

201333007B

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23年度～25年度 総合研究報告書

研究代表者 成松 久

平成26(2014)年 5月

目次

I. 総合研究報告	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, 米田政志, 今井康陽, 是永匡紹	
＜研究協力者＞池田 均	
II. 総合分担研究報告	
1. 新規肝疾患病態指標マーカーの簡易測定系開発	3
成松 久	
2. 慢性肝疾患における非侵襲的肝線維化診断法と 新規糖鎖抗原線維化マーカー(WFA ⁺ -M2BP)の有用性の検討	11
溝上雅史	
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	19
是永匡紹	
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 および発癌リスク評価に関する研究	24
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	30
今井康陽, 澤井良之, 倉橋知英	
6. 肝線維化における新規血清マーカーとしての 糖鎖(WFA ⁺ -M2BP)の有用性の検討	38
調 憲, 前原喜彦, 戸島剛男, 吉屋匠平	
7. 血清 WFA ⁺ -M2BP を用いた肝細胞癌患者における 肝線維化および術後予後予測	41
武富紹信	

8. B型肝炎の自然経過例および核酸アナログ治療例における 線維化マーカーの変化	45
松本晶博	
9. C型肝炎患者における WFA+-M2BP 測定の有用性： 肝線維化診断能と発がん予測能	48
市田隆文, 玄田拓哉	
10. 新規肝線維化マーカーWFA+-M2BP と肝発癌に関する解析	52
八橋 弘, 山崎一美, 佐々木龍	
11. 肝硬変の病因と WFA+-M2BP 値の異同 (C型肝炎硬変と NASH 肝硬変)	56
髭 修平	
12. (1) NAFLD における WFA+-M2BP の線維化予測に対する有用性 (2) NAFLD における耐糖能異常と肝線維化	61
日野啓輔	
13. NAFLD における血清 WFA+-M2BP の線維化予測に対する有用性	65
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	68
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	72
田中靖人, 飯尾悦子	
16. 肝発癌例と非発癌例での血中 WFA+-M2BP と WFA+-CSF1R の検討 —発癌 3 年前の血清マーカーからの検討—	78
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	87
IV. 研究成果の刊行物・別刷	127

I . 総合研究報告

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。本研究では、肝線維化マーカー **WFA⁺-M2BP** について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** の有効性検証については、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、総数約 6000 サンプルを測定した。その結果、本線維化マーカーの有効性・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課題で見出した複数の候補のうち、がんマーカー候補として最初に発見され、測定法を確立した **WFA⁺-CSF1R (H1-12)** については、臨床試料を用いた小規模有効性検証を実施し、肝硬変患者の予後及び発がん予測に利用できる可能性を見出した。また、多種の培養細胞株の糖鎖プロファイル分析の結果から、AFP 非産生肝がんに関連するプロブレクチンが見出され、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、背景肝の病態が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強度が増すレクチン 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

研究分担者 (つづき)

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

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

Ⅱ. 総合分担研究報告

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を以下のように探索、測定系開発、および有効性検証したので報告する。(1) 培養肝がん細胞培地及び肝がん患者血清の分析から選別された候補糖タンパク質（コード名 H1-12: WFA⁺CSF1R）について、測定系を整え、課題 2 の実用化研究における臨床機関研究分担者によって準備された患者試料を用いて有効性検証を行った。(2) AFP 非産生肝がん細胞群に相関するレクチンを選別し、肝がん細胞培養液より、このレクチンに結合する糖タンパク質を捕集し、同定した。健常肝臓、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、小規模検証した。(3) 肝がん組織標本（切片）を用い、病巣微小領域のグライコームをレクチンアレイ分析でプロファイルして、がん性糖鎖に関連するレクチンを選別し、これを用いて組織染色を実施した。(4) 肝線維化マーカー WFA⁺M2BP の測定標準品とするリコンビナントタンパク質に結合している糖鎖構造を分析し、WFA 結合性構造 (LacdiNAc) の存在が確認された。

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 H1-12）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 (WFA⁺M2BP) 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) 肝がんマーカー候補糖タンパク質の測定系の確立、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、がん性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 (CSF1R) を絞り込んだ。この分子に対する抗体とレクチン (WFA) 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、CSF1R 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、この検証に用いた全ての血清サンプルと組織サンプルの収集と使用については、インフォームドコンセントにより患者（試料提供者）からの同意が得られている。またすべての試料の使用は、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をレクチンマイクロアレイ法で分析し、得られた糖鎖プロファイルに基づき、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) 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北海道大学より供与頂いた。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を北海道大学と九州大学より供与頂いた。これらの組織ブロックから組織切片を作製してレーザーマイクロダイセクションを活用した解析に用いた。ホイルコートスライドへ 5 μm 厚薄切組織をマウントし、脱パラフィン処理後、レーザーマイクロダイセクション法により、がん部および非がん部肝実質細胞領域を 1mm² の領域ずつ単離した。得られた組織片を 1.5 mL 容マイクロチューブへ移し、松田らの手法にしたがって前処理してタンパク質溶液を得た。Cy3 標識後、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 を示すレクチンを選別し、がんを見分けるレクチン候補分子とした。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。脱パラフィン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観察した。

(4) マーカート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ブレーション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) 肝がんマーカー候補糖タンパク質 WFA+CSF1R の測定系の確立、正当性検証：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（約 150 検体）を対象に小規模な有効性検証を行った。統計解析の結果、(i) 肝硬変患者群では、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、(ii) 肝硬変患者群では、予後予測が可能である可能性を示した（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を要する。免疫蛍光染色組織染色の結果からは、CSF1R 分子とレクチンの認識する糖鎖エピトープ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) 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、さらには結節内結節を呈するがんが出現した肝がん患者 24 症例の組織標本からがん部 46 カ所、非がん部 24 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、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。

(4) マーカートンパク質の糖鎖解析：リコンビナント M2BP は、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 WFA⁺-CSF1R 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、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て解析を進めてきたが、さらに詳細な検討を必要とすると思われる。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必要がある。
- (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。結節内結節型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して行く必要がある。
- (4) マーカータンパク質の糖鎖解析：キャリブ兰特として有効なリコンビナント M2BP には

LacdiNAc 糖鎖が付加しているものであった。これは、WFA の既報の特異性に合致するものであり、キャリブ兰特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もたれる。

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により有望な候補分子を絞り込む事ができた。
- (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だすことに成功した。
- (4) 肝線維化マーカー分析装置のキャリブ兰特分子は LDN 含有糖鎖を持ち、WFA と反応していると考えられた。

F. 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.
- 6) **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; 3:1065 (Article number).
- 7) **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.
- 8) **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.
- 9) **Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Saito K, Ito K, Tsuruno C, Nagai S, Takahama Y, Mizokami M, Hirabayashi J, Narimatsu H.** LecT-Hepa: A triplex lectin-antibody sandwich immuneassay for estimating the progression dynamics of liver fibrosis assisted by a bedside clinical chemistry analyzer and an automated pretreatment machine. *Clin Chim Acta.* 2011 Sep; 412 (19-20):1767-1772.
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.
 - 13) 成松 久. 糖鎖研究の基盤開発からバイオマーカーの実用化、そして国際動向、特にアジア戦略について. 平成23年度 第11回産総研・産技連 LS-BT 合同研究発表会. 2012.01.31. 産総研つくばセンター共用講堂.
 - 14) 成松 久. 疾患特異的バイオマーカーとしての糖鎖 (糖鎖をつかう). KAST 教育講座: 糖鎖科学・糖鎖工学の基礎から応用 ~糖鎖

- を知る、見る、創る、使う～. 2012.01.25. かながわサイエンスパーク (KSP) (川崎市).
- 15) 久野 敦、池原 譲、田中 靖人、溝上 雅史、成松 久. 新規糖タンパク質マーカーを用いた肝線維化迅速評価系の開発. 第39回日本肝臓学会西部会. 2011.12.09. 岡山.
 - 16) 成松 久. 糖鎖科学の基盤技術開発と、それを利用した肝線維化マーカー、および肝がん、胆管癌マーカーの開発. 日東紡セミナー. 2011.11.26. 東京.
 - 17) 伊藤 清顕、久野 敦、池原 譲、田中 靖人、成松 久、溝上 雅史. EVALUATION OF NEW GLYCO-MARKER USING MULTIPLE LECTINS AS PREDICTOR OF LIVER FIBROSIS IN CHRONIC LIVER DISEASES PATIENTS. The Liver Meeting 2011. 2011.11.04. サンフランシスコ.
 - 18) 久野 敦、池原 譲、田中 靖人、伊藤 清顕、溝上 雅史、平林 淳、成松 久. LecT-Hepa: a triplex lectin-antibody sandwich automated immunoassay for estimating the progression dynamics of liver fibrosis. The Liver Meeting 2011. 2011.11.04. サンフランシスコ.
 - 19) Narimatsu H. Clinical Implementation of a Glycoprotein Biomarker for Estimating the Progression of Liver Fibrosis Dynamics. The 3rd ACGG Conference. 2011.10.28. Shanghai, China.
 - 20) 榎谷内 晶、ほか. グライコプロテオミクス技術による疾患糖鎖バイオマーカーの探索と開発. 産総研オープンラボ. 2011.10.14. 産業技術総合研究所つくばセンター.
 - 21) 久野 敦. 肝臓・胆管疾患マーカー開発に鑑みるレクチンアレイの実力. 産総研オープンラボ. 2011.10.14. 産業技術総合研究所つくばセンター.
 - 22) 成松 久. 糖鎖疾患バイオマーカー探索の戦略と肝線維化マーカー開発の成功. 日本臨床検査自動化学会 第43回大会. 2011.10.08. パシフィコ横浜.
 - 23) 久野 敦. グライコプロテオミクスを基軸とした肝線維化レベル定量評価系開発戦略. 第6回糖鎖産業技術フォーラム. 2011.10.05. パシフィコ横浜.
 - 24) 成松 久. 肝線維化、肝臓癌糖鎖バイオマーカーの中日共同研究. 第70回日本癌学会学術総会. 2011.10.04. 名古屋国際会議場.
 - 25) 雄長 誠、成松 久ほか. 肝細胞がん糖鎖マーカーの探索と検証. 第70回日本癌学会学術総会. 2011.10.03-05. 名古屋国際会議場.
 - 26) 雄長 誠、成松 久ほか. 肝細胞がんの血清糖鎖バイオマーカーの開発. 第31回日本分子腫瘍マーカー研究会. 2011.10.02. 名古屋国際会議場.
 - 27) Narimatsu H. GLYCOPROTEOMICS APPROACH TOWARD DISCOVERY OF GLYCOBIOMARKERS. Human Glycomics/Proteome Initiative (HUPO 2011 10th World Congress). 2011.09.05. Geneva, Switzerland.
 - 28) 久野 敦、池原 譲、田中 靖人、溝上 雅史、成松 久. Clinical implementation of a fibrosis-related glycoprotein biomarker. JHUPPO サテライトシンポジウム. 2011.07.30. 新潟.
 - 29) Narimatsu H. Development of diagnosis kit for liver fibrosis and liver cancer. The 2011 Glycobiology Gordon Research Conference. 2011.05.09. Lucca, Italy.
 - 30) 成松 久. グライコプロテオミクス技術を駆使したバイオマーカー探索. 臨床応用を目指した最前線セミナーPart.12. 2011.04.27. 品川コクヨホール.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

1) 肝線維化マーカーに関する特許

登録：3件（日本 特許第 5031928 号※
(2012.7.6)、特 5441280 (2013.12.27) およ
び 米国 8623608 (2014.1.7)）

他 5 か国へ出願中

※糖タンパク質の測定方法、肝疾患の検査方法、
糖タンパク質定量用試薬および肝疾患病態指
標糖鎖マーカー糖タンパク質。成松 久、池原
譲、久野 敦、曾我部 万紀、田中 靖人、溝上 雅
史、伊藤 清顕、松原 俊介、鶴野 親是、高浜 洋
一、香川 孝司、永井 慎也。

2) 糖鎖解析装置に関する特許

登録：1件（米国 8597576※ (2013.12.03)）

※糖鎖アイソフォーム検出方法及び糖鎖アイソ
フォーム検出装置。成松 久 ほか。

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))

※糖タンパク質検出方法・装置に関する特許。
成松 久、久野 敦、池原 譲、橋本 康弘、城谷
圭朗、奈良 清光、苅谷 慶喜、星 京香。

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

慢性肝疾患における非侵襲的肝線維化診断法と
新規糖鎖抗原線維化マーカー（WFA⁺-M2BP）の有用性の検討
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線維化マーカー（WFA⁺-M2BP）と、非侵襲的線維化診断法である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、その有用性を比較・検討した。WFA⁺-M2BP は、C型慢性肝疾患において 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。

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、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、他の肝線維化マーカーや Fibroscan、ARFI といった非侵襲的な肝線維化診断法との比較することで、目的で以下の検討を行った。

B. 研究方法

2010年4月～2013年12月までに当院で腹部超音波検査時に VTQ (Virtual Touch Tissue Quantification) 及び FibroScan 測定された 5573 例中、施行当日の血清保存が確認された 920 検体の WFA+M2BP の測定を行い、特に C 型慢性肝疾患に対して、本マーカーが経過観察に有効か比較検討した。

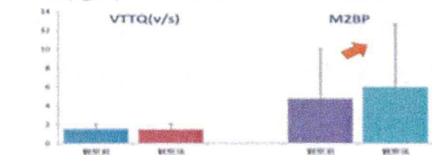
C. 研究結果

(1) HCV: 平均 16.4months の経過観察で VTQ は変化を認めないものの、WFA+M2BP では上昇傾向を示した。(図 1) 上昇する要因として、IFN 投与中が考えられた。(図 2) 一方、IFN 投与後は、既報の如く、SVR/TR 例では WFA+M2BP が低下し、NVR 例では低下せず、これらの減少は VTQ より早期に確認された。(図 3) また小数例ながら、約半年の経過で WFA+M2BP が上昇する症例では、発癌症例が存在したが、その間 VTQ に変化を認めなかった。

経過観察例：HCV例での検討 (平均16.4Month)

図1

	経過観察前	経過観察後
N(M/F)	54 (21/33)	54 (21/33)
Age	67.2±8.8	68.7±8.7
Alb(g/dL)	4.08±0.53	4.09±0.52
AST(IU/L)	55±36	45±25
ALT(IU/L)	57±42	41±27
PLT(万)	16±5.7	15±5.3
AFP(ng/ml)	16±20	15±30



経過観察例1：HCV例での検討 (平均16.4Month)

図2

IFN投与中ではM2BPは上昇傾向

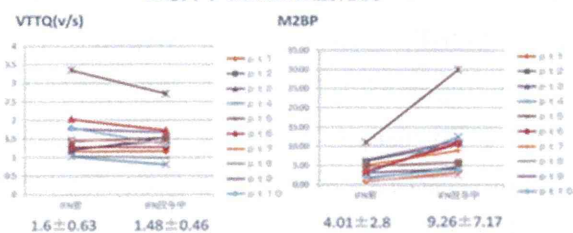
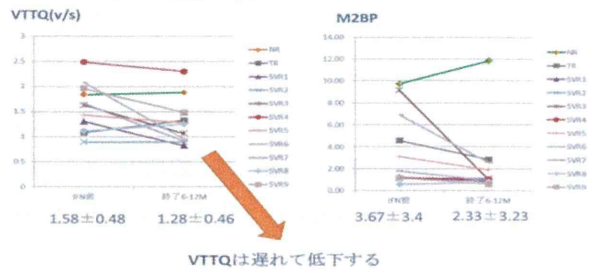


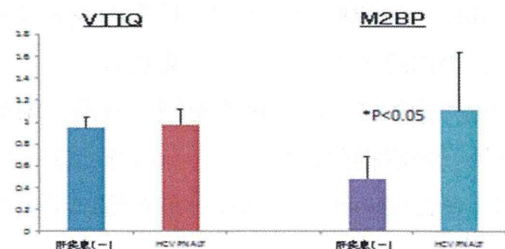
図3 IFN投与終了後、SVR例ではVTQ・M2BPの低下が確認される NR例ではM2BPが上昇する



(2) その他の疾患: HBV や PBC では HCV の様な相関関係が得られず、特に HBV では ALT 上昇に伴い WFA+M2BP が上昇し、抗ウイルス剤併用ともに著明に改善した。PBC では投薬においても WFA+M2BP の改善はみられなかった。

また、ALT 値が正常で慢性肝疾患を認めない 33 症例に年齢を併せた ALT 正常 HCV 感染者 (PNALT) 25 症例を比較検討したところ、WFA+M2BP は非慢性肝疾患群で有意に低値を示した。これにより、ALT 正常でも HCV 感染のより、WFA+M2BP が上昇することが明らかになり、特に 0.5 COI 以上では非ウイルス感染者でも、肝疾患合併を考慮すべきと考えられた。(図 4)

図4 非慢性肝疾患のM2BP値は、ALT正常HCV感染者 (PNALT)と比較して、有意に低下する



(3) FibroScan と VTQ 同時測定による検討: 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 5, 6)

図5 WFA+-M2BPはFibroscanで予測される線維化stageと相関する

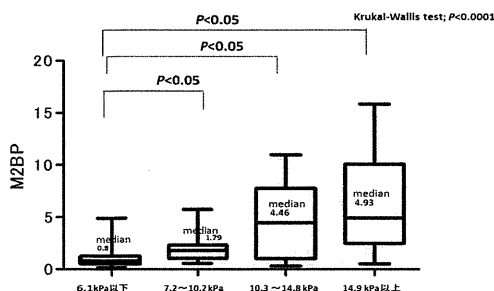
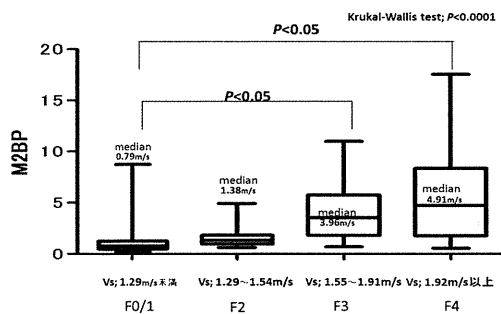


図6 WFA+-M2BPはVTQで予測される線維化stageと相関する



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				

D. 考察

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 (DAAs) 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、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ること また、HBV、PBC では HCV の様な高い相関が確認されず、非 B 非 C の線維化にはその cut off を含めた更なる検討が必要である。

E. 結論

(1) 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。

(2) 高価な腹部超音波装置を購入しなくても少量の血液で肝線維化進展例の絞り込みが可能である。

(3) HCV 排除後に WFA+-M2BP の改善が得られない症例は、線維化改善が得られていない可能性があり、DAAs 投与後のモニタリングにも有効である。

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.
 - 11) 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.
 - 12) 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; 3:1065 (Article number).
 - 13) 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-alpha in human and chimeric mice carrying human hepatocytes with variants of the IL28B gene. *Gut*. 2012 Nov; 62 (9):1340-1646.
 - 14) Saito H, Ito K, Sugiyama M, Matsui T, Aoki Y, Imamura M, Murata K, Masaki N, Nomura H, Adachi H, Hige S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Mizokami M, Watanabe S. Factors responsible for the discrepancy between IL28B polymorphism prediction and the viral response to peginterferon plus ribavirin therapy in Japanese chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res*. 2012 Oct; 42 (10):958-965.
 - 15) 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.
 - 16) 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,