

新規糖鎖マーカー「Mac-2結合蛋白糖鎖修飾異性体 (M2BPGi)」による肝線維化評価

A novel glycobiomarker: *Wisteria floribunda agglutinin*⁺ - *Mac-2 binding protein*, *M2BPGi*, for predicting liver fibrosis

いい お えつ こ た なか やす ひと く の あつし なり まつ ひさし
 飯 尾 悦 子¹⁾ : 田 中 靖 人²⁾ : 久 野 敦³⁾ : 成 松 久³⁾
 Etsuko IIO Yasuhito TANAKA Atsushi KUNO Hisashi NARIMATSU

<キーワード>

WFA⁺-M2BP, M2BPGi, liver fibrosis (肝線維化)、hepatocellular carcinoma : HCC (肝癌)、serum marker (血清マーカー)

はじめに

本邦におけるB型肝炎、C型肝炎感染者はそれぞれ150万人、200万人程度と推定されている。慢性肝炎は治療によりウイルスが排除されない限り、持続的に肝障害が進行し、感染から20～30年程度後に、肝硬変に進展し、肝細胞癌へと至ることが知られている。C型慢性肝炎においては近年interferon (IFN) を使用しないdirect acting antivirals (DAAs) の開発によりウイルス排除が飛躍的に進んでいるが^{1,2)}、肝線維化が進行した症例ではウイルス学的著効 (sustained virologic response: SVR) 後も発癌のリスクは残存する。なお、がん統計情報によると、原発性肝癌によって2013年度には30,175人が死亡しており、その9割以上は、B型やC型肝炎ウイルス感染者である³⁾。特に本邦においてはC型肝炎患者の高齢化が進み、発癌は重要な問題である。また、近年では非アルコール性脂肪性肝炎 (nonalcoholic steatohepatitis ; NASH) を背景とする肝癌も増加している⁴⁾。肝細胞癌の発生率と肝線維

化の程度は相関することが知られており、肝線維化の把握は肝細胞癌の高リスク群を予測するうえで極めて重要である。しかし線維化診断のゴールドスタンダードである肝生検は侵襲的であり、出血など重篤な合併症を引き起こす可能性があるため、肝生検に代わる線維化評価が重要とされている。*Wisteria floribunda agglutinin* (WFA)⁺-*Mac-2 binding protein* (M2BP) はFibrosis stage が上がるに従って上昇する、非侵襲的な肝線維化評価が可能な新規糖鎖マーカーである。本稿では、最近同定された糖鎖関連の肝線維化マーカー WFA⁺-M2BP を中心に解説する。このマーカーは肝線維化検査用試薬として開発が終わり、M2BPGi (M2BP Glycan isomer) と命名されて、2015年1月1日から保険適応されている。

I. 肝線維化進展と発癌

肝細胞癌の発生頻度は、肝臓の線維化の程度と相関することが知られており、C型肝炎患者における線維化の程度別の発癌率は、F0～1で年率0.5%、F2で2%、F3:5.3%、F4:7.9%である(図1)。したがって、発癌を予測するうえで肝臓の線維化の程度を確定することは重要である。従来、この診断には肝生検が用いられ、実際に肝組織を病的に観察することから信頼度の高い検査であるといえる。一方で、肝生検は、経皮的に肝臓の組織を直接採取する検査であるため、侵襲性が高く出血などのリスクもあり、

1) 名古屋市立大学大学院医学研究科
 消化器・代謝内科学

2) 名古屋市立大学大学院医学研究科
 病態医学(ウイルス学)

〒467-8601 名古屋市瑞穂区瑞穂町字川澄1

3) 国立研究開発法人産業技術総合研究所

〒305-8568 茨城県つくば市梅園1-1-1つくば中央2

1) Department of Gastroenterology and Metabolism, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan.

2) Department of Virology and Liver Unit, Nagoya City University Graduate School of Medical Sciences, Nagoya, Japan.

(Kawasumi 1, Mizuho-cho, Mizuho-ku, Nagoya-shi, Aichi)

3) National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST) (Tsukubachuo 2, 1-1-1 Umezono, Tsukuba-shi, Ibaraki)

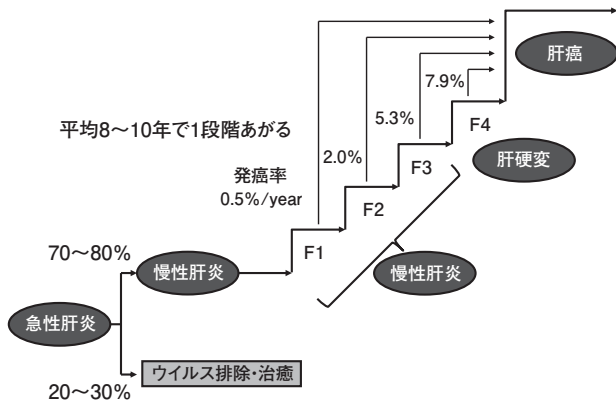


図1 C型肝炎の線維化と発癌
(Yoshida H et al. Ann Inter Med 1999より引用改変)

進行する病態を評価するために繰り返し行うことは身体的負担が大きい。また生検針を刺す肝臓の部位により、線維化の程度にばらつきがあることは否めない。このようなことから、より非侵襲的な肝線維化の検査法が考案されてきた。簡便な血液検査で得られるヒアルロン酸、IV型コラーゲン、IV型コラーゲン7S、III型コラーゲンN末端ペプチド(PⅢNP)、あるいは複数の血液検査の結果の組み合わせから肝線維化を推定するFIB-4 indexやAST to Platelet Ratio Index (APRI)、最近ではFibroscanやtransient elastographyを用いた肝線維化評価法などが知られている。既存の検査法より高感度かつ特異的な肝線維化診断法を目指し、近年、第三の生命鎖として注目されている糖鎖に着目し、肝線維化あるいは発癌にかかわる新規糖鎖マーカーの開発が行われてきた。

II. 糖鎖とは

糖鎖は核酸、タンパク質につぐ第三の生命鎖とし

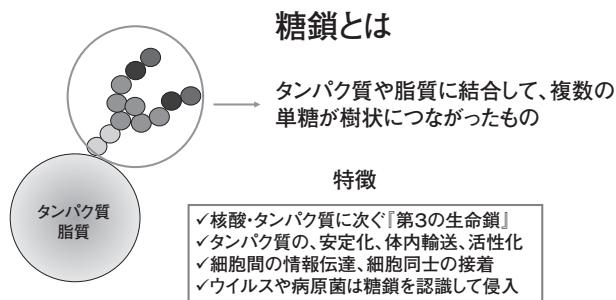


図2 糖鎖構造と特徴

で注目されている。糖鎖はタンパク質や脂質に結合して存在し、複数の単糖が枝分かれしながら鎖状につながったものであり、それぞれ糖タンパク質、糖脂質と呼ばれる。膜タンパク質や血清タンパク質のほとんどが糖タンパク質であり、糖鎖が結合して初めて機能する。糖鎖は180種類以上にもおよぶ糖転移酵素により合成される。糖転移酵素は細胞内の小胞体やゴルジ装置に膜結合型として存在しており、ここでタンパク質や脂質に糖鎖を転移する。細胞内にどの種類の糖転移酵素がどのくらい発現しているかにより、タンパク質上の糖鎖構造が決まる。タンパク質に比べて糖鎖は多様性があり、また構造が複雑なため、その解析は難解であった。近年、質量分析などの進歩や糖鎖遺伝子の改変動物を用いた機能解析の成果により、糖鎖の研究が飛躍的に発展し、タンパク質の安定化、体内輸送、活性化、細胞間の情報伝達、細胞同士の接着に関与すること、またウイルスや病原菌は糖鎖を認識して侵入することなどが報告されている(図2)。さらに様々な病気の発症の解明や、診断、治療に糖鎖研究が欠かせないことが明らかになってきている。診断への応用としては、炎症、がん化に伴う同一糖タンパク質の糖鎖構造の変化を捉えることにより、糖鎖疾患マーカーの開発が試みられている(図3)。腫瘍マーカーのα-fetoprotein (AFP)-L3は糖鎖構造の変化を利用した代表的なマーカーである。AFPは背景病変としての慢性肝炎や肝硬変の非癌部肝細胞においても産生されるため、肝細胞癌診断の特異度は低いのに対し、AFP-L3分画は、このAFP陽性の肝癌患者に対する特異性を高めるべく開発されたマーカーである。AFP-

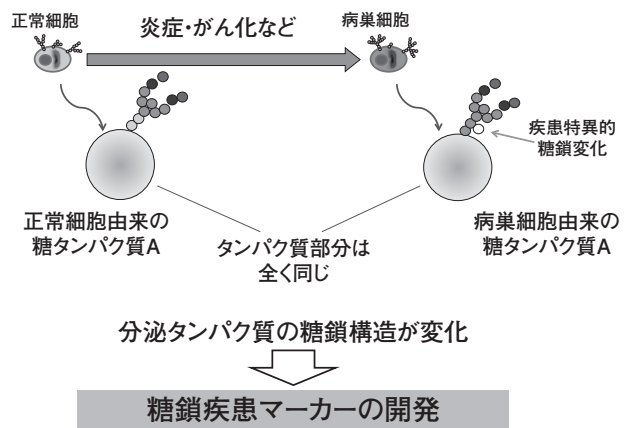


図3 病態変化と糖鎖構造の変化

L3分画とは、AFPに結合する1本の糖鎖（アスパラギン結合型糖鎖；N-グリカン）のコア部分にフコースが結合して構造変化したものである。レクチンとは、ある特定部分の糖鎖構造を認識し結合するタンパク質のことであるが、このコア部分を認識するレンズマメレクチン（*Lens culinaris agglutinin*；LCA）を用いたレクチン親和性電気泳動を用いて分離されるバンドを陽極側からL1、L2およびL3とすると、肝細胞癌患者ではL3分画の占める比率が増加し、AFP-L3/AFPの量比が肝臓癌マーカーとして臨床的に応用されている。

Ⅲ. 新規肝線維化マーカー探索のための糖鎖構造解析技術の開発

バイオマーカーの多くは疾患の際に生じるタンパク質の量的変化を測定しているが、元来タンパク質は糖鎖修飾による多様性を持つことが知られている。近年、疾患特異的に修飾された糖鎖を持つタンパク質の新たなバイオマーカーとしての可能性についての研究が本邦を中心に行われている。

新規糖鎖疾患マーカー候補の探索は、3ステップで行われる⁵⁾。まず健常者の血清と疾患群（線維化進展度別）の血清を比較することで、糖鎖遺伝子の発現プロファイルの違いを利用し、実際に産生、分泌された糖タンパク質糖鎖をレクチンマイクロアレイ分析し、患者群で特徴的に産生する糖鎖に反応するレクチンあるいは抗糖鎖抗体のプロープを選択する。肝線維化糖鎖マーカーの開発に当たっては、線維化により糖鎖構造がかわる糖タンパク質と、構造変化した糖鎖だけに反応するプロープレクチンの決定が重要である。前述した戦略により、肝線維化の場合は、糖タンパク質としてM2BP、そして糖鎖部分に結合するレクチンとしてWFAが多くの候補の中から抽出された。

1. コア糖タンパク質の同定

目的とする疾患に特異的な糖鎖マーカーを探索するためには、その糖鎖をもつコアタンパク質を同定・定量する技術が必要である。早期癌などが特異的に血中に放出するタンパク質は少量であり、血清中で希釈されるために微量な糖タンパク質を効率よく濃縮・精製する試料調製法と、それらを高感度に同定・

構造解析・比較定量する技術が必要であるが、これまでの液体クロマトグラフィーや質量分析器を用いた糖鎖解析（LC/MS）法では、糖鎖をタンパク質から切り離して蛍光標識しなければならず、多くの工程数と時間を要していたが、産業技術総合研究所で開発された糖鎖付加部位を選択的に標識する糖鎖付加位置特異的安定同意標識法（IGOT）⁶⁾を組み合わせることで、糖タンパク質の種別、糖鎖付加位置、位置ごとに存在する糖鎖モチーフを網羅的に分析することが可能になった。

2. 抗体オーバーレイ・レクチンマイクロアレイ法

レクチンマイクロアレイとは特異性の異なる複数レクチン（30種以上が好ましい）を同一基板上に固相化したものであり、通常ガラス1枚あたり複数のサンプルを同時に分析できる形態をとる。抗体オーバーレイ検出法は、分析対象である糖タンパク質は蛍光標識等の処理をせずにそのままレクチンマイクロアレイに添加し反応させ、基板上的レクチンへ結合した糖タンパク質をコアタンパク質認識蛍光標識抗体で検出する。スライドガラスの側面から励起光を入射し全反射させることにより、ガラス面から200nmくらいの厚みでエバネッセント波を発生させ、この厚みの中に入った蛍光物質だけがシグナルを出すように設計されている。このアレイは極めて感度が高く微量の糖鎖でも検出できる⁷⁾。

以上のようなグライコミクス解析により選ばれた候補糖タンパク質から、バイオインフォーマティクス技術を組み合わせ、1) 血中に分泌されるかどうか 2) 健常人血清由来タンパクには反応せず患者血清由来タンパクと反応し、その差が大きいかどうか 3) 糖タンパク質1分子あたりの糖鎖の本数が多いかどうかなどを考慮し、臨床診断薬として最適な糖鎖マーカーが絞りこまれた。

3. WFA⁺ - M2BP (M2BPGi) の同定

肝線維化糖鎖マーカーの開発に当たっては、線維化により糖鎖構造がかわる糖タンパク質と変化したものだけに反応するプロープレクチンの決定が重要である。前述したシステムを活用し、得られたマーカー候補分子の中から、肝線維化の場合は、糖タンパク質としてM2BP、そして糖鎖部分に結合するレクチンとしてWFAが多くの候補の中から抽出された。

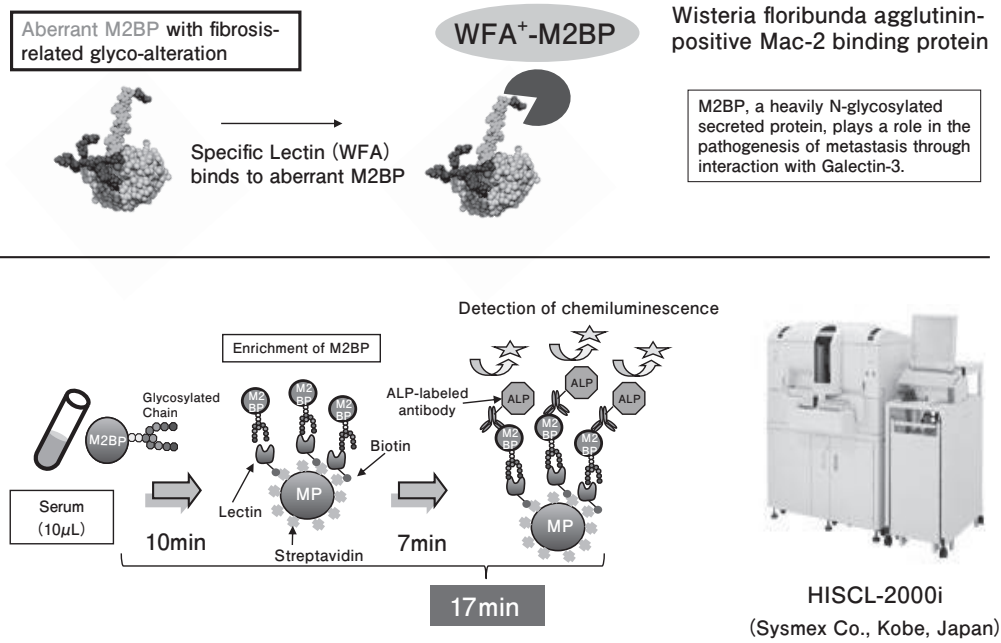
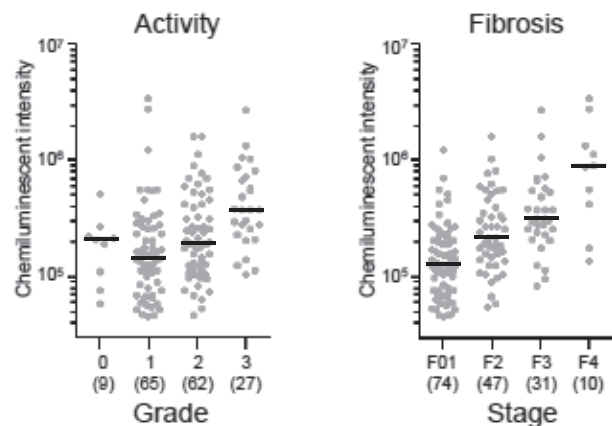


図4 WFA⁺-M2BP (M2BPGi) 測定の流れ

疾患により糖鎖構造が変化する糖タンパク質は多数存在する。M2BPはMacrophage-associated lectinであるMac-2のリガンドとして知られている血清中に存在する分泌型糖タンパクであり、細胞接着に関与していることが報告されている⁸⁾。585残基のアミノ酸により構成され、1分子で7本のN-グリカン(アスパラギン結合型の糖鎖)を持ち、さらに生体内では10-15分子のドーナツ状の多量体構造で存在しているため、1分子あたりの糖鎖本数が多く、1つのポリマーが100本近くのN-グリカンを有する。このため、支持体へ固定されたWFAと多点結合が可能となり、強い親和性を示す。M2BPの糖鎖構造は肝臓の線維化進展により顕著に変化することが報告されており⁹⁻¹²⁾、一方でM2BPは健常者の血清中でも数µg/mL発現しており、タンパク質発現レベルの測定のみでは臨床診断上の有用性は低いと考えられている¹³⁾。次に、血中の主要な糖タンパク質に邪魔されずに、肝線維化進展度に相関して糖鎖が変化した分子をとらえるレクチンを絞りこみ、WFAというレクチン(糖鎖プローブ)が選択された⁶⁾。WFAレクチンを高密度に固相化することで、多点結合により、WFA-M2BP間に非常に強い結合を形成する。肝線維化の進行度によってM2BP上の糖鎖構造が変化するが、タンパク質部分と糖鎖構造の両方を検

出することで、診断マーカーとして利用できる。WFAが認識するM2BPの糖鎖構造変化の測定は肝臓の線維化病態の把握に有用であり、産業技術総合研究所のKunoらによってFastLec-Hepa法を用いてWFA-M2BPが定量化され、Fibrosis stageを反映する糖鎖マーカーであることが明らかにされた(図4, 5)¹⁴⁾。この後、産総研とシスメックス社の共同研究が始まり、シスメックス社の自動免疫測定装置HISCL-2000iを用いて、わずか17分でWFA⁺-M2BP値が測定できる測定キットが完成した。



WFA⁺-M2BPは線維化の進行に伴って上昇する
Kuno A et al. Sci Rep 2013より改変

図5

IV. 新規肝線維化マーカー WFA⁺-M2BP (M2BPGi) による臨床応用

この WFA⁺-M2BP を測定する試薬キットは M2B-PGi と命名され 2015 年 1 月に保険収載された。保険点数は 200 点である。慢性肝炎および肝硬変の診断・治療において肝臓の Fibrosis stage を診断し、治療方針の指標およびモニタリングに有用とされている。WFA レクチンを用いて M2BPGi を捉え、化学発光酵素免疫反応により M2BPGi 量に応じた発光強度を検出する検査技術であり、肝臓の線維化の進行度が反映される。このような検査技術は、これまでのタンパク質ベースでの検査では実現できなかったが、線維化病態における M2BPGi 表面上の糖鎖構造変化を捉えることで可能になった有用性の高い検査である。

M2BPGi の測定値は以下のように Cutoff index (C.O.I.) として定量化された。

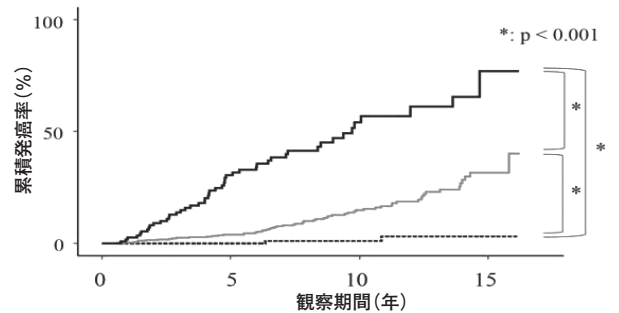
$$\text{C.O.I.} = ([\text{M2BPGi}] - [\text{M2BPGi}]_{\text{nc}}) / ([\text{M2BPGi}]_{\text{pc}} - [\text{M2BPGi}]_{\text{nc}})$$

ここで [M2BPGi] nc はバックグラウンドバッファーにおける定量値、[M2BPGi] pc は健康人血清における定量値の平均値+2.5SD である。

M2BPGi の C.O.I. を 1.0 としたとき、肝生検検査 F0F1 判定以上との一致率は 0.822、感度 0.735、特異度 0.974 であった。また肝生検検査での Fibrosis stage F3、F4 検体を用いての C.O.I. を 3.0 以上としたときの F4 判定との一致率は 0.857、感度 0.806、特異度 0.862 であり、既存の肝線維化指標に劣らない結果である。したがって、測定範囲は 0.10 ~ 20.00 C.O.I. (半定量法) で、判定方法は、陰性 (C.O.I. < 1.00)、陽性 1+ (慢性肝炎 1.00 ≤ C.O.I. < 3.00)、陽性 2+ (肝硬変判定 C.O.I. ≥ 3.00) とされる。

これまでに Yamasaki らは C 型慢性肝疾患患者における WFA⁺-M2BP 値を < 1、1-4、> 4 としたときに累積発がん率が異なることを報告し (図 6)¹⁵⁾、WFA⁺-M2BP 値は肝線維化評価だけでなく WFA⁺-M2BP 値を経時的に follow up することで、C 型慢性肝疾患の肝発癌予測も可能になることを報告した。また WFA⁺-M2BP は初期の開発段階では C 型慢性肝疾患患者において肝線維化評価が検討されたが、脂肪性肝疾患 (NAFLD) においても線維化進展に伴

WFA ⁺ -M2BP levels (C.O.I.)	累積発がん率 (number at risk)			
	N	5th year	10th year	15th year
— ≥4	118	30.5% (89)	54.1% (61)	77.0% (50)
— 1-4	434	3.9% (342)	14.8% (197)	31.6% (90)
- - - <1	155	0% (109)	1.1% (60)	3.1% (10)



WFA⁺-M2BP 値の上昇に伴い累積発がん率が上昇する

Yamasaki et al, Hepatology2014より改変

図 6

い上昇することが報告され¹⁶⁾、今後問題になる脂肪肝を伴う症例からの進展例の絞り込みにも有望と思われた。また ultrasound based-virtual touch tissue quantification (VTTQ) や magnetic resonance imaging based-liver-to-major psoas muscle intensity ratio (LMR) といった他の線維化評価法との比較¹⁷⁾ など本邦から WFA⁺-M2BP の有用性が報告されている。一方で B 型肝炎や NASH は同じ F4 においても C 型肝炎と比べて低値であり¹⁶⁾、肝臓の線維化を評価する上で注意を要し、カットオフラインの設定を含め、今後の検討が必要である。

おわりに

新規糖鎖マーカー WFA⁺-M2BP (M2BPGi) は採血のみで肝線維化評価が可能な、かつ採血から測定結果まで 20 分以内という迅速な測定が可能である。このような非侵襲性かつ簡便な検査系を確立することにより、患者の身体的負担を軽減し、肝線維化の進展を推定できるようになり、その結果、肝細胞癌の高リスク群の囲い込みが可能となるため、WFA⁺-M2BP (M2BPGi) は今後広く臨床の場で用いられることが予想される。このような糖鎖構造変化を用いたバイオマーカー探索により、今回紹介した肝線

維化マーカーのみならず、早期肝細胞癌のマーカーをはじめとした様々な疾患関連マーカーの開発が期待される。

謝 辞

本稿で紹介した内容は、産業技術総合研究所・糖鎖医学研究センター「糖鎖機能活用技術開発」プロジェクト(MGプロジェクト)(プロジェクトリーダー、成松 久)と国立国際医療センター国府台病院肝炎・免疫研究センター(センター長、溝上雅史)と名古屋市立大学医学部(教授、田中靖人)との共同研究において得られた肝疾患マーカー開発の研究成果である。

文 献

- 1) Kumada H, Suzuki Y, Ikeda K, et al. Daclatasvir plus asunaprevir for chronic HCV genotype 1b infection. *Hepatology*. 2014 ; **59**(6) : 2083-2091.
- 2) Poordad F, Hezode C, Trinh R, et al. ABT-450/r-ombitasvir and dasabuvir with ribavirin for hepatitis C with cirrhosis. *The New England journal of medicine*. 2014 ; **370**(21) : 1973-1982.
- 3) 厚生労働省 : 平成25年(2013)人口動態統計(確定数)の概況.
- 4) Sun C, Fan JG, Qiao L. Potential epigenetic mechanism in non-alcoholic Fatty liver disease. *International journal of molecular sciences*. 2015 ; **16**(3) : 5161-5179.
- 5) Narimatsu H, Sawaki H, Kuno A, et al. A strategy for discovery of cancer glyco-biomarkers in serum using newly developed technologies for glycoproteomics. *The FEBS journal*. 2010 ; **277**(1) : 95-105.
- 6) Kaji H, Ocho M, Togayachi A, et al. Glycoproteomic discovery of serological biomarker candidates for HCV/ HBV infection-associated liver fibrosis and hepatocellular carcinoma. *Journal of proteome research*. 2013 ; **12**(6) : 2630-2640.
- 7) Kuno A, Uchiyama N, Koseki-Kuno S, et al. Evanescent field fluorescence-assisted lectin microarray : a new strategy for glycan profiling. *Nature methods*. 2005 ; **2**(11) : 851-856.
- 8) Inohara H, Akahani S, Kohts K, et al. Interactions between galectin-3 and Mac-2-binding protein mediate cell-cell adhesion. *Cancer research*. 1996 ; **56**(19) : 4530-4534.
- 9) Sasaki T, Brakebusch C, Engel J, et al. Mac-2 binding protein is a cell-adhesive protein of the extracellular matrix which self-assembles into ring-like structures and binds beta1 integrins, collagens and fibronectin. *The EMBO journal*. 1998 ; **17**(6) : 1606-1613.
- 10) 成松 久. 肝線維化マーカーの開発と実用化. *バイオサイエンスとインダストリー*. 2013 ; **71**(4) : 337-339.
- 11) 成松 久. 【グライコプロテオミクス技術開発と医療への応用】実用化に向けた糖鎖バイオマーカー開発の戦略. *医学のあゆみ*. 2014 ; **249**(8) : 649-654.
- 12) Kamada Y, Fujii H, Sawai Y, et al. Serum Mac-2 binding protein levels as a novel diagnostic biomarker for prediction of disease severity and nonalcoholic steatohepatitis. *Proteomics Clinical applications*. 2013.
- 13) Ozaki Y, Kontani K, Hanaoka J, et al. Expression and immunogenicity of a tumor-associated antigen, 90K/Mac-2 binding protein, in lung carcinoma. *Cancer*. 2002 ; **95**(9) : 1954-1962.
- 14) Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, et al. A serum “sweet-doughnut” protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. *Scientific reports*. 2013 ; **3** : 1065.
- 15) Yamasaki K, Tateyama M, Abiru S, et al. Elevated serum levels of Wisteria floribunda agglutinin-positive human Mac-2 binding protein predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients. *Hepatology*. 2014 ; **60**(5) : 1563-1570.
- 16) Abe M, Miyake T, Kuno A, et al. Association between Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein and the fibrosis stage of non-alcoholic fatty liver disease. *Journal of gastroenterology*. 2014.
- 17) Toshima T, Shirabe K, Ikegami T, et al. A novel serum marker, glycosylated Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein(WFA(+)-M2BP), for assessing liver fibrosis. *Journal of gastroenterology*. 2015 ; **50**(1) : 76-84.