

201333007A

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-011)

平成 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 成松 久

平成 26 (2014) 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, 榎谷内晶, 佐藤 隆, 米田政志, 今井康陽, 是永匡紹 | |
| <研究協力者>池田 均 | |
| 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 | 7 |
| 成松 久, 梶 裕之, 久野 敦, 榎谷内晶, 佐藤 隆, 田中靖人, 伊藤浩美, 池原 讓, 雄長 誠, 後藤雅式 | |
| 2. C型慢性肝疾患における非侵襲的肝線維化測定法(ARFI/FibroScan)・血清線維化マーカーと新規肝線維化糖鎖マーカー(WFA ⁺ -M2BP)の比較 | 13 |
| 溝上雅史, 是永匡紹, 杉山真也 | |
| 3. 肝線維化糖鎖抗原マーカー(WFA ⁺ -M2BP)の非侵襲的肝線維化診断法との乖離例の検討 | 17 |
| 是永匡紹, 杉山真也, 山田剛太郎, 鹿毛政義 | |
| 4. C型慢性肝炎における WFA ⁺ -M2BP を用いた非侵襲的肝線維化評価に関する研究 | 21 |
| 泉 並木, 黒崎雅之, 玉城信治 | |
| 5. C型肝炎関連肝細胞癌患者における新規肝糖鎖マーカー (WFA ⁺ -M2BP) の線維化診断精度、治療後の早期再発予測因子としての有効性の検討 | 24 |
| 今井康陽, 澤井良之, 倉橋知英 | |
| 6. 肝線維化マーカーの臨床的検討と肝癌悪性化マーカーの検出 | 29 |
| 調 憲, 戸島剛男, 吉屋匠平 | |
| 7. 新規肝線維化マーカーWFA ⁺ -M2BP の肝臓外科学領域における診断基準の検討 | 32 |
| 武富紹信 | |

| | |
|--|----|
| 8. B型慢性肝炎核酸アナログ投与例における発癌例の解析 | 35 |
| 松本晶博, 田中榮司 | |
| 9. C型肝炎患者における WFA ⁺ -M2BP と | |
| 肝弾性値の発がん予測因子としての有用性比較 | 37 |
| 市田隆文, 玄田拓哉 | |
| 10. C型肝炎ウイルス学的著効後肝発癌と | |
| 新規糖鎖マーカーWFA ⁺ -M2BP の検討 | 41 |
| 八橋 弘, 山崎一美, 佐々木龍 | |
| 11. NAFLD における肝線維化評価と WFA ⁺ -M2BP の有用性 | 44 |
| 髭 修平 | |
| 12. NASH における耐糖能異常と肝線維化 | 48 |
| 日野啓輔, 原 裕一, 仁科惣治 | |
| 13. NAFLD における血清 WFA ⁺ -M2BP の線維化予測に対する有用性 | 51 |
| 阿部雅則, 今井康陽, 日野啓輔, 髭 修平, 坂元亨宇, 山田剛太郎, 鹿毛政義, 是永匡昭, 三宅映己, 日浅陽一 | |
| 14. 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 | 54 |
| 上野 義之 | |
| 15. 肝硬変における新規糖鎖マーカーWFA ⁺ -CSF1R の臨床的有用性 | 57 |
| 田中靖人, 飯尾悦子 | |
| 16. 肝発癌例と非発癌例での血中 WFA ⁺ -CSF1R の検討 | |
| —発癌3年前の血清マーカーからの検討— | 60 |
| 熊田 卓, 豊田秀徳, 多田俊史 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 65 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷 | 79 |

I . 総括研究報告

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。本研究は、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、約 6000 サンプルを測定した。この結果によりマーカーの有効性・特性が明確になった。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ー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。さらに、背景肝の異なる複数の肝がん組織標本を対象としたレクチンアレイによる比較糖鎖解析を行った。がん部・非がん部組織領域について解析を行った結果、がん部で有意にシグナルが増すレクチン X をみとめ、組織染色により、レクチン X はがん細胞の特定領域を染めることが判明した。

【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。がんマーカーについては、AFP や PIVK^{II} など、既存のものとは異なる用途が期待できる候補分子が複数同定された。今後の有効性検証試験の結果が待たれる。

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
伊藤清顕 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・病理学・教授
武富紹信 北海道大学大学院・医学研究科・消化器外科学分野 I・教授
髭 修平 札幌厚生病院・第 3 消化器内科・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・肝疾患診療相談センター・准教授
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・消化器・内分泌・代謝内科学・准教授
調 憲 九州大学大学院・医学研究院・消化器・総合外科・准教授
米田政志 愛知医科大学・内科学講座・教授
今井康陽 市立池田病院・病院長
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

研究分担者(つづき)

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・上級主任研究員
梅谷内晶 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

池田 均 東京大学医学部附属病院・検査部・副部長

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が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(CSF1R：昨年度までは H1-12 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継続的に行う。また並行して、昨年度同定した、AFP 非産生肝がん培養細胞反応性レクチンに結合する糖タンパク質(ペプチド) 群よりマーカー候補分子を選別し、検証を行う。さらに、がん細胞表層に出現する糖タンパク質分子を同定することを念頭に置き、肝細胞がん患者組織標本のレクチンアレイ解析を実施する。

(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：CSF1R 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である WFA を用いて構築したサンドイッチ ELISA システム (WFA⁺-CSF1R 検出系)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) を引き続き行った。加えて、CSF1R の総量(total CSF1R)も測定し、total CSF1R に対する WFA⁺-CSF1R の割合(WFA/total)を算出し、有効性検証を行った。

また、昨年度までに、AFP 産生性及び非産生性の肝がん細胞の培養上清を用いて新規 AFP 非産生肝がんマーカーの探索を行った。糖タンパク質マーカー候補分子は、ペプチドマスフィンガープリント法あるいは、IGOT 法を利用したショットガン分析法によって同定した。ショットガン分析法によって同定した候補分子については、AFP 産生細胞と非産生細胞とを比較する事で候補分子の選抜を行った。そして、さらにその中からバイオインフォマティクスなどによって有望と思われる候補をさらに選択した。次に候補分子の抗体を利用して、培地や患者血清からエンリッチした候補分子についてレクチンアレイ分析による糖鎖分析を行い、各分子に肝疾患疾患による糖鎖変化が生じているかを解析した。さらには、ウイルス性肝炎を背景に持つ肝がん患者の組織で、同一組織標本中にかん部位と線維化部位の両方を含むパラフィンブロック、非ウイルス性肝がん患者のがん部と非がん部の凍結組織ブロックから組織切片を作製した。5 μm 厚薄切標本から、レーザーマイクロダイセクションを用い、そのがん部および非がん部肝実質細胞領域から 1mm² の領域ずつ組織片を単離した。前処理によりタンパク質溶液を得て、Cy3 標識後、レクチンアレイ解析に用いた。データは規格化後、対応ありの 2 群比較により P<0.05 を示すレクチンを候補レクチンとして選抜した。レクチン組織染色では、脱パラ処理した組織切片に対し、最適濃度に希釈したビオチン化レクチンを添加し、洗浄後、Alexa488 標識ストレプトアビジンを加え、蛍光顕微鏡を用いて特異的なシグナルを検出した。

(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で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: 各種肝患者血清を用いた正当性検証の結果、WFA⁺-CSF1R は、肝硬変の予後予測や肝がんの発症リスク予測の指標としての有用性が示された。今後はより大規模に検体を測定することによって、マーカーの有用性がより明らかにされる事が望まれる。WFA⁺-CSF1R /total CSF1R についても肝がんの発症リスク予測の指標として利用できる可能性が示唆された。

一方、新規な肝疾患マーカー(AFP 非産生肝がんマーカー) 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700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た。次に各種の情報(公共データベース等) を利用したバイオインフォマティクスの手法により、数十分子にまで候補タンパク質を絞り込んだ。このうち6種の分子については、血清中の候補分子を免疫沈降によってエンリッチし、レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイルの分析を実施した。このうち1種については、肝硬変マーカーの候補分子と思われる。一方、ペプチドマスフィンガープリン

ト法では7種のメジャータンパク質バンドが同定された。そのうちの2種の分子についてレクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイルの分析を実施した。その結果、1種の糖鎖シグナルは、肝炎の進行に伴って上昇し、別の1種の分子の糖鎖シグナルは、AFP 低値を示す血清においても高い値を示した。本分子はAFP を補完する肝がんマーカーである可能性が示唆された。ただし、今後は更に多くの血清検体を用いて再現性・正当性を確認する必要がある。また、その他の分子群についても、必要に応じて同様の検討を進めていく必要があると考えられる。

つぎに、レクチンアレイ解析技術を肝がん細胞表層に超微量で存在する糖タンパク質の比較糖鎖解析に応用した。まずウイルス性肝炎を背景に持つ肝がん患者ホルマリン固定組織標本7例分に対し、がん部・非がん部をそれぞれ49カ所所で解析を行ったところ、がん部でシグナルが上昇するレクチンシグナルを10種以上取得した。次に、非ウイルス感染肝がん患者8症例のがん部20カ所、非がん部19カ所を用いて同様の解析を行い、さらには2つの異なる分化度の癌が共存する肝がん患者23症例の組織標本からがん部46カ所、非がん部23カ所を単離し、解析した結果も加え、統計解析を行ったところ、レクチンXのシグナルが共通してがん部で上昇することが判明した。レクチンプローブを用いた組織標本の蛍光染色により、レクチンXへ結合する糖タンパク質は、がん細胞のある部位に局在していることが判明した。

(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、約6000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 CSF1R については、これまでに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(WFA 反応性糖鎖) と共局在することが判明している。今後は、より多検体の組織について染色像を観察し、発現のメカニズムを明らかにする事が望まれる。昨年度より継続して行ってきた臨床情報の明確な患者血清を用いた検証により、本分子が肝硬変患者の予後予測マーカーである事と、肝がんの発症予測マーカーである事が明らかになった。今後は臨床的な有用性を、さらに多検体を用いて解析する事が望まれる。

AFP 非産生肝がんに対する新規マーカー開発では、AFP 低値の血清で値が上昇する傾向がみられるマーカー候補分子が 1 種見いだされた。

ただし、これは数検体レベルの解析結果であるので、適切な検体を用いて再現性の確認と正当性の検討を行う必要があると考えられる。

組織標本のレクチンアレイ解析では、予想を超える有意差を示すレクチンを選抜することができた。今後はそのレクチン X 結合性肝細胞がん表層タンパク質の同定を急ぐ。これはマーカーとしてだけでなく、分子治療標的としての利用も期待される。

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. 研究発表

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(予定を含む。)

分担研究報告書に記載した。

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(肝炎関係研究分野))
分担研究報告書(平成 25 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：新規肝疾患病態指標マーカーの探索・有効性検証を行ったので報告する。本課題で解析してきた候補糖タンパク質(コード名 H1-12: WFA+CSF1R) について、臨床機関研究分担者によって準備された患者試料(実用化の課題 2 での試料も含む) を用いて検証した結果、肝硬変患者の予後・発癌予測マーカーである可能性が示された。一方、AFP 非産生肝がん群に相関するレクチンに結合する、肝がん細胞由来の糖タンパク質から選別した候補について、小規模血清検体を用いレクチンアレイ解析を行った。またレクチンアレイによる肝細胞がん組織標本の比較糖鎖解析を行った。背景肝の異なる複数のがん組織標本(38 例) を用い、がん部・非がん部組織領域(1mm 四方ずつ約 200 カ所) についてレクチンアレイ解析を行った。データ規格化後の統計解析の結果、がん部で有意にシグナルが増減するレクチンをいくつか見出した。特にレクチン X はがん部でのシグナルが高値であった。組織染色により、レクチン X はがん細胞の特定領域を染めることが判明した。

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・上級主任研究員
梶谷内晶 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
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

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

研究協力者(つづき)

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

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、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 WFA⁺-CSF1R) について、迅速、簡便かつ安価な測定法を確立し、臨床的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。

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：昨年度開発した血清マーカー候補分子 (WFA⁺-CSF1R) を検出するためのレクチンサンドイッチ ELISA 系を用い、昨年引き続き、生存時間の分析、及び肝細胞がん発症リスク解析の為の測定を行った。加えて、本年度は新たに血中における総 CSF1R 量(total CSF1R)を抗体サンドイッチ ELISA 系によって測定し、total CSF1R に対する WFA⁺-CSF1R の割合 (WFA/total)を算出した。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患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

絞り込んだ肝がんマーカー候補分子について、小規模血清検体を用いた検証を行った。まず、抗体の性能を肝がん培養上清や血清を用いて行った。その後、20名の肝細胞がん患者血清を、AFP の水準(高値/低値)、WFA⁺-CSF1R の水準(高値/低値)を基準に5名ずつ4群に分類し、それぞれの血清から候補分子を免疫沈降し、

それをレクチンアレイ解析することで検証を進めた。

(3) 肝細胞がん症例組織標本のレクチンアレイ解析：肝細胞がんと線維化部位を判別可能なマーカーを探索するため、ウイルス性肝炎を背景に持つ肝がん患者の組織で、同一組織標本中ががん部位と線維化部位の両方を含むパラフィンブロックを協力機関より供与頂いた。また、非ウイルス性肝がん患者のがん部と非がん部の凍結組織も同様に供与頂いた。これらの組織ブロックから 5 μ m 厚薄切組織を作製して、ホルコートスライドへマウントした。これを脱パラフィン処理後、レーザーマイクロダイセクションを用い、そのがん部および非がん部肝実質細胞領域から 1mm² の領域ずつ組織片を単離し、1.5 mL 容マイクロチューブへ移した。チューブ内の組織片は松田らの手法に従い前処理し、タンパク質溶液を得た。Cy3 標識後、その一部をレクチンアレイ解析に用いた。シグナル取得後、画像解析ソフトにより数値化し、データを規格化後、GraphPad Prism5 により統計解析し、対応ありの 2 群比較により P<0.05 を示すレクチンを肝細胞がん検出候補レクチンとして選抜した。レクチン候補の有用性は肝がん患者組織切片を用いたレクチン組織染色により確認した。脱パラ処理した組織切片に対し、最適濃度に希釈したビオチン化レクチンを添加し、洗浄後、Alexa488 標識ストレプトアビジンを加え、蛍光顕微鏡を用いて特異的なシグナルを検出した。

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)WFA⁺-CSF1R 値によって肝硬変患者の予後予測が可能であること(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) (ii) 早期 HCC 発症

予測が可能である事(詳細については分担研究者・大垣市民病院・熊田卓の項を参照) (iii) WFA⁺-CSF1R /total CSF1R は HCC の発症予測が可能である事(分担研究者・名古屋市立大学・田中靖人の項を参照) を示した。今後臨床上の有用性についてより明らかにする為に、自動検出系の開発や多施設共同研究による詳細な検討が必要だと考えている。

(2) 新規肝がんマーカーの探索：AFP 産生の低い培養細胞株 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シグナルを同定した。当該のレクチンを用いて、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 IGOT-LC/MS 法で同定した。AFP 低産生群からは延べ 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糖タンパク質が 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 糖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。絞り込んだ分子のうち 6 種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立し、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、検証を行った。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 種を同定した。うち 2 種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立し、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、マーカーとなる可能性を検討した。

(3) 肝細胞がん症例組織標本のレクチンアレイ解析：レクチンアレイ解析技術を肝がん細胞表層に超微量で存在する糖タンパク質の比較糖鎖解析に応用した。まずウイルス性肝炎を背景に持つ肝がん患者ホルマリン固定組織標本 7 例分に対し、がん部・非がん部をそれぞれ 49 カ所で解析を行ったところ、がん部でシグナルが上昇するレクチンシグナルが 10 種以上選ばれた。次に、非ウイルス感染肝がん患者 8 症例のがん部 20 カ所、非がん部 19 カ所を用いて同様の解析を行い、さらには 2 つの異なる分化度の癌が共存する肝がん患者 23 症例の組織標本からがん部 46 カ所、非がん部 23 カ所を単離し、解析した結果も加え、統計解析を行った。その結果、ある 1 つのレクチン(レクチン X とする) のシグナルが共通してがん部で上昇することが判明した。レクチンプローブを用いた組織標本の蛍光染色により、レクチン X へ結合する糖タンパク質は、がん細胞のある部位に局在していることが判明した。

D. 考察

(1) マーカー候補分子 WFA⁺-CSF1R は肝硬変の予後予測血清マーカー、あるいは肝細胞がんの発症リスクマーカーであると考えられた。ただし、臨床的な有用性についてはさらに詳細な検討を必要とすると思われる。今後は課題 2 のような多施設研究での検討を通し、マーカーの有用性を明確にする必要がある。

(2) 新規肝がんマーカーの探索：AFP 低産生細胞株群から多くの糖タンパク質候補分子が検出され、バ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てきたが、今後はより多くの臨床検体を使用して正当性および有用性の検証をしていく予定である。

- (3) 肝細胞がん症例組織標本のレクチンアレイ解析：本実験は、薄切組織標本の特定領域を単離し、レクチンアレイ解析するシステムの検証として、がん部特異的なレクチンを選抜した初めての例であった。選抜されたレクチンの肝細胞がん細胞特異的な染色性はこれまで報告がない。2つの異なる分化度の癌が共存する肝細胞がん症例の結果から、レクチン X は分化度が低い方が染色性が強い可能性が示唆されている。今後、肝がん早期発見のためのマーカーを探索するのに有効なレクチンを見出すためには、今回のような分化度の異なるがんが共存する症例の分析数を増やす必要がある。

E. 結論

- (1) 新規肝がんマーカー候補分子 WFA⁺-CSF1R は肝硬変患者の予後予測マーカー、あるいは肝がんの発症リスクマーカーであると考えられた。
- (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分子群から、種々の方法によって候補分子を絞り込み、その検証を行った。
- (3) 肝臓の背景によらずがんの出現に伴い結合シグナルが上昇するレクチンを見い出すことに成功した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Toshima T, Shirabe K, Ikegami T, Yoshizumi T, Kuno A, Togayachi A, Gotoh M, Narimatsu H, Korenaga M, Mizokami M, Nishie A, Aishima S,

Maehara Y. A novel serum marker, glycosylated Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein (WFA⁺-M2BP), for assessing liver fibrosis. *J Gastroenterol.* 2014 Mar; In press.

- 2) Ocho M, Togayachi A, Iio E, Kaji H, Kuno A, Sogabe M, Korenaga M, Gotoh M, Tanaka Y, Ikehara Y, Mizokami M, Narimatsu H. Application of a glycoproteomics-based biomarker development method: alteration in glycan structure on colony stimulating factor 1 receptor as a possible glyco-biomarker candidate for evaluation of liver cirrhosis. *J Proteome Res.* 2014 Jan; 13(3):1428-1437.

- 3) Tan B, Matsuda A, Zhang Y, Kuno A, Narimatsu H. Multilectin-assisted fractionation for improved single-dot tissue glycome profiling in clinical glycoproteomics. *Mol Biosyst.* 2013 Dec; 10(2):201-205.

- 4) 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 Oct; 7(9-10):642-647.

- 5) 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 Jun; 12(6):2630-2640.

2. 学会発表

- 1) **Narimatsu H.** Development Strategy of Glyco-biomarkers aiming Clinical Diagnosis: A Case of Liver Fibrosis Marker 27th International Carbohydrate Symposium (ICS27) 2014.01.15. Bangalore, India. 招待(Invited Speaker).
- 2) Iio E, Tanaka Y, Watanabe T, Ikehara Y, Ocho M, **Togayachi A**, **Kuno A**, Gotoh M, Joh T, Mizokami M, **Narimatsu H.** A new liver fibrosis marker WFA⁺-H1-12 is useful for an evaluation of the prognosis in liver cirrhosis patients. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2013.11.01-05. Washington, DC.
- 3) **Kuno A.** It's coming to the end: Development of glyco-diagnostic kit for evaluating liver fibrosis Asian Communications of Glycobiology and Glycotechnology (5th ACGG) 2013.10.16. Kohn Kaen, Thailand. 一般(OR2).
- 4) 久野 敦. 緩行性疾患評価マーカーの開発 BioJapan 2013 2013.10.09. パシフィコ横浜. 依頼.
- 5) 梶 裕之. 糖鎖マーカーの探索と検証を推進するグライコプロテオミクス技術 BioJapan 2013 2013.10.09. パシフィコ横浜. 依頼.
- 6) **Narimatsu H.** A Success in a Diagnosis Kit for Liver Fibrosis Using Multiple Novel Technologies of Glycoproteomics. グライコプロテオミクス研究の基盤技術開発とその応用 HUPO 12th Annual World Congress(※日本プロテオーム学会賞 受賞講演) 2013.09.18. パシフィコ横浜. 招待(受賞講演) (J-HUPO Award Lecture(JHA-A-02)).
- 7) **Kaji H**, Tomioka A, Shikanai T, **Narimatsu H.** Assignment by Duplex-LC/MS Analyses HUPO 12th Annual World Congress 2013.09.17. パシフィコ横浜. Invited(PS29-S-03).
- 8) **Kuno A.** Development of quantitative glyco-indices for hepatic diseases HUPO 12th Annual World Congress 2013.09.17. パシフィコ横浜. 依頼(Luncheon Seminar 10).
- 9) 成松 久. Development of basic tools for glycoscience and their application to cancer diagnosis 北大 リーディングセミナー 2013.07.26. 北海道大学. 依頼.
- 10) **Kaji H.** Dissociation-independent method to assign glycopeptide signals in LC/MS data 4th AOMSC & 10th TSMS Annual Conference 2013.07.12. Taipei, Taiwan. 招待(IL-14.1).
- 11) **Kuno A.** Glycome mapping of mouse tissue samples by means of lectin microarray 第3回 比較発生糖鎖生物学とその医工学の応用に関する日本・オーストラリア2国間セミナー 2013.07.02. (独)理化学研究所 和光研究所 鈴木梅太郎記念ホール. 依頼.
- 12) **Narimatsu H.** Development of Basic Tools For Glycoscience And Their Application In Clinical Diagnosis 日本組織培養学会 第86回大会 2013.05.31. 産総研 つくばセンター 共用講堂. 招待.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

1) 肝線維化マーカーに関する特許

登録：2件(日本 特 5441280 (2013/12/27)および 米国 8623608 (2014/1/7))

出願：1件(米国 14/051729 (2013/10/11))

2) 糖鎖解析装置に関する特許

登録：1件(米国 8597576 (2013/12/03))

3) 糖タンパク質検出方法・装置に関する特許
出願：1件(PCT/JP2013/071653 (2013/8/9))

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

C 型慢性肝疾患における非侵襲的肝線維化測定法(ARFI/FibroScan)・血清線維化マーカーと
新規肝線維化糖鎖マーカー(WFA⁺-M2BP)の比較

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

研究要旨：近年、核酸(DNA)、タンパク質に続く第三の鎖状生命分子として、糖鎖分子が注目されている。糖鎖研究は、遺伝子機能解析やタンパク質の構造・機能解析などを中心とするポストゲノム研究に続く、ポスト・ポストゲノム研究と考えられており、広く医療分野への応用が望まれている。産業技術総合研究所の糖鎖医工学センターで開発された新規肝線維化マーカー(WFA⁺-M2BP)と、非侵襲的線維化診断法である ARFI (VTQ:m/s)・FibroScan(kPa)を同時に測定し、既存の血清線維化マーカー(Fib-4,IV7scollage,ヒアルロン酸)を加え、C 型慢性肝炎患者でその有用性を比較・検討した。WFA⁺-M2BP は、VTQ/Fibroscan 値と併によく相関し、VTQ/Fibroscan で F3 以上と診断される識別能と同等であった。相関係数は、WFA⁺-M2BP は FibroScan>ヒアルロン酸>VTQ>IV7s collagen の順番であり、VTQ は IV7s collagen と良く相関した。海外でも測定診断の基準となり、本邦でも保険適応されている FibroScan と同等の診断能力であり、また迅速測定可能であることより非常に有用な線維化マーカーとして使用可能であることが推測された。

研究協力者

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

杉山真也 国立国際医療研究センター・肝炎・免疫研究センター・上級研究員

A. 研究目的

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。肝線維化の進行につれ肝硬変を経て肝癌に増加するため、肝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。

産業技術総合研究所の糖鎖医工学センターで

はレクチンに着目し、活用することにより肝臓で産生される急性期蛋白である $\alpha 1$ 酸性糖タンパク質(AGP)の糖鎖構造変化が、肝線維化の進展を非侵襲的に検査うるマーカーとなることを明らかにした。さらに、肝炎患者、肝硬変患者および健常者より AGP を簡易精製し、レクチンマイクロアレイによる比較糖鎖解析を行ったところ、シグナルの得られたレクチンのうち、非肝硬変群と肝硬変群で、顕著な変化を示したレクチン 6 種を見いだした。そこで、肝炎ウイルスに罹患し、肝生検により線維化の程度(staging)が病理診断された患者群を対象に分析し、統計学的に肝線維化の進展と最も相関があるレクチンをさらに選抜してきており、われわれも、共同研究することで、C 型慢性肝疾患における肝線維化マーカー(WFA⁺-M2BP)を報

告してきた (Kuno A, et al Science Reports 2013)。今回、FibroScan、ARFI といった非侵襲的な肝線維化測定法との有用性の比較する目的で以下の検討を行った。

B. 研究方法

検討 1: 2013 年 2 月～2013 年 10 月までに当院で腹部超音波検査時に FibroScan、VTQ を同時測定された 126 例の WFA+・M2BP の測定を行い、本マーカーの有効性を比較検討した。

C. 研究結果

既報に従い、FibroScan では F0/1(6.1kPa 以下)、F2(7.2～10.2kPa)、F3(10.3～14.8kPa)、F4(14.9kPa 以上)、VTQ では F0/1(1.29 m/s 未満)、F2(1.29～1.54m/s)、F3(1.55～1.91m/s)、F4(1.92 m/s 以上)とし、それぞれに WFA+・M2BP 値を代入したところ FibroScan/VTQ 値の上昇とともに、WFA+・M2BP 値は有意に上昇し (Kruskal-Wallis test; $P < 0.0001$)、特に F1 未満と F3/F4 以上の鑑別に有用であった。(図 1,2)

図1: WFA+M2BPはFibroScanで予測される線維化stageと相関する

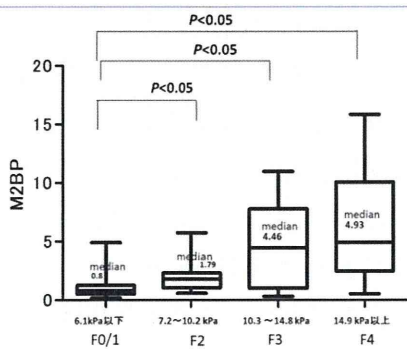
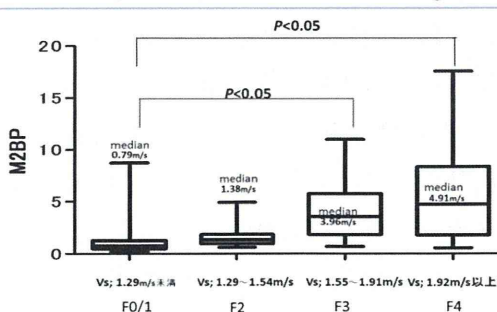


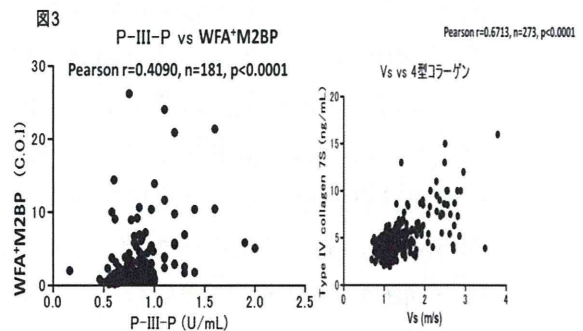
図2: WFA+M2BPはVTQで予測される線維化stageと相関する



また、それぞれの相関係数は、FibroScan やヒアルロン酸が VTQ や IV7s collagen より高値であった(表 1)

| 表 1 | FibroScan | VTQ | ヒアルロン酸 | IV7s collagen |
|---------------|-----------|--------|--------|---------------|
| WFA+・M2BP | 0.6866 | 0.5908 | 0.6634 | 0.5977 |
| Pearson n=126 | | | | |

一方で線維化の活動性を示す PIIIP と WFA+・M2BP の相関は前述の 4 種類の線維化マーカーより相関が低く、測定数は増加させても変化を認めなかった(図 2)。また VTQ は IVs collagen と相関していた。



D. 考察

肝線維化診断を簡便に行うことは、線維化進展例の絞り込みを容易に行えるだけでなく、肝細胞癌の早期発見に繋がる。

本研究で見つめられた新規糖鎖抗原線維化マーカーである WFA+・M2BP は採血検査であり、「非侵襲的」とは言えないが、20ul の血清で測定可能であり、ヨーロッパ肝臓学会ですでにガイドラインに組み込まれている FibroScan と同等に、高度線維化進展例を抽出可能である。また、高価な腹部超音波装置を購入しなくても肝発癌予測ができること、FibroScan の測定に影響を与える肥満・肝萎縮症例にも測定できることも利点の一つである。

Kuno A らは (Science Reports 2013) で IFN 治療にてウイルス排除後に WFA+・M2BP の低下を報告しており、今後、IFN free の経口抗ウイルス剤投与によってウイルス排除後高率に可能となった後の follow up にも有用である。

一方で、昨年報告した様に、IFN 投与中では一過性に WFA⁺-M2BP は上昇するため、IFN 治療中のモニタリングには不向きであり、HBV、PBC では HCV の様な高い相関が確認されず、非 B 非 C の線維化には更なる検討が必要である。

E. 結論

WFA⁺-M2BP は超音波を用いた肝線維化診断法である FibroScan や VTQ よりも高度線維化進展例を分類可能である。肝硬変と診断されても上昇する症例も存在し、特に HCV 症例では、肝線維化の更なる進展や肝発癌リスク上昇を予見できる非常に有用なマーカーとなる可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Khudayberganova D, Sugiyama M, Masaki N, Nishida N, Mukaide M, Sekler D, Latipov R, Nataliya K, Dildora S, Sharapov S, Usmanova G, Raxmanov M, Musabaev E, **Mizokami M**. IL28B Polymorphisms and Clinical Implications for Hepatitis C Virus Infection in Uzbekistan. PLoS One. 2014 Mar; 9(3):e93011.
- 2) Toshima T, Shirabe K, Ikegami T, Yoshizumi T, Kuno A, Togayachi A, Gotoh M, Narimatsu H, Korenaga M, **Mizokami M**, Nishie A, Aishima S, Maehara Y. A novel serum marker, glycosylated Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein (WFA⁺-M2BP), for assessing liver fibrosis. J Gastroenterol. 2014 Mar; In press.
- 3) Nishida N, Sawai H, Kashiwase K, Minami M, Sugiyama M, Seto WK, Yuen MF, Posuwan N, Poovorawan Y, Ahn SH,

Han KH, Matsuura K, Tanaka Y, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Kang JH, Hige S, Ide T, Yamamoto K, Sakaida I, Murawaki Y, Itoh Y, Tamori A, Orito E, Hiasa Y, Honda M, Kaneko S, Mita E, Suzuki K, Hino K, Tanaka E, Mochida S, Watanabe M, Eguchi Y, Masaki N, Murata K, Korenaga M, Mawatari Y, Ohashi J, Kawashima M, Tokunaga K, **Mizokami M**. New Susceptibility and Resistance HLA-DP Alleles to HBV-Related Diseases Identified by a Trans-Ethnic Association Study in Asia. PLoS One. 2014 Feb; 9(2):e86449.

- 4) Ocho M, Togayachi A, Iio E, Kaji H, Kuno A, Sogabe M, Korenaga M, Gotoh M, Tanaka Y, Ikehara Y, **Mizokami M**, Narimatsu H. Application of a glycoproteomics-based biomarker development method: alteration in glycan structure on colony stimulating factor 1 receptor as a possible glycobiomarker candidate for evaluation of liver cirrhosis. J Proteome Res. 2014 Jan; 13(3):1428-1437.
- 5) Murata K, Sugiyama M, Kimura T, Yoshio S, Kanto T, Kirikae I, Saito H, Aoki Y, Hiramane S, Matsui T, Ito K, Korenaga M, Imamura M, Masaki N, **Mizokami M**. Ex vivo induction of IFN-lambda3 by a TLR7 agonist determines response to Peg-IFN/Ribavirin therapy in chronic hepatitis C patients. J Gastroenterol. 2014 Jan; 49(1):126-137.
- 6) Ito K, Yotsuyanagi H, Yatsushashi H, Karino Y, Takikawa Y, Saito T, Arase Y, Imazeki F, Kurosaki M, Umemura T,

- Ichida T, Toyoda H, Yoneda M, Mita E, Yamamoto K, Michitaka K, Maeshiro T, Tanuma J, Tanaka Y, Sugiyama M, Murata K, Masaki N, **Mizokami M**. Risk factors for long-term persistence of serum hepatitis B surface antigen following acute hepatitis B virus infection in Japanese adults. *Hepatology*. 2014 Jan; 59(1):89-97.
- 7) Yotsuyanagi H, Ito K, Yamada N, Takahashi H, Okuse C, Yasuda K, Suzuki M, Moriya K, **Mizokami M**, Miyakawa Y, Koike K. High levels of hepatitis B virus after the onset of disease lead to chronic infection in patients with acute hepatitis B. *Clin Infect Dis*. 2013 Oct; 57(7):935-942.
- 8) Akkarathamrongsin S, Hacharoen P, Tangkijvanich P, Theamboonlers A, Tanaka Y, **Mizokami M**, Poovorawan Y. Molecular epidemiology and genetic history of hepatitis C virus subtype 3a infection in Thailand. *Intervirology*. 2013 Sep; 56(5):284-294.
- 9) 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 Jun; 12(6):2630-2640.
- 10) Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, Murata K, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, **Mizokami M**, Takehara T. Human blood dendritic cell antigen 3 (BDCA3)(+dendritic cells are a potent producer of interferon-lambda in response to hepatitis C virus. *Hepatology*. 2013 May; 57(5):1705-1715.
2. 学会発表 (関連含む)
- 1) Iio E, Tanaka Y, Watanabe T, Ikehara Y, Ocho M, Togayachi A, Kuno A, Gotoh M, Joh T, **Mizokami M**, Narimatsu H. A new liver fibrosis marker WFA⁺-H1-12 is useful for an evaluation of the prognosis in liver cirrhosis patients. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2013.11.01-05. Washington, DC.
- 2) 是永 匡紹、西田 奈央、溝上 雅史. 高齢・非線維化進展 C 型慢性肝疾患の遺伝子多型測定の有用性. 第 17 回日本肝臓学会大会. 2013.10.09-12. 東京. パネルディスカッション 8.
- G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし