

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, IV7s collagen, 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。

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。

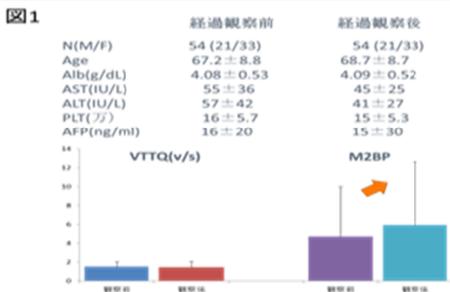
B. 研究方法

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)



経過観察例1：HCV例での検討 (平均16.4Month)

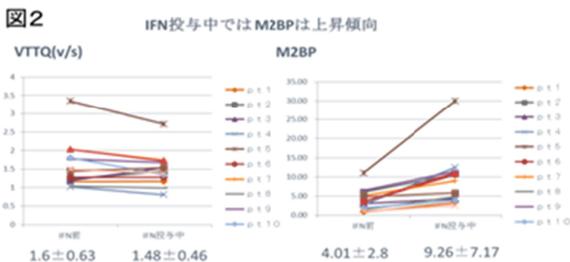
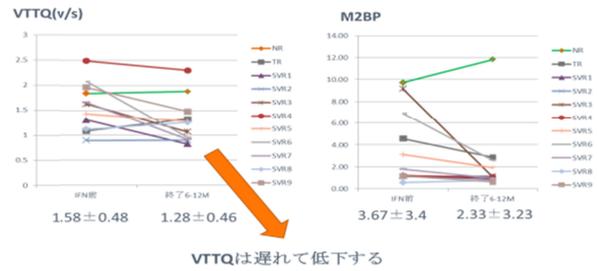


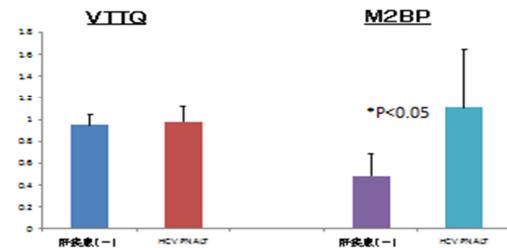
図3 IFN投与終了後、SVR例ではVTQ・M2BPの低下が確認されるNR例ではM2BPが上昇する



(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0.5COI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(1.29m/s未満)、F2(1.29～1.54m/s)、F3(1.55～1.91m/s)、F4(1.92m/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

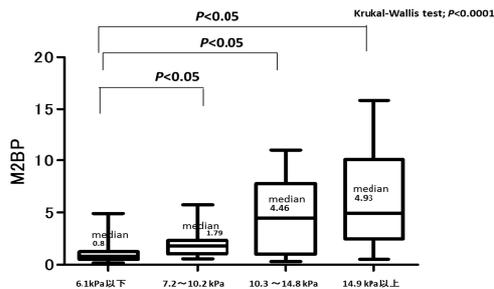
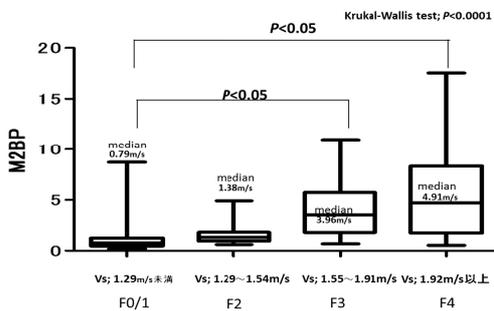


図6 WFA+M2BPはVTQで予測される線維化stageと相関する



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見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 glycomarker 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, Yatsushashi 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,

- Honda M, Kaneko S, Orito E, Itoh Y, Mita E, Tamori A, Murawaki Y, Hiasa Y, Sakaida I, Korenaga M, Hino K, Ide T, Kawashima M, Mawatari Y, Sageshima M, Ogasawara Y, Koike A, Izumi N, Han KH, Tanaka Y, Tokunaga K, **Mizokami M**. Genome-Wide Association Study Confirming Association of HLA-DP with Protection against Chronic Hepatitis B and Viral Clearance in Japanese and Korean. *PLoS One*. 2012 Jun; 7 (6).
- 17) Sawai H, Nishida N, Mbarek H, Matsuda K, Mawatari Y, Yamaoka M, Hige S, Kang JH, Abe K, Mochida S, Watanabe M, Kurosaki M, Asahina Y, Izumi N, Honda M, Kaneko S, Tanaka E, Matsuura K, Itoh Y, Mita E, Korenaga M, Hino K, Murawaki Y, Hiasa Y, Ide T, Ito K, Sugiyama M, Ahn SH, Han KH, Park JY, Yuen MF, Nakamura Y, Tanaka Y, **Mizokami M**, Tokunaga K. No association for Chinese HBV-related hepatocellular carcinoma susceptibility SNP in other East Asian populations. *BMC Med Genet*. 2012 Jun; 13 (47).
- 18) Miyaaki H, Ichikawa T, Yatsushashi H, Taura N, Miuma S, Usui T, Mori S, Kamihira S, Tanaka Y, **Mizokami M**, Nakao K. Suppressor of cytokine signal 3 and IL28 genetic variation predict the viral response to peginterferon and ribavirin. *Hepato Res*. 2011 Dec; 41 (12):1216-1222.
- 19) Sugiyama M, Tanaka Y, Wakita T, Nakanishi M, **Mizokami M**. Genetic Variation of the IL-28B Promoter Affecting Gene Expression. *PLoS One*. 2011 Oct; 6 (10):e26620.
- 20) Suzuki H, Murata K, Gotoh T, Kusano M, Okano H, Oyamada T, Yasuda Y, Imamura M, Kudo M, **Mizokami M**, Sakamoto A. Phenotype-dependent production of des-gamma-carboxy prothrombin in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 2011 Oct; 46 (10):1219-1229.
- 21) Nakamura I, Tanaka Y, Ochiai K, Moriyasu F, **Mizokami M**, Imawari M. Clarification of interspousal hepatitis C virus infection in acute hepatitis C patients by molecular evolutionary analyses: Consideration on sexual and non-sexual transmission between spouses. *Hepato Res*. 2011 Sep; 41 (9):838-845.
- 22) Sugiyama M, Inui A, Shin-I T, Komatsu H, Mukaide M, Masaki N, Murata K, Ito K, Nakanishi M, Fujisawa T, **Mizokami M**. Easy-to-use phylogenetic analysis system for hepatitis B virus infection. *Hepato Res*. 2011 Oct; 41 (10):936-945.
- 23) 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.
- 24) Furui Y, Hoshi Y, Murata K, Ito K, Suzuki K, Uchida S, Satake M, **Mizokami M**, Tadokoro K. Prevalence of Amino acid mutation in hepatitis C virus core region among Japanese volunteer blood donors. *J Med Virol*. 2011 Nov; 83 (11):1924-1929.

- 25) Tanaka Y, Kurosaki M, Nishida N, Sugiyama M, Matsuura K, Sakamoto N, Enomoto N, Yatsushashi H, Nishiguchi S, Hino K, Hige S, Itoh Y, Tanaka E, Mochida S, Honda M, Hiasa Y, Koike A, Sugauchi F, Kaneko S, Izumi N, Tokunaga K, **Mizokami M**. Genome-wide association study identified ITPA/DDRGK1 variants reflecting thrombocytopenia in pegylated interferon and ribavirin therapy for chronic hepatitis C. *Hum Mol Genet*. 2011 Sep; 20 (17):3507-3516.
- 26) Sa-Nguanmoo P, Tanaka Y, Ratanakorn P, Sugiyama M, Murakami S, Payungporn S, Sommanustweechai A, **Mizokami M**, Poovorawan Y. Cross-species transmission of gibbon and orangutan hepatitis B virus to uPA/SCID mice with human hepatocytes. *Virus Res*. 2011 Jun; 158 (1-2):209-215.
- 27) Ito K, Higami K, Masaki N, Sugiyama M, Mukaide M, Saito H, Aoki Y, Sato Y, Imamura M, Murata K, Nomura H, Hige S, Adachi H, Hino K, Yatsushashi H, Orito E, Kani S, Tanaka Y, **Mizokami M**. The rs8099917 polymorphism, when determined by a suitable genotyping method, is a better predictor for response to pegylated alpha interferon/ribavirin therapy in Japanese patients than other single nucleotide polymorphisms associated with interleukin-28B. *J Clin Microbiol*. 2011 May; 49 (5):1853-1860.
- 28) Matsuura K, Tanaka Y, Kusakabe A, Hige S, Inoue J, Komatsu M, Kuramitsu T, Hirano K, Ohno T, Hasegawa I, Kobashi H, Hino K, Hiasa Y, Nomura H, Sugauchi F, Nojiri S, Joh T, **Mizokami M**. Recommendation of lamivudine-to-entecavir switching treatment in chronic hepatitis B responders: Randomized controlled trial. *Hepatol Res*. 2011 Jun; 41 (6):505-511.
- 29) Kurosaki M, Tanaka Y, Tanaka K, Suzuki Y, Hoshioka Y, Tamaki N, Kato T, Yasui Y, Hosokawa T, Ueda K, Tsuchiya K, Kuzuya T, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Asahina Y, Matsuura K, Sugauchi F, Enomoto N, Nishida N, Tokunaga K, **Mizokami M**, Izumi N. Relationship between polymorphisms of the inosine triphosphatase gene and anaemia or outcome after treatment with pegylated interferon and ribavirin. *Antivir Ther*. 2011 May; 16:685-694.
- 30) Tatematsu K, Tanaka Y, Sugiyama M, Sudoh M, **Mizokami M**. Host sphingolipid biosynthesis is a promising therapeutic target for the inhibition of hepatitis B virus replication. *J Med Virol*. 2011 Apr; 83 (4):587-593.
- 31) Kanathezhath B, **Mizokami M**, Stanislaus S, Hounshell C, Neumayr L, Guo H, Hearst JE, Walters MC, Kuypers FA. Improved engraftment with minimal graft-versus-host disease after major histocompatibility complex-mismatched cord blood transplantation with photochemically treated donor lymphocytes. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2011 Apr; 236 (4):492-504.
- 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.
- 3) 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.
- 4) 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.

- 5) 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.
- 6) 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. JHUPO サテライトシンポジウム. 2011.07.30. 新潟.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし