

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 PIVKAI 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 型肝炎慢性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(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、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 μ m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、それ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た。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プ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。

