

## 肝疾患病態指標血清マーカーの開発と低侵襲かつ効率的に評価・予測する新規検査系の実用化

業務主任者 成松 久 産業技術総合研究所 糖鎖創薬技術研究センター 招聘研究員

### 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、独自の糖鎖バイオマーカー開発プラットフォームにより肝線維化マーカーを実用化してきた。本研究では、肝細胞がんなど異なる目的のマーカー開発のため、関連技術を改良・最適化すると共に、新たなマーカーの探索、正当性検証を経て、実用化することを目的とする。

【結果と考察】背景肝に影響されず、肝がん関連糖鎖変化を反映する新規レクチン NPA に対する反応性の高い肝がん培養細胞株 2 種を選択し、NPA 反応性糖タンパク質（マーカー候補）を 370 種同定した。また、組織標本のレクチン染色より NPA 反応性は、がん部で強度が高いだけでなく、局在も変化していることが判明した。並行して、より疾患特異度の高い糖鎖マーカーを同定・検証するため、分析法の微量化など改善を進めた。開発の先行している肝硬変マーカー候補 WFA+-CSF1R については、市販の抗体、レクチンを用いた ELISA 系を構築し、収集した検体約 1,000 件に対し正当性検証を進めた。その結果、このマーカーは肝がん高発がん群の同定、高危険患者囲い込みに有効である可能性が見いだされた。今後このマーカーを迅速測定するための分析キット開発を進め、分析キャリブレーター安定産生、供給系を確立した。このキャリブレーターは市販 CSF1R の約 7.8 倍の反応性を示した。

【結論】新規マーカー WFA+-CSF1R の臨床的有用性（高発がん群の同定）の可能性が見出された。検証数を増やし、迅速測定系を確立して、有用性検証を進めると共に、新規肝がんマーカーの絞り込み、検証を進める。

### 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

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  
患研修室長  
武富 紹信 北海道大学大学院 医学研究

	科 外科学講座消化器外科学分 野 教授
髭 修平	札幌厚生病院第三消化器内科 主任部長
上野 義之	山形大学医学部 内科学第二 講座（消化器内科学）科長
伊藤 浩美	福島県立医科大学医学部 生 化学講座 助教
末松 誠	慶應義塾大学医学部 医化学 教室 教授
坂元 亨宇	慶應義塾大学医学部 病理学 教室 教授
齋藤 英胤	慶應義塾大学大学院 薬学研 究科 薬物治療学教室 教授
渡辺 純夫	順天堂大学医学部 消化器内 科 科長
橋本 悦子	東京女子医科大学医学部 消 化器内科 教授
泉 並木	武蔵野赤十字病院 消化器科 部長
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
熊田 卓	大垣市民病院 副院長 / 消化 器内科
米田 政志	愛知医科大学医学部 内科学 講座（消化器内科）教授
伊藤 清顕	愛知医科大学医学部 内科学 講座（消化器内科）准教授
日野 啓輔	川崎医科大学 肝胆膵内科学 教授
阿部 雅則	愛媛大学大学院医学系研究科 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・総合外科学分野（第二 外科）准教授
八橋 弘	長崎医療センター臨床研究セ

	ンター長
梶 裕之	産業技術総合研究所 糖鎖創 薬技術研究センター チーム長
久野 敦	産業技術総合研究所 糖鎖創 薬技術研究センター 上級主任 研究員
梅谷内 晶	産業技術総合研究所 糖鎖創 薬技術研究センター 主任研究 員
佐藤 隆	産業技術総合研究所 糖鎖創 薬技術研究センター 主任研究 員
研究協力者	
雄長 誠	産業技術総合研究所 糖鎖創薬 技術研究センター 特別研究員

## A. 研究目的

本邦には約 300 万人の B・C 型ウイルス性肝炎患者が存在し、肝炎関連疾患で年間約 4 万人が死亡している。現在肝がんは早期発見できれば 5 年生存率は 7 割を超えているが、現時点での肝がんマーカーである AFP, AFP-L3, PIVKA-II を駆使した早期がん検出の正診率は 7 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。正診率向上には 1 つのマーカーや診断技術に頼るのではなく、病変（病態）を細分化しそれぞれを定量的に検出できるマーカー（分子病態マーカー）の開発と、その実用化が必須である。本研究では、これら肝炎患者の、病態の進展や予後予測、治療効果を判定する検査薬を開発、実用化し、適切な治療の開始、治療法の選択による患者 QOL の向上に資することを目的とする。

本目的達成のため、（病理解析を応用した肝がん糖鎖）マーカー探索班、（微量迅速測定）キット開発班、（多施設共同による）バリデーション班の 3 つの開発班を設定し、それ

それに適切な人材・技術を配置すると同時に、役割を明確にする。具体的には

- ・先の肝炎マーカー研究班で開発された肝硬変の予後予測を可能とする血清バイオマーカーの簡便測定系を開発し(キット開発班)、臨床情報が整った収集済み血清 6000 検体から適切な検体を用い、すみやかにバリデーションする(バリデーション班)。

- ・既に構築されているバイオマーカー開発戦略と病理解析を効果的に組み合わせ、新規な肝がん病態特徴的糖鎖変化を発見し、分子マーカーを同定する(マーカー探索班)。有力マーカーに対する迅速検出系を構築後(キット開発班)、上述の 6000 検体によるバリデーションで臨床的意義を明確にする(バリデーション班)。

## B. 研究方法

マーカー探索班

a. 病態病理・分子病理に基づいた肝がん特徴的な糖鎖変化の検出

分子病態マーカーを適宜併用し、客観的な指標によって病理学的に規定された組織標本のきわめて微小な領域 (<0.5mm<sup>2</sup>) をレーザーマイクロダイセクションにより単離し、レクチンアレイによる比較糖鎖解析で、肝がんの特徴的な糖鎖変化を検出すると同時に、最適なプローブ(レクチン)を選抜する。選抜されたレクチンの妥当性は複数の異なる手法により検証する。妥当性検証には 7 種の肝細胞がん細胞株も用いる。その結果を基に、以後の探索フェーズでどの細胞株を対象に解析を進めるのかを決定する。

b. 肝がんマーカー候補糖タンパク質探索・検証のための技術開発

a. の疾患糖鎖プロファイルが微小試料から検出されるため、マーカー分子の探索、検証分析も、同様な分析スケールで進めなければならない。そこで、本年度は培養肝がん細胞やマウス

肝臓をモデル試料として、質量分析による糖タンパク質同定、糖鎖構造分析技術の微小化、高感度化、高効率化を進める。また a. で適当なプローブレクチンが見出され、適用可能な組織試料が入手可能であるなら、標的糖タンパク質の同定と構造検証を行う。

キット開発班

微量迅速測定系開発に関連する研究開発

肝硬変の予後予測を可能とする血清バイオマーカーの迅速測定系を開発する。本年度は安定な測定を可能にするキャリブレーションプレートを作製する技術を、特定糖鎖を有するリコンビナント糖タンパク質合成ノウハウをもとに開発する。

バリデーション班

多施設多検体解析

国立国際医療研究センター肝炎情報センターを中核とした 15 施設の共同研究体制により、臨床情報が整った 6000 検体レベルのライブラリを維持する。検討されるマーカーに応じて使用する検体を組み替え、複数の検討項目を起案、実施する。本年度は肝硬変予後予測マーカーについてライブラリを構築する。

## C. 研究結果

マーカー探索班

a. 病態病理・分子病理に基づいた肝がん特徴的な糖鎖変化の検出

NPA の反応性で説明される肝がんの特徴的な糖鎖変化は、肝細胞がん培養細胞株 7 種および肝がん患者組織を対象としたレクチンアレイで確認した。この実験より、マーカー探索に使用する細胞株として、HAK-1A と HLF が選択された。次に細胞、組織を対象として、自らが開発した多段階レクチン利用法、簡易レクチン評価法により、NPA レクチンが優れたプローブとなりうることを確認した。レクチンアレイの結果

として得られたシグナル強度の差を組織染色でも検証した。その結果、がん部・非がん部ともに蛍光を発する部位が存在することには変わらないが、興味深いことにその染色パターンおよび強度ががん部と非がん部では大きく異なることが判明した。

#### b. 肝がんマーカー候補糖タンパク質探索・検証のための技術開発

肝がん細胞株 HuH-7 細胞を対象に、IGOT-LC/MS 分析し、使用タンパク質量と同定数の関係を検証した。その結果、出発時のタンパク質量が 0.4ug 相当でも候補分子のリスト化に必要な 200 種の糖ペプチドが同定できることがわかった。次に実際の探索試料となる FFPE 簿切試料 1 枚(約 80mm<sup>2</sup>、5um 厚)を対象に、IGOT-LC/MS 分析し、必要最低面積を推定した。その結果、レクチンアレイで使用するのと同程度である 1mm<sup>2</sup> においても、約 200 種の糖ペプチドが同定できた。また、糖ペプチドの LC/MS 分析から、糖鎖付加位置ごとの糖鎖パラエティーをハイスループットに同定する分析手法を構築し、バイオマーカー候補における糖鎖変化を確認できることが分かった。

次に NPA 認識糖鎖を持つ糖タンパク質を、肝がん培養細胞株 HAK1A および HLF の細胞ペレットと培養上清より捕集、同定し、それぞれ 100 ~ 200 種、総数 370 種の糖タンパク質を同定した。遊離された糖鎖の MALDI-TOF-MS 分析から、NPA はハイマンノース型の糖鎖を優先的に結合することが確認された。

#### キット開発班

微量迅速測定系開発に関連する研究開発

本年度は肝硬変を含む肝疾患の血清糖タンパク質マーカーとして見出された WFA+-CSF1R の微量迅速測定キット用のキャリブレーション製法を開発した。CSF1R タンパク質の一次構造情

報を基に、シグナル配列と細胞外領域からなるリコンビナント CSF1R(rCSF1R)発現ベクターを構築した。これらのプラスミドを HEK293 細胞にトランスフェクションし、rCSF1R タンパク質をおよそ 100 μg 精製した。rCSF1R の品質評価を兼ねて WFA+-CSF1R 濃度を現行の ELISA 系により測定した結果、今回発現した rCSF1R-1 は市販のそれに比べて、7.76 倍 WFA との結合値が高く、優れていた。そこで rCSF1R を安定発現培養細胞株の樹立と精製法の改良を行い、ほぼ確立したため、次年度以降の供給体制は出来上がった。

#### バリデーション班

多施設多検体解析

肝硬変マーカー WFA+-CSF1R 実用化のためにあるキット開発に先立ち、マーカーの臨床的有効性を見出すために、市販抗体やレクチンを活用した簡易測定系(マニュアル法によるサンドイッチ ELISA 系)を構築し、収集された臨床検体の一部について、バリデーション試験を実施した。この結果から、構築した測定は肝細胞がんの「高発がん群」の同定に有用であり、高危険群の囲い込みに有用となる可能性が示された。

#### D. 考察、結論

マーカー開発は対象疾患に特徴的な糖鎖変化を探索するフェーズから始まるが、この段階がクリアされない限りは、以後の開発は進められない。そのような点から、本年度の早い段階で背景肝に左右されない肝がんの特徴的な糖鎖変化をインジケートするレクチンが見出されたのは大きい。その変化の検証手段としては、これまでは組織標本のレクチン染色のみしか持ちえなかったが、多段階レクチン利用法や簡易レクチン評価法など、複数の独自手法を構築することができ、それをを用いた妥当性検証からも、NPA

レクチンの可能性が示された。

技術開発は、質量分析による糖タンパク質の同定の工程にも及んだ。FFPE 簿切試料微小部位 1mm<sup>2</sup> から、約 200 糖ペプチド (160 糖タンパク質) を同定できるようになったのは大きな進歩である。本年度は肝細胞がん細胞株からの糖タンパク質同定を行い、370 種を決めているが、次年度は候補分子の絞り込みを行うと同時に、肝細胞がん患者組織標本からの NPA 結合性糖タンパク質の同定にも挑戦していきたい。

本研究では肝細胞がんマーカーの実用化に先立ち、肝硬変を含む肝疾患の血清糖タンパク質マーカー WFA+-CSF1R の実用化を先行して進めている。本年度の成果により微量迅速測定キットによる多検体測定に必要なだけ供給できるリコンビナントタンパク質生産安定発現株の取得もほぼできており、次年度に予定しているモノクローナル抗体の取得ができれば、in house の ELISA 系は完成し、実用化に必要な多検体測定は期間内に完了するであろう。

これまで肝硬変マーカーとして開発を進めてきた WFA+-CSF1R は、今回の検証試験より、肝細胞がんの高危険群の困り込みに有用となる可能性が見出された。しかし、分析検体が 1000 に満たなかったため、今後はより多くの検体による測定・検討を通し、肝疾患における当該のマーカー候補分子の臨床的有用性を明らかにする。

## E. 健康危険情報

本研究課題に従事する者は、肝疾患関連患者の検体を取り扱うため、実験従事前の肝炎ウイルスワクチンの接種を義務づける。また、年 1 回程度の抗体価検査の実施を行い、経時的なモニタリングを行うものとする。また、実験時の試料の取り扱い時には、白衣 (ディスポーザブル白衣)、防護メガネ、防護マスク、防護グローブ、安全キャビネット等を使用する、あるいは検体の不活化を行うものとする。現在までに感染事故等の発生は無い。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

業務項目報告書に記載した。

### 2. 学会発表

業務項目報告書に記載した。

## G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

### 1. 特許出願

久野敦、佐藤隆、梶裕之、調憲ら、「肝細胞がんマーカー」出願 1 件 (公開前のため特許番号の開示は致しません)

肝疾患病態指標糖鎖マーカー に関する特許  
審査請求 : 3 件 (特願 2011-522807、US  
13/384,031、CN 201080040973.8)

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし