

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
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
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、昨年に引き続き、生存時間の分析、及び肝細胞がん発症リスク解析の為に測定を行った。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 μm 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正すことに成功した。

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 glycobiomarker 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