

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 値と供に良く相関し、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。

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し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

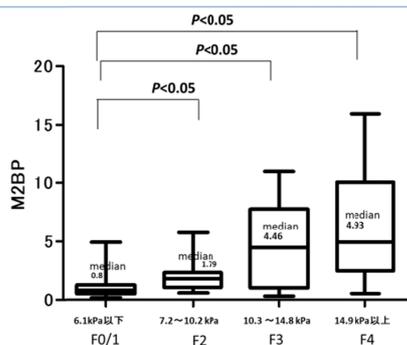
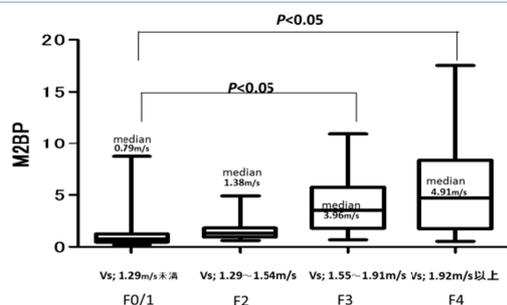


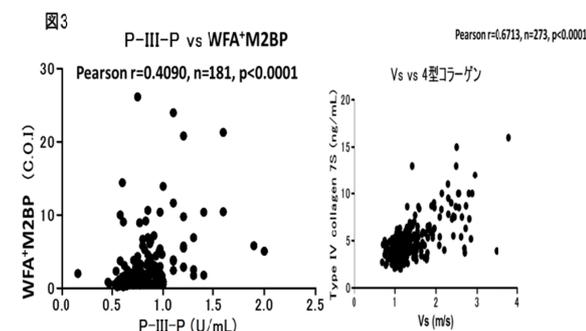
図2: WFA+M2BPはVTQで予測される線維化stageと相関する



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)

	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 3)。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。

本研究で見つけ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測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効性. 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