

肝硬変における新規糖鎖マーカーWFA⁺-CSF1R の臨床的有用性

田中靖人 名古屋市立大学大学院・医学研究科・教授

研究要旨：新たに開発された糖鎖マーカーWisteria floribunda agglutinin (WFA) -reactive colony-stimulating factor 1 receptor (WFA⁺-CSF1R) は肝線維化の進展とともに上昇し、代償期肝硬変患者において予後予測因子として有効であった。また WFA⁺-CSF1R 値により生存率に有意差を認めた。さらに WFA⁺/Total-CSF1R 比は、発癌予測因子として有効であった。WFA⁺-CSF1R は従来の非侵襲的な肝線維化診断法では評価できなかった、肝硬変患者の予後予測や発癌 potential の評価が可能であった。また WFA⁺-CSF1R は、先行して開発された WFA⁺- Mac-2 binding protein (M2BP) と異なったメカニズムを有していると考えられており、今後の肝疾患治療に有効と思われる。

研究協力者

飯尾悦子 名古屋市立大学大学院・医学研究科・大学院生・医師

A. 研究目的

我が国において慢性肝疾患を背景とした発癌や、肝硬変の合併症など、慢性肝疾患への対策は重要な課題である。肝線維化は発癌の重要なリスク因子であり、近年の抗ウイルス療法の進歩により C 型慢性肝疾患患者におけるウイルス排除後の発癌が将来的に問題になることが予想される。このため簡便かつ非侵襲的に線維化を評価するマーカーが必要である。C 型慢性肝疾患患者において新規血清マーカー WFA⁺-CSF1R の線維化評価及び生命予後あるいは肝発癌との関連性を検討した。また WFA⁺-M2BP との比較を行った。

B. 研究方法

1998 年 1 月～2013 年 1 月まで、名古屋市立大学病院及び関連病院通院中の C 型肝炎ウイル

ス (HCV) 感染者 207 名において、WFA⁺-CSF1R の有用性を検討した。症例内訳は chronic hepatitis (CH) : liver cirrhosis (LC) = 99:108、年齢中央値 64 (21-87) 歳、男性 52.8%、血小板 11.9 (2.9-32.7) ($\times 10^4/\text{mm}^3$)、PT 88.0 (43-136) (%)、アルブミン 4.0 (1.9-5.1) (g/dL)、AST 49 (14-534) (IU/L)、ALT 45 (6-820) (IU/L)、AFP 8.9 (1.5-9993) (ng/ml)、PIVKA-17 (6-23400) (mAU/ml) であった。平均観察期間は 51 (0-195) カ月であった。

(倫理面への配慮)

血清の保存、研究面での各種ウイルスマーカーの測定は、患者に説明し書面上で同意書を取得した上で行った。

C. 研究結果

WFA⁺-CSF1R と WFA⁺-M2BP は fibrosis stage の上昇に伴い有意に上昇し、それぞれ CH 群 82.3 (5.0-241.0) ng/ml、1.34 (0.26-13.96) (C.O.I.)、LC 群 216.9 (34.3-574.8) ng/ml、7.93 (0.52-39.26) (C.O.I.) と LC 群で有意に高値であ

った ($p < 0.001$)。また 3 例の Child - Pugh C を除いた LC 群における検討では、HCC の有無による有意差は認めなかった (WFA⁺-CSF1R [HCC 208.9 (85.4-500.9) ng/ml vs Non-HCC 214.8 (34.3-442.2) ng/ml]、WFA⁺-M2BP [HCC 6.5 (0.8-39.3) (C.O.I.) vs Non-HCC 8.9 (0.87-37.7) (C.O.I.)] }。また LC 群で、HCC なし群 (n=45) と初発 hepatocellular carcinoma (HCC) が外科的切除、または経皮的ラジオ波焼灼療法によりコントロールされた群 (n=32) とを含めた 77 名において、Time-dependent ROC 解析を用いて、生命予後と累積肝発癌に関わる因子を検討した。

(1) 生命予後の検討

アルブミン、fib4、年齢、血小板、AFP、APRI などの線維化や予後に関わる因子を加えて生存率を検討すると、WFA⁺-CSF1R は全観察期間における AUC は 0.868、HR 2.20 であり、WFA⁺-CSF1R の予後予測能力は FIB4 と同程度で、AFP や APRI より優れていた。一方でアルブミンが全観察期間における AUC が 0.883、HR 3.45 と最も良好であった。

WFA⁺-CSF1R 230ng/ml をカットオフとして Kaplan-Meier 生存曲線を検討すると WFA⁺-CSF1R < 230 ng/ml 群 [n = 43, 観察期間中央値 36M (0 - 195)]では 5 年生存率 82%であったが、WFA⁺-CSF1R ≥ 230 ng/ml 群 [n=34, 観察期間中央値 33M (0 - 108)]では 42%であった ($p = 0.0001$)。またアルブミン > 3.5 g/dl の 52 症例の検討で、WFA⁺-CSF1R ≥ 230 ng/ml 群 (n = 15) は、WFA⁺-CSF1R < 230 ng/ml 群 (n = 37) に比べ、有意に生存率が低かった ($p = 0.017$)。

(2) 肝発癌の検討

発癌予測因子を AFP、PIVKA-II などの腫瘍マーカーや Fib4、APRI などの線維化 index

などと合わせて検討すると (血清中の Total CSF1R を測定し、WFA⁺/Total 比で発癌予測を検討)、WFA⁺/Total CSF1R の AUC は 0.898、HR 1.36 であり、発癌予測因子として WFA⁺/Total CSF1R が最も良好であった。つづいて WFA⁺/Total CSF1R 0.35 をカットオフとして累積発癌率を検討すると、WFA⁺/Total - CSF1R ≥ 0.35 群 (n = 8) の累積発癌率は 4 年で 70%であるのに対し、WFA⁺/Total - CSF1R < 0.35 群 (n = 69) は 4 年で 36%と、累積発癌率が有意に高かった ($p = 0.0019$)。

(3) WFA⁺-CSF1R と WFA⁺-M2BP の関連性検討

WFA⁺-M2BP と WFA⁺-CSF1R は相関係数 0.48 と良好な相関を示したが、2 例で乖離症例を認めた。1 例は WFA⁺-M2BP に比べ WFA⁺-CSF1R が極めて高値であり、もう一例は、反対に WFA⁺-M2BP に比べ WFA⁺-CSF1R が高値であったが、いずれも 29M、0M で肝不全にて死亡した。

D. 考察

WFA⁺-CSF1R は線維化の指標のみならず、発癌予測マーカーとしての可能性が示唆される。WFA⁺-CSF1R の最適なカットオフ値の決定や、発癌との関連についてはさらなる検討が必要である。WFA⁺-CSF1R と WFA⁺-M2BP との関連性、差別化のために現在、病理組織学的検討を行っている。

E. 結論

WFA⁺-CSF1R は肝硬変の診断だけでなく、予後予測が可能な線維化マーカーとして期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 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) 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.
- 4) 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.
- 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) 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.
- 7) 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).
- 8) 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.
 - 9) 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.
 - 10) 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.
 - 11) 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).
 - 12) 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).
 - 13) Wang J, Singh US, Rawal RK, Sugiyama M, Yoo J, Jha AK, Scroggin M, Huang Z, Murray MG, Govindarajan R, **Tanaka Y**, Korba B, Chu CK. Antiviral activity of novel 2'-fluoro-6'-methylene-carbocyclic adenosine against wild-type and drug-resistant hepatitis B virus mutants. *Bioorg MedChem Lett.* 2012 Apr; 22 (7):2641.
 - 14) Matsumoto A, Tanaka E, Suzuki Y, Kobayashi M, **Tanaka Y**, Shinkai N, Hige S, Yatsushashi H, Nagaoka S, Chayama K, Tsuge M, Yokosuka O, Imazeki F, Nishiguchi S, Saito M, Fujiwara K, Torii N, Hiramatsu N, Karino Y, Kumada H. Combination of hepatitis B viral antigens and DNA for prediction of relapse after

- discontinuation of nucleos (t) ide analogs in patient with chronic hepatitis B. *Hepatol Res.* 2012 Feb; 42 (2):139-149.
- 15) Miyaaki H, Ichikawa T, Yatsushashi H, Taura N, Miura 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. *Hepatol Res.* 2011 Dec; 41 (12):1216-1222.
- 16) 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.
- 17) 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. *Hepatol Res.* 2011 Sep; 41 (9):838-845.
- 18) 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.
- 19) **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.
- 20) 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.
- 21) 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.
- 22) 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.

- 23) 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.
- 24) 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.

2. 学会発表

- 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) 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.

- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.

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