硬変の予後の推測に利用できる可能性が示唆された。これは染色から推測されることと一致する。今後は、より有効性の期待される試料セットを用いて、その正当性、有効性を検証する必要がある。一方、新規マーカーの探索では、6種の肝細胞がん培養液より、レクチン-IGOT-LC/MS 法で約 1,000 種のプローブレクチン反応性の糖タンパク質が同定され、AFP 非産生株群からのみ検出された糖タンパク質は約 150 種であった。これらの糖タンパク質プロファイルの比較情報と、肝臓での発現傾向、肝がんがん部での発現傾向など、各種の情報を利用したバイオインフォマティクスの手法により、

期待される候補タンパク質を絞り込んだ。またプローブ結合性の糖タンパク質の検出、同定からは7種のメジャータンパク質バンドが同定され、そのうちの一つについては、肝硬変の段階から高値を示す傾向が見出された。AFP産生との関連性などについて、今後検証が必要であろう。

2) 多施設多検体検証

各機関より15の課題が提案され、HBV, HCV感染ないし非感染の慢性肝炎、肝硬変、肝細胞がん患者および非アルコール性脂肪性肝疾患

(NAFLD)を対象として、累計4095サンプルの測定が行われた。各課題のデータ解析の結果、線維化ステージF3以上で今回検証した他の非侵襲型線維化評価技術(LSM, ARFI)およびインデックス(APRI, FIB-4,)と遜色ない、もしくは凌駕する肝線維化との相関が得られた。また、インターフェロン治療後経過観察例などの測定結果から、肝発がんリスクを有する症例の囲い込みへの有効性を見出した。

D. 結論と展望

新規肝がんマーカー候補として正当性検証を行った候補分子H1-12については、肝硬変結節部周辺域においてプローブレクチンエピトープ糖鎖と共局在することが判明し、臨床情報の明確な患者血清を用いた検証では、肝硬変患者の

予後予測マーカーとしての可能性が示唆された。この臨床的な意義や利用法などについて今後更なる検証が必要である。AFP非産生肝がんに対する新規マーカー開発では、多数の候補タンパク質が見出され、検証候補を効率的に選出するためのバイオインフォマティクス技術を開発しつつ、候補の絞り込みを行った。これらの候補については市販の抗体を購入し、正当性検証の準備を進めている。

また線維化マーカーに関しては、肝発がんリスクが増加するF3以降での鑑別への有効性が複数の提案課題で確認された。今後は各課題の結果の精度を高めるための追加測定を行い、各用途へのカットオフ値の設定や診断のためのガイドラインの提案を目指す。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 論文発表

分担研究報告書に記載した。

G. 知的財産権の出願・登録状況

肝線維化マーカーに関する特許

登録：1件(特5031928)

審査請求：1件(特願2012-110964)

Ⅱ. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書（平成 24 年度）

新規肝疾患病態指標マーカーの簡易測定系開発
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:肝がん細胞株群のレクチンアレイ分析より見出された AFP 非産生肝がん細胞群に相関するレクチンを用いて、AFP 産生細胞 3 種、非産生細胞 3 種の各培養液より、このレクチンに結合する糖タンパク質あるいは糖ペプチドを捕集し、同定した。糖タンパク質の捕集では 7 種の、糖ペプチドの捕集では約 700 種の糖タンパク質が同定された。AFP 非産生株群から同定された約 350 種の糖タンパク質について、肝臓での発現、肝がんでの発現などの情報を収集して統計解析し、検証するマーカー候補を選別した。

研究分担者

梶 裕之 産業技術総合研究所・糖鎖医工学
研究センター・研究チーム長

久野 敦 産業技術総合研究所・糖鎖医工
学研究センター・主任研究員

榎谷内晶 産業技術総合研究所・糖鎖医工
学研究センター・主任研究員

佐藤 隆 産業技術総合研究所・糖鎖医工
学研究センター・研究員

伊藤浩美 福島県立医科大学・医学部・生
化学講座・助教

研究協力者

池原 譲 産業技術総合研究所・糖鎖医工学
研究センター・研究チーム長

雄長 誠 産業技術総合研究所・糖鎖医工
学研究センター・特別研究員

後藤雅式 産業技術総合研究所・糖鎖医工
学研究センター・副研究センター
長

AFP-L3、PIVKA-II による早期がん検出の正診率は 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、それを生成する組織・細胞の分化度や障害の程度により、結合している糖鎖の構造が異なることを、各種糖鎖関連解析技術を開発することで明らかにしてきた。さらに肝臓については、肝がんの発症リスクと関連する肝線維化の程度を反映する複数の糖タンパク質と新規肝がん血清マーカーになりうる糖タンパク質候補を見出してきた。本課題では、後者の新規マーカー候補（先行候補 H1-12）について、迅速、簡便かつ安価な測定法を確立し、臨床の有効性を検証すること、および並行して、異なる新しい用途に適用可能な新規肝がんマーカー候補の探索、および正当性検証を行うことを目的とする。さらに、課題 2 において有効性検証の進められているマーカー糖タンパク質の糖鎖構造を同定し、原理検証の一助とする。

A. 研究目的

現在肝がんは早期発見できれば 5 年生存率が 6 割を超えているが、肝がんマーカー AFP、

B. 研究方法

(1) 先行マーカー候補の測定系の確立、正当性検証：肝がん細胞株の培養液および HCC 患

者血清より、糖鎖変化を示した糖鎖マーカー候補分子を探索し、その中から、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、血清マーカー候補分子 H1-12 を絞り込んだ。この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、適切に肝生検・病理診断された HCV 感染肝炎・肝硬変および肝細胞がん患者の血清(150 検体程度)を対象に小規模な有効性検証を行った。また、肝臓の組織切片を、H1-12 分子に対する抗体およびレクチンで免疫蛍光組織染色した。なお、上述の検証に用いた全ての血清サンプルと組織サンプルは、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) 新規肝がんマーカーの探索

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で分析した結果に基づき、今年度は AFP 産生の低い細胞株群に相関するレクチンを選択し、このレクチンに結合する糖タンパク質を系統的に同定した。さらに同定された糖タンパク質プロファイルの比較から、AFP 非産生肝がんのマーカー候補を分類整理して絞り込んだ。次に絞り込んだマーカー候補から公共データベースの DNA マイクロアレイデータを利用し、データマイニングし、候補分子を絞り込んだ。さらに統計解析の結果、糖鎖修飾部位の数、文献情報等を利用して正当性検証を進める際の順位付けを行った。並行して、培地より当該レクチンで糖タンパク質を捕集し、SDS ゲル電気泳動で分離後、顕著に観察された結合タンパク質を質量分析により同定した。抗体が取得可能であるものについては正当性検証を進めた。

(3) マーカータンパク質の糖鎖解析

肝線維化の糖鎖バイオマーカーとして開発している M2BP について、その自動測定におけるキャリアプラントして利用するリコンビナント M2BP の糖鎖構造を質量分析により分析した。このマーカーの検出には糖鎖プローブとしてレクチン WFA が用いられているので、このレクチンによって M2BP 由来の糖ペプチドを捕集し、それぞれの糖鎖の構造解析を行った。

C. 研究結果

(1) 先行マーカー候補の測定系の確立、正当性検証：統計解析の結果、(i)肝炎患者群においては、肝細胞がんを発症した患者群は非がん患者群よりも有意に値が上昇している事、(ii)肝硬変患者群においては、肝細胞がんを発症した患者群と非がん患者群との間に有意差が認められない事、(iii)肝硬変患者の予後予測が可能である兆候を明らかにした(詳細については分担研究者・名古屋市立大学・田中靖人の項を参照)。マーカーの臨床上的有用性については今後の検討課題とする。免疫蛍光組織染色の結果からは、特定した分子とレクチンの認識する糖鎖エピソードの組織レベルでの局在が明らかとなった。

(2) 新規肝がんマーカーの探索：AFP 産生の低い細胞株 3 種、および高い株 3 種の培養上清を準備し、AFP 低産生細胞株群に相関するレクチンを用いて、これに結合する糖タンパク質を同定した。具体的には、各培地のタンパク質を還元アルキル化の後、トリプシン消化し、得られたペプチド混合物から当該レクチンに結合する糖ペプチド群を捕集し、これをそれぞれ IGOT-LC/MS 法で同定した。AFP 低産生群からはのべ 364 種、高産生群からは 517 種の糖タンパク質が同定された。これらを比較した結果、低産生群でのみ検出されたタンパク質が 83 種見出された。

IGOT-LC/MS 法により AFP 非産生株群から同定された 364 タンパク質について、候補分子を絞り込み、さらに解析を進める為の優先順位付けを行った。これらの解析には公共のデータベースの情報・糖鎖関連情報を利用し、データマイニングの手法により行った。また、培養上清から糖タンパク質の状態でレクチン捕集し、捕集画分をゲル電気泳動した。検出されたバンドのうち、主要なタンパク質 7 つを同定した。うち 1 つについては培養上清および血清からのエンリッチ方法を確認し、抗体オーバーレイレクチンアレイにより比較糖鎖プロファイリングを実施した。その結果、培養上清および血清中に素材する党外候補分子は、同定の際捕集に用いたレクチンとの反応性を示すことを確認した。

(3) マーカータンパク質の糖鎖解析：リコンビナント M2BP を抗体カラムを用いた親和性クロマトグラフィーで精製し、還元アルキル化の後、トリプシンで消化した。生じたペプチド混合物から親水性クロマトグラフィーで糖ペプチドを精製した後、WFA カラムに供した。このレクチンカラムに結合する糖ペプチドと結合しないものに分離し、それぞれを LC/MS で分析した。その結果、M2BP に存在する 7 カ所の糖鎖付加部位にはすべて糖鎖が結合しており、WFA 結合糖ペプチドのほとんどには、N,N-diacetyllactosediamine(LacdiNAc)構造をもつことが予想される組成の糖鎖が結合していた。

D. 考察

(1) マーカー候補分子 H1-12 は肝硬変の予後予測血清マーカーとなる可能性を示した。その一方、臨床的な有用性については他の指標との比較を行うなど慎重な検討を必要とする。今後は課題 2 の多施設研究での検討を通し、肝臓組織における分子の発現と病態との関連性を明らかにする必要がある。

(2) 新規肝がんマーカーの探索：AFP 低産生細胞株群から 350 種ほどの糖タンパク質候補が検出され、パイオインフォマティクスにより正当性検証の優先順位を算出した。有望な分子から、少数の臨床検体を用い検討を進める予定である。また並行してタンパク質レベルの解析で同定されたタンパク質についても検証を進めていく。

(3) マーカータンパク質の糖鎖解析：キャリアブランチとして有効なりコンビナント M2BP には LacdiNAc 糖鎖が付加しているものであった。これは、既報のレクチンの特異性に合致するものであり、キャリアブランチとして適当であることが支持される。次いで、肝がん細胞及び肝疾患患者に由来する WFA 結合性 M2BP の糖鎖構造解析に興味をもたれる。

E. 結論

(1) 新規肝がんマーカー候補分子 H1-12 は肝硬変患者の予後予測マーカーである可能性が示された。

(2) AFP 低産生肝がん細胞株より同定した多くのマーカー候補からデータマイニング等により有望な候補分子を絞り込む事ができた。

(3) 肝線維化マーカー分析装置のキャリアブランチ分子は LDN 含有糖鎖を持ち、WFA と反応していると考えられた。

F. 論文発表

- 1) Kuno A, Sato T, Shimazaki H, Unno S, Saitou K, Kiyohara K, Sogabe M, Tsuruno C, Takahama Y, Ikehara Y, Narimatsu H. Reconstruction of a robust glycodiagnostic agent supported by multiple lectin-assisted glycan profiling. PROTEOMICS Clin Appl. 2013 May;In press.
- 2) Kaji H, Ocho M, Togayachi A, Kuno A, Sogabe M, Ohkura T, Nozaki H, Angata T,

- Chiba Y, Ozaki H, Hirabayashi J, Tanaka Y, Mizokami M, Ikehara Y, **Narimatsu H**. Glycoproteomic Discovery of Serological Biomarker Candidates for HCV/HBV Infection-Associated Liver Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma. *J Proteome Res.* 2013 Apr;In press.
- 3) Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Ito K, Matsuda A, Sekiya S, Hige S, Sakamoto M, Kage M, Mizokami M, **Narimatsu H**. A serum “sweet-doughnut” protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. *Sci Rep.* 2013 Jan;3.
- 4) Du D, Zhu X, Kuno A, Matsuda A, Tsuruno C, Yu D, Zhang Y, Ikehara Y, Tanaka Y, Zhang X, **Narimatsu H**. Comparison of LecT-Hepa and FibroScan for assessment of liver fibrosis in hepatitis B virus infected patients with different ALT levels. *Clin Chim Acta.* 2012 Nov;413(21–22):1796–1799.
- 5) Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga M, Murata K, Masaki N, Tanaka Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, **Narimatsu H**, Mizokami M. LecT-hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology.* 2012 Oct;56(4):1448–1456.

G. 知的財産権の出願・登録状況

肝線維化マーカーに関する特許

登録：1件（特 5031928）

審査請求：1件（特願 2012-110964）

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

H1-12 に関する基礎的検討

田中 靖人 名古屋市立大学大学院 医学研究科・教授

研究要旨：新たに開発された血清マーカーH1-12は肝線維化の進展とともに上昇し、代償期肝硬変患者においてH1-12 240 ng/ml で生存率に有意差をみとめた。H1-12は従来の非侵襲的な肝線維化診断法では評価できなかった、肝硬変患者の予後予測が可能であり、予後不良が予測される患者や積極的な治療介入が必要な患者群を拾い上げることで肝硬変患者の予後延長に貢献することが期待される。

研究協力者

飯尾悦子 名古屋市立大学大学院医学研究科・大学院生／臨床医師

A. 研究目的

わが国において慢性肝疾患を背景とした発癌や、肝硬変の合併症など、慢性肝疾患への対策は重要な課題である。しかし現在有効な抗線維化薬は存在せず、肝硬変の治療法の開発のためにも線維化を評価するマーカーが必要である。新規血清マーカーH1-12がC型慢性肝疾患患者における予後予測因子となりうるか、また発癌との関連性を検討した。

B. 研究方法

1998年4月～2013年1月まで、名古屋市立大学病院及び関連病院通院中のC型肝炎ウイルス(HCV)感染者218名において、H1-12の有用性を検討した。症例内訳はchronic hepatitis (CH) : liver cirrhosis (LC) = 103 : 115、年齢中央値64(21-87)歳、男性52.8%、血小板12.2(2.9-32.7)($\times 10^4/\text{mm}^3$)、PT 87.2(42-136)(%)、アルブミン4.0(1.9-5.1)(g/dL)、AST 49(14-534)(IU/L)、ALT 45(6-820)(IU/L)、AFP

17.8(1.6-9993)(ng/ml)、PIVKA-II 18(6-13700)(mAU/ml)、WFA結合性Mac-2 binding protein(WFA+-M2BP) 5.1(0.52-98.7)(C.O.I)であった。平均観察期間は43(1-173)カ月であった。CHの内訳は、F1/F2/F3/NT=28/29/29/17、LCではbiopsyあり(F4)66例、biopsyなし49例であった。

(倫理面への配慮)

血清の保存、研究面での各種ウイルスマーカーの測定は、患者に説明し書面上で同意書を取得した上で行った。

C. 研究結果

H1-12はfibrosis stageの上昇に伴い有意に上昇し、CH群83(5.0-240.0)ng/ml、LC群214(34.2-574.7)ng/mlとLC群で有意に高値であった($p < 0.001$)。またLC群における検討では、hepatocellular carcinoma(HCC)あり群($n=65$)とHCCなし群($n=50$)において、HCCの有無による有意差は認めなかった(HCC 207(39.7-574.7)ng/ml vs Non-HCC 217(34.2-552.0)ng/ml)。なお背景肝として、両群間で血小板、PT、アルブミン、AST、AFPに有意差はみとめず、AFPとPIVKA-IIはHCC群

で有意に高かった。さらに HCC を有さない LC 患者 50 名のうち、child A である 43 名の予後を検討すると、H1-12 < 240 ng/ml 群(観察期間中央値 46 (3-178)ヵ月)では 5 年生存率 90 %であったが、H1-12 ≥ 240 ng/ml 群(同 26 (11-108)ヵ月)では 25%であった (p=0.017)。

WFA+M2BP と H1-12 は相関係数 0.54 と良好な相関を示すが、一部に乖離症例を認めた。乖離症例 6 例はいずれも WFA+M2BP に比べ H1-12 が高値であり、5 例で HCC を認めたが(残りの 1 例も 18 ヶ月後に HCC 発症)、死亡した 4 例の死因は肝不全と HCC が 2 例ずつであった。

D. 考察

H1-12 は、LC 群において CH に比べ有意に上昇し、LC child A 患者において H1-12 240 ng/ml を cut off として 5 年生存率に有意差を認め、LC child A 患者において予後予測マーカーとなりうる可能性が示唆された。一方で、H1-12 と WFA+M2BP の乖離症例については、発癌の potential の観点からも今後の検討を必要とする。

E. 結論

H1-12 は LC child A 患者において予後予測マーカーとなりうる可能性が示唆された。これまでは HCV 患者における小規模な検討であり、来年度は症例を増やしての検討を予定する。

F. 研究発表

- 1) Kaji H, Ocho M, Togayachi A, Kuno A, Sogabe M, Ohkura T, Nozaki H, Angata T, Chiba Y, Ozaki H, Hirabayashi J, **Tanaka Y**, Mizokami M, Ikehara Y, Narimatsu H. Glycoproteomic Discovery of Serological Biomarker Candidates for HCV/HBV Infection-Associated Liver Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma. *J Proteome Res.*

2013 Apr;In press.

- 2) Kurosaki M, **Tanaka Y**, Nishida N, Sakamoto N, Enomoto N, Matsuura K, Asahina Y, Nakagawa M, Watanabe M, Sakamoto M, Maekawa S, Tokunaga K, Mizokami M, Izumi N. Model incorporating the ITPA genotype identifies patients at high risk of anemia and treatment failure with pegylated-interferon plus ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *J Med Virol.* 2013 Mar;85(3):449–458.
- 3) Kuno A, Ikehara Y, **Tanaka Y**, Ito K, Matsuda A, Sekiya S, Hige S, Sakamoto M, Kage M, Mizokami M, Narimatsu H. A serum “sweet-doughnut” protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. *Sci Rep.* 2013 Jan;3.
- 4) Du D, Zhu X, Kuno A, Matsuda A, Tsuruno C, Yu D, Zhang Y, Ikehara Y, **Tanaka Y**, Zhang X, Narimatsu H. Comparison of LecT-Hepa and FibroScan for assessment of liver fibrosis in hepatitis B virus infected patients with different ALT levels. *Clin Chim Acta.* 2012 Nov;413(21–22):1796–1799.
- 5) Watanabe T, Sugauchi F, **Tanaka Y**, Matsuura K, Yatsushashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon-α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut.* 2012 Nov;In press.
- 6) Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga M, Murata K, Masaki N, **Tanaka**

- Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, Narimatsu H, Mizokami M. LecT-hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology*. 2012 Oct;56(4):1448–1456.
- 7) Nishida N, Sawai H, Matsuura K, Sugiyama M, Ahn SH, Park JY, Hige S, Kang JH, Suzuki K, Kurosaki M, Asahina Y, Mochida S, Watanabe M, Tanaka E, Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, Mizokami M. Genome-Wide Association Study Confirming Association of HLA-DP with Protection against Chronic Hepatitis B and Viral Clearance in Japanese and Korean. *PLoS One*. 2012 Jun;7(6).
- 8) Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, Mizokami M, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Med Genet*. 2012 Jun;13(47).
- G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

WFA+-M2BP と肝線維化・肝発癌の検討

八橋 弘 国立病院機構長崎医療センター・臨床研究センター長

研究要旨：新規肝線維化マーカーWFA+-M2BP と一般血液検査データとの関連、肝線維化進展度との関連、肝癌発生率との関連について検討した。対象は当院で肝生検を行った HCV 単独感染例 708 例（年齢中央値 57 才、男 352 例（49.7%））。F0/1：274 例、F2：193 例、F3：120 例、F4：121 例。経過中 IFN を投与した症例は 373 例（52.7%）であった。観察期間中央値は 8.2 年（最大 16.7 年）。WFA+-M2BP 値は血小板、アルブミンと負の相関（ $p < 0.001$ ）、AFP および年齢と正の相関があった（ $p < 0.001$ ）。肝線維化ステージごとの WFA+-M2BP 値は F0-1: 1.3 ± 1.0 、F2: 2.2 ± 1.3 、F3: 3.3 ± 2.2 、F4: 5.2 ± 3.6 であった。線維化ステージが上がれば有意に高値を示した（F0/1 vs. F2, F3, F4 : $p < 0.001$ 、F2 vs. F3, F4 : $p < 0.001$ 、F3 vs. F4 : $p < 0.001$ ）。WFA+-M2BP 値は肝線維化と関連していた。

研究協力者

山崎一美 国立病院機構長崎医療センター
臨床研究センター・臨床疫学研究室長

A. 研究目的

C 型慢性肝疾患は慢性肝炎から肝硬変、肝癌への進展させることが少なくない。我が国において C 型肝炎は肝癌の主要な原因となっている。肝癌発生率は背景肝組織と関連し、線維化の進展とともに肝癌発生率は高くなり、肝硬変からの発癌率が最も高い。肝線維化の評価は、血液検査でヒアルロン酸、4 型コラーゲン、血小板数、アルブミン値などからも推量できるが、肝生検による組織評価がもっとも信頼できる。しかし肝実質自体を経皮的に狙撃し採取するため侵襲度も高く、検査後の安静時間も短くなく、被験者に与える負担は大きい。

肝組織の特異的糖鎖変化をとらえる Mac2

binding protein（WFA+-M2BP）が血中で測定できるよることが最近報告された（Atsushi K et al. Scientific Reports 3, Article number:1065doi: 10.1038 / srep01065）。われわれはこの新規肝線維化マーカーが、C 型慢性肝疾患患者に有用であるか検討した。

B. 研究方法

対象は、独立行政法人国立病院機構長崎医療センターで、1992 年 1 月～2003 年 12 月に肝生検施行した 2,853 例において、HCV RNA 持続陽性者 833 例の中から、HBs 抗原陽性 12 例、大量飲酒家 26 例、自己免疫性肝炎/原発性胆汁性肝硬変 8 例、抗核抗体陽性のみ 8 例、観察期間 180 日未満 71 例を除外した 708 例を対象とした。

C. 研究結果

1) 対象の背景

対象患者 708 名の背景を表 1 に示す。

表 1. 患者背景

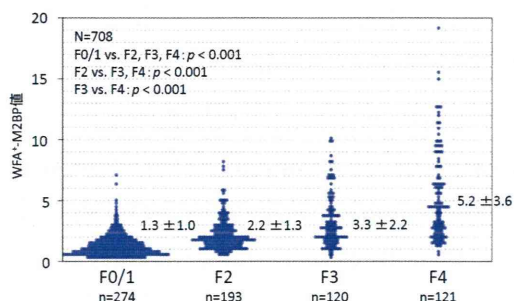
年齢(才)	57 (19-79)
男性	352 (49.7%)
観察期間(年)	8.2 (-16.2)
IFN導入	373 (52.7%)
常習飲酒家	136 (19.2%)
線維化スコア F 0/1	274
F 2	193
F 3	120
F 4	121
血小板 (*10 ⁴ / mm ³)	15.6 (3 -39.1)
アルブミン (g/dl)	4.2 (2.7 -5.3)
AST (IU/mL)	53 (11 -422)
ALT (IU/mL)	82 (1 -1057)
AFP (ng/mL)	5.1 (0.7 -513.8)

2) WFA+-M2BP 値と患者背景因子の関係

WFA+-M2BP 値と年齢の間には正の相関があった (R² 0.082, p<0.001)。WFA+-M2BP と血小板数の間には負の相関があった (R² 0.203, p<0.001)。WFA+-M2BP とアルブミン値には負の相関があった (R² 0.192, p<0.001)。

WFA+-M2BP と AFP 値には正の相関があった (R² 0.156, p<0.001)。

WFA+-M2BP を肝線維化ステージ別に示す。F0-1: 1.3±1.0, F2: 2.2±1.3, F3: 3.3±2.2, F4: 5.2±3.6 であった。線維化ステージが上がれば有意に高値を示した (F0/1 vs. F2, F3, F4 : p<0.001, F2 vs. F3, F4 : p<0.001, F3 vs. F4 : p<0.001) (図 1)。



(図 1) WFA+-M2BP 値と肝線維化ステージ

D. 考察

C 型慢性肝疾患患者は最終転帰は、一般健康人と比較して肝疾患関連死亡によるところが多い。その多くは肝癌である。肝癌の発生率は背景肝の線維化ステージの進展度に従って高くなる。肝線維化は肝生検がもっとも信頼される検査法であるが、患者負担が高く、安易に行えない。WFA+-M2BP は血液で測定し、20 分以内に測定結果が得られる。患者負担は極端に軽減され、検査結果も採血日に伝えることができ、肝疾患診療に大変有用となりうる。

今回われわれは、この新規マーカーが C 型慢性肝疾患症例に有用であるか検討した。アルブミン値、血小板数、年齢は肝線維化と関連するが、WFA+-M2BP 値はいずれにも相関を示した。また肝癌の腫瘍マーカーである AFP 値に相関関係があることは大変興味深い。

肝生検評価による肝線維化ステージと比較したが、線維化ステージ進展とともに WFA+-M2BP 値は有意に上昇していた。

E. 結論

WFA+-M2BP 値は肝線維化と関連していた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Izumi N, Asahina Y, Kurosaki M, Yamada G, Kawai T, Kajiwara E, Okamura Y, Takeuchi T, Yokosuka O, Kariyama K,

Toyoda J, Inao M, Tanaka E, Moriwaki H, Adachi H, Katsushima S, Kudo M, Takaguchi K, Hiasa Y, Chayama K, Yatsuhashi H, Oketani M, Kumada H. Inhibition of hepatocellular carcinoma by PegIFN α -2a in patients with chronic hepatitis C: a nationwide multicenter cooperative study. *J Gastroenterol*. 2013 Mar;48(3):382-390.

2) Kurosaki M, Hiramatsu N, Sakamoto M, Suzuki Y, Iwasaki M, Tamori A, Matsuura K, Kakinuma S, Sugauchi F, Sakamoto N, Nakagawa M, Yatsuhashi H, Izumi N. Age and total ribavirin dose are independent predictors of relapse after interferon therapy in chronic hepatitis C revealed by data mining analysis. *Antivir Ther*. 20Dec;17(1):35-43.

3) Ueda T, Tsuchiya K, Hashimoto S, Inoue T, Enomoto N, Inao M, Tanaka A, Kaito M, Imazeki F, Nishiguchi S, Mochida S, Yokosuka O, Yatsuhashi H, Izumi N, Kudo M. Retreatment with Peginterferon α -2a + Ribavirin in Patients Who Failed Previous Peginterferon α -2b + Ribavirin Combination Therapy. *Dig Dis*. 2012

Dec;30(6):554-560.

4) Watanabe T, Sugauchi F, Tanaka Y, Matsuura K, Yatsuhashi H, Murakami S, Iijima S, Iio E, Sugiyama M, Shimada T, Kakuni M, Kohara M, Mizokami M. Hepatitis C virus kinetics by administration of pegylated interferon- α in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut*. 2012 Nov;In press.

5) Taura N, Ichikawa T, Miyaaki , Kadokawa Y, Tsutsumi T, Tsuruta S, Kato Y, Inoue O, Kinoshita N, Ohba K, Kato H, Ohata K, Masuda J, Hamasaki K, Yatsuhashi H, Nakao K. Baseline Serum Cholesterol Is Associated with a Response to Pegylated Interferon Alfa-2b and Ribavirin Therapy for Chronic Hepatitis C Genotype 2. *Gastroenterol Res Pract*. 2012 Nov.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

厚生労働科学研究費補助金（難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業）
分担研究報告書

肝細胞癌手術症例における術前肝線維化マーカーとしての WFA+-M2BP の
診断精度に関する検討

武富 紹信 北海道大学 医学研究科 消化器外科学分野 I・教授

研究要旨：当研究では肝細胞癌症例における WFA+-M2BP の術前肝線維化マーカーとしての有用性および診断精度に関する評価を行うため、新犬山分類に基づく手術検体の組織学的な肝線維化評価を Gold standard とした統計学的解析を行った。

肝線維化に従い群別化した 5 群 (F0-4) における WFA+-M2BP の平均（標準偏差）は 0.81 (0.37), 1.09 (0.63), 1.44 (1.14), 1.74 (1.52) および 2.85 (3.45) であり、F0-F1, F1-F2, F3-F4 間で有意差（有意水準 $p=0.0125$ ）を認めた。また、組織学的肝線維化診断（F0-4）に関する WFA+-M2BP, APRI, FIB-4 の Overall accuracy (SE) はそれぞれ 0.869 (0.010), 0.867 (0.010), 0.847 (0.011) であった。

WFA+-M2BP はその分布において肝線維化の進行に伴い有意な上昇傾向を示し、組織学的肝線維化診断に関する正診性において他の線維化指標（APRI および FIB-4）に劣らない診断精度を示した。

WFA+-M2BP は手術適応症例に対する術前線維化マーカーとして有望であると考えられた。

A. 研究目的

WFA+-M2BP に関し、肝細胞癌患者における術前肝線維化マーカーとしての有用性と診断精度の評価を行うこと

B. 研究方法

2001 年から 2012 年までに北海道大学病院において肝切除術もしくは生体肝移植を施行した肝細胞癌症例 458 症例において術前採取した凍結血清検体中の WFA+-M2BP を FastLec-Hepa 法を用いて定量化した。肝線維化の診断には手術検体を用い、背景肝の組織学的所見より新犬山分類（F0-4）に従って評価した。

WFA+-M2BP と診断能を比較するための他の

線維化指標には APRI および FIB-4 を用いた。統計学的解析には Bonferroni 法にて補正した t 検定による多重比較および Obchowski の overall accuracy による比較を用いた。解析は R (Version 2.13.0) + nonbinROC package 上で実行した。

（倫理面への配慮）

当研究は凍結保存検体および病理組織診断データを用いた臨床研究であり、北海道大学病院の臨床研究に関する倫理委員会の承認下に施行している。

また、検体の採取・使用に関しては全例で患者本人の同意を確認している。