

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 25 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 成松 久

平成 26 (2014) 年 5 月

目次

・ 総括研究報告	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	
・ 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	7
成松 久, 梶 裕之, 久野 敦, 梅谷内晶, 佐藤 隆, 田中靖人, 伊藤浩美, 池原 讓, 雄長 誠, 後藤雅式	
2. C型慢性肝疾患における非侵襲的肝線維化測定法(ARFI/FibroScan)・血清線維化マーカーと新規肝線維化糖鎖マーカー(WFA+-M2BP)の比較	13
溝上雅史, 是永匡紹, 杉山真也	
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	17
是永匡紹, 杉山真也, 山田剛太郎, 鹿毛政義	
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評価に関する研究	21
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	24
今井康陽, 澤井良之, 倉橋知英	
6. 肝線維化マーカーの臨床的検討と肝癌悪性化マーカーの検出	29
調 憲, 戸島剛男, 吉屋匠平	
7. 新規肝線維化マーカーWFA+-M2BPの肝臓外科学領域における診断基準の検討	32
武富紹信	

8. B型慢性肝炎核酸アナログ投与例における発癌例の解析 松本晶博, 田中榮司	35
9. C型肝炎患者における WFA ⁺ -M2BP と 肝弾性値の発がん予測因子としての有用性比較 市田隆文, 玄田拓哉	37
10. C型肝炎ウイルス学的著効後肝発癌と 新規糖鎖マーカー WFA ⁺ -M2BP の検討 八橋 弘, 山崎一美, 佐々木龍	41
11. NAFLD における肝線維化評価と WFA ⁺ -M2BP の有用性 髭 修平	44
12. NASH における耐糖能異常と肝線維化 日野啓輔, 原 裕一, 仁科惣治	48
13. NAFLD における血清 WFA ⁺ -M2BP の線維化予測に対する有用性 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	51
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 上野 義之	54
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 田中靖人, 飯尾悦子	57
16. 肝発癌例と非発癌例での血中 WFA ⁺ -CSF1R の検討 - 発癌 3 年前の血清マーカーからの検討 - 熊田 卓, 豊田秀徳, 多田俊史	60
. 研究成果の刊行に関する一覧表	65
. 研究成果の刊行物・別刷	79

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。本研究は、肝線維化マーカー WFA⁺-M2BP については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 の正当性検証は、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、約 6000 サンプルを測定した。この結果によりマーカーの有効性・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うち、がんマーカーは、多種の培養細胞株の糖鎖プロファイル分析の結果から見出された、AFP 非産生肝がんに関連するプロブレクチンを用いて、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 PIVKAI 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
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

研究分担者(つづき)

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

A. 研究背景・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。C 型肝炎慢性患者では肝線維化の進行につれ肝硬変を経て肝癌に進展する。現時点では慢性 C 型肝炎の根治療法はインターフェロン・リビリン療法であるが、その効果予測因子としては肝線維化が大きな指標になる。このため肝の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。現在肝癌は早期発見できれば 5 年生存率は 6 割を超えているが、現時点での肝癌マーカーである AFP、AFP-L3、PIVKA-II を駆使した早期癌検出の正診率は 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、組織の分化度や障害の程度により付加される糖鎖が異なることを、各種糖鎖特異的測定法を開発することで明らかにしてきた。その中で、肝臓については、肝の線維化をはじめとする肝疾患の病態指標となりうる血清マーカー糖タンパク質を見出してきた。本研究はこれらマーカー群を活用した迅速、簡便かつ安価な測定法を開発し、実用化することが最終目標である。本

年度は、

(1) 新規肝疾患病態指標マーカー開発:昨年度肝がん患者血清を用いて疾患に伴う糖鎖変化が検証された候補タンパク質(CSF1R:昨年度まではH1-12と表記)については、臨床情報の明確な患者血清を用いた小規模な有効性検証を継続的に行う。また並行して、昨年度同定した、AFP非産生肝がん培養細胞反応性レクチンに結合する糖タンパク質(ペプチド)群よりマーカー候補分子を選別し、検証を行う。さらに、がん細胞表層に出現する糖タンパク質分子を同定することを念頭に置き、肝細胞がん患者組織標本のレクチンアレイ解析を実施する。

(2) 多施設多検体検証:昨年度までに開発した、肝線維化の進展度を血清で測定可能な糖タンパク質血清マーカー(WFA⁺-M2BP)簡便測定系の有効性評価判定試験の位置づけとして、参画大学・臨床機関より集約された3000を超える血清サンプルを測定し、肝生検組織との比較、現在の他マーカーとの比較や最適な組み合わせを探り、身体的負担が大きいとされる肝生検に代わる新たな検査方法の実用化をはかることを目的とする。

B. 研究方法

(1) 新規肝疾患病態指標マーカー開発:CSF1Rに対する抗体と疾患関連糖鎖変化を反映するプローブレクチンであるWFAを用いて構築したサンドイッチELISAシステム(WFA⁺-CSF1R検出系)を利用して、線維化ステージや肝がんの有無など臨床情報の規定された患者血清を対象とした小規模な有効性検証(一部は正当性検証の拡大)を引き続き行った。加えて、CSF1Rの総量(total CSF1R)も測定し、total CSF1Rに対するWFA⁺-CSF1Rの割合(WFA/total)を算出し、有効性検証を行った。

また、昨年度までに、AFP産生性及び非産生性の肝がん細胞の培養上清を用いて新規AFP非産生肝がんマーカーの探索を行った。糖タンパク質マーカー候補分子は、ペプチドマスフィンガープリント法あるいは、IGOT法を利用したショットガン分析法によって同定した。ショットガン分析法によって同定した候補分子については、AFP産生細胞と非産生細胞とを比較する事で候補分子の選抜を行った。そして、さらにその中からバイオインフォマティクスなどによって有望と思われる候補をさらに選択した。次に候補分子の抗体を利用して、培地や患者血清からエンリッチした候補分子についてレクチンアレイ分析による糖鎖分析を行い、各分子に肝疾患疾患による糖鎖変化が生じているかを解析した。さらには、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、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ブロックから組織切片を作製した。5µm厚薄切標本から、レーザーマイクロダイセクションを用い、そのがん部および非がん部肝実質細胞領域から1mm²の領域ずつ組織片を単離した。前処理によりタンパク質溶液を得て、Cy3標識後、それレクチンアレイ解析に用いた。データは規格化後、対応ありの2群比較によりP<0.05を示すレクチンを候補レクチンとして選抜した。レクチン組織染色では、脱パラ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特異的なシグナルを検出した。

(2) 多施設多検体検証

参画臨床機関・大学より提案され、研究代表者および臨床機関統括者により承認された研究課題を対象に、肝線維化マーカーWFA⁺-M2BP

の測定を行った。測定は昨年度までに構築した迅速測定法(Fastlec-Hepa)を用いた。サンプルは各施設より臨床機関統括者へ集約され、連結可能二重匿名化後、測定機関である産業技術総合研究所糖鎖医工学研究センターへ移送された。測定値はカットオフインデックス値に換算され、速やかに提案者へ報告された。提案者は測定値をもとに、各課題における検証作業を行った。なお、これらの検証に用いるすべ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。

C. 研究結果と考察

(1) 新規肝疾患病態指標マーカー開発:各種肝患者血清を用いた正当性検証の結果、WFA⁺-CSF1R は、肝硬変の予後予測や肝がんの発症リスク予測の指標としての有用性が示された。今後はより大規模に検体を測定することによって、マーカーの有用性がより明らかにされる事が望まれる。WFA⁺-CSF1R /total CSF1R についても肝がんの発症リスク予測の指標として利用できる可能性が示唆された。

一方、新規な肝疾患マーカー(AFP 非産生肝がんマーカー)の探索では、6種の肝細胞がん培養液より、レクチン-IGOT-LC/MS法で約700種のプローブレクチン反応性の糖タンパク質が同定された。次に各種の情報(公共データベース等)を利用したバイオインフォマティクスの手法により、数十分子にまで候補タンパク質を絞り込んだ。このうち6種の分子については、血清中の候補分子を免疫沈降によってエンリッチし、レクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイルの分析を実施した。このうち1種については、肝硬変マーカーの候補分子と思われた。一方、ペプチドマスフィンガープリン

ト法では7種のメジャータンパク質バンドが同定された。そのうちの2種の分子についてレクチンマイクロアレイによる糖鎖プロファイルの分析を実施した。その結果、1種の糖鎖シグナルは、肝炎の進行に伴って上昇し、別の1種の分子の糖鎖シグナルは、AFP 低値を示す血清においても高い値を示した。本分子はAFPを補完する肝がんマーカーである可能性が示唆された。ただし、今後は更に多くの血清検体を用いて再現性・正当性を確認する必要がある。また、その他の分子群についても、必要に応じて同様の検討を進めていく必要があると考えられる。

つぎに、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2つの異なる分化度の癌が共存する肝がん患者23症例の組織標本からがん部46カ所、非がん部23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、レクチンX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。

(2) 多施設多検体検証

各機関より15の課題が提案され、HBV、HCV感染ないし非感染の慢性肝炎、肝硬変、肝細胞がん患者および非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)を対象として、約6000サンプルの

測定が行われた。各課題のデータ解析の結果、線維化ステージ F3 以上で今回検証した他の非侵襲型線維化評価技術(LSM、ARFI) およびインデックス(APRI、FIB-4) と遜色ない、もしくは凌駕する肝線維化との相関が得られた。また、インターフェロン治療後経過観察例などの測定結果から、肝発がんリスクを有する症例の囲い込みへの有効性を見出した。

D. 結論と展望

新規肝がんマーカー候補として正当性検証を行った候補分子 CSF1R については、これまでに肝硬変結節部周辺域においてプロープレクチンエピトープ糖鎖(WFA 反応性糖鎖) と共局在することが判明している。今後は、より多検体の組織について染色像を観察し、発現のメカニズムを明らかにする事が望まれる。昨年度より継続して行ってきた臨床情報の明確な患者血清を用いた検証により、本分子が肝硬変患者の予後予測マーカーである事と、肝がんの発症予測マーカーである事が明らかになった。今後は臨床的な有用性を、さらに多検体を用いて解析する事が望まれる。

AFP 非産生肝がんに対する新規マーカー開発では、AFP 低値の血清で値が上昇する傾向がみられるマーカー候補分子が 1 種見いだされた。

ただし、これは数検体レベルの解析結果であるので、適切な検体を用いて再現性の確認と正当性の検討を行う必要があると考えられる。

組織標本のレクチンアレイ解析では、予想を超える有意差を示すレクチンを選抜することができた。今後はそのレクチン X 結合性肝細胞がん表層タンパク質の同定を急ぐ。これはマーカーとしてだけでなく、分子治療標的としての利用も期待される。

また線維化マーカーに関しては、肝発がんリスクが増加する F3 以降での鑑別への有効性が複数の提案課題で確認された。今後は各課題の結果の精度を高めるための追加測定を行い、各用途へのカットオフ値の設定や診断のためのガイドラインの提案を目指す。

E. 健康危険情報

特になし。

F. 研究発表

分担研究報告書に記載した。

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

分担研究報告書に記載した。

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の探索・有効性検証を行ったので報告する。本課題で解析してきた候補糖タンパク質(コード名 H1-12: WFA⁺-CSF1R) について、臨床機関研究分担者によって準備された患者試料(実用化の課題 2 での試料も含む) を用いて検証した結果、肝硬変患者の予後・発癌予測マーカーである可能性が示された。一方、AFP 非産生肝がん群に相関するレクチンに結合する、肝がん細胞由来の糖タンパク質から選別した候補について、小規模血清検体を用いレクチンアレイ解析を行った。またレクチンアレイによる肝細胞がん組織標本の比較糖鎖解析を行った。背景肝の異なる複数のがん組織標本(38 例) を用い、がん部・非がん部組織領域(1mm 四方ずつ約 200 カ所) についてレクチンアレイ解析を行った。データ規格化後の統計解析の結果、がん部で有意にシグナルが増減するレクチンをいくつか見出した。特にレクチン X はがん部でのシグナルが高値であった。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。

研究分担者

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
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

研究協力者

池原 譲 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

研究協力者(つづき)

雄長 誠 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター・特別研究員
後藤雅式 産業技術総合研究所・糖鎖医工学研究センター・副研究センター長

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 WFA⁺-CSF1R) 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) 先行マーカー候補の測定系の確立、正当性検証：昨年度開発した血清マーカー候補分子 (WFA⁺-CSF1R) を検出するためのレクチンサンドイッチ ELISA 系を用い、昨年に引き続き、生存時間の分析、及び肝細胞がん発症リスク解析の為に測定を行った。加えて、本年度は新たに血中における総 CSF1R 量(total CSF1R)を抗体サンドイッチ ELISA 系によって測定し、total CSF1R に対する WFA⁺-CSF1R の割合 (WFA/total)を算出した。なお、上述の検証に用いた全ての血清サンプルと組織サンプルは、インフォームドコンセントにより患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。

(2) 新規肝がんマーカーの探索

絞り込んだ肝がんマーカー候補分子について、小規模血清検体を用いた検証を行った。まず、抗体の性能を肝がん培養上清や血清を用いて行った。その後、20 名の肝細胞がん患者血清を、AFP の水準(高値/低値)、WFA⁺-CSF1R の水準(高値/低値)を基準に 5 名ずつ 4 群に分類し、それぞれの血清から候補分子を免疫沈降し、

それをレクチンアレイ解析することで検証を進めた。

(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協力機関より供与頂いた。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も同様に供与頂いた。これらの組織ブロックから 5 μm 厚薄切組織を作製して、ホルコートスライドへマウントした。これを脱パラフィン処理後、レーザーマイクロダイセクションを用い、そのがん部および非がん部肝実質細胞領域から 1mm² の領域ずつ組織片を単離し、1.5 mL 容マイクロチューブへ移した。チューブ内の組織片は松田らの手法に従い前処理し、タンパク質溶液を得た。Cy3 標識後、その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 を示すレクチンを肝細胞がん検出候補レクチンとして選抜した。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特異的なシグナルを検出した。

C. 研究結果

(1) 先行マーカー候補の測定系の確立、正当性検証：統計解析の結果、(i)WFA⁺-CSF1R 値によって肝硬変患者の予後予測が可能であること(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) (ii) 早期 HCC 発症

予測が可能である事(詳細については分担研究者・大垣市民病院・熊田卓の項を参照) (iii) WFA⁺-CSF1R /total CSF1R は HCC の発症予測が可能である事(分担研究者・名古屋市立大学・田中靖人の項を参照) を示した。今後臨床上の有用性についてより明らかにする為に、自動検出系の開発や多施設共同研究による詳細な検討が必要だと考えている。

(2) 新規肝がんマーカーの探索：AFP 産生の低い培養細胞株 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シグナルを同定した。当該のレクチンを用いて、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

IGOT-LC/MS 法で同定した。AFP 低産生群からは延べ 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糖タンパク質が 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 糖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。絞り込んだ分子のうち 6 種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、検証を行った。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 種を同定した。うち 2 種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、マーカーとなる可能性を検討した。

(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が 10 種以上選ばれた。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 2 つの異なる分化度の癌が共存する肝がん患者 23 症例の組織標本からがん部 46 カ所、非がん部 23 カ所を単離し、解析した結果も加え、統計解析を行った。その結果、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。

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、あるいは肝細胞がんの発症リスクマーカーであると考えられた。ただし、臨床的な有用性についてはさらに詳細な検討を必要とすると思われる。今後は課題 2 のような多施設研究での検討を通し、マーカーの有用性を明確にする必要がある。

(2) 新規肝がんマーカーの探索：AFP 低産生細胞株群から多くの糖タンパク質候補分子が検出され、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検討を進めてきたが、今後はより多くの臨床検体を使用して正当性および有用性の検証をしていく予定である。

- (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。2つの異なる分化度の癌が共存する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す必要がある。

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、あるいは肝がんの発症リスクマーカーであると考えられた。
- (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分子群から、種々の方法によって候補分子を絞り込み、その検証を行った。
- (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正すことに成功した。

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.

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.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

1) 肝線維化マーカーに関する特許

登録：2件(日本 特 5441280 (2013/12/27)および 米国 8623608 (2014/1/7))

出願：1件(米国 14/051729 (2013/10/11))

2) 糖鎖解析装置に関する特許

登録：1件(米国 8597576 (2013/12/03))

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))

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

C 型慢性肝疾患における非侵襲的肝線維化測定法(ARFI/FibroScan)・血清線維化マーカーと
新規肝線維化糖鎖マーカー(WFA⁺-M2BP)の比較

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肝線維化マーカー(WFA⁺-M2BP)と、非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、C 型慢性肝炎患者でその有用性を比較・検討した。WFA⁺-M2BP は、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。

研究協力者

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

杉山真也 国立国際医療研究センター・肝炎・免疫研究センター・上級研究員

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臨床上重要であるが生検に頼らざるを得ない点が臨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、C 型慢性肝疾患における肝線維化マーカー(WFA⁺-M2BP)を報

告してきた (Kuno A, et al Science Reports 2013)。今回、FibroScan、ARFI といった非侵襲的な肝線維化測定法との有用性の比較する目的で以下の検討を行った。

B. 研究方法

検討 1: 2013 年 2 月 ~ 2013 年 10 月までに当院で腹部超音波検査時に FibroScan、VTQ を同時測定された 126 例の WFA⁺-M2BP の測定を行い、本マーカーの有効性を比較検討した。

C. 研究結果

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 1,2)

図1: WFA+M2BPはFibroScanで予測される線維化stageと相関する

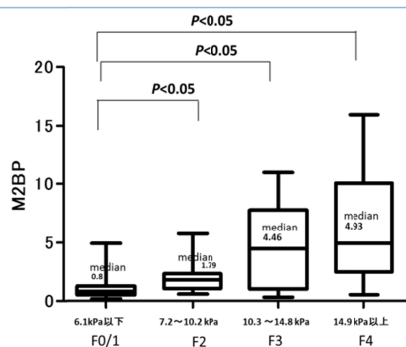
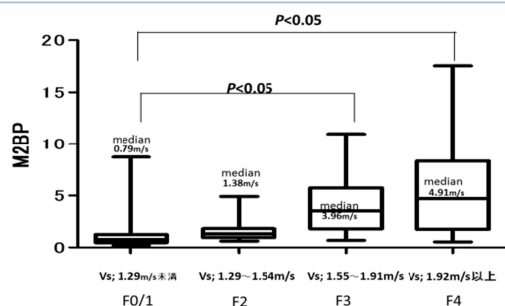


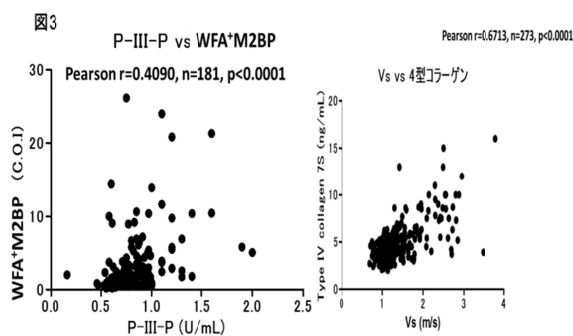
図2: WFA+M2BPはVTQで予測される線維化stageと相関する



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

一方で線維化の活動性を示す PIIIP と WFA⁺-M2BP の相関は前述の 4 種類の線維化マーカーより相関が低く、測定数は増加させても変化を認めなかった(図 3)。また VTQ は IVs collagen と相関していた。



D. 考察

肝線維化診断を簡便に行うことは、線維化進展例の絞り込みを容易に行えるだけでなく、肝細胞癌の早期発見に繋がる。

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、昨年報告した様に、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り、HBV、PBC では HCV の様な高い相関が確認されず、非 B 非 C の線維化には更なる検討が必要である。

E. 結論

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。

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, Yatsuhashi 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.

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.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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
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

研究要旨：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肝線維化マーカー(WFA⁺-M2BP)と、非侵襲的線維化診断法である ARFI (VTQ:m/s)・FibroScan(kPa)と同等の診断能力がある一方で、乖離例も存在する。
WFA⁺-M2BP の今後の臨床応用を考え、乖離する症例を検索したところ C 型慢性肝疾患の女性、特に高齢者で高値になることが明らかになった。また、IFN 投与中は一過性に上昇し、徐々に低下することも確認された。一方、非ウイルス肝疾患の伴う肝硬変例では、その値は HCV 関連肝硬変よりも低く、cut off 値を新規に作成する必要性が確認されたため、非アルコール性脂肪肝疾患の線維化診断のため、各施設より組織を集め 3 人の病理医と共に組織検討会を開催した。また非ウイルス肝炎発癌に伴う新規糖鎖抗原腫瘍マーカーの開発のため、線維化を伴わない肝細胞癌組織 35 症例を集め、解析中である。

研究協力者

杉山真也 国立国際医療研究センター・肝炎・免疫研究センター・上級研究員

山田剛太郎 川崎医科大学附属川崎病院・総合内科学 2・特任教授

鹿毛政義 久留米大学・病理学・教授

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臨床上重要であるが生検に頼らざるを得ない点が臨床上大きな隘路となっている。

われわれは、産業技術総合研究所の糖鎖医工学センターと共同研究することで、C 型慢性肝疾患における肝線維化マーカー(WFA⁺-M2BP)を報告してきた (Kuno A, et al Science

Reports 2013)。更なる検討にて、FibroScan、ARFI といった非侵襲的な肝線維化測定法と同等な識別能があることも確認され、高価な超音波装置を用いることなく、肝線維化進展例を抽出できることが明らかになる一方で、乖離例が存在する。臨床応用を勧めるうえで、どのような症例に注意すべきかを明らかにする目的で以下の検討を行った。

B. 研究方法

検討: 2013 年 2 月～2013 年 10 月までに当院で腹部超音波検査時に FibroScan、VTQ を同時測定された 236 例の WFA⁺-M2BP の測定を行いその値別に 1 未満、3 以上に分類し FibroScan、VTQ、一部は Fib4 index との乖離例を解析した。

C. 研究結果

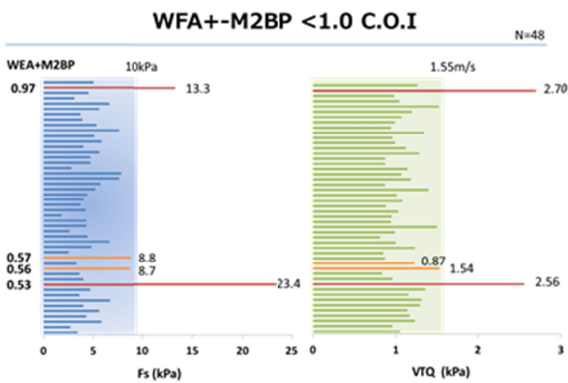
(1) Fib4 index との検討

$$\text{FIB-4 index} = (\text{年齢} \times \text{AST}) / (\text{血小板数} \times \text{ALT})$$

の平方根) (3.25 以上が severe fibrosis とされる) は欧米を中心に有効であると報告される一方で、年齢と血小板が利用されており、高齢者や門脈圧亢進を伴わない血小板低下例では線維化進展と診断されやすいと考えられる。WFA+-M2BP<2C.O.I 未満、Fib-43.25 以上と診断された 8 例では、VTQ, Fibroscan いずれも、高度線維化進展とは診断されず、Fib4 index は 75 歳以上・血小板 15 万未満では、overestimate しやすく、HCV 陽性者が高齢者に多い本邦では十分な注意が必要である。(下表)

Pt	Sex	Age	AST	ALT	PLT	Fib-4	M2BP	Vs	Fibroscan
1	F	75	22	16	11.2	3.683036	0.77	1.07	7.8
2	F	84	26	15	13.6	4.14637	0.94	1.21	6.6
3	M	74	27	25	10.9	3.666055	1.10	0.89	5.1
4	F	69	48	26	16.1	4.034389	1.13	1.08	2.8
5	M	82	38	22	14.9	4.458614	1.37	1.47	6.8
6	M	87	36	33	14.2	3.839516	1.78	1.24	4.6
7	F	60	50	59	11.2	3.487203	1.80	1.26	8.8
8	F	76	37	35	14.6	3.25558	1.46	1.14	6.1

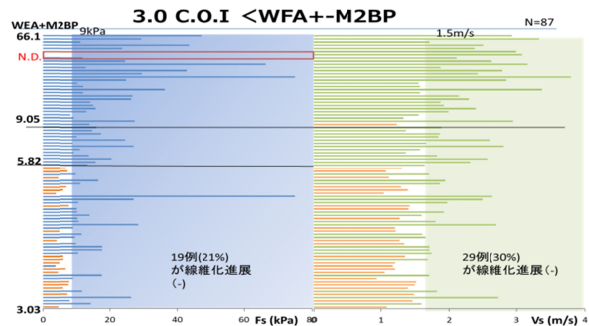
(2) WFA+-M2BP< 1 C.O.I での検討(下図)



上記の様に 2 例(4%)で WFA+-M2BP 低値に関わらず、FibroScan・VTQ で高値を示した。(下表)

Gender	Age	M2BP	Fib4	Kpa	VTQ平均	CAP	HCC	DM
F	65	0.53	7.889723	23.4	2.56	214	有	無
M	69	0.97	1.564566	13.3	2.70	281	無	有

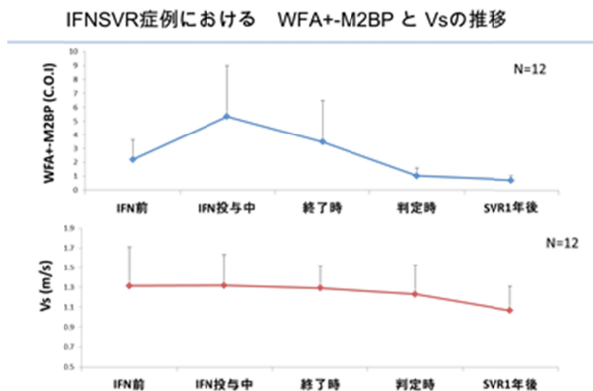
(3) WFA+-M2BP>3 C.O.I での検討(下図)



Fibroscan で 20%、VTQ で 30%高度線維化進展と診断されない症例が存在した。特に肝硬変と診断される COI>4 であって非線維化進展とされた 9 例は全員女性であった。(下表)

Gender	Age	M2BP	Fib4	Kpa	VTQ平均	CAP	HCC	DM
F	75	3.03	2.3134	4.6	1.08	195	無	無
F	86	3.06	5.57858	8.1	1.46	252	無	無
F	76	3.16	4.20473	7.3	1.48	227	無	無
F	42	3.26	2.84088	6	1.39	119	無	無
F	55	3.32	3.13703	7.6	1.49	185	無	無
M	51	3.48	3.09295	7.8	1.51	205	無	無
F	60	3.49	1.77428	9	0.93	257	無	無
F	77	3.6	2.80055	4.4	1.05	228	無	無
F	64	3.6	3.32839	6.8	1.2	212	無	無
M	75	3.66	2.51185	3.7	1.17	168	無	無
F	92	3.72	6.97087	4.9	1.2	180	無	無
M	64	3.78	2.82517	6	1.35	200	無	無
F	85	4.03	6.10303	4	1.27	193	無	無
F	69	4.3	5.5983	4.9	1.21	139	無	無
F	78	4.38	2.35612	9	1.2	172	無	無
F	68	4.87	4.17216	7.7	1.42	186	無	無
F	70	5.04	1.849	3.8	1.04	168	無	無
F	63	5.3	4.7121	7	1.29	230	無	無
F	85	5.72	6.57388	4.5	1.11	203	無	無
F	46	5.78	2.0612	6.9	1.3	199	無	無
		55	4.029	3.74022	6.2	1.2575	195.9	

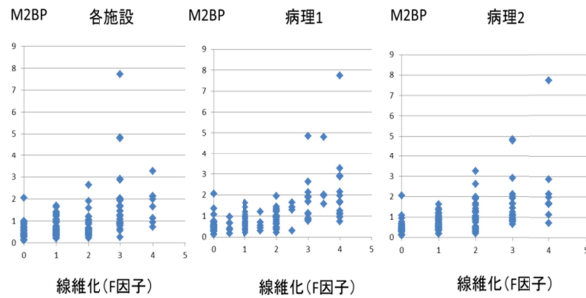
(4) IFN 投与中の WFA+-M2BP



IFN 投与は VTQ に影響を受けないも、WFA+-M2BP は、IFN 導入により一過性に上昇する。

(5) 多施設で集めた NASH 組織の再検討

多施設で NASH と診断された組織を 230 検体集め、3 人の病理に判定して頂いたところ、約 20% が NAFLD/NASH と診断できず、3 人の病理に一致率も 30% であった。



病理医の診断により、その線維化診断異なり、予後解析にも影響を与えかねないと考え、再度病理医と臨床医により解析を行い、NASH 線維化進展と WFA⁺-M2BP の解析を進めた。

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、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である。

本邦の C 型慢性肝疾患症例の多くは高齢者であり、今回の検討では、Fib4 index を用いての高齢者での解析には十分な注意が必要であり、WFA⁺-M2BP が 1(COI)未満であれば、非線維化進展と診断して良いと考えられる。一方で、同じ高齢者でも WFA⁺-M2BP が 4(COI)以上であっても女性では非線維化進展例が含まれ、特に 3~5COI の高齢・女性の線維化診断には、十分な検討が必要である。

一方で、HCV 以外での WFA⁺-M2BP 値についても検討が必要なため、NAFLD/NASH の検体を厳格に診断し、HCV での cut off 値より低値であることが確認された。非ウイルス肝炎例

での線維化診断・肝発癌予測には更なる新規糖鎖抗原マーカー、特に AFP/PIVKII よりも鋭敏な腫瘍マーカー開発が必要である。

E. 結論

WFA⁺-M2BP 低値であれば、高度線維化進展例は殆ど含まれないが、高齢女性の 3~5COI は overestimate する可能性があり、その診断には注意を要する

WFA⁺-M2BP は IFN 投与中高値となり、また非 HCV 症例では低値なり、疾患別の cut off が必要である。

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) 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.

- 3) 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.
- 4) 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.

- 5) Korenaga K, **Korenaga M**, Teramoto F, Suzuki T, Nishina S, Sasaki K, Nakashima Y, Tomiyama Y, Yoshioka N, Hara Y, Moriya T, Hino K. Clinical usefulness of non-protein respiratory quotient measurement in non-alcoholic fatty liver disease. Hepatol Res. 2013 Dec; 43(12):1284-1294.

2. 学会発表

- 1) **是永 匡紹**、西田 奈央、溝上 雅史、高齡・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。

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

C 型慢性肝炎における WFA+-M2BP を用いた非侵襲的肝線維化評価に関する研究

泉 並木 武蔵野赤十字病院・副院長

研究要旨：C 型慢性肝炎において肝線維化は発癌や予後と関連しているため、線維化を正確に評価することは臨床上極めて重要である。肝線維化評価の Golden standard は肝生検であるが、侵襲を伴うため、合併症を有する患者、高齢者などでは簡便に行うことができない。そこで本研究では WFA+-M2BP を用いた非侵襲的肝線維化評価の検討を行った。武蔵野赤十字病院において肝生検を施行した C 型慢性肝炎患者 97 例を対象とし、肝生検時の WFA+-M2BP を測定し、肝生検による線維化診断と比較をおこなった。それぞれの線維化ステージにおける WFA+-M2BP の平均値は F1/F2/F3/F4 で 1.48/2.63/3.15/7.29 と線維化の進行にしたがって WFA+-M2BP が上昇する有意な相関関係があった。特に肝硬変症例の診断において WFA+-M2BP が有用であった。WFA+-M2BP は簡便に測定可能であり、高い線維化診断能を有していることから、肝生検にかわる肝線維化診断法として用いることが可能である。

研究協力者

黒崎雅之 武蔵野赤十字病院・消化器科・
部長

玉城信治 武蔵野赤十字病院・消化器科・
医師

A. 研究目的

C 型慢性肝炎において肝線維化は発癌や予後と関連しているため、線維化を正確に評価することは臨床上極めて重要である。肝線維化評価の Golden standard は肝生検であるが、侵襲を伴うため、合併症を有する患者、高齢者などでは簡便に行うことができない。WFA+-M2BP は血液サンプルを用いて非侵襲的に肝線維化を評価する新しい検査手法であり、その有用性が検討されている。そこで本研究では C 型慢性肝炎における WFA+-M2BP の肝線維化診断の有用性を検討することを目的とした。

B. 研究方法

武蔵野赤十字病院にて 2011 年以降に肝生検を行い、同時に血液サンプルの保存された 97 例を対象とした。血液サンプルからそれぞれ WFA+-M2BP を測定し、肝生検による線維化診断と比較を行った。これらの症例は肝生検と同時に超音波を用いた非侵襲的肝線維化診断法として有用性が報告されている Real-time tissue elastography(RTE)を行っている。そこで RTE から算出される肝線維化予測値である LF index と WFA+-M2BP の有用性を比較した。

C. 研究結果

97 例の線維化の内訳は F1:39 例、F2:24 例、F3:23 例、F4:11 例であった。それぞれのステージにおける WFA+-M2BP の平均値は F1/F2/F3/F4 でそれぞれ 1.48/2.63/3.15/7.29 と線維化の進行にしたがって WFA+-M2BP が上昇する有意な相関関係があった。特に F4 症例の診

断に極めて有用であり、ROC 解析を行うと F4 症例診断における WFA+-M2BP の AUC は 0.90 と極めて高値であった。これは LF index による線維化診断よりも有用であった。WFA+-M2BP を用いることによって 7 割の症例を 99%の精度で肝硬変の有無を見分けることが可能であった。

D. 考察

WFA+-M2BP を測定することによって、肝線維化を正確に診断することが可能であった。肝生検は侵襲を伴い、医療費も高額となるが、WFA+-M2BP は血液サンプルを用いて極めて簡便に測定することが可能である。また既知の超音波を用いた肝線維化診断法と比較しても有用であることが示された。これらのことから WFA+-M2BP は肝生検に代わる、簡便な線維化診断法として活用できる可能性が示唆された。

E. 結論

WFA+-M2BP は C 型慢性肝炎における肝線維化診断法として有用である。

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) Osaki Y, Ikeda K, **Izumi N**, Yamashita S, Kumada H, Hatta S, Okita K. Clinical effectiveness of bipolar radiofrequency ablation for small liver cancers. J Gastroenterol. 2013 Jul; 48(7):874-883.
- 3) Sato A, Sata M, Ikeda K, Kumada T, **Izumi N**, Asahina Y, Osaki Y, Chayama K, Kaneko S, Sakai A, Onji M, Hiasa Y, Omura T, Ozeki I, Yokosuka O, Shiina S, Itsubo M, Nishiguchi S, Hirano K, Ide T, Sakisaka S, Yamasaki T, Hidaka I, Tanaka M, Kim SR, Ichida T. Clinical characteristics of patients who developed hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus eradication with interferon therapy: current status in Japan. Intern Med. 2013 Jul; 52(24):2701-2706.
- 4) Ikeda K, **Izumi N**, Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Kumada H. Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B. Hepatol Res. 2013 Jun; 43(6):596-604.
- 5) Abe T, Hashiguchi A, Yamazaki K, Ebinuma H, Saito H, Kumada H, **Izumi N**, Masaki N, Sakamoto M. Quantification of collagen and elastic fibers using whole-slide images of liver biopsy specimens. Pathol Int. 2013 Jun; 63(6):305-310.
- 6) Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M, **Izumi N**, Ichida T, Kudo M, Ku Y, Sakamoto M, Nakashima O, Matsui O,

Matsuyama Y. Comparison of resection and ablation for hepatocellular carcinoma: A cohort study based on a Japanese nationwide survey. J Hepatol. 2013 Apr; 58(4):724-729.

- 7) Arao T, Ueshima K, Matsumoto K, Nagai T, Kimura H, Hagiwara S, Sakurai T, Haji S, Kanazawa A, Hidaka H, Iso Y, Kubota K, Shimada M, Utsunomiya T, Hirooka M, Hiasa Y, Toyoki Y, Hakamada K, Yasui K, Kumada T, Toyoda H, Sato S, Hisai H, Kuzuya T, Tsuchiya K, **Izumi N**, Arii S, Nishio K, Kudo M. FGF3/FGF4 amplification and multiple lung metastases in responders to sorafenib in hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2013 Apr; 57(4):1407-1415.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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
今井康陽 市立池田病院・病院長

研究要旨：C 型肝炎関連肝細胞癌患者において肝細胞癌切除術、ラジオ波焼灼術(RFA) 前の血漿より新規肝糖鎖マーカーWFA⁺-M2BP を測定し、肝線維化進展度、肝細胞癌再発率との関連について検討した。対象は C 型肝炎関連肝細胞癌患者 115 例(男性 84 例;73.0%)、年齢の中央値 70.0 歳(47-88 歳)、病理所見は F stage (0-1/2/3/4): 30/14/36/35 例であった。WFA⁺-M2BP は F stage の進行に伴って有意な増加を認め、WFA⁺-M2BP は C 型肝炎関連肝細胞癌患者において、術前非侵襲的肝線維化マーカーとして有用であると考えられた。また肝切除、RFA 後の無再発生存に寄与する因子として WFA⁺-M2BP は抽出されなかったが、F4 で腫瘍数 1 の症例群においては WFA⁺-M2BP 高値の症例の再発率が高い傾向にあり、組織学的線維化進展例と診断された症例の中でも WFA⁺-M2BP 値によりさら肝細胞癌治療後の再発の高危険群を層別化できる可能性が示唆された。

研究協力者
澤井良之 市立池田病院・消化器内科・副部長
倉橋知英 市立池田病院・消化器内科・専攻医

A. 研究目的

肝細胞癌に対する肝切除ラジオ波焼灼術(RFA) による治療後の予後規定因子としては、現在、Stage 分類、脈管侵襲、肝機能、腫瘍数などが挙げられている。

最近、肝組織の特異的糖鎖変化をとらえる Mac2 binding protein (WFA⁺-M2BP) が血中で測定できることが報告された(Kuno A, et al. Scientific Reports 2013;3:1065)。

今回、C 型肝炎関連肝細胞癌患者において肝細胞癌切除術、ラジオ波焼灼術前の血清より

WFA⁺-M2BP を測定し、術前線維化マーカーとしての有用性と早期再発予測因子としての有効性を明らかにする。

B. 研究方法

(2001 年 3 月～2012 年 2 月まで、市立池田病院及び大阪大学医学部付属病院にて肝細胞癌に対し肝切除術あるいはラジオ波焼灼療法にて治療された C 型肝炎関連肝細胞癌患者 115 例について、術前採取した凍結血漿検体中の WFA⁺-M2BP を測定した。肝線維化の診断には手術検体、肝生検検体を用い、背景肝の組織学的所見より新犬山分類(F0-4) に従って評価した。

WFA⁺-M2BP の線維化マーカーとしての有用性について 型コラーゲン 7S、ヒアルロン酸、および FIB-4 と比較検討した。

WFA⁺-M2BP の肝早期再発予測因子としての有効性を検討するため、Cox 比例ハザードモデル

によって多変量解析を行った。

(倫理面への配慮)

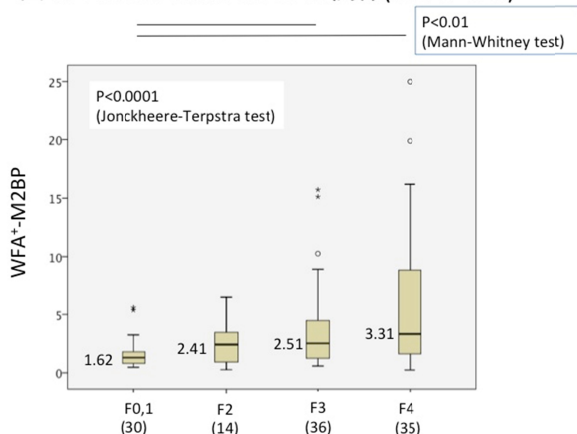
当研究は凍結保存検体(血液)、病理組織診断データを用いた臨床研究であり、市立池田病院、大阪大学医学部附属病院の臨床研究に関する倫理委員会の承認下に施行している。また、検体の採取・使用に関しては全例で患者本人の同意を確認している。

C. 研究結果

対象は C 型肝炎関連肝細胞癌患者 115 例(男性 84 例;73.0%)、年齢の中央値 70.0 歳(47-88 歳)、病理所見は F stage (0-1/2/3/4): 30/14/36/35 例であった。

病理所見を gold standard とし、F stage ごとの WFA⁺-M2BP 値を検討したところ、F stage の進行に伴って WFA⁺-M2BP 値の増加を認めた (P<0.0001 ; Jonckheere-Terpstra test)。また、F0-1, F3 群間、F0-1, F4 群間にも有意差を認めた (Bonferroni 法にて補正した Mann-Whitney test) (図 1)。

図 1. F score と WFA⁺-M2BP の関係 (HCV n=115)



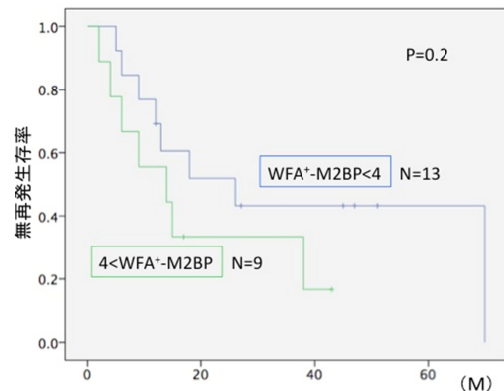
F ≥ 2 予測における AUROC を検討すると、型コラーゲン 7S、ヒアルロン酸、FIB-4、WFA⁺-M2BP の AUROC はそれぞれ 0.74, 0.70, 0.67, 0.70、F ≥ 3 予測では 0.72, 0.64, 0.67, 0.67、F ≥ 4 予測では 0.68, 0.69, 0.62, 0.69 であった。今回の検討では肝線維化ステージ診断能は他の

血清マーカーと同等であった。

C 型肝炎関連肝細胞癌患者 115 例中 57 例 (49.7%) に肝細胞癌再発がみられた。

Kaplan-Meier 法にて検討したところ、累積無再発生存率は 3 年で 46.3%、5 年で 34.6% であった。性、年齢、Child-pugh grade、線維化、腫瘍数、Stage 分類、最大腫瘍径、分化度、AFP、PIVKA-II、WFA⁺-M2BP について Cox 比例ハザードモデルによって多変量解析を行ったところ、無再発生存に寄与する因子としては腫瘍数のみが抽出された (ハザード比 : 1.73, 95% CI: 1.19-2.49, p<0.0005)。そこで、腫瘍数 1 かつ F4 の症例 22 例について検討すると、有意差は認められなかったが WFA⁺-M2BP 値 4 以上の症例 (n=9) において 4 以下症例 (n=13) に比し、無再発生存率が低い傾向が見られた (p=0.2、図 2)。

図 2. 無再発生存率 (HCV, 腫瘍数 1, F4; n=22)



D. 考察

血中 WFA⁺-M2BP は F stage の進行に伴って有意な増加を認めた。

肝切除、RFA 後の無再発生存に寄与する因子として、血中 WFA⁺-M2BP は抽出されなかった。しかし、F4、腫瘍数 1 の症例群においては WFA⁺-M2BP 高値の症例の再発率が高い傾向にあった。組織学的線維化進展例と診断された症例の中でも WFA⁺-M2BP 値によりさら肝細胞癌治療後の再発の高危険群を層別化できる可能性が示唆された。

E. 結論

血中 WFA⁺-M2BP は C 型肝炎関連肝細胞癌患者において、術前非侵襲的肝線維化マーカーとして有用である。線維化進展例においては、肝細胞癌治療後の再発を予見できるマーカーである可能性がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Fukuda K, **Imai Y**, Hiramatsu N, Irishio K, Igura T, Sawai Y, Kogita S, Makino Y, Mizumoto R, Matsumoto Y, Nakahara M, Zushi S, Kajiwara N, Oze T, Kawata S, Hayashi N, Takehara T. Renal impairment during the treatment of telaprevir with peginterferon and ribavirin in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol Res.* 2014 Jan; In press.
- 2) Inoue T, Hyodo T, Murakami T, Takayama Y, Nishie A, Higaki A, Korenaga K, Sakamoto A, Osaki Y, Aikata H, Chayama K, Suda T, Takano T, Miyoshi K, Koda M, Numata K, Tanaka H, Iijima H, Ochi H, Hirooka M, **Imai Y**, Kudo M. Hypovascular Hepatic Nodules Showing Hypointense on the Hepatobiliary-Phase Image of Gd-EOB-DTPA-Enhanced MRI to Develop a Hypervascular Hepatocellular Carcinoma: A Nationwide Retrospective Study on Their Natural Course and Risk Factors. *Dig Dis.* 2013 Nov; 31(5-6):472-479.
- 3) Sasaki M, Kondo F, Sawai Y, **Imai Y**, Kadowaki S, Sano K, Fukusato T, Matsui O, Nakanuma Y. Serum amyloid A-positive hepatocellular neoplasms in the resected livers from 3 patients with alcoholic cirrhosis. *Histol Histopathol.* 2013 Nov; 28(11):1499-1505.
- 4) Makino Y, **Imai Y**, Igura T, Kogita S, Sawai Y, Fukuda K, Hori M, Kudo M, Murakami T. Usefulness of the Extracted-Overlay Function in CT/MR-Ultrasonography Fusion Imaging for Radiofrequency Ablation of Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis.* 2013 Nov; 31(5-6):485-489.
- 5) Makino Y, **Imai Y**, Igura T, Hori M, Fukuda K, Sawai Y, Kogita S, Ohama H, Matsumoto Y, Nakahara M, Zushi S, Kurokawa M, Isotani K, Takamura M, Fujita N, Murakami T. Utility of computed tomography fusion imaging for the evaluation of the ablative margin of radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma and the correlation to local tumor progression. *Hepatol Res.* 2013 Sep; 43(9):950-958.
- 6) Ohama H, **Imai Y**, Nakashima O, Kogita S, Takamura M, Hori M, Seki Y, Sawai Y, Igura T, Fukuda K, Makino Y, Morimoto O, Ohsawa M, Sakamoto M, Murakami T. Images of Sonazoid-enhanced ultrasonography in multistep hepatocarcinogenesis: comparison with Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI. *J Gastroenterol.* 2013 Aug; In press.
- 7) Takemura T, Yoshida Y, Kiso S, Kizu T, Furuta K, Ezaki H, Hamano M, Egawa M, Chatani N, Kamada Y, **Imai Y**, Higashiyama S, Iwamoto R, Mekada E, Takehara T. Conditional loss of heparin-binding EGF-like growth factor results in enhanced liver fibrosis after bile duct ligation in mice. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Jul; 437(2):185-191.

- 8) Higashitani K, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Matsubara T, Kakita N, Oze T, Miyazaki M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Mita E, **Imai Y**, Kasahara A, Okuno A, Takikawa O, Hayashi N, Takehara T. Association of enhanced activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection. J Gastroenterol. 2013 May; 48(5):660-670.
- 9) Harada N, Hiramatsu N, Oze T, Yamada R, Kurokawa M, Miyazaki M, Yakushijin T, Miyagi T, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Oshita M, Mita E, Hagiwara H, Inui Y, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, **Imai Y**, Inoue A, Hayashi N, Takehara T. Incidence of hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients with normal alanine aminotransferase levels categorized by Japanese treatment guidelines. J Gastroenterol. 2013 Apr; 48(4):535-543.

2. 学会発表

- 1) 倉橋 知英、井倉 技、**今井 康陽**、福田 和人、澤井 良之、小来田 幸世、牧野 祐紀、水本 壘、大西 孝典、卜部 彩子、八木 麻衣、松本 康史、中原 征則、厨子 慎一郎、黒川 正典、関 康. アオナゾイソ造影エコーによる肝細胞癌に対する分子標的治療薬の早期治療効果予測に関する検討. 第 17 回日本肝臓学会大会. 2013.10.09-12. 東京.
- 2) 澤井 良之、**今井 康陽**、卜部 彩子、八木 麻衣、大西 孝典、倉橋 知英、牧野 祐紀、小来田 幸世、井倉 技、福田 和人、梶原 信之、入潮 佳子、黒川 正典、小瀬 嗣子、平松 直紀、竹原 徹郎. C 型慢性肝炎に対する Peg-IFN 2b/Ribavirin/Telaprevir 併用療法における腎障害および高尿酸血症に関する検討. 第 49 回日本肝臓学会総会. 2013.06.07. 東京. P-194.
- 3) 菅 理恵、**今井 康陽**、福田 和人、井倉 技、澤井 良之、小来田 幸世、卜部 彩子、牧野 祐紀、八木 麻衣、倉橋 知英、大西 孝典、水本 壘、松本 康史、中原 征則、厨子 慎一郎、黒川 正典、片山 和宏. C 型慢性肝炎に対する Peg-IFN 2b/Ribavirin/Telaprevir 併用療法の早期治療効果、副作用に関する検討. 第 49 回日本肝臓学会総会. 2013.06.07. 東京. P-208.
- 4) 牧野 祐紀、井倉 技、**今井 康陽**. Volume Navigation System における enhanced-overlay 機能を用いた RFA 治療支援と効果判定の試み. 第 49 回日本肝臓学会総会. 2013.06.06-07. 東京. パネルディスカッション 2「肝画像診断の進歩と pitfall」.
- 5) 澤井 良之、**今井 康陽**、福田 和人、井倉 技、小来田 幸世、牧野 祐紀、黒川 正典、高村 学、大橋 寛嗣、中島 収、佐々木 素子、中沼 安二、北尾 梓、松井 修. アルコール性肝障害を基礎に発症した FNH-like nodule と肝細胞癌の画像、病理学的所見の比較検討. 第 49 回日本肝臓学会総会. 2013.06.06-07. 東京. ワークショップ 2「良性肝細胞性結節の諸問題：肝細胞線種、限局性結節性過形成を含む過形成結節の基礎と臨床」.
- 6) 井倉 技、塩見 浩也、福田 和人、澤井 良之、小来田 幸世、水本 壘、牧野 祐紀、大西 孝典、倉橋 知英、八木 麻衣、呉 隆進、中村 仁信、**今井 康陽**. 肝細胞癌に対する定位放射線療法における EOB-MRI を用いた肝小体積耐容線量に関する検討. 第 49 回日本肝臓学会総会. 2013.06.06-07. 東京.
- 7) 福田 和人、澤井 良之、小来田 幸世、牧野 祐紀、岡田 拓也、津川 真美子、井倉 技、**今井 康陽**. 糖尿病患者の NAFLD/NASH 発

症・進行における内臓脂肪の関与. 第 49 回日本肝臓学会総会. 2013.06.06-07. 東京.

- 8) 入潮 佳子、**今井 康陽**、福田 和人、井倉 技、澤井 良之、小来田 幸世、卜部 彩子、牧野 祐紀、八木 麻衣、倉橋 知英、大西 孝典、水本 壘、松本 康史、中原 征則、厨子 慎一郎、黒川 正典、小瀬 嗣子、平松 直紀、竹原 徹郎. Peg-IFN 2b/Ribavirin/Telaprevir 併用療法における貧血に關与する因子の検討. 第 49 回日本肝臓学会総会. 2013.06.06. 東京.
- 9) 福田 和人、関 康、一樋 政宏、比嘉 裕次、小来田 幸世、澤井 良之、井倉 技、**今井 康陽**. 超音波検査にて診断・経過観察した下行結腸腹膜垂炎の一例. 日本超音波医学会第 86 回学術集会. 2013.05.24 . 大阪.
- 10) 福田 和人、関 康、一樋 政宏、比嘉 裕次、小来田 幸世、澤井 良之、井倉 技、**今井 康陽**. NAFLD/NASH における腹膜前脂肪/皮下脂肪比評価の意義. 日本超音波医学会第 86 回学術集会. 2013.05.24. 大阪.
- 11) 小来田 幸世、関 康、牧野 祐紀、澤井 良之、井倉 技、福田 和人、森本 修邦、柴田 邦隆、

今井 康陽. 肝細胞癌における超音波カテゴリ分類を用いた判定についての検討. 日本超音波医学会第 86 回学術集会. 2013.05.24. 大阪.

- 12) 関 康、小来田 幸世、澤井 良之、井倉 技、比嘉 裕次、一樋 政宏、宇戸 朋之、**今井 康陽**. 胆嚢病変における超音波カテゴリ分類の有用性についての検討. 日本超音波医学会第 86 回学術集会. 2013.05.24. 大阪.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

肝線維化マーカーの臨床的検討と肝癌悪性化マーカーの検出
調 査 九州大学大学院・医学研究院・消化器・総合外科・准教授

研究要旨：1.肝線維化マーカーの臨床的検討：本研究班で新規レクチンアレイ法による画期的な線維化マーカーとして *Wisteria floribunda* agglutinin-positive human Mac-2 binding protein (WFA⁺-M2BP)が同定されたことから臨床的な意義の検証を行った。糖鎖の発現と肝線維化の相関解析には、肝炎/肝硬変/肝癌 240 症例における肝切除症例/肝移植症例における術前の血液サンプルを用いて、肝線維化マーカーとしての有用性を検討した。血清 WFA⁺-M2BP 値は、肝線維化(カットオフ、F0:1.62, F1:1.82, F2:3.02, F3:3.32, F4:3.67)の進行に伴い、有意に増加した。ROC 曲線を用いた解析では、肝線維化を診断する WFA⁺-M2BP 値による AUROC 値は 0.812 であり、最新の肝線維化の指標である VTTQ 値を用いた AUROC 値 0.814 に匹敵するとともに、LMR index 0.766, APRI 0.694, 血清ヒアルロン酸値 0.683, 血清 4 型コラーゲン値 0.625 よりも有意に優れた診断能を認めていた。WFA⁺-M2BP の測定は肝線維化マーカーとして臨床上有用であることが明らかとなった。2. 肝癌悪性化マーカーの検出：われわれは産業技術総合研究所と共同で肝癌悪性化のマーカーを検出するため、異なる分化度の存在するいわゆる nodule-in-nodule の肝癌で laser microdissection を行い、異なる分化度の腫瘍部分で相互にレクチンマイクロアレイを行うことで、肝癌悪性度のマーカーを検出する研究に着手した。

研究協力者

戸島剛男 九州大学大学院・消化器・総合外科・医師(共同研究員)
吉屋匠平 九州大学大学院・消化器・総合外科・大学院生

A. 研究目的

(1) 肝線維化マーカーの臨床的検討：

慢性肝疾患の問題点として、経時的に肝線維化、肝硬変へと進展し、肝機能が低下することが挙げられる。また、肝硬変は肝癌発症の大きな成因の一つでもある。現在、肝線維化の状態

を診断するためには侵襲的な検査である、肝生検が必須となっている。非侵襲的な検査法として、VTTQ や fibroscan などの検討がなされているが検査実施者の技術に依存することもあり確立された検査方法ではない。近年、肝線維化の糖鎖マーカーとして新規レクチンアレイ法による画期的な線維化マーカーとして *Wisteria floribunda* agglutinin-positive human Mac-2 binding protein (WFA⁺-M2BP)が同定された。WFA⁺-M2BP と肝線維化の相関が解明されれば、検査実施者の技術によらない血液検査からのみで肝線維化の状態を把握することが可能となる。上記糖鎖の発

現と肝線維化の相関解析には、肝炎/肝硬変/肝癌症例における肝切除症例/肝移植症例における術中・術前の血液サンプルを用いて、肝線維化マーカーとしての有用性を検討するとともに、肝切除術後の腹水発生状況との関連を検討する予定である。

(2) 肝癌悪性化マーカーの検出：

肝癌は分化度により、悪性度が異なることが報告されており、低分化になるほど、悪性度が高い。したがって、治療前よりその腫瘍の biological behavior が明らかになれば、治療方針決定に重要な情報となる。

B. 研究方法

(1) 肝線維化マーカーの臨床的意義の検討：

2000年1月1日から2013年12月31日までに九州大学病院で肝切除・肝移植施行した症例のうち、術前に非侵襲的肝線維化測定方法である VTTQ 値と血液学的線維化マーカー(血清ヒアルロン酸値、血清コラーゲン値、血清 APRI 値)を測定し得た 240 症例において、検査施行後の余剰血液サンプルを対象とする。

解析方法としては、これら線維化マーカーが測定済みである 240 症例の対象患者において、すでに採取済みである余剰血液サンプルを用いて、肝線維化マーカーとして同定された WFA⁺-M2BP の測定を行い、WFA⁺-M2BP 値と線維化(F0-4)の相関を解析、同時に既に測定済みである VTTQ 値や血液学的線維化マーカー(血清ヒアルロン酸値、血清コラーゲン値、血清 APRI 値)を比較検討した。

(2) 肝癌悪性化の糖鎖マーカーの検出：

24 症例の異なる分化度の存在するいわゆる nodule-in-nodule の肝癌で laser microdissection を行い、異なる分化度の腫瘍について相互にレクチンマイクロアレイを行うこ

とで、ターゲットとなる糖鎖マーカーを検出する。

(倫理面への配慮)

本研究は、上述の通り健康被害が発生する介入研究ではない。

臨床上必要に応じて既に採取された血液のうち、すでに検査施行後の余剰血液サンプルを用いた臨床研究であり、新たなサンプル採取などの不利益は生じない。その他の線維化マーカー(VTTQ 値：腹部エコーと同等、血清ヒアルロン酸値・血清コラーゲン値・血清 APRI 値)や肝切除術後の腹水発生状況(肝細胞癌の肝切除症例 60 症例、臨床上既に測定済み)に関しては、臨床上通常の前検査として既に測定済みであるので、新たな医療費など発生することはなく、不利益は生じない。

被験者が得られる利益としては、余剰血液サンプルを用いた WFA⁺-M2BP 値を測定することで、肝線維化の予測がより正確となり、手術に際しての術式決定・術後管理における投薬治療、または肝炎に対する投薬治療の参考となり、肝切除術後もよりよい治療が行えるという利益が生まれると考えられる。

肝癌悪性化の糖鎖マーカーについては通常の病理業務の残余プレパラートを用いて、連結不可能匿名化を行い、検討を進めることで、倫理的な問題はない。

なお、本研究は九州大学の臨床研究倫理審査委員会における承認を得て行われた。

C. 研究結果

(1) 肝線維化マーカーの臨床的意義の検討：

血清 WFA⁺-M2BP 値は、肝線維化(カットオフ、F0:1.62, F1:1.82, F2:3.02, F3:3.32, F4:3.67)の進行に伴い、有意に増加した。ROC 曲線を用いた解析では、肝線維化を診断する WFA⁺-M2BP 値による AUROC 値は 0.812

であり、VTTQ 値を用いた AUROC 値 0.814 に匹敵するとともに、LMR index 0.766, APRI 0.694, 血清ヒアルロン酸値 0.683, 血清 4 型コラーゲン値 0.625 よりも有意に優れた診断能を認めていた。

(2) 肝癌悪性化の糖鎖マーカーの検出：

レクチンマイクロアレイを終了し、候補となる糖鎖マーカーを 2 つに絞込んでいる。

D. 結論

WFA+ -M2BP の測定は肝線維化マーカーとして臨床上有用であることが明らかとなった。今後、肝癌悪性度マーカーとして有望な糖鎖を有する蛋白が明らかになりつつある。

E. 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. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

新規肝線維化マーカー-WFA⁺-M2BP の肝臓外科学領域における診断基準の検討

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

研究要旨:新規肝線維化マーカーである血清 WFA⁺-M2BP の肝臓外科領域における診断基準を確立するため、まず血清レベルに影響を与える臨床病理学的因子を検討した。その結果、性別、HCV 感染、ICG-R15、アルブミン、ALT、総ビリルビン、肝硬変が有意な独立影響因子であった。

血清 WFA⁺-M2BP の COI 値は、HCV 感染により有意に上昇するが、HCV 陰性および陽性両群において肝線維化の重症度に伴う上昇を示しマーカーとして機能することが期待されたため、両群間での COI 値の調整式を導出した。

調整 COI 値の肝線維化(F1-4) 診断基準として 1.048、肝硬変(F4) 診断基準として 1.780 を用いると、感度および特異度はそれぞれ、57.1%および 79.3%、43.1%および 86.2%であり、HCV 陰性および陽性症例におけるサブグループ解析においても同等の肝線維化予測能を示した。

このように、血清 WFA⁺-M2BP は肝臓外科領域において組織学的肝線維化およびそれに伴う肝機能障害を総合的に反映する術前マーカーとして、HCV 陰性および陽性群いずれにも適用可能と考えられる。

A. 研究目的

新規肝線維化マーカー-WFA⁺-M2BP の肝臓外科領域への適用のための診断基準を構築すること。

B. 研究方法

当研究では、2001 年 5 月から 2012 年 2 月までに当科で初回肝切除術を施行した 376 例の HCC 患者を対象としており、全例で術前に採取された血清標本が凍結保存されていた。これらの検体を用いて血清 WFA⁺-M2BP レベルを測定した。臨床病理学的因子としては、性別、年齢、HBV 感染、HCV 感染、ICG-R15、PT、血小板数、アルブミン、ALT、総ビリルビン、AFP、AFP-L3、PIVKA II、腫瘍数、最大腫瘍径、リンパ節転移、血管侵襲、腫瘍分化度、線維化ステージおよび術式を用いた。

(1) 血清 WFA⁺-M2BP レベルに影響を与える臨床病理学的因子の検討:

臨床病理学的因子の血清 WFA⁺-M2BP に対する影響を評価するため、各因子により層別化した 2 群間で血清 WFA⁺-M2BP の COI 値を比較し、Wicoxon 順位和検定により検定した。続いて単変量解析にて優位であった因子を共変量とする重回帰モデルを用いた多変量解析を行った。

(2) 血清 WFA⁺-M2BP レベルの HCV 陰性および陽性症例間における調整:

血清 WFA⁺-M2BP は HCV 陰性症例および陽性症例両群において、肝線維化マーカーとして機能するが、その血清レベルは HCV 陽性症例において有意に高いため、両群間での値の調整を行った。我々は、HCV 陰性症例における血清 WFA⁺-M2BP レベルが 2 次以下の多項式変換に

より陽性症例における同等の値に変換可能であることと、調整された血清レベルは肝硬変(F4)の診断において HCV 陰性および陽性の両群で同じ診断閾値を有することを仮定し、多項ロジスティックモデルにおいて AIC を基準とするモデル選択を行い、HCV 陰性および陽性間での血清 WFA⁺-M2BP レベルの調整式を導出した。

(3) 血清 WFA⁺-M2BP の調整 COI 値を用いた診断基準の構築：

血清 WFA⁺-M2BP の調整 COI 値の F1 以上の肝線維化の診断閾値に F0 症例における調整 COI 値の 80 パーセンタイル値を、肝硬変(F4) の診断閾値に F3 症例における 80 パーセンタイル値を用いた。

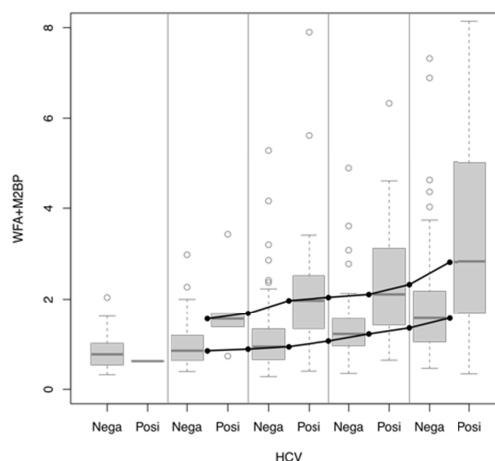
C. 研究結果

(1) 血清 WFA⁺-M2BP レベルに影響を与える臨床病理学的因子の検討：

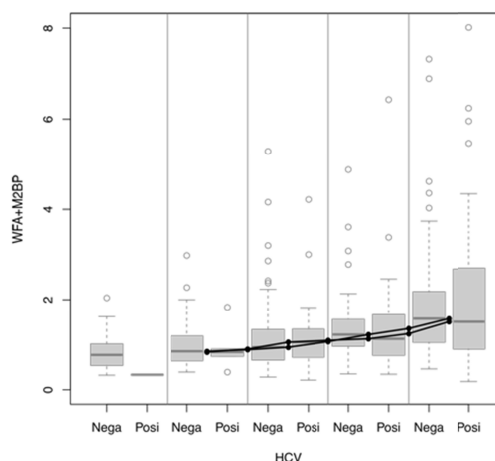
単変量解析における血清 WFA⁺-M2BP に対する有意な影響因子は、性別、HCV 感染、ICG-R15、PT、血小板数、アルブミン、ALT、総ビリルビン、腫瘍数、最大腫瘍径、肝線維化および肝硬変であった。このうち、性別(女性)、HCV 感染(陽性)、ICG-R15(>15%)、アルブミン(≤3.5g/mL)、ALT(>65IU/L)、総ビリルビン(>1.5mg/dL)、肝硬変(F4) は多変量解析においても有意な独立影響因子であった。

(2) 血清 WFA⁺-M2BP レベルの HCV 陰性および陽性症例間における調整：

HCV 感染により層別化した場合の各群における血清 WFA⁺-M2BP の COI 値は、下図のように両群において肝線維化の重症度に伴い上昇傾向を示したが、その値は HCV 陽性群で有意に高値を示した。



我々は、血清 WFA⁺-M2BP に関する HCV 陰性および陽性症例間における調整式として、
 $adjusted\ COI = COI\ (if\ HCV\ negative)\ or\ 0.534 * COI\ (if\ HCV\ positive)$
 を得た。この変換により、下図のように各線維化ステージにおける血清 WFA⁺-M2BP レベルの HCV 陰性および陽性症例間の群間差はほぼ解消した。



(3) 血清 WFA⁺-M2BP の調整 COI 値を用いた診断基準の構築：

正常肝(F0) 症例における血清 WFA⁺-M2BP の調整 COI 値の 80 パーセンタイル値は 1.048 であった。この値は、健常人検体における平均 + 2.5SD 値である 1.0 に近似していた。調整 COI=1.048 を F1 以上の肝線維化の診断基準として用いた場合、感度は 57.1%、特異度は 79.3%であった。

F3 症例における 80 パーセンタイル値は 1.780

であり、調整 COI=1.780 を肝硬変(F4) の診断基準として用いた場合、感度は 43.1%、特異度は 86.2%であった。

HCV 陰性および陽性症例をそれぞれ対象としたサブグループ解析では、上記診断基準の感度および特異度は両群で同等であった。

D. 考察

血清 WFA⁺-M2BP は組織学的な肝線維化に加え、肝機能も反映しており、肝線維化の進行を総合的に示すマーカーである可能性が示唆された。

血清 WFA⁺-M2BP は HCV 感染により有意に上昇するが、陰性群および陽性群それぞれにおいて肝線維化の重症度に伴う上昇傾向を示し、肝線維化マーカーとしての機能が期待されたため、両群間での COI 値の調整を行ったところ、群間差はほぼ解消され、組織学的肝線維化の予測診断能も両群で同等となった。

E. 結論

血清 WFA⁺-M2BP は肝機能障害を含めた肝線維化の進行を反映する総合的な肝線維化マーカーであり、測定値の COI 値を調整することにより、HCV 陰性および陽性症例の両群において切除検体における肝線維化ステージの術前予測因子として機能した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuizaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T, **Taketomi A**, Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S. Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor κB/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis*. 2014 Feb; 35(2):272-281.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

B 型慢性肝炎核酸アナログ投与例における発癌例の解析

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

研究要旨：B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ治療により、B 型慢性肝炎からの発癌率は低下している。しかしながら、核酸アナログ投与をしても発癌する症例がある。

研究協力者

田中榮司 信州大学・医学部・内科学第二
教室・教授

A. 研究目的

B 型慢性肝炎に対する核酸アナログ治療により、肝細胞癌の発症率は低下している。しかしながら、核酸アナログを投与していても発癌する症例が見られている。今回、核酸アナログ治療例における発癌率を調査し、発癌に関与する因子および肝の線維化の状態と発癌との関係を検討した。

B. 研究方法

対象は、信州大学および関連病院にて核酸アナログ治療を受けている B 型慢性肝疾患例 195 例(男性:女性 141:54 例、年齢中央値 55 歳)であり、発癌前核酸アナログ導入例(A 群)が 156 例、肝細胞癌治療後に核酸アナログを導入した例(B 群)が 39 例であった。それぞれの群における発癌例についてその背景因子を検討した。

C. 研究結果

A 群：発癌前治療例の観察期間中央値は 9 年であり、発癌は 16 例(10%)に認められた。発癌の時期の中央値は 4 年であり、最長が治療開始 13 年目であった。

B 群：肝細胞癌治療後に核酸アナログ治療を開始した群の治療期間の中央値は 6 年であり、発癌を 29 例(74%)で認めた。発癌は 7 年以内の早期に起こっていた。

発癌の背景因子の解析では、肝硬変(OR 5.4,95%CI 3.3 - 8.7, $p<0.001$)、男性(OR 2.6, 95%CI 1.5 - 4.5, $P<0.001$)、BCP 変異(OR 5.0, 95%CI 2.1 - 11.8, $p<0.001$)、治療開始時 AFP>6.0ng/ml (OR 2.1, 95%CI 1.3 - 3.6, $p=0.005$)、治療開始時血小板>14 万 μ l (OR 8.5, 95%CI 2.4 - 30.7, $p=0.001$)、開始時年齢 (OR 1.1, 95%CI 1.0 - 1.1, $p<0.001$)が抽出された。

D. 結論

核酸アナログ投与例からの発癌は年率 1%であり、これは核酸アナログ耐性発生頻度よりも高率であった。また、肝細胞癌の発症には、核酸アナログ開始時の肝硬変の存在が強く関連していた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Morita S, **Matsumoto A**, Umemura T, Shibata S, Kamijo N, Ichikawa Y, Kimura T, Joshita S, Komatsu M, Yoshizawa K, Tanaka E. Characteristics and prediction of hepatitis B e-antigen negative hepatitis following

seroconversion in patients with chronic hepatitis B. Hepatol Res. 2013 Aug; In press.

- 2) Morita S, **Matsumoto A**, Umemura T, Shibata S, Kamijo N, Ichikawa Y, Kimura T, Joshita S, Komatsu M, Yoshizawa K, Tanaka E. Characteristics and prediction of hepatitis B e-antigen negative hepatitis following seroconversion in patients with chronic hepatitis B. Hepatol Res. 2013 Aug; In press.
- 3) Komatsu M, Tanaka N, Shibata SI, Kimura T, Ichikawa Y, Morita S, Joshita S, Nagaya T, Umemura T, Ichijo T, **Matsumoto A**, Yoshizawa K, Tanaka E. Laparoscopic findings of congenital hepatic fibrosis: A case report and review of the published work. Hepatol Res. 2013 Jul; In press.

2. 学会発表

- 1) **松本 晶博**. B 型慢性肝炎の自然史と治療における各種 HBV マーカーの変化. 第 53 回

日本臨床化学会. (臨床化学. 42(Suppl 1):269). 2013.09.01. 徳島.

- 2) **松本 晶博**, 森田 進, 田中 榮司. B 型肝炎概念の変遷とその臨床的意義 高感度 HBV RNA 定量系による B 型慢性肝炎核酸アナログ治療例の病態解析. 第 49 回日本肝臓学会総会. (肝臓 54(Suppl 1):42) 2013.06.06-07.
- 3) 奥原 禎久, 梅村 武司, 城下 智, 柴田 壮一郎, 木村 岳史, 森田 進, 小松 通治, **松本 晶博**, 吉澤 要, 田中 榮司. Entecavir 治療中における B 型慢性肝炎患者の血清サイトカイン、ケモカインの検討. (肝臓. 54(Suppl 1):407) 2013.06.06-07.

F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

C 型肝炎患者における WFA⁺-M2BP と肝弾性値の発がん予測因子としての有用性比較

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

研究要旨:252 例の C 型肝炎患者を対象に、新規肝線維化マーカー WFA⁺-M2BP と肝弾性値の発がん予測因子としての有用性を比較検討した。WFA⁺-M2BP と LSM は共に肝発がんに関連する有意な要因であり、その測定により同程度に発がん予測能が向上することが期待できた。一方、両者のリスク評価は必ずしも一致せず、相補的に用いることでより有効な肝発がんリスク症例の拾い上げが可能になると考えられた。

研究協力者

玄田拓哉 順天堂大学医学部附属静岡病院・消化器内科・准教授

A. 研究目的

C 型肝炎患者の発がん予測因子としての WFA⁺-M2BP 測定の有用性を、既存の非侵襲的肝線維化マーカーである肝弾性値測定と比較検討する。

B. 研究方法

順天堂静岡病院消化器内科において、FibroScan(R) による肝弾性値測定(liver stiffness measurement; LSM) を実施し 6 カ月以上の経過観察期間を有する C 型肝炎患者を対象に、LSM 測定時の血中 WFA⁺-M2BP を測定し肝発がんに関連する要因を検討した。

C. 研究結果

対象症例は 252 例(男性 142 例、56.3%) で年齢の中央値は 62 歳(22-84 歳)であった(表 1)。LSM 測定後、全例に IFN 治療が行われ、ウイルス学的著効(SVR)は 153 例(60.7%) で得られた。LSM 測定後の観察期間中央値 1104 日で 252

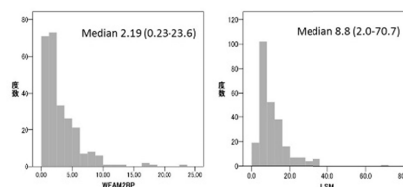
例中 18 例(7%) に肝発がんが認められた。

表 1: 患者背景

Variables	N=252
Age (year)	62 (22-84)
Male (%)	56.3
Observation period	1104 (181-2143)
HCC development	18 (7%)
HCV-genotype-1 (%)	54.8
IFN-Tx (%)	100
SVR (%)	60.7
Albumin (g/dL)	3.8 (3.1-5.0)
ALT (IU/L)	49 (9-410)
Total bilirubin (mg/dL)	0.7 (0.2-2.3)
γGTP (IU/L)	43 (4-517)
Platelet count (x10 ⁴ /μL)	16.4 (5.2-38.9)
Prothrombin time (%)	102 (58-187)

対象症例における WFA⁺-M2BP の測定結果は中央値 2.19、範囲 0.23-23.6 であり、LSM は中央値 8.8kPa、範囲 2.0-70.7kPa であった(図 1)

図 1: WFA⁺-M2BP と LSM の測定結果



次に、肝発がんに関連する要因を Cox 比例ハザードモデルで解析した。単変量解析では SVR、血中アルブミン値、血小板数と共に、WFA⁺-M2BP と LSM 測定値が肝発がんに関連する有意な要因として抽出された(表 2)。

WFA⁺-M2BP と LSM は、共に代替肝線維化マーカーであることから、個別に多変量モデルに投入し肝発がんに関連する要因を検討したところ、WFA⁺-M2BP と LSM はそれぞれ SVR と共に有意な要因として抽出された(表 3)。

表 2 : 肝発がんに関連する要因 : 単変量解析

Variables	Univariate analysis	
	HR (95% CI)	P value
Age	1.06 (1.01-1.12)	0.021
Male gender	1.22 (0.47-3.16)	0.677
SVR	0.17 (0.05-0.58)	0.005
WFA-M2BP	1.16 (1.07-1.25)	<0.001
LSM	1.05 (1.02-1.08)	<0.004
Alb	0.05 (0.01-0.23)	<0.001
ALT	1.00 (1.00-1.01)	0.544
γGTP	1.00 (1.00-1.01)	0.356
T-bil	2.00 (0.61-6.57)	0.255
AFP	1.01 (1.00-1.02)	0.216
PIt	0.86 (0.78-0.95)	0.003

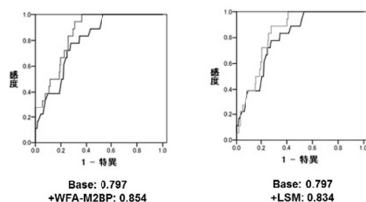
表 3 : 肝発がんに関連する要因 : 多変量解析

Model 1				
Variables	Category	HR	95%CI	P-value
SVR	SVR	1		
	non-SVR	5.62	1.62 – 19.44	0.006
WFA-M2BP	<3.6	1		
	≥3.6	3.65	1.37 – 9.74	0.010

Model 2				
Variables	Category	HR	95%CI	P-value
SVR	SVR	1		
	non-SVR	4.34	1.26 – 15.33	0.020
LSM	<10.0	1		
	≥10.0	8.50	1.94 – 37.31	0.005

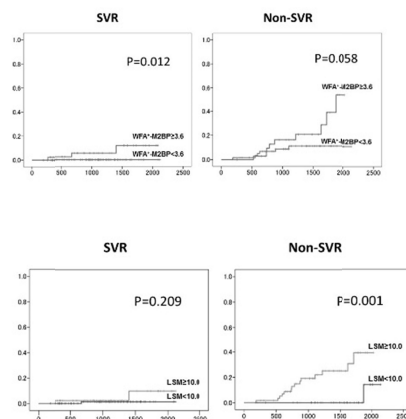
WFA⁺-M2BP もしくは LSM の測定を施行した場合の肝発がん予測能の向上を比較するために、多変量モデルの ROC 曲線を検討した。その結果 WFA⁺-M2BP もしくは LSM を測定しなかった場合に作成されたモデルの肝発がん予測に対する AUROC は 0.797 であったが、WFA⁺-M2BP もしくは LSM を測定した場合、前者は AUROC を 0.858、後者は 0.834 へ増加させた(図 2)。

図 2 : 肝発がんの予測能 : ROC 解析



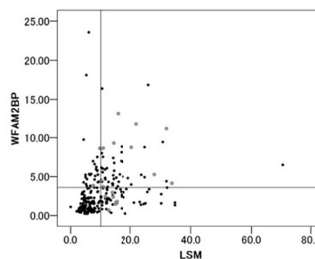
SVR 例と非 SVR 例での累積発がん率を検討したところ、WFA⁺-M2BP で層別化した場合は SVR において有意な差が認められた。一方、LSM で層別化した場合は非 SVR 例において有意な差が認められた(図 3)。

図 3 : 累積肝発がん率



WFA⁺-M2BP と LSM の測定結果を比較したところ、どちらか一方の測定結果のみしかカットオフ値以上を示さない不一致例が少なからず存在していた。また、このようなリスク評価不一致例からも肝発がんが認められていた(図 4)。

図 4 : WFA⁺-M2BP と LSM の測定結果の相関



D. 考察

C 型肝炎患者において WFA⁺-M2BP 測定は LSM と同程度のダイナミックレンジを持つ検査法であり、WFA⁺-M2BP 測定を行うことで、LSM 測定と同程度に肝発がん予測能を向上させ得る可能性がある。一方、これら二つの検査で抽出される肝発がんリスク群は完全に一致す

るものではなく、相補的に用いることでより効果的な肝発がんリスク患者の拾い上げが可能になると考えられた。

E. 結論

WFA⁺-M2BP 測定はC型肝炎患者における肝発がんリスク群の抽出に有用である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Genda T, **Ichida T**, Sakisaka S, Sata M, Tanaka E, Inui A, Egawa H, Umeshita K, Furukawa H, Kawasaki S, Inomata Y. Waiting list mortality of patients with primary biliary cirrhosis in the Japanese transplant allocation system. *J Gastroenterol*. 2014 Feb; 49(2):324-331.
- 2) 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.
- 3) Narita Y, Genda T, Tsuzura H, Sato S, Kanemitsu Y, Ishikawa S, Kikuchi T, Hirano K, Iijima K, Wada R, **Ichida T**. Prediction of liver stiffness for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients on interferon-based

anti-viral therapy. *J Gastroenterol Hepatol*. 2014 Jan; 29(1):137-143.

- 4) Sato A, Sata M, Ikeda K, Kumada T, Izumi N, Asahina Y, Osaki Y, Chayama K, Kaneko S, Sakai A, Onji M, Hiasa Y, Omura T, Ozeki I, Yokosuka O, Shiina S, Itsubo M, Nishiguchi S, Hirano K, Ide T, Sakisaka S, Yamasaki T, Hidaka I, Tanaka M, Kim SR, **Ichida T**. Clinical characteristics of patients who developed hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus eradication with interferon therapy: current status in Japan. *Intern Med*. 2013 Jul; 52(24):2701-2706.
- 5) Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M, Izumi N, **Ichida T**, Kudo M, Ku Y, Sakamoto M, Nakashima O, Matsui O, Matsuyama Y. Comparison of resection and ablation for hepatocellular carcinoma: A cohort study based on a Japanese nationwide survey. *J Hepatol*. 2013 Apr; 58(4):724-729.
- 6) Harada K, Hirohara J, Ueno Y, Nakano T, Kakuda Y, Tsubouchi H, **Ichida T**, Nakanuma Y. Incidence of and risk factors for hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: National data from Japan. *Hepatology*. 2013 May; 57(5):1942-1949.

2. 学会発表

- 1) 甘樂 裕徳、玄田 拓哉、佐藤 俊輔、村田 礼人、金光 芳生、成田 諭隆、石川 幸子、菊池 哲、森 雅史、平野 克治、飯島 克順、**市田 隆文**. インターフェロン治療後の肝発癌予測因子としての AKR1B10 の有用性. 第 40 回日本肝臓学会西部会. 2013.12.09. 岐阜.

- 2) Tsuzura H, Genda T, Sato S, Murata A, Kanemitsu Y, Narita Y, Ishikawa S, Kikuchi T, Mori M, Hirano K, Iijima K, **Ichida T**. Acquisition of aldo-keto reductase family 1 member B10 expression in early stage of human hepatocarcinogenesis. AASLD 64th Annual Meeting. 2013.11.05. Washington DC.
- 3) Tsuzura H, Genda T, Sato S, Murata A, Kanemitsu Y, Narita Y, Ishikawa S, Kikuchi T, Mori M, Hirano K, Iijima K, **Ichida T**. Aldo-keto reductase family 1 member B10 and platelet count predict the risk of hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients receiving interferon therapy. AASLD 64th Annual Meeting. 2013.11.05. Washington DC.
- 4) Sato S, Genda T, Murata A, Tsuzura H, Kanemitsu Y, Narita Y, Ishikawa S, Kikuchi T, Mori M, Hirano K, Iijima K, **Ichida T**. The impact of aldo-keto reductase family 1 member B10 expression on the risk of hepatocellular

carcinoma in patients with chronic hepatitis C. AASLD 64th Annual Meeting. 2013.11.05. Washington D.C. USA.

- 5) 成田 諭隆、玄田 拓哉、村田 礼人、甘楽 裕徳、佐藤 俊輔、金光 芳生、石川 幸子、菊池 哲、森 雅史、平野 克治、飯島 克順、**市田 隆文**. Fibroscan(R) を用いた C 型慢性肝炎患者のインターフェロン治療後肝発癌予測. 第 17 回日本肝臓学会大会. 2013.10.11. 東京.
- 6) 佐藤 俊輔、玄田 拓哉、**市田 隆文**. C 型肝炎における発癌を予測する新規バイオマーカー-AKR1B10. 第 17 回日本肝臓学会大会. 2013.10.09. 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

C 型肝炎ウイルス学的著効後肝発癌と新規糖鎖マーカー-WFA⁺-M2BP の検討

八橋 弘 国立病院機構長崎医療センター・臨床研究センター長

研究要旨:新規糖鎖マーカー-WFA⁺-M2BP と C 型肝炎ウイルス駆除後肝発癌の関連を既存の因子とともに検討した。1989 年 11 月～2010 年 12 月に当院で IFN を施行しウイルス学的著効(SVR) が得られ、肝細胞癌既往症例・IFN 治療終了後 1 年以内肝発癌症例を除外し保存血清の存在する 238 例を対象とした。WFA⁺-M2BP 値は、発癌例・非発癌例にかかわらず治療前 1.69(range 0.28-12.04)、治療後 0.80(range 0.17-5.29)と有意に低下していた(p<0.001)。SVR 判定時 WFA⁺-M2BP 値は発癌群 1.24(range 0.42-4.40)、非発癌群 0.79(0.17-5.29)有意差を認めた。Cox 比例ハザードにて発癌に寄与する因子を検討したところ年齢≥60(HR 9.824, p=0.001)、血小板値<15.0 万(HR 4.438, p=0.015)、男性(HR 4.668, p=0.023)、SVR 判定時 WFA⁺-M2BP>2.0(HR 4.898, p=0.009)が有意な因子として抽出された。SVR 判定時 WFA⁺-M2BP は SVR 後発癌予測に有用な可能性がある。

研究協力者

山崎一美 長崎医療センター・臨床研究センター・臨床疫学研究室長
佐々木龍 長崎医療センター・肝臓内科・医師

A. 研究目的

C 型慢性肝疾患は慢性肝炎から肝硬変、肝癌への進展をきたす。我が国において C 型肝炎は肝癌の主要な原因となっている。肝癌発生率は背景肝組織と関連し、線維化の進展とともに肝癌発生率は高くなり、肝硬変からの発癌率が最も高い。C 型肝炎の肝組織評価は肝生検で評価される。血清で測定する Mac2 binding protein(M2BP)値は肝線維化ステージと関連していることが以前から報告され、M2BP の糖鎖抗原の変化を測定する WFA⁺-M2BP は、さらなる特異性をもって肝線維化と関連することが

2013 年に報告された(Kuno, et al. Sci. Rep 2013)。

IFN 治療でウイルス学的著効(Sustained virological response: SVR)が得られれば肝発癌は大きく抑制できるが、SVR 症例においても一部発癌例は認められる。当院の SVR 症例において発癌寄与因子を解析したところ年齢、治療後 AFP 値、血小板、飲酒が有意な因子として抽出された。そこで WFA⁺-M2BP を検討項目に追加し、SVR 後発癌予測に有用であるか検討した。

B. 研究方法

対象は、独立行政法人国立病院機構長崎医療センターで、1989 年 11 月～2010 年 12 月に IFN を施行し SVR が得られた症例において、HBs 抗原陽性、自己免疫性肝炎/原発性胆汁性肝硬変、観察期間 12 か月未満、肝細胞癌既往、IFN 終了後 1 年以内発癌、少量長期投与例を除外し保存血清が存在する 238 例を対象とした。

WFA⁺-M2BP 値は IFN 治療前、SVR 判定時、発癌/最終観察時の 3 ポイント測定した。

C. 研究結果

(1) 対象の背景

対象患者 238 名の背景を表 1 に示す。

表 1. 患者背景

年齢(才)	55 (18-75)
男性(%)	147 (61.8)
観察期間(年)	9.1
線維化スコア F 1/2/3/4	104/68/42/24
治療前AST (IU/mL)	60 (12-365)
治療前ALT (IU/mL)	100 (12-519)
Alb (g/dl)	4.3 (2.9-5.5)
T.bil (mg/dl)	0.7 (0.3-1.9)
治療前AFP (ng/mL)	5 (1-200)
治療血小板 (*10 ⁴ /mm ³)	16.0 (6.4-33.2)
SVR時AST (IU/mL)	20 (10-54)
SVR時ALT (IU/mL)	17 (7-64)
SVR時AFP (ng/mL)	3 (1-46)
SVR時血小板 (*10 ⁴ /mm ³)	16.8 (6.5-36.3)
IFN regimen(%)	
IFN monotherapy	123(51.6)
PEG-IFN monotherapy	28(11.8)
IFN/PEG-IFN+RBV	87(36.6)
抗HBc抗体陽性	26(10.9)
飲酒(>20g/day)	64 (26.9)

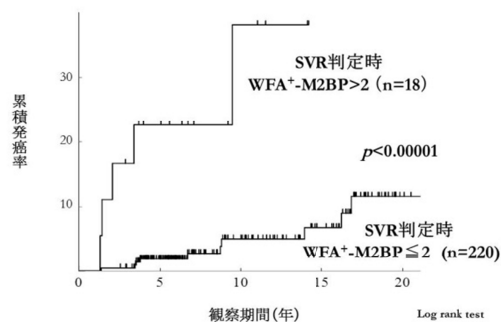
(2) WFA⁺-M2BP 値の推移

観察期間中に 16 例の発癌を認めた。

WFA⁺-M2BP 値は発癌群(n=16)で治療前 2.07(0.99-8.04)、SVR 判定時 1.24(0.42-4.44)、発癌時 0.79(0.41-2.79)、非発癌群(n=222)で治療前 1.68(0.28-12.0)、SVR 判定時 0.79(0.17-5.29)、最終観察時 0.74(0.14-7.24)と発癌・非発癌に関わらず経時的に低下を認めた。SVR 判定時 WFA⁺-M2BP 値のみ発癌群・非発癌群で有意差を認めた(p<0.01)。

(3) SVR 判定時 WFA⁺-M2BP 値と肝発癌

SVR 判定時 WFA⁺-M2BP 値≤2.0(n=220)での累積肝発癌率は 5 年で 5.0%に対し、SVR 判定時 WFA⁺-M2BP 値>2.0(n=18)の症例では 38.1%であった(p<0.0001) (下図)。



SVR判定時WFA⁺-M2BP値と累積発癌率

(4) SVR 後発癌に寄与する因子

SVR 後発癌に寄与する因子を検討し単変量解析では年齢・肝線維化・治療前 AFP・Alb・血小板値・飲酒・SVR 判定時 WFA⁺-M2BP 値が有意な因子として抽出された。Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析では年齢 ≥60(HR 9.824, p=0.001)、血小板値<15.0 万 (HR 4.438, p=0.015)、男性(HR 4.668, p=0.023)、SVR 判定時 WFA⁺-M2BP>2.0(HR 4.898, p=0.009)が有意な因子として抽出された。

D. 考察

C 型肝炎ウイルス駆除により肝発癌は有意に抑制される。一方で SVR 後の肝発癌も少なからず報告されている。これまで高齢、男性、高度線維化、飲酒等がリスク因子と報告されており、近年では IFN 治療前・SVR 判定時の AFP 等も予測に有用であることが報告されている。C 型肝炎ウイルス治療の進歩に伴い SVR 率は向上し、新規薬剤の登場によりさらなる著効率の改善が期待される。それに伴い発癌高リスク群で

ある高齢・線維化進展例での SVR 症例が増えることで SVR 後発癌の予測・リスク評価は非常に重要な課題である。

今回われわれは、この新規マーカーが SVR 後発癌予測に有用であるか検討した。

WFA⁺-M2BP 値はウイルス駆除により経時的に低下するが、SVR 判定時の WFA⁺-M2BP 値は発癌群で有意に高値であった。SVR 判定時 WFA⁺-M2BP 値>2.0 の症例では有意に累積肝発癌率が高く、その後の肝発癌予測に有用である可能性が示唆された。

E. 結論

SVR 判定時 WFA⁺-M2BP 値は肝発癌を予測するマーカーとして有用である。

F. 健康危険情報

特記すべきことなし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ito K, Yotsuyanagi H, **Yatsunami 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.

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

NAFLD における肝線維化評価と WFA⁺-M2BP の有用性

髭 修平 札幌厚生病院・第 3 消化器内科・主任部長

研究要旨：近年、非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD) の症例は増加傾向にあり、臨床的重要性が増しているが、正確な診断のためには、現時点では肝生検が必須である。そこで、線維化マーカーとして新規に開発された WFA⁺-M2BP を用いて肝生検施行 NAFLD 症例の線維化を評価し、他の血液生化学検査や線維化マーカーとの比較検討を行った。その結果、NAFLD 症例における WFA⁺-M2BP 測定値は、肝生検組織所見と良好な相関を示し、線維化レベル別の判定法として優れていることが明らかにされた。

A. 研究目的

非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD) は、近年、増加傾向にあり、我が国の慢性肝障害の原因としても注目が高まっている。なかでも、肝組織の壊死・炎症や線維化を伴う非アルコール性脂肪肝炎(NASH) への進展により、肝硬変や肝発癌のリスクが高まるため、疾患群の診断が重要となる。しかし、現時点で NASH 症例を診断するためには肝の組織学的診断が必須であり、観血的検査が必要となるが、その一方で、検体採取量は限定的であるため組織診断が不十分となる可能性も指摘されている。そこで、NAFLD を対象として、本研究班で明らかにされた新規マーカーである WFA⁺-M2BP を測定し、肝予備能、他の線維化マーカーとの関連を検討する。

B. 研究方法

(1) 検討対象

2003 年から 2013 年の間に当科にて肝生検を実施し、同時期に採取された血清が保存されている NAFLD 症例 66 例を対象とした。肝生検組織は、組織学的評価に十分な大きさを採取されたものに限定した。

対象は、男性/女性が 25/41 例、年齢は中央値 60.5 歳(29 歳～92 歳)、BMI は 27.6(17.1～42.4) であった。肝癌合併例は 7 例認めた。糖尿病合併は 32 例(薬物治療例 14 例)、高血圧合併 31 例、脂質異常症合併 30 例であった。

(2) 測定方法

肝生検を施行した時期と同一の凍結保存血清を用いて WFA⁺-M2BP を測定した。さらに、血清ヒアルロン酸、IV 型コラーゲン 7S、フェリチン、サイトケラチン 18(CK18) についても同様に測定した。また、血液凝固系検査、生化学検査として、白血球、ヘモグロビン、血小板、PT 活性、アルブミン、コリンエステラーゼ、ICG 負荷試験 15 分値の測定結果を検討に用いた。

(3) 検討項目

- 1) WFA⁺-M2BP 測定値と肝生検組織線維化(staging) の関連
- 2) 他のマーカーと肝組織線維化の関連
- 3) WFA⁺-M2BP 測定値と他のマーカーとの関連
- 4) 線維化判別のための各マーカーの ROC 解

析

5) WFA⁺-M2BP と血液生化学検査結果との関連

なお、FIB-4 index は以下の式を用いて算出した。FIB-4 = age (years) ×AST (U/L) / platelets (10⁹/L)×ALT (U/L)^{1/2}

C. 研究結果

(1) 肝の組織学的所見と WFA⁺-M2BP 測定値

肝生検組織による stage 0/1/2/3/4 それぞれの症例の WFA⁺-M2BP 測定値(平均 ± 標準偏差) は、0.54 ± 0.16/0.95 ± 0.40/1.31 ± 0.36/1.73 ± 0.80/4.16 ± 2.68 との結果で、stage の進展と WFA⁺-M2BP 値に相関傾向を認めた。

(2) 他のマーカーとして、ヒアルロン酸、IV 型

コラーゲン 7S、フェリチン、CK18 の肝線維化(staging) との関連を示す。stage 0/1/2/3/4 別の測定値(平均 ± 標準偏差) は、ヒアルロン酸では 34.0 ± 16.6/58.1 ± 45.4/115.5 ± 93.2/137.3 ± 118.8/383.7 ± 263.4、IV 型コラーゲン 7S では 3.34 ± 0.93/4.73 ± 1.62/6.44 ± 1.89/6.34 ± 1.00/9.13 ± 1.92 で線維化の程度と相関する傾向を示したが、フェリチンでは 181.4 ± 180.7/351.1 ± 292.5/422.0 ± 370.4/456.2 ± 348.2/187.4 ± 171.5、CK18 では 229.5 ± 130.9/625.0 ± 354.5/816.0 ± 314.6/644.4 ± 377.8/432.5 ± 263.3 との結果で、良好な相関を示さなかった。

(3) WFA⁺-M2BP 測定値と他のマーカーとの相

関につき検討した。WFA⁺-M2BP と有意な相関関係を認めたのは、ヒアルロン酸(r=0.75、p<0.001)、IV 型コラーゲン 7S(r=0.67、p<0.001)、FIB-4 index(r=0.63、p<0.001) であった。一方、フェリチンや CK18 とは相関を認めなかった。

(4) 肝生検の各線維化スコア間の鑑別能に関し

て、ROC 解析の AUC 値を用いて比較を行った。F0/F1 以上、F1 以下/F2 以上、F2 以下/F3 以上、F3 以下/F4 のそれぞれの判別について、WFA⁺-M2BP による AUC は、それぞれ、0.942、0.907、0.901、0.908 であり、いずれの stage 間でも 0.90 以上の AUC 値を示した。IV 型コラーゲン 7S では、0.928、0.894、0.865、0.955、ヒアルロン酸では、0.842、0.865、0.864、0.944、FIB-4 index では、0.867、0.890、0.837、0.901 の結果で、比較 stage によっては AUC が低下するところもみられた。

(5) WFA⁺-M2BP と、血液生化学検査結果との相

関性につき検討した。WFA⁺-M2BP と良好な相関関係を認めた検査項目は、白血球(r=-0.37、p=0.002)、ヘモグロビン(r=-0.48、p<0.001)、血小板(r=-0.62、p<0.001)、PT 活性(r=-0.52、p<0.001)、アルブミン(r=-0.69、p<0.001)、コリンエステラーゼ(r=-0.50、p<0.001)、ICG 負荷試験 15 分値(r=0.77、p<0.001) であった。

D. 考察

今回、肝生検組織で stage を評価可能な NAFLD 症例を対象として、WFA⁺-M2BP を含めて血液検査にて測定可能なマーカーによる検討を行った。肝線維化の程度と相関を示すものには、WFA⁺-M2BP、ヒアルロン酸、IV 型コラーゲン 7S、FIB-4 index が挙げられた。その中で、WFA⁺-M2BP は、線維化の進行と一致して段階的に測定値の上昇を示し、また、ROC 解析結果から示された stage 間の判別能もそれぞれにバランスのよい結果を示した。

今回の結果から、WFA⁺-M2BP を用いた NAFLD 症例の線維化評価は有用であることが明らかとなった。今後、NASH 症例や NASH への進行が懸念される症例の絞り込み、対象症例の経時的変化の評価などに、WFA⁺-M2BP の測定は臨床的に有用な情報を提供するものと期待

される。

一方で、これまでの肝線維化マーカーの評価は、肝生検組織所見を基準として行われてきたが、今回の検討においても、組織検体の大きさ、不均一性など、肝生検の限界も明らかである。今後は、WFA⁺-M2BP など有効な定量的検査結果による評価が重要であると思われる。

今回の解析対象は NAFLD 症例であったが、ウイルス性など他の慢性肝疾患における肝内線維化の状態とは異なる所見を示す。この差異は、線維化マーカー測定値にも少なからず影響を及ぼす可能性があり、今後、病態別の判定基準を検討する必要もあるものと考えられる。

E. 結論

NAFLD 症例の肝生検組織所見と血液による線維化マーカーとの関連を検討した。その結果、WFA⁺-M2BP は他のマーカーと同等以上の線維化判別能があることが示された。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, **Hige S**, Nakanishi M, Natsuizaka M, Suda G, Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T, Taketomi A, Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S. Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor κ B/mitogen-activated protein kinase. *Carcinogenesis*. 2014 Feb; 35(2):272-281.
- 2) 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. 学会発表

- 1) **Hige S**, Karino Y, Kimura M, Arakawa T, Nakajima T, Kuwata Y, Ozeki I, Sato T, Ohmura T, Toyota J. Paradoxical progression of anemia at delayed phase of triple therapy with telaprevir for ITPA non-CC patients with chronic hepatitis C. AASLD The Liver Meeting 2013. 2013.11.05. Washington D.C. USA..
- 2) **髙 修平**、狩野 吉康、小関 至、木村 睦海、荒川 智宏、中島 知明、桑田 靖昭、赤池 淳、佐藤 隆啓、大村 卓味、豊田 成司. C型慢性肝炎に対する simeprevir 併用治療の有効性 –telaprevir 併用との比較. 第 17 回日本肝臓学会大会(肝臓. 54(Suppl 2):A621). 2013.10.10. 東京.
- 3) **髙 修平**、狩野 吉康、豊田 成司. C型肝炎に対する 3 剤併用療法における治療成績と至適投与量の検討. 第 49 回日本肝臓学会総会(肝臓. 54(Suppl 1):A20). 2013.06.06. 東京. SY1-10.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

NASH における耐糖能異常と肝線維化

日野啓輔 川崎医科大学・肝胆膵内科学・教授

研究要旨：NASH は高率に耐糖異常・糖尿病を合併し、糖尿病は肝線維化・肝発癌の危険因子である。NASH の耐糖能異常をより早期の段階で発見すれば薬物療法を行わずとも生活習慣の改善のみで耐糖能異常が是正され、肝病変進展を抑制しうる可能性がある。そこで血糖値、HbA1c 値からは耐糖能異常・糖尿病の合併を認めない 47 人の NAFLD 患者に経口糖負荷試験を行い、耐糖能異常・糖尿病の合併を検索するとともに、どの糖代謝マーカーが NAFLD における肝線維化と関連するかについて検討を行った。糖負荷試験では全体で 74%、線維化進展例に限ると 83% に耐糖能異常・糖尿病を認めた。一方、NAFLD の肝線維化予測には本研究班で開発された WFA⁺-M2BP が優れており、WFA⁺-M2BP 高値の NAFLD 症例は糖負荷試験を行うことで高率に耐糖能異常を見出せる可能性が示唆された。

研究協力者

原 裕一 川崎医科大学・肝胆膵内科学・
講師

仁科惣治 川崎医科大学・肝胆膵内科学・
講師

A. 研究目的

NASH は高率に耐糖異常・糖尿病を合併し、糖尿病は肝線維化・肝発癌の危険因子である。NASH の耐糖能異常をより早期の段階で発見すれば薬物療法を行わずとも生活習慣の改善のみで耐糖能異常が是正され、肝病変進展を抑制しうる可能性がある。そこで血糖値、HbA1c 値からは耐糖能異常・糖尿病の合併を認めない NAFLD 患者に経口糖負荷試験を行うことで、より早期の耐糖能異常・糖尿病を見出し、加えて NAFLD における肝線維化進展と関連する糖代謝マーカーを同定することを目的とした。

B. 研究方法

2009 年 1 月から 2014 年 2 月までに当科において肝生検を行い糖尿病と診断されていない NAFLD 患者 47 例に対して 75g OGTT と肝生検を行った。また、線維化進展群(Brunt stage 2-4) と非線維化進展群(線維化なし又は Brunt stage 1) の 2 群において、種々の糖代謝マーカーを比較検討した。

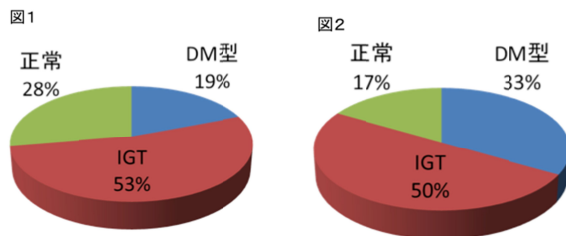
なお本研究は臨床研究に関する倫理委員会の承諾を得て行った。

C. 研究結果

(1) 75g OGTT の結果

血糖値、HbA1c 値からは耐糖能異常・糖尿病の合併を認めない NAFLD 患者の 53% に耐糖能異常、19% に糖尿病を認めた(図 1)。さらに線維化進展群に限ると 50% に耐糖能異常、33% に糖尿病を認めた(図 2)。このように NAFLD 患者では血糖値、HbA1c 値に異常を認めなくとも、高率に耐糖能異常・糖尿病を合

併していると考えられた。



(2) 線維化進展群(Brunt stage 2-4) と非線維化進展群(線維化なし又はBrunt stage 1) の比較非線維化進展群(Brunt stage 0-1) と線維化進展群(stage 2-4) の2群において、性別($p < 0.01$)、AST($p < 0.01$)、PLT($p < 0.05$)、ALB($p < 0.05$)、4型コラーゲン7S($p < 0.01$)、ヒアルロン酸($p < 0.01$)、WFA⁺-M2BP($p < 0.01$)、IRI($p < 0.05$)、HOMA-IR($p < 0.01$)、0-2時間の血糖曲線下面積(血糖 AUC 0-2h) ($p < 0.05$)、およびインスリン AUC 0-2h($p < 0.01$)で有意差を認めた。また有意差を認めた項目で多変量解析を行ったところ、血糖値、HbA1c値からは耐糖能異常・糖尿病の合併を認めないNAFLDにおける肝線維化と有意に関連する因子は血糖 AUC 0-2h値のみであった(Odds ratio 10.241 $P=0.034$)。また、有意差こそ認めなかったもののWFA⁺-M2BPもNAFLDにおける肝線維化との関連が強かった(Odds ratio 7.4 $P=0.057$)。

D. 考察

血糖値、HbA1c値からは耐糖能異常・糖尿病の合併を認めないNAFLDにおいて経口糖負荷試験を行うことにより高率に耐糖能異常・糖尿病を見出すことが可能であり、また血糖 AUC 0-2h値は肝線維化の進展を予測するパラメーターであった。しかし、臨床の現場においてNAFLD全例に対して経口糖負荷試験を行うことは不可能であり、糖負荷試験を行う対象症例の絞り込みが必要である。より肝病変が進行し

たNAFLD症例の耐糖能異常を是正するという観点からは、肝線維化進展例において経口糖負荷試験を行う意義があると考えられた。この点においてWFA⁺-M2BPはNAFLDの肝線維化進展と強く関連するマーカーであるため、WFA⁺-M2BP高値のNAFLD症例は経口糖負荷試験を行うよい対象ではないかと考えられた。

E. 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) **Hino K**, Hara Y, Nishina S. Mitochondrial reactive oxygen species as a mystery voice in hepatitis C. *Hepatology Res*. 2014 Feb; 44(2):123-132.
- 3) Korenaga K, Korenaga M, Teramoto F, Suzuki T, Nishina S, Sasaki K, Nakashima Y, Tomiyama Y, Yoshioka N, Hara Y, Moriya T, **Hino K**. Clinical usefulness of non-protein respiratory quotient measurement in non-alcoholic fatty liver disease. *Hepatology Res*. 2013

- Dec; 43(12):1284-1294.
- 4) **Hino K**, Nishina S, Hara Y. Iron metabolic disorder in chronic hepatitis C: mechanisms and relevance to hepatocarcinogenesis. J Gastroenterol Hepatol. 2013 Nov; 28(Suppl 4):93-98.
 - 5) Tomiyama Y, Nishina S, Hara Y, Kawase T, **Hino K**. Hepatic oxidative stress in ovariectomized transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein is augmented through suppression of AMPK/PGC-1alpha signaling. Hepatol Res. 2013 Oct; In press.
 - 6) Nakamura M, Nakashima H, Tsutsumi K, Matsumoto H, Muta Y, Ueno D, Yoshida K, **Hino K**, Urakami A, Tanaka M. First jejunal vein oriented mesenteric excision for pancreatoduodenectomy. J Gastroenterol. 2013 Aug; 48(8):989-995.

- 7) Tomiyama Y, Takenaka K, Kodama T, Kawanaka M, Sasaki K, Nishina S, Yoshioka N, Hara Y, **Hino K**. Risk factors for survival and the development of hepatocellular carcinoma in patients with primary biliary cirrhosis. Intern Med. 2013 Jul; 52(14):1553-1559.

2. 学会発表

なし

F. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

NAFLD における血清 WFA⁺-M2BP の線維化予測に対する有用性
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

研究要旨：非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)における血清 WFA⁺-M2BP 値の線維化予測に対する有用性を解析した。対象は国内の 4 施設で肝生検を行い診断した NAFLD 289 症例。肝組織診断は病理医 3 名により統一した見解を得た。肝組織での線維化(stage)と血清 WFA⁺-M2BP 値との関係を解析した。血清 WFA⁺-M2BP 値は線維化の進展に伴って増加し、特に stage 3 以上の線維化進展例の抽出に有用な因子であった。また、今回検討した他の血清マーカーやスコアに比し、NAFLD の線維化進展例の判別能が優れていた。

研究分担者(共同研究者)

今井康陽 市立池田病院・病院長
日野啓輔 川崎医科大学・肝胆膵内科学・
教授
髭 修平 札幌厚生病院・第 3 消化器内科・
主任部長
坂元亨宇 慶應義塾大学・医学部・病理
学・教授

研究協力者

山田剛太郎 川崎医科大学附属川崎病
院・総合内科学 2・特任教授
鹿毛政義 久留米大学病院・病理部・教授
是永匡昭 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
三宅映己 愛媛大学大学院・消化器・内分
泌・代謝内科学・特任講師
日浅陽一 愛媛大学大学院・消化器・内分
泌・代謝内科学・教授

A. 研究目的

近年、肥満人口の急増により非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)が増加し、最も高頻度な肝疾患として注目されている。そのなかには進行する非アルコール性脂肪肝炎(NASH)が含まれ、肝硬変への進行や肝癌の合併を視野に入れた診療が必要となる。NAFLD の線維化進展については血液マーカーや画像診断を用いた診断法が開発されてきているが、いまだ信頼されるマーカーはなく、肝組織診断がゴールドスタンダードであり、新たな非侵襲的診断マーカーが求められている。

今回、C 型慢性肝炎の線維化診断マーカーとして報告された WFA⁺-Mac-2 binding protein (M2BP)の NAFLD の線維化予測に対する有用性について解析した。

B. 研究方法

愛媛大学、市立池田病院、川崎医科大学、札幌厚生病院において肝生検を施行し、NAFLD と診断した 289 例を対象とした。男性 159 例、女性 130 例。平均年齢は 54.8±14.6 歳。肝組織診断については Brunt 分類を用いて 3 人の病理医がブラインドで診断し、全体で討議を行って

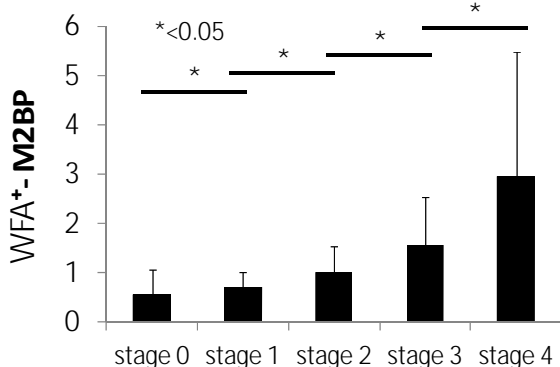
統一した見解を得た。生検時に採取した血清を用いて WFA⁺-M2BP 値を測定し、肝組織での線維化(stage)との関係を解析した。

C. 研究結果

(1) 肝組織診断は stage 0 35 例、stage 1 113 例、stage 2 49 例、stage 3 41 例、stage 4 51 例であった。

(2) 血清 WFA⁺-M2BP 値は、stage 0: 0.57±0.49、stage 1: 0.70±0.33、stage 2: 1.02±0.53、stage 3: 1.57±0.98、stage 4: 2.96±2.53 であり、線維化の進展に伴って上昇した(図)。

(図) 血清 WFA⁺-M2BP 値と線維化進展との関連



(3) 単変量解析で、血清 WFA⁺-M2BP 値は stage 0-2 と stage 3-4、stage 0-3 と stage 4 との鑑別に有用であった(ともに p<0.001)。

(4) 多変量解析では、血清 WFA⁺-M2BP 値は stage 0-2 と stage 3-4 (Odds 比 6.650 [2.476-21.975], p<0.001)、stage 0-3 と stage 4 (Odds 比 5.072 [2.006-16.979], p=0.003)との鑑別に有用な独立した因子であった。

(5) ROC 解析で線維化進展の予測に有用なカットオフ値を解析すると、stage 3 以上 0.94、stage 4 1.46 であり、正診率はそれぞれ 78.2%、84.4%であった。(表 1)

(表 1) 血清 WFA⁺-M2BP による線維化進展例の予測

Patient Group	AUC (95% CI)	Cutoff level	Sensitivity (%)	Specificity (%)	PPV (%)	NPV (%)	Predictive accuracy(%)
Stage 3s	0.94 (0.832-0.911)	0.94	85.9	74.6	61.2	91.9	78.2
Stage 4	0.879 (0.835-0.914)	1.46	72.6	87	54.4	93.7	84.4

(6) 他の線維化マーカーやスコアとの有用性を ROC 曲線下面積(AUCROC)で比較した。血清 WFA⁺-M2BP 値は血小板数、ヒアルロン酸、AST/ALT 比、APRI、Fib-4 に比べて stage 3 以上 (AURROC 0.876)、stage 4 (AURROC 0.878)の判別に有用であった。(表 2)

(表 2) 血清マーカー、スコアによる線維化進展例の予測

Marker and Score	Stage 3-4 AUROC Curve	Stage 4 AUROC Curve
WFA ⁺ -M2BP	0.876	0.879
Platelet count	0.81	0.815
Hyaluronic acid	0.856	0.858
AST/ALT ratio	0.77	0.752
APRI	0.758	0.745
Fib-4	0.857	0.849

D. 考察

今回の検討で、血清 WFA⁺-M2BP 値は NAFLD の進行例の拾い上げに有用であることが示された。NAFLD の診断には肝組織診断が必要であるが、肝生検には侵襲性、サンプリングエラーなどの問題点がある。特に、NAFLD では施設間、病理医間の不一致も多いことも報告されている。本研究は 3 人の病理医で統一した見解に至った 289 例という多数例を用いた解析であり、線維化診断マーカーの有用性を判定するのに最適なコホートの一つではないかと考えられる。

また、今回の血清 WFA⁺-M2BP 値が既報の C 型慢性肝炎と比べて全体的に低くなっているが、NAFLD とウイルス性肝炎との進展様式の違いを示唆しているものと思われる。脂肪化、肝細

胞壊死・変性などの関連についても検討していく必要がある。

E. 結論

血清 WFA⁺-M2BP 値は NAFLD の線維化診断マーカーとして有用であった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Miyake T, **Abe M**, Tokumoto Y, Hirooka M, Furukawa S, Kumagi T, Hamada M, Kawasaki K, Tada F, Ueda T, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M. B cell-activating factor is associated with the histological severity of nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatol Int.* 2013 Jun; 7(2):539-547.
- 2) Takeji S, Hirooka M, Koizumi Y, Tokumoto Y, **Abe M**, Ikeda Y, Nadano S, Hiasa Y, Onji M. Des-gamma-carboxy prothrombin identified by P-11 and P-16 antibodies reflects prognosis for patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 2013 Apr; 28(4):671-677.

2. 学会発表

- 1) 徳本 良雄、**阿部 雅則**、日浅 陽一. 非アルコール性脂肪性肝疾患診断における腹腔鏡検査の有用性. 第 17 回日本肝臓学会大会 2013.10.09-12. 東京.
- 2) 川崎 敬太郎、**阿部 雅則**、徳本 良雄、ほか. 非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD) の肝脂肪化における B 細胞活性化因子 (BAFF) の役割. 第 49 回日本肝臓学会総会. 2013.06.06. 東京. O-67.
- 3) **阿部 雅則**、陳 式儀、姚 立穎、ほか. 非アルコール性脂肪性肝疾患の病態における骨髄由来抑制細胞の役割. 第 50 回日本消化器免疫学会. 2013.05.30. 東京. O-379.
- 4) **阿部 雅則**、三宅 映己、藤堂 裕彦、ほか. 高齢者における糖尿病を合併した脂肪肝の特徴. 第 56 回日本糖尿病学会年次学術集会. 2013.05.16-18. 熊本.

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

上野義之 山形大学・内科学第二講座・教授

研究要旨：原発性胆汁性肝硬変(PBC)は、肝内胆管の進行性破壊と消失が特徴的な原因不明の疾患である。しかしその病因の詳細は不明であり、一定の見解を得るに至っていない。本研究では、より感度が高く定量性にもすぐれている次世代シーケンサーを用いて、PBC に特徴的に発現される血清内の短鎖遺伝子断片についてその特徴的な発現プロファイルを検討した。前年に引き続き検討を重ね、血清内の遊離 miRNA の内数種類で PBC と他のウイルス性肝疾患で異なる発現プロファイルを持つものを同定した。この解析法が、PBC の病態解析及び亜病型の診断にも有用である可能性が示唆された。

原発性胆汁性肝硬変(PBC)は原因不明の疾患で、その病因は未だ不明である。一方、近年次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現の超大量解析が進んでおり、肝疾患領域でも次世代シーケンサーを用いた解析、とりわけマイクロ RNA の報告が散見されている。マイクロ RNA(以下 miRNA)は短鎖 RNA であり、標的となる分子の発現を調整する多彩な役割を有している。肝疾患では主にウイルス性肝炎でそれぞれ発現が特徴的な miRNA の報告がなされてきた。今回、PBC の患者の血清より得られた検体を用いて、血清内の遊離 miRNA を網羅的に検討した。本年度は、特に技術的な検討を行うために、PBC と他の肝疾患と比較することにより miRNA プロファイリングによる階層的クラスタ分類が技術的に可能かということについて、少数例での端索的検討を行った。

A. 研究方法

PBC 患者の血清内遊離 miRNA のプロファイリングを検討。血清より Trizol LS を用いて Total RNA を抽出、TruSeq small RNA sample prep kit を用いて、ライブラリーを作成し、シ

ークエンシングを行った。疾患コントロールとして同数の慢性 B 型肝炎、同数の慢性 C 型肝炎、そして健常者からの検体を用いて検討した。ミスマッチの許容は 1%で行い、ANOVA による有意差検討で統計学的さを認めたものについてはさらに定量的 PCR 法にて発現の多少を検討した。

B. 研究結果

(1) PBC 患者血清 5 検体の血清内遊離 miRNA のプロファイリングを行い、B 型肝炎、C 型肝炎、健常者と多群比較しクラスタリング ANOVA(分散分析)で $P < 0.05$ を抽出した。P-value が計算できたものは 670 個あり、解析の結果得られたものは、110 個の miRNA。110 個の miRNA について発現パターンによるクラスタリングを行い、ヒートマップを作成したところ、PBC は一つの群を形成した。さらに定量的 PCR 法で発現を定量したところ、次世代シーケンサーで特徴的に低値であった miRNA はこの方法でも低値であることが確認された。

(2) 亜病型ごとの検討では、門亢症型と、肝不全型で特異的に低下する miRNA が拾い上げられ、定量的 RT-PCR でも低下が確認された。

C. 考察

血清内遊離 miRNA を解析することにより、疾患の新たな特徴を見い出せる可能性があり、発症原因の解明に迫ることができる。今後、さらに症例数を増やして PBC に特徴的な miRNA や新規 miRNA の同定を行い、さらに肝線維化マーカーとの比較を行う予定である。

D. 結論

次世代シーケンサーによる miRNA 解析は、PBC の発症に関係する miRNA の探索に有用であり、さらに、亜病型ごとに異なる発現プロファイルを有している可能性が示された。PBC の線維化マーカーの探索にも有用なツールになる可能性が示された。

E. 健康危険情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Mancinelli R, Franchitto A, Glaser S, Meng F, Onori P, Demorrow S, Francis H, Venter J, Carpino G, Baker K, Han Y, **Ueno Y**, Gaudio E, Alpini G. GABA induces the differentiation of small into large cholangiocytes by activation of Ca(2+)/CaMK I-dependent adenylyl cyclase 8. *Hepatology*. 2013 Jul; 58(1):251-263.
- 2) Ninomiya M, Kondo Y, Funayama R, Nagashima T, Kogure T, Kakazu E, Kimura O, **Ueno Y**, Nakayama K, Shimosegawa T. Distinct microRNAs

expression profile in primary biliary cirrhosis and evaluation of miR 505-3p and miR197-3p as novel biomarkers. *PLoS one*. 2013 Jun; 8(6):e66086.

- 3) Harada K, Hirohara J, **Ueno Y**, Nakano T, Kakuda Y, Tsubouchi H, Ichida T, Nakanuma Y. Incidence of and risk factors for hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: National data from Japan. *Hepatology*. 2013 May; 57(5):1942-1949.

2. 学会発表

- 1) Katsumi T, Ninomiya M, Shimosegawa T, Mizuno K, Tomita K, Sato C, Okumoto K, Nishise Y, Watanabe H, Saito T, **Ueno Y**. Ability of miRNA Profiling to Distinguish the Clinical Course of Patients with Primary Biliary Cirrhosis: Comprehensive Analysis with Deep Sequencing. AASLD annual meeting. 2013.11.01-05. Washington DC.
- 2) Graf A.B, Francis H.L, Hargrove L, Kennedy L, Hodges K.M, Greene J.F, **Ueno Y**. Knockout of the histidine decarboxylase (HDC) gene reduces biliary hyperplasia in cholestatic bile duct ligated (BDL) mice. AASLD annual meeting. 2013.11.01-05. Washington D.C. USA.
- 3) Meng FY, Francis H, Glaser S, Han YY, DeMorrow S, Stokes A, Staloch D, Venter J, White M, **Ueno Y**, Reid LM, Alpini G. Role of stem cell factor and granulocyte colony-stimulating factor in remodeling during liver regeneration. AASLD annual meeting. 2013.11.01-05. Boston.

- 4) Graf A.B, Francis H.L, Hargrove L, Kennedy L, Hodges K.M, Greene J.F, **Ueno Y**. The mast cell stabilizer, cromolyn sodium, reduces bile duct ligated-induced biliary hyperplasia: a novel role for the in vivo paracrine influence of mast cells on biliary proliferation. AASLD annual meeting. 2013.11.01-05. Washington D.C. USA.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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。WFA⁺-CSF1R を測定することで、発癌リスクの高い予後不良な患者群を拾い上げることが可能となり、肝硬変患者の予後延長に貢献することが期待される。

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 の線維化評価と予後予測能、さらに発癌との関連性を検討した。

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 は fibrosis stage の上昇に伴い有意に上昇し、CH 群 82.3 (5.0-241.0) ng/ml、LC 群 216.9 (34.3-574.8) ng/ml 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[HCC

208.9 (85.4-500.9) ng/ml vs Non-HCC 214.8 (34.3-442.2) ng/ml]。なお背景肝として、両群間で血小板、PT、アルブミン、AST、ALT に有意差は認めず、AFP と PIVKA-Ⅰ は HCC 群で有意に高かった。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、予後と累積発癌に関わる因子を検討した。

(1) 予後検討

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 の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) 発癌検討

発癌予測因子を AFP、PIVKA-Ⅰ 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。

続いて 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)。

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。

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.
- 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.
- G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)**
- 1. 特許取得**
なし
- 2. 実用新案登録**
なし
- 3. その他**
なし

肝発癌例と非発癌例での血中 WFA⁺-CSF1R の検討 - 発癌 3 年前の血清マーカーからの検討 -
熊田 卓 大垣市民病院・副院長

研究要旨：2000 年 1 月から 2009 年 12 月の間に経験した B 型肝炎ウイルス (HBV) キャリアもしくは C 型肝炎ウイルス (HCV) キャリア 2750 例中、3 年以上経過観察されかつ血清保存された 1110 例で経過観察中に 83 例の肝細胞癌 (HCC) が発生した。この発癌例の 83 例と非発癌例の 1027 例で年齢、性、成因 (HBV もしくは HCV)、Child-Pugh 分類、血小板、alanine aminotransferase (ALT) の 6 因子を propensity score 法でマッチさせて発癌例 79 例、非発癌例 79 を抽出した。これらの症例で HCC 診断時 (非発癌例では最終血清保存日)、1 年前、2 年前、3 年前の保存血清で *Wisteria floribunda* agglutinin-reactive colony-stimulating factor 1 receptor (WFA⁺-CSF1R)、-fetoprotein (AFP)、lens culinaris agglutinin A-reactive -fetoprotein (AFP-L3%)、DCP (des-gamma-carboxy prothrombin)、FIB4 index、AST-to-platelet ratio index (APRI) を測定した。診断時の HCC の結節径は 1.8cm (1.0-3.0cm)、単発/多発は 53 例/26 例、TNM 分類 / / は 36 例 / 30 例 / 13 例であった。HCC 診断前 3 年前の血清で ROC (Receiver Operatorating Characteristic) 曲線を作成すると AUC (Area under the curve) は WFA⁺-CSF1R (0.7250) で最も高く、次いで AFP (0.6599)、FIB4 index (0.6192)、APRI (0.5905)、AFP-L3% (0.5685)、DCP (0.4903) の順であった。WFA⁺-CSF1R の ROC 曲線の AUC は発癌 3 年前が 2 年前、1 年前に比し有意に高値であった。以上から WFA⁺-CSF1R は高発癌状態の良いマーカーとなりうる可能性が示された。

共同研究者

豊田秀徳 大垣市民病院・消化器科・医長
多田俊史 大垣市民病院・消化器科・医長

A. 研究目的

肝細胞癌 (HCC) 診断に腫瘍マーカーとして、
-fetoprotein (AFP)、lens culinaris agglutinin
A-reactive -fetoprotein (AFP-L3%) および
DCP (des-gamma-carboxy prothrombin) あるい
は protein induced vitamin K absence- :

PIVKA) の 3 種類が良く用いられている。2009 年 4 月からは AFP と DCP の 2 つの腫瘍マーカーの同時測定が保険診療上認められ、肝癌診療ガイドライン (2009 年版) にも、対象者を高危険群 (B 型慢性肝炎、C 型慢性肝炎、肝硬変) と超高危険群 (B 型肝硬変、C 型肝硬変) に分け、前者では 6 ヶ月に一度の超音波検査と腫瘍マーカー (AFP と AFP-L3% と DCP) の測定を、後者では 3-4 ヶ月毎の超音波検査と腫瘍マーカーの測定に加え 6-12 ヶ月毎の CT/MRI 検査 (Option) が推奨されている。

一方、HCCは線維化の進行した例から発生しやすいことが知られており、線維化を正確に、非侵襲的に測定する方法が求められている。今回我々は線維化マーカーとして開発された血清 macrophage colony-stimulating factor 1 receptor (CSF1R)を測定する機会を得て、保存血清を用いて肝発癌例、非発癌例で *Wisteria floribunda* agglutinin-reactive(WFA⁺)-CSF1Rを測定し、その臨床的意義について検討した。

B. 研究方法

B型肝炎ウイルス(HBV)キャリアもしくはC型肝炎ウイルス(HCV)キャリア 2750例中、(1)HBs抗原もしくはHCV抗体が6カ月以上陽性、(2)HCC診断前3年以上経過観察されている、(3)血清が12カ月の間隔で少なくとも2点以上で保存されている、(4)発癌例では最大腫瘍径3cm以下3個以下で診断されている、(5)ワーファリンが内服していない5点を満たす1110例を対象とした。経過観察中に83例で発癌が認められた。

この発癌83例と非発癌1027例を年齢、性、成因(HBVもしくはHCV)、Child-Pugh分類、血小板、alanine aminotransferase(ALT)の5因子をpropensity score法を用いてマッチさせたところ、発癌群79例、非発癌群79例が抽出された。これらの症例でHCC診断時(非発癌例では最終血清保存日)、1年前、2年前、3年前の保存血清でWFA⁺-CSF1R、AFP、高感度AFP-L3%(μ TAS Wako i30)、DCPを測定した。また、3年前の血液データからFiB-4 = [年齢(y) × AST(IU/L)] / [血小板(10⁹/L) × ALT(IU/L)^{1/2}]、AST-to-platelet ratio index (APRI) = {[AST(IU/L) / ALT_ULN(IU/L)] × 100} / platelet count(10⁹/L)を測定した。

C. 研究結果

(1) 背景因子

発癌群79例、非発癌群79例の背景因子を示す(表1)。年齢、性、成因、Child-Pugh分類、ALT、血小板に差は認めていない。HCC診断時の最大径は1.8cm(1.0-3.0cm)、単発53例、多発26例、stageはⅠが36例、Ⅱが30例、Ⅲが13例であった。WFA⁺-CSF1Rは発癌群では非発癌群に比し有意に高値であった。

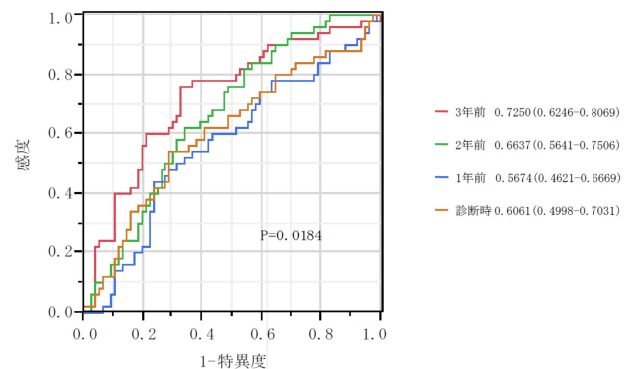
表1、背景因子(経過観察開始時)

Characteristics	HCC (n=79)	Non-HCC (n=79)	P
Age	Median (Range) 67 (34-84)	67 (14-84)	0.692
Gender	Male / Female 49 / 30	45 / 34	0.517
Etiology	B / C / B+C 13 / 65 / 1	11 / 67 / 1	0.966
Child-Pugh classification	A / B / C 63 / 13 / 3	67 / 10 / 2	0.699
ALT(IU/L)	Median (Range) 49 (7-361)	49 (12-321)	0.960
Platelet (x10 ⁹ /L)	Median (Range) 99 (32-340)	122 (21-414)	0.124
Presence of cirrhosis	Present/Absent 63/16	64/15	0.842
WFA ⁺ -CSF1R (ng/mL)	Median (Range) 224.6 (33.1-785.8)	135.2 (52.7-638.0)	<0.001
AFP (ng/mL)	Median (Range) 11 (0.8-627.1)	5.7 (0.8-1131.4)	<0.001
AFP-L3 (%)	Median (Range) 5.0 (0.00-11.6)	4.2 (0.5-10.3)	0.146
DCP (mAU/mL)	Median (Range) 15 (5-304)	14 (5-324)	0.6735
Tumor size(cm)	Median (Range) 1.8 (1.0-3.0)	NA	NA
Tumor number	Single / Multiple 53/26	NA	NA
TNM stage	I / II / III 36/30/13	NA	NA

(2) WFA⁺-CSF1RのROC曲線のAUCの変化

AUCは3年前0.7250(95%信頼区間0.6246-0.8069)、2年前0.6637(0.5641-0.7506)、1年前0.5674(0.4621-0.6669)、診断時0.6061(0.4998-0.7031)であり、3年前のAUCは1年前、診断時より優位に高値であった(P=0.0016と0.0196)。

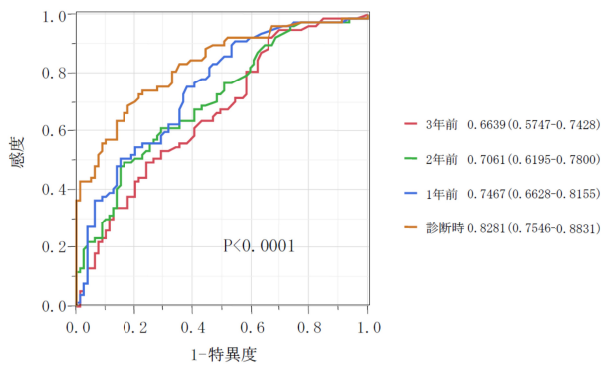
図1、CSF1Rの発癌3年前、2年前、1年前、診断時のROC曲線



(3) AFP の ROC 曲線の AUC の変化

AUC は 3 年前 0.6639(0.5747-0.7428)、2 年前 0.7061(0.6195-0.7800)、1 年前 0.7467(0.6628-0.8155)、診断時 0.8281(0.7546-0.8831) であり診断時に近づくにつれて有意に AUC は増加した。(図 2)。

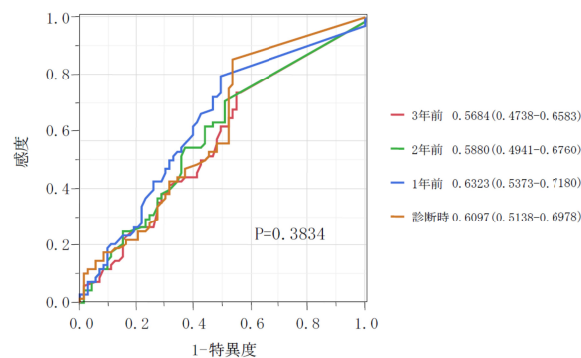
図2、AFPの発癌3年前、2年前、1年前、診断時のROC曲線



(4) AFP-L3%の ROC 曲線の AUC の変化

AUC は 3 年前 0.5684(0.4738-0.6583)、2 年前 0.5880(0.4941-0.6760)、1 年前 0.6323(0.5373-0.7180)、診断時 0.6097(0.5138-0.6978) であり差は認めなかった。(図 3)。

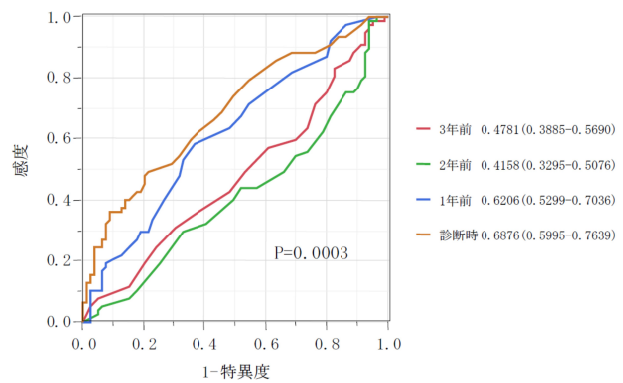
図3、AFP-L3%の発癌3年前、2年前、1年前、診断時のROC曲線



(5) DCP の ROC 曲線の AUC の変化

AUC は 3 年前 0.4781(0.3885-0.5690)、2 年前 0.4158(0.3295-0.5076)、1 年前 0.6206(0.5299-0.7036)、診断時 0.6876(0.5995-0.7639) であり診断時に近づくにつれて有意に増加した。(図 4)。

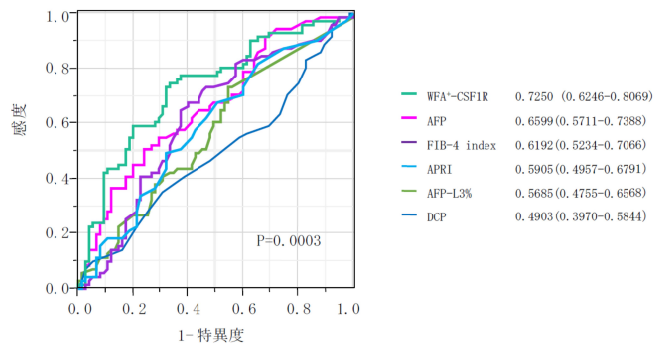
図4、DCPの発癌3年前、2年前、1年前、診断時のROC曲線



(6) 発癌 3 年前の各種マーカーの ROC 曲線

3 年前の各種マーカーの AUC を求めると WFA+-CSF1R が 0.7250(0.6246-0.8069)で最も高く、次いで AFP 0.6599 (0.5711-0.7388)、FIB-4 index 0.6192 (0.5234-0.7066)、APRI 0.5905(0.4957-0.6791)、AFP-L3% 0.5685(0.4755-0.6568)、DCP 0.4903(0.3970-0.5844) の順であった。

図5、3年前の各種マーカーのROC曲線



D. 結論

背景因子を合わせた肝発癌群 79 例と非発癌群 79 例の WFA⁺-CSF1R、AFP、高感度 AFP-L3%、DCP、FIB-4 index、APRI を測定しその有用性について検討した。

- (1) WFA⁺-CSF1R は発癌群で 3 年前から高値を示した。
- (2) WFA⁺-CSF1R は発癌前 3 年前の ROC 曲線の AUC で 0.7250(0.6246-0.8069)と最も高値を示し次いで AFP、FIB-4 index で、高発癌状態の一つの指標となる可能性が示された。

E. 健康危険情報

特記すべきことなし。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tada T, **Kumada T**, Toyoda H, Kiriyaama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Kitabatake S, Niinomi T, Ito T, Hasegawa R, Ando Y, Yamamoto K, Tanaka T. Oral supplementation with branched-chain amino acid granules prevents hepatocarcinogenesis in patients with hepatitis C-related cirrhosis: A propensity score analysis. *Hepatol Res.* 2014 Mar; 44(3):288-295.
- 2) **Kumada T**, Toyoda H, Tada T, Kiriyaama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tanaka J, Kagebayashi C, Satomura S. High-sensitivity Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein assay predicts early detection of hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol.* 2014 Mar; 49(3):555-563.
- 3) Toyoda H, **Kumada T**, Tada T, Murakami Y. Impact of hepatitis B virus integration into liver tissue on the efficacy of peginterferon and ribavirin therapy in hepatitis b virus-negative chronic hepatitis C patients. *J Clin Gastroenterol.* 2014 Jan; 48(1):73-79.
- 4) Shimada N, Toyoda H, Tsubota A, Ide T, Takaguchi K, Kato K, Kondoh M, Matsuyama K, **Kumada T**, Sata M. Baseline factors and very early viral response (week 1) for predicting sustained virological response in telaprevir-based triple combination therapy for Japanese genotype 1b chronic hepatitis C patients: a multicenter study. *J Gastroenterol.* 2013 Nov; In press.
- 5) Matsushima-Nishiwaki R, **Kumada T**, Nagasawa T, Suzuki M, Yasuda E, Okuda S, Maeda A, Kaneoka Y, Toyoda H, Kozawa O. Direct Association of Heat Shock Protein 20 (HSPB6) with Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in Human Hepatocellular Carcinoma: Regulation of the PI3K Activity. *PLoS One.* 2013 Nov; 8(11):e78440.
- 6) Toyoda H, **Kumada T**, Kiriyaama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tada T, Kitabatake S, Murakami Y. Association between hepatic steatosis and hepatic expression of genes involved in innate immunity in patients with chronic hepatitis C. *Cytokine.* 2013 Aug; 63(2):145-150.
- 7) Toyoda H, **Kumada T**. Extended treatment duration overcomes the requirement for profound week-4 interferon responsiveness in order for hepatitis C genotype 1 patients with unfavorable IL-28B genotype to achieve

sustained virologic response. J Clin Virol. 2013 Aug; 57(4):381.

- 8) Sato A, Sata M, Ikeda K, **Kumada T**, Izumi N, Asahina Y, Osaki Y, Chayama K, Kaneko S, Sakai A, Onji M, Hiasa Y, Omura T, Ozeki I, Yokosuka O, Shiina S, Itsubo M, Nishiguchi S, Hirano K, Ide T, Sakisaka S, Yamasaki T, Hidaka I, Tanaka M, Kim SR, Ichida T. Clinical characteristics of patients who developed hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus eradication with interferon therapy: current status in Japan. Intern Med. 2013 Jul; 52(24):2701-2706.
- 9) Toyoda H, **Kumada T**, Tada T, Niinomi T, Ito T, Sone Y, Kaneoka Y, Maeda A. Non-hypervascular hypointense nodules detected by Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI are a risk factor for recurrence of HCC after hepatectomy. J Hepatol. 2013 Jun; 58(6):1174-1180.
- 10) Arao T, Ueshima K, Matsumoto K, Nagai T, Kimura H, Hagiwara S, Sakurai T, Haji S, Kanazawa A, Hidaka H, Iso Y, Kubota K, Shimada M, Utsunomiya T, Hirooka M, Hiasa Y, Toyoki Y, Hakamada K, Yasui K, **Kumada T**, Toyoda H, Sato S, Hisai H,

Kuzuya T, Tsuchiya K, Izumi N, Arie S, Nishio K, Kudo M. FGF3/FGF4 amplification and multiple lung metastases in responders to sorafenib in hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2013 Apr; 57(4):1407-1415.

- 11) Toyoda H, **Kumada T**, Tada T. Lower incidence of hepatocellular carcinoma in patients with transient virologic response to peginterferon and ribavirin combination therapy: Is it really the effect of the therapy? J Hepatol. 2013 Apr; 58(4):838-839.

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	9(3)	e9301 1	2014 Mar
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.	In press.		2014 Mar
Tada T, Kumada T, Toyoda H, Kiriyaama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Kitabatake S, Niinomi T, Ito T, Hasegawa R, Ando Y, Yamamoto K, Tanaka T.	Oral supplementation with branched-chain amino acid granules prevents hepatocarcinogenesis in patients with hepatitis C-related cirrhosis: A propensity score analysis.	Hepatol Res.	44(3)	288-295	2014 Mar
Kumada T, Toyoda H, Tada T, Kiriyaama S, Tanikawa M, Hisanaga Y, Kanamori A, Tanaka J, Kagebayashi C, Satomura S.	High-sensitivity Lens culinaris agglutinin-reactive alpha-fetoprotein assay predicts early detection of hepatocellular carcinoma.	J Gastroenterol.	49(3)	555-563	2014 Mar
Chuma M, Sakamoto N, Nakai A, Hige S, Nakanishi M, Natsuizaka M, Suda G,	Heat shock factor 1 accelerates hepatocellular carcinoma development by activating nuclear factor	Carcinogenesis.	35(2)	272-281	2014 Feb

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Sho T, Hatanaka K, Matsuno Y, Yokoo H, Kamiyama T, Taketomi A , Fujii G, Tashiro K, Hikiba Y, Fujimoto M, Asaka M, Maeda S.	B/mitogen-activated protein kinase.				
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.	9(2)	e8644 9	2014 Feb
Hino K , Hara Y, Nishina S.	Mitochondrial reactive oxygen species as a mystery voice in hepatitis C.	Hepatol Res.	44(2)	123-132	2014 Feb
Genda T, Ichida T , Sakisaka S, Sata M, Tanaka E, Inui A,	Waiting list mortality of patients with primary biliary cirrhosis in the Japanese transplant	J Gastroenterol.	49(2)	324-331	2014 Feb

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Egawa H, Umeshita K, Furukawa H, Kawasaki S, Inomata Y.	allocation system.				
Toyoda H, Kumada T , Tada T, Murakami Y.	Impact of hepatitis B virus integration into liver tissue on the efficacy of peginterferon and ribavirin therapy in hepatitis b virus-negative chronic hepatitis C patients.	J Clin Gastroenterol.	48(1)	73-79	2014 Jan
Fukuda K, Imai Y , Hiramatsu N, Irishio K, Igura T, Sawai Y, Kogita S, Makino Y, Mizumoto R, Matsumoto Y, Nakahara M, Zushi S, Kajiwara N, Oze T, Kawata S, Hayashi N, Takehara T.	Renal impairment during the treatment of telaprevir with peginterferon and ribavirin in patients with chronic hepatitis C.	Hepatol Res.	In press.		2014 Jan
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.	13(3)	1428-1437	2014 Jan
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.	49(1)	126-137	2014 Jan

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	10(2):	201-20 5	2013 Dec
Korenaga K, Korenaga M , Teramoto F, Suzuki T, Nishina S, Sasaki K, Nakashima Y, Tomiyama Y, Yoshioka N, Hara Y, Moriya T, Hino K.	Clinical usefulness of non-protein respiratory quotient measurement in non-alcoholic fatty liver disease.	Hepatol Res.	43(12)	1284-1 294	2013 Dec
Ito K , Yotsuyanagi H, Yatsuhashi 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.	59(1)	89-97	2014 Jan
Narita Y, Genda T, Tsuzura H, Sato S, Kanemitsu Y, Ishikawa S, Kikuchi T, Hirano K, Iijima K, Wada R, Ichida T.	Prediction of liver stiffness for hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis C patients on interferon-based anti-viral therapy.	J Gastroentar ol Hepatol.	29(1)	137-14 3	2014 Jan
Inoue T, Hyodo T, Murakami T, Takayama Y, Nishie A, Higaki A, Korenaga K, Sakamoto A, Osaki Y,	Hypovascular Hepatic Nodules Showing Hypointense on the Hepatobiliary-Phase Image of Gd-EOB-DTPA-Enhanced MRI to Develop a Hypervascular	Dig Dis.	31(5- 6)	472-47 9	2013 Nov

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Aikata H, Chayama K, Suda T, Takano T, Miyoshi K, Koda M, Numata K, Tanaka H, Iijima H, Ochi H, Hirooka M, Imai Y , Kudo M.	Hepatocellular Carcinoma: A Nationwide Retrospective Study on Their Natural Course and Risk Factors.				
Sasaki M, Kondo F, Sawai Y, Imai Y , Kadowaki S, Sano K, Fukusato T, Matsui O, Nakanuma Y.	Serum amyloid A-positive hepatocellular neoplasms in the resected livers from 3 patients with alcoholic cirrhosis.	Histol Histopathol.	28(11)	1499-1505	2013 Nov
Makino Y, Imai Y , Igura T, Kogita S, Sawai Y, Fukuda K, Hori M, Kudo M, Murakami T.	Usefulness of the Extracted-Overlay Function in CT/MR-Ultrasonography Fusion Imaging for Radiofrequency Ablation of Hepatocellular Carcinoma.	Dig Dis.	31(5-6)	485-489	2013 Nov
Shimada N, Toyoda H, Tsubota A, Ide T, Takaguchi K, Kato K, Kondoh M, Matsuyama K, Kumada T , Sata M.	Baseline factors and very early viral response (week 1) for predicting sustained virological response in telaprevir-based triple combination therapy for Japanese genotype 1b chronic hepatitis C patients: a multicenter study.	J Gastroenterol.	In press.		2013 Nov
Hino K , Nishina S, Hara Y.	Iron metabolic disorder in chronic hepatitis C: mechanisms and relevance to hepatocarcinogenesis.	J Gastroenterol Hepatol.	28(Suppl 4)	93-98	2013 Nov
Matsushima-Nishiwaki R, Kumada T , Nagasawa T, Suzuki M, Yasuda E, Okuda S, Maeda A, Kaneoka Y, Toyoda H, Kozawa O.	Direct Association of Heat Shock Protein 20 (HSPB6) with Phosphoinositide 3-kinase (PI3K) in Human Hepatocellular Carcinoma: Regulation of the PI3K Activity.	PLoS One.	8(11)	e78440	2013 Nov

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.	PROTEOMI CS Clin Appl.	7(9-1 0)	642-64 7	2013 Oct
Tomiyama Y, Nishina S, Hara Y, Kawase T, Hino K.	Hepatic oxidative stress in ovariectomized transgenic mice expressing the hepatitis C virus polyprotein is augmented through suppression of AMPK/PGC-1alpha signaling.	Hepatol Res.	In press.		2013 Oct
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.	57(7)	935-94 2	2013 Oct
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.	Intervirolog y.	56(5)	284-29 4	2013 Sep
Makino Y, Imai Y, Igura T, Hori M, Fukuda K, Sawai Y, Kogita S, Ohama H, Matsumoto Y, Nakahara M, Zushi S, Kurokawa M, Isotani K, Takamura M, Fujita N, Murakami T.	Utility of computed tomography fusion imaging for the evaluation of the ablative margin of radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma and the correlation to local tumor progression.	Hepatol Res.	43(9)	950-95 8	2013 Sep
Toyoda H, Kumada T, Kiriya S, Tanikawa M, Hisanaga Y,	Association between hepatic steatosis and hepatic expression of genes involved in innate	Cytokine.	63(2)	145-15 0.	2013 Aug

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kanamori A, Tada T, Kitabatake S, Murakami Y.	immunity in patients with chronic hepatitis C.				
Toyoda H, Kumada T.	Extended treatment duration overcomes the requirement for profound week-4 interferon responsiveness in order for hepatitis C genotype 1 patients with unfavorable IL-28B genotype to achieve sustained virologic response.	J Clin Virol.	57(4)	381	2013 Aug
Morita S, Matsumoto A, Umemura T, Shibata S, Kamijo N, Ichikawa Y, Kimura T, Joshita S, Komatsu M, Yoshizawa K, Tanaka E.	Characteristics and prediction of hepatitis B e-antigen negative hepatitis following seroconversion in patients with chronic hepatitis B.	Hepatol Res.	In press.		2013 Aug
Nakamura M, Nakashima H, Tsutsumi K, Matsumoto H, Muta Y, Ueno D, Yoshida K, Hino K, Urakami A, Tanaka M.	First jejunal vein oriented mesenteric excision for pancreatoduodenectomy.	J Gastroenter ol.	48(8)	989-99 5	2013 Aug
Ohama H, Imai Y, Nakashima O, Kogita S, Takamura M, Hori M, Seki Y, Sawai Y, Igura T, Fukuda K, Makino Y, Morimoto O, Ohsawa M, Sakamoto M, Murakami T.	Images of Sonazoid-enhanced ultrasonography in multistep hepatocarcinogenesis: comparison with Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI.	J Gastroenter ol.	In press.		2013 Aug
Osaki Y, Ikeda K, Izumi N, Yamashita S, Kumada H, Hatta S, Okita K.	Clinical effectiveness of bipolar radiofrequency ablation for small liver cancers.	J Gastroenter ol.	48(7)	874-88 3	2013 Jul

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Takemura T, Yoshida Y, Kiso S, Kizu T, Furuta K, Ezaki H, Hamano M, Egawa M, Chatani N, Kamada Y, Imai Y , Higashiyama S, Iwamoto R, Mekada E, Takehara T.	Conditional loss of heparin-binding EGF-like growth factor results in enhanced liver fibrosis after bile duct ligation in mice.	Biochem Biophys Res Commun.	437(2)	185-191	2013 Jul
Komatsu M, Tanaka N, Shibata SI, Kimura T, Ichikawa Y, Morita S, Joshita S, Nagaya T, Umemura T, Ichijo T, Matsumoto A , Yoshizawa K, Tanaka E.	Laparoscopic findings of congenital hepatic fibrosis: A case report and review of the published work.	Hepatol Res.	In press.		2013 Jul
Tomiya Y, Takenaka K, Kodama T, Kawanaka M, Sasaki K, Nishina S, Yoshioka N, Hara Y, Hino K .	Risk factors for survival and the development of hepatocellular carcinoma in patients with primary biliary cirrhosis.	Intern Med.	52(14)	1553-1559	2013 Jul
Sato A, Sata M, Ikeda K, Kumada T , Izumi N , Asahina Y, Osaki Y, Chayama K, Kaneko S, Sakai A, Onji M, Hiasa Y, Omura T, Ozeki I, Yokosuka O, Shiina S, Itsubo M, Nishiguchi S, Hirano K, Ide T, Sakisaka S, Yamasaki T, Hidaka I, Tanaka M, Kim SR, Ichida T .	Clinical characteristics of patients who developed hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus eradication with interferon therapy: current status in Japan.	Intern Med.	52(24)	2701-2706	2013 Jul
Toyoda H, Kumada T , Tada T, Niinomi T, Ito T, Sone Y, Kaneoka Y,	Non-hypervascular hypointense nodules detected by Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI	J Hepatol.	58(6)	1174-1180	2013 Jun

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Maeda A.	are a risk factor for recurrence of HCC after hepatectomy.				
Miyake T, Abe M , Tokumoto Y, Hirooka M, Furukawa S, Kumagi T, Hamada M, Kawasaki K, Tada F, Ueda T, Hiasa Y, Matsuura B, Onji M.	B cell-activating factor is associated with the histological severity of nonalcoholic fatty liver disease.	Hepatol Int.	7(2)	539-547	2013 Jun
Ikeda K, Izumi N , Tanaka E, Yotsuyanagi H, Takahashi Y, Fukushima J, Kondo F, Fukusato T, Koike K, Hayashi N, Kumada H.	Fibrosis score consisting of four serum markers successfully predicts pathological fibrotic stages of chronic hepatitis B.	Hepatol Res.	43(6)	596-604	2013 Jun
Mancinelli R, Franchitto A, Glaser S, Meng F, Onori P, Demorrow S, Francis H, Venter J, Carpino G, Baker K, Han Y, Ueno Y , Gaudio E, Alpini G.	GABA induces the differentiation of small into large cholangiocytes by activation of Ca(2+) /CaMK I-dependent adenylyl cyclase 8.	Hepatology.	58(1)	251-263	2013 Jul
Abe T, Hashiguchi A, Yamazaki K, Ebinuma H, Saito H, Kumada H, Izumi N , Masaki N, Sakamoto M .	Quantification of collagen and elastic fibers using whole-slide images of liver biopsy specimens.	Pathol Int.	63(6)	305-310	2013 Jun
Ninomiya M, Kondo Y, Funayama R, Nagashima T, Kogure T, Kakazu E, Kimura O, Ueno Y , Nakayama K, Shimosegawa T.	Distinct microRNAs expression profile in primary biliary cirrhosis and evaluation of miR 505-3p and miR197-3p as novel biomarkers.	PloS one.	8(6)	e66086	2013 Jun
Kaji H , Ocho M, Togayachi A , Kuno A , Sogabe M, Ohkura T,	Glycoproteomic Discovery of Serological Biomarker Candidates for HCV/HBV	J Proteome Res.	12(6)	2630-2640	2013 Jun

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Nozaki H, Angata T, Chiba Y, Ozaki H, Hirabayashi J, Tanaka Y, Mizokami M, Ikehara Y, Narimatsu H.	Infection-Associated Liver Fibrosis and Hepatocellular Carcinoma.				
Higashitani K, Kanto T, Kuroda S, Yoshio S, Matsubara T, Kakita N, Oze T, Miyazaki M, Sakakibara M, Hiramatsu N, Mita E, Imai Y, Kasahara A, Okuno A, Takikawa O, Hayashi N, Takehara T.	Association of enhanced activity of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells with the induction of regulatory T cells in chronic hepatitis C infection.	J Gastroenterol.	48(5)	660-670	2013 May
Hasegawa K, Kokudo N, Makuuchi M, Izumi N, Ichida T, Kudo M, Ku Y, Sakamoto M, Nakashima O, Matsui O, Matsuyama Y.	Comparison of resection and ablation for hepatocellular carcinoma: A cohort study based on a Japanese nationwide survey.	J Hepatol.	58(4)	724-729	2013 Apr
Arao T, Ueshima K, Matsumoto K, Nagai T, Kimura H, Hagiwara S, Sakurai T, Haji S, Kanazawa A, Hidaka H, Iso Y, Kubota K, Shimada M, Utsunomiya T, Hirooka M, Hiasa Y, Toyoki Y, Hakamada K, Yasui K, Kumada T, Toyoda H, Sato S, Hisai H, Kuzuya T, Tsuchiya K, Izumi N, Arii S, Nishio	FGF3/FGF4 amplification and multiple lung metastases in responders to sorafenib in hepatocellular carcinoma.	Hepatology.	57(4)	1407-1415	2013 Apr

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
K, Kudo M.					
Harada N, Hiramatsu N, Oze T, Yamada R, Kurokawa M, Miyazaki M, Yakushijin T, Miyagi T, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Oshita M, Mita E, Hagiwara H, Inui Y, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Imai Y , Inoue A, Hayashi N, Takehara T.	Incidence of hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients with normal alanine aminotransferase levels categorized by Japanese treatment guidelines.	J Gastroenterol.	48(4)	535-543	2013 Apr
Toyoda H, Kumada T , Tada T.	Lower incidence of hepatocellular carcinoma in patients with transient virologic response to peginterferon and ribavirin combination therapy: Is it really the effect of the therapy?	J Hepatol.	58(4)	838-839	2013 Apr
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.	57(5)	1705-1715	2013 May
Harada K, Hirohara J, Ueno Y , Nakano T, Kakuda Y, Tsubouchi H, Ichida T , Nakanuma Y.	Incidence of and risk factors for hepatocellular carcinoma in primary biliary cirrhosis: National data from Japan.	Hepatology.	57(5)	1942-1949	2013 May

総説

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Oze T, Hiramatsu N, Yakushijin T, Miyazaki M, Yamada A, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Fukui H, Inui Y, Hijioka T, Inada M, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y , Hayashi E, Kato M, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kasahara A, Hamasaki T, Hayashi N, Takehara T; the Osaka Liver Forum.	Post-treatment levels of -fetoprotein predict Incidence of hepatocellular carcinoma after interferon therapy.	Clin Gastroenterol Hepatol.	In press.		2013 Dec

総説(和文)

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
豊田 秀徳、 熊田 卓 .	HCV 治療後発癌例の解析(C 型肝炎治療 2014:経口抗ウイルス薬時代の到来, HCV 駆除後肝発癌の対策).	肝胆膵.	67(6)	1035-1039	2013 Dec
髙 修平 、木村 睦海、荒川 智宏、小関 至、狩野 吉康、豊田 成司.	肝線維化の定量的測定(検査値の読み方 連載).	臨床消化器内科.	28(13)	1783-1788	2013 Dec
多田 俊史、 熊田 卓 、豊田 秀徳.	超高齢肝細胞癌患者に対する治療法の選択と予後 -後期高齢者との比較検討-.	The Liver Cancer Journal.	5(4)	268-272	2013 Dec
山本 健太、 熊田 卓 、桐山 勢生、谷川 誠、久永康宏、豊田 秀徳、金森 明、多田 俊史、北畠 秀介、長谷川 綾平、伊藤 隆徳、安藤 祐資、颯田 祐介、田中 達也、曾根 康	肝細胞癌と鑑別が困難であった reactive lymphoid hyperplasia の 1 例.	肝臓.	54(11)	755-764	2013 Nov

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
博、福里 利夫.					
多田 俊史、 熊田 卓 、豊田 秀徳.	C 型肝硬変例における分岐鎖アミノ酸製剤と肝発癌との関連 -Propensity score 分析を用いた検討-	消化と吸収.	35(3)	290-294	2013 Jul
松田 厚志、 久野 敦 、 成松 久 、監修：第 62 回日本医学検査学会記念誌編集委員会.	グライコプロテオミクスによる臨床糖鎖腫瘍マーカー開発 -グライコームからグライコプロテオームへ.	検査診断学への展望 -臨床検査指針：測定とデータ判読のポイント-			2013 May

