

厚生労働科学研究委託事業（肝炎等克服実用化研究事業（肝炎等克服緊急対策研究事業））
委託業務成果報告（業務項目）

微量迅速測定系の多施設多検体解析

担当責任者 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
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
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 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
泉 並木 武蔵野赤十字病院 消化器科 部長
渡辺 純夫 順天堂大学医学部 消化器内科 科長
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
橋本 悦子 東京女子医科大学医学部 消化器内科 教授
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 研究センター長
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

研究要旨：国立国際医療研究センターを中核とした 15 施設の共同研究体制を構築し、臨床情報が整った血清、約 4000 検体（10 施設前後）を用いて糖鎖バイオマーカーの測定を行う。開発項目 2 より供給される測定系あるいは手動簡易測定系を使用して実測し、既存測定技術との統計学的な比較を行い、マーカー候補分子の有効性を検証する。今年度は肝疾患（肝硬変）糖鎖バイオマーカー・WFA⁺-CSF1R 分子を評価するための測定系の基礎検討（精度管理等）ならびに一部の臨床検体を用いた測定を行った。

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、肝線維化の程度を反映する糖タンパク質を始めとした新規な肝疾患血清マーカーになりうる糖タンパク質候補分子を見出してきた。本課題項目では、肝疾患マーカー候補分子 [特に、肝硬変マーカー候補である、*Wisteria floribunda* agglutinin (ノダフジ凝集素; WFA) reactive colony stimulating factor 1 receptor (WFA 反応性マクロファージ刺激因子-1 受容体; WFA+-CSF1R)] について、迅速、簡便かつ安価な測定法・精度管理方法を確立し、そのマーカーとしての臨床的有効性を検証することを目的とする。

B. 研究方法

(1) マーカー候補の簡易測定系の確立：血清肝疾患マーカー候補分子 WFA+-CSF1R に対する、手動での簡易測定系として、WFA レクチン (糖鎖プローブ) と抗体によるサンドイッチ ELISA 系 (レクチン-抗体サンドイッチ ELISA) 系を構築した。本レクチン-抗体サンドイッチ ELISA 系を用いることで、高い S/N 比が得られ、血中 WFA+-CSF1R の定量解析が可能である。また、糖鎖の有無に関係なく、CSF1R タンパク質の量を定量するための、Total CSF1R 測定 ELISA 系を構築した。WFA+-CSF1R 値ならびに Total CSF1R 値の比を取ることで、全体の CSF1R タンパク質のうち、肝疾患由来の糖鎖変化を起こした WFA+-CSF1R がどのくらいの割合になっているのかを計算することが出来る (考え方としては、既存マーカーの AFP-L3 が類するものとして挙げられる)。この WFA+-CSF1R 分子に対する抗体とレクチンとのサンドイッチ 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を対象に小規模な有効性検証を行っており、その結果から血中

WFA+-CSF1R 量は慢性肝疾患の進行に伴って増加しており、特に肝硬変 (F4) において顕著に増加する事を明らかにしている。

(2) 自動化による測定系の構築は進行中 (開発項目 2 の項を参照) のため、既に構築された手動による簡易測定系を用いて、各臨床機関から収集された検体の一部について先行的に測定を行った。尚、後述するが、本研究課題項目での検証に用いた全ての血清サンプルは、インフォームドコンセントにより研究対象者 (患者、試料提供者) から同意の得られたものである。またすべて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たものを用いている。

(倫理面への配慮)

本研究の開始にあたり、本研究に参加する研究者は、産業技術総合研究所ならびに、各班員らの所属する臨床機関において、本研究実施計画書および研究対象者への説明文書が施設の倫理審査委員会もしくは治験審査委員会 (IRB) で承認を得た上で検体を採取・収集し、研究に使用した。文部科学省・厚生労働省・経済産業省「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針 (平成 16 年文部科学省・厚生労働省・経済産業省告示第 1 号)」、遺伝医学関連 10 学会より提案された「遺伝学的検査に関するガイドライン」、厚生労働省・文部科学省「疫学研究に関する倫理指針」を遵守するものとした。

各臨床機関においては、研究対象者に対し下記に示す説明事項について十分説明した上で、本研究への参加について自由意思による同意を文書で得た [説明事項; (1) 研究の目的および方法 (2) 予想される研究成果 (3) 研究試料の採取方法など (4) 研究への参加に同意しない場合であっても不利益は受けない旨 (5) 研究の参加に同意した場合でも何時でもこれを撤回できる

旨 (6) 人権の保護に関する配慮 (7) 研究担当者の氏名および連絡先など]。さらに研究対象者のプライバシーの保護と識別のため対象者の同定や照会は、登録時に発行される症例登録番号、患者イニシャル、生年月日を用いて行われ、患者名など第三者が直接患者を識別できる情報が本研究課題のデータベースに登録されることはないようにして行われた(以上の検体の集中管理ならびに二重匿名化などは国立国際医療研究センター・肝炎 免疫研究センターにて実施されている)。

本研究項目は多施設共同研究によって行うものであり、前述のように各臨床機関について諸手続きを経た上で収集された検体(国立国際医療研究センター・肝炎 免疫研究センターで集中管理)は産業技術総合研究所に検体の一部を送付して、マーカー候補分子の測定・解析が行われた。産業技術総合研究所においても、医療機関から送られた検体はヒト由来試料実験倫理委員会に諮った上で使用されている。本倫理委員会は、厚生労働省の「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」あるいは「臨床研究に関する倫理指針」に準ずるものとして運営されているものである。以上の様に、本研究課題において用いられた全ての臨床検体の収集は、インフォームドコンセントによる同意が得られている患者より提供されたものであり、また、全ての試料の使用については、検体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。

また、組換えDNA実験、動物実験を行う場合には、産業技術総合研究所ライフサイエンス実験に関する倫理及び安全管理規程に従い、関連する委員会の承認を得た上で実施する(産業技術総合研究所の関連する倫理委員会は、「カルタヘナ法」あるいは「動物実験等の実施に関する基本指針」に準じている)。

C. 研究結果

多施設多検体解析：肝疾患(特に肝硬変)マーカー・WFA(+)-CSF1R および Total CSF1R の手動操作による簡易測定系(マニュアル法によるサンドイッチ ELISA 系)を構築した。測定系の検討(マニュアル測定での精度管理・プロトコルのブラッシュアップ)を進めた。当該の測定系では、1 検体あたり 2 連あるいは 3 連で測定しており、その(測定プレート間の)精度管理としては Control 血清(pool 血清)およびリコンビナント CSF1R タンパク質で評価している。C.V. 値が 10%以内の誤差であれば、測定値を採用するものとした。

現在、より多検体を再現性良く測定するために、自動化を進めているところであるが、マーカー候補の臨床的有用性を明らかにするために、構築済みのマニュアル(手動)操作による簡易測定系にて一部の臨床検体の測定を行うものとした。収集された臨床検体の一部(大垣市民病院にて収集された約 800 検体)について、同測定系による WFA⁺-CSF1R のバリデーション試験を先行的に実施した。臨床検体を用いて、WFA(+)-CSF1R および Total CSF1R について測定した。発がんの診断時より 3 年前に遡った血清検体における 糖鎖マーカーの測定値より、WFA⁺-CSF1R/ total-CSF1R 比率値の発がん群(vs 非発がん群)の AUC は 0.8379(0.7756-0.8855)と、AFP など他のマーカーに比べて最も良好であることが明らかとなった。以上から、WFA⁺-CSF1R/ total-CSF1R の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。但し、マーカーの有効性について、より詳細に検体を分類して再検討する必要があると考えられたため、今後も検討を継続していく予定である。

D. 考察

マーカー候補分子 WFA⁺-CSF1R 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必要がある。

E. 結論

新規肝疾患糖鎖バイオマーカー候補分子 WFA⁺-CSF1R は肝疾患（肝硬変あるいは高発がんリスク）患者のマーカーとしての可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 雄長誠、榎谷内晶：グリコプロテオミクス技術開発と医療への応用 肝疾患血清糖鎖バイオマーカーの開発 グリコプロテオミクス技術の疾患糖鎖バイオマーカー開発への応用例、医学のあゆみ、(2014年) 249 巻 8号、661-665 ページ
- 2) Yamasaki K, Tateyama M, Abiru S, Komori A, Nagaoka S, Saeki A, Hashimoto S, Sasaki R, Bekki S, Kugiyama Y, Miyazoe Y, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Ocho M, Mizokami M, Narimatsu H, Yatsushashi H. Elevated serum levels of WFA⁺-M2BP predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients. *Hepatology*. (2014) 60(5):1563-70. DOI: 10.1002/hep.27305.
- 3) 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*-positive Mac-2 binding protein (WFA⁺-M2BP), for assessing liver fibrosis. *J Gastroenterol*. (2015) 50(1):76-84. DOI: 10.1007/s00535-014-0946-y

- 4) Tamaki N, Kurosaki M, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Gotoh M, Nakakuki N, Takada H, Matsuda S, Hattori N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Mizokami M, Narimatsu H, Izumi N. *Wisteria floribunda* agglutinin positive human Mac-2-binding protein as a predictor of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res*. (2015) Jan 6. in press. DOI: 10.1111/hepr.12466.

2. 学会発表

- 1) Togayachi A, Ocho M, Kaji H, Kuno A, Iio E, Sogabe M, Tanaka Y, Ikehara Y, Mizokami M, Narimatsu H. Glycoproteomic Discovery of Serological Biomarker for Hepatitis Virus Infection-associated Chronic Liver Disease. 2014 TASL-Japan Hepatitis B Workshop (Second). Taipei (Academia Sinica), 19-20 Apr. 2014.
- 2) 雄長誠、榎谷内晶、梶裕之、久野敦、飯尾悦子、曾我部万紀、是永匡紹、後藤 雅式、田中靖人、池原謙、溝上雅史、成松久：グリコプロテオミクスを基盤とした肝硬変血清バイオマーカー“WFA(+)-CSF1R”の開発、日本プロテオーム学会 2014 年会、つくば、2014 年 7 月
- 3) 榎谷内晶、梶裕之、久野敦、久保田智己、雄長誠、曾我部万紀、池原謙、成松久：グリコプロテオミクス技術を基盤とした血清糖鎖バイオマーカー開発戦略、日本プロテオーム学会

2014 年会、1L-p グライコプロテオミクスと
その応用 / Glycoproteomics and
Applications、筑波、2014 年 7 月

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

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