

糖鎖マーカを用いた運動療法・禁酒による 肝障害改善評価法の開発

(研究助成金 60万円)

代表研究者 大阪大学大学院医学系研究科機能診断科学 准教授 鎌田 佳宏

大阪大学医学部卒業
大阪大学大学院博士課程修了

研究目的

現在我が国は急速に高齢化が進むとともに肥満人口が増加し、いわゆるメタボリックシンドローム患者数が増加している。メタボリックシンドロームの肝臓における表現型である非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) 患者数も増加の一途をたどっている。わが国では約1000万人のNAFLD患者が存在するものと推定されているものの現在簡便かつ正確に病態を評価できるバイオマーカーはない。NAFLDは明らかな飲酒歴がないにもかかわらずアルコール性肝障害に類似した肝組織像を呈する疾患であり、非進行性の非アルコール性脂肪肝 (NAFL) と肝硬変・肝がんへと進展しうる非アルコール性脂肪肝炎 (NASH) に大別され、NASH患者は我が国で200万人存在すると推定されている。一方、アルコール性肝障害患者は現在我が国で約250万人存在すると推定されており、肝硬変・肝がんへと進展しうる疾患である。

NASH, アルコール性肝障害の重症度判定にはこれまで有用な血液バイオマーカーが存在せず、肝生検による組織診断によってその障害度判定が行われてきた。私どもは最近、**フコシル化ハプトグロビン (Fuc-Hpt) とMac-2 binding protein (Mac-2bp)** という糖鎖関連蛋白がNASHの血液バイオマーカーとなり、これらの組み合わせが組織診断に匹敵する強力なNASH診断ツールとなることを報告した (Hepatology 2015)。アルコール性肝障害とNASHは肝組織像が似ており、これら糖鎖バイオマーカーによる肝障害度診断への有用性が十分期待できる。

本研究では2つの糖鎖マーカを用いた運動療法前後、禁酒前後に測定することで客観的に運動療法、禁酒

の肝臓への影響を評価することを目的とする。また経年的に経過を追えた対象者については予後予測への有用性についても検討する。

研究実施計画の概要

- 糖鎖バイオマーカーFuc-Hpt, Mac-2bpの測定はそれぞれ申請者らの研究室で開発したELISAキットを用いて測定する。
- 私どもはすでに数年以上にわたり、同一機関で同一健診受診者の血清を毎年数千以上の規模で経年的に収集している。これら健診受信者は問診にて飲酒習慣をチェックしており、飲酒習慣の変化（不変，増加，減少）別に糖鎖マーカーの推移を検討する。
- 本研究の対象者は肝臓組織の検討は行っていないため年齢・性別・血清生化学検査値などを組み合わせた種々のスコアリングシステム（FIB4 index, NAFLD fibrosis score, APRI scoreなど）を用いて間接的に肝障害度を推定し、糖鎖マーカーとの比較検討も行う。
- 健診受診者については初回登録より数年以上経過している症例が多数いるため予後調査も行う。
- 本研究は非侵襲的研究であり、対象者に不利益を生ずることはない。

はじめに

現在我が国は急速に高齢化が進むとともに肥満人口が増加し、いわゆるメタボリックシンドローム患者数が増加している。メタボリックシンドロームの肝臓における表現型である非アルコール性脂肪性肝疾患（NAFLD：nonalcoholic fatty liver disease）患者数も増加の一途をたどっている。我が国では約1000万人のNAFLD患者が存在するものと推定されているものの、現在簡易的に病態を評価できるバイオマーカーは少ない。NAFLDは明らかな飲酒歴がないにもかかわらずアルコール性肝障害に類似した肝組織像を呈する疾患であり、非進行性の非アルコール性脂肪肝（NAFL：nonalcoholic fatty liver）と肝硬変・肝がんへと進展しうる非アルコール性脂肪肝炎（NASH：nonalcoholic steatohepatitis）に大別される。NAFLD患者のうち1～2割がNASHと推定され、NASH患者は我が国で200万人存在すると考えられている。一方、近年、アルコール性肝障害患者は現在我が国で約250万人存在すると推定されており、肝硬変・肝がんへと進展しうる疾患である。NASH、アルコール性肝障害の重症度判定にはこれまで有用な血液バイオマーカーが存在せず、肝生検による組織診断によってその障害度判定が行われてきた。私どもは最近、フコシル化ハプトグロビン（Fuc-Hpt：fucosylated haptoglobin）とMac-2 binding protein（Mac-2bp）という糖鎖関連蛋白がNASHの血液バイオマーカーとなり、これらの組み合わせが組織診断に匹敵する強力なNASH診断ツールとなることを報告した。血液バイオマーカーを用いてNASH診断を非侵襲的に行うことは肝がん高危険群の囲い込みに極

めて重要である。

食の欧米化に伴う肥満人口増加により消化器癌は増加している。なかでも膵がんは肝がんを次いで肥満と関連の深い“肥満関連消化器がん”である。我々は最近、膵がん手術症例と膵がん以外の原因で死亡した剖検症例の正常膵組織を検討した。その結果、膵がん症例の背景膵では脂肪化、炎症細胞浸潤、線維化が特徴的所見であることを見出した。この組織所見は慢性膵炎の組織像であるが76例の膵がん症例全例が明らかな膵炎の既往歴を持っていなかった。このことは慢性膵炎が膵がんの背景に存在し、そのほとんどが無症状の潜在性慢性膵炎であることを示している。さらに興味深いことに、脂肪化、線維化は膵がんを合併していない剖検症例の半数に認められた。慢性膵炎の一般人口における罹患率は報告によると0.04～5%と幅広い。これは潜在的な慢性膵炎がかなり存在することを示唆しているものと考ええる。潜在的慢性膵炎患者を血液バイオマーカーで鑑別することができれば、膵がんの高危険群囲い込みに有用であり、膵がんの早期発見に寄与するものと考えられる。

本研究では2つの糖鎖マーカーFuc-HptとMac-2bpを運動療法前後、禁酒前後に測定することで客観的に運動療法、禁酒の肝臓への影響を評価することを目的として開始し、現在症例の蓄積および解析を行っているところである。少数例の検討だが、アルコール性肝障害患者の禁酒前後で大きくFuc-Hptは低下した。一方Retrospective studyとして運動療法前後での糖鎖バイオマーカーを測定したところ、Fuc-Hptでは有意な変化は認めなかったが、Mac-2bpは低下した。しかし、同様の報告がHepatologyに掲載されたため論文報告は行っていない。またこれまでに、ヒト臨床応用のためのマウスNAFLD/NASHバイオマーカー開発、肥満関連消化器がんの前がん病変として慢性膵炎バイオマーカー開発を行い、最近論文報告できた。本実績報告書では、マウスNAFLD/NASHバイオマーカー開発および慢性膵炎バイオマーカー開発を中心に報告する。

(1) マウスNAFLD/NASHバイオマーカーの開発

Mac-2bpは567アミノ酸からなる糖タンパク質であり、分泌タンパク質としては多い7カ所のN型糖鎖付着部位を持つ。我々はフコシル化の標的タンパク質の探索のため胆管がん細胞株HuccT-1細胞の培養上清から糖鎖解析技術を用いてMac-2 binding protein (Mac-2bp) を同定した。127名の肝組織診断確定したNAFLD患者を対象に、企業との共同研究により開発したヒトMac-2bp ELISAを用いて血中Mac-2bpを測定した。血中Mac-2bp濃度は健常対象者に比べ、NAFL患者で有意に上昇し、NASH患者でさらに上昇していた。血中Mac-2bp濃度と肝組織像との比較では、肝線維化進展の程度との関連が強く、NAFLDの肝線維化マーカーとなることがわかった。特にF0～F2の線維化非進展ステージでも有意な上昇を認める点で、Mac-2bpはNAFLDの優れた線維化バイオマーカーであった。単独NASH鑑別バイオマーカーとしての有用性はFuc-HptとMac-2bpはそれぞれ、これまで最も有用性が高いとされているサイトケラチン18断片(M30)より高かった(図1)。

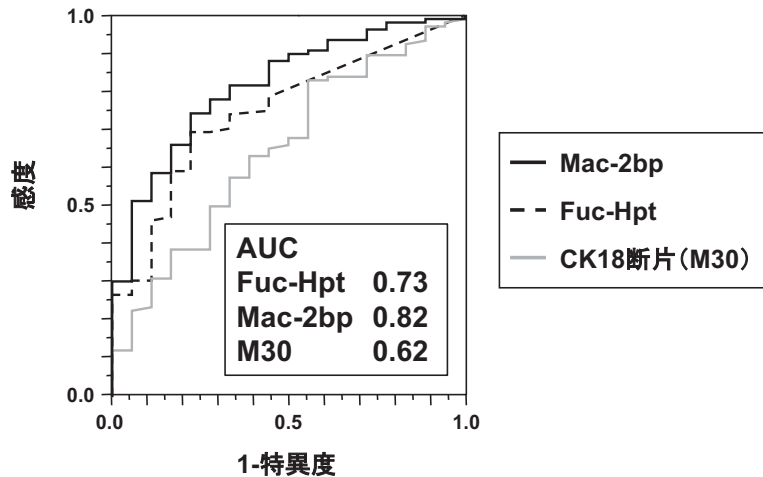


図1 フコシル化ハプトグロビン (Fuc-Hpt), Mac-2bpのNASH鑑別能

NASH鑑別能の比較 (Fuc-Hpt, Mac-2bp, サイトケラチン (CK) 18断片 (M30))。NAFLDからNASHを鑑別する能力はM30に比べ、Fuc-HptとMac-2bpが優れていた。AUC, area under the curve。(文献3,4より改変引用)

我々の開発したMac-2bp ELISAはMac-2bpのタンパク全体を測定している。近年肝線維化マーカーとして保険収載されたM2BPGiはWFA (*Wisteria floribunda* Agglutinin) というノダフジ由来レクチンに認識される糖鎖修飾されたMac-2bpである。M2BPGiはC型慢性肝炎患者を対象にして線維化進展に伴う糖鎖修飾の変化を検討して開発された。C型慢性肝炎患者を対象にした検討でM2BPGiは線維化ステージ進展に伴い有意に上昇しており、将来の肝発がん予測のバイオマーカーとなることが報告されている。その他B型慢性肝炎, NAFLD, 自己免疫性肝炎でも線維化バイオマーカーとなることが報告されている。しかしながらC型慢性肝炎以外の肝疾患ではstage 2以下の早期線維化症例においては変化が少ないのが問題点である。

以上のヒトNAFLD症例での背景を元に最近、我々はマウスMac-2bp ELISAキットを企業との共同研究により開発した。このキットは異時・同時再現性に優れ、ヘモグロビン、脂質、ビリルビンによる影響をほとんど受けないことがわかった。このキットを用いてマウスNAFLDモデル、肝線維化モデルで検討を行ったところ、ヒトNAFLDと同様にノーマル食投与マウスに比べ血中Mac-2bpレベルはNAFLDモデルマウス、肝線維化モデルマウスで有意に上昇していた (表1)。また肝線維化ステージ進展に伴い、血中Mac-2bp濃度は有意に上昇していった (図2)。肝臓Mac-2bp遺伝子発現と血中Mac-2bp濃度は強い正の相関を示し、血中Mac-2bpが肝臓から産生されていることが予想された (図3)。

表1 NAFLDモデル, 肝線維化モデルでの血中Mac-2bp濃度

群	負荷週数(週)	数	Mac-2bp (ng/ml)	P value *
ND		28	231 ± 33	
MCD	4	10	243 ± 31	Not significant
	8	6	385 ± 219	<0.05
	10	3	622 ± 184	<0.01
HFHC	4	11	303 ± 100	<0.05
	8	5	494 ± 183	<0.001
HFD	4	6	292 ± 19	<0.005
CCl ₄	4	8	565 ± 129	<0.0001

ND, ノーマル食群; MCD, メチオニンコリン欠乏食群; HFHC, 高脂肪高コレステロール食群; HFD, 高脂肪食群; CCl₄, 四塩化炭素誘発肝線維化群。*NDとの比較

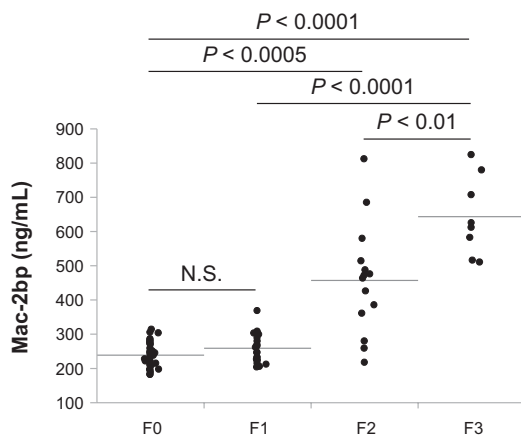


図2 肝線維化ステージと血中Mac-2bp濃度 (マウス実験モデルの検討)

マウス実験モデルを用いて肝線維化ステージ別血中Mac-2bp濃度を比較した。ステージ進展に伴い, 血中Mac-2bp濃度は上昇していった。(文献10より改変引用)

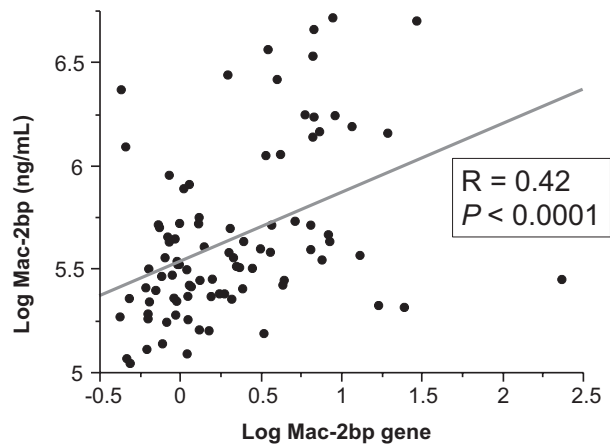


図3 血中Mac-2bp濃度と肝臓Mac-2bp遺伝子発現の比較

マウス実験モデルを用いて血中Mac-2bp濃度と肝臓Mac-2bp遺伝子発現を比較した。肝臓遺伝子発現上昇に伴い, 血中Mac-2bp濃度は上昇していた。(文献10より改変引用)

(2) 慢性膵炎の血液バイオマーカーとしてのMac-2bp

我々は, 膵がん手術症例の非癌部膵臓組織と膵がん以外で死亡した症例の膵臓組織の比較により, 膵がん症例の背景膵臓組織像として脂肪化, 線維化, 炎症細胞浸潤がそれぞれ独立した特徴的所見であることを見出した。これら組織像はNASHの肝臓においても見られる所見である。我々は膵がん発症の母地として“膵臓のNASH様病態”が存在するのではないかと考え, 膵がん高危険群である慢性膵炎患者でMac-2bpを測定した。そこで, 健常人59名, 臨床的慢性膵炎162名を対象に血中Mac-2bpを測定し, 検討を行った。予想通り, 血中Mac-2bpは健常コントロール者に比べ, 慢性膵炎患者で上昇していた(図4 (A))。血中Mac-2bp濃度が健常人から慢性膵炎患者を鑑別する能力を, ROC (receiver operating characteristic) 解析にておこなったところ, AUROC (area

under the ROC curve) が0.73, 感度88%, 特異度55%とまずまず良好な診断能を有していることがわかった (図4 (B))。慢性膵炎患者の膵臓ではMac-2bp陽性細胞はほとんど認められず, 血中Mac-2bp濃度はアミラーゼとの相関がなく, AST・ALTと有意な正の相関関係があった。これらのことから, 慢性膵炎患者の血中で上昇するMac-2bpは肝臓で産生されているのではないかと現在考えている (図4 (C))。すなわち, 門脈血流に乗って慢性膵炎の膵臓から生理活性物質が肝臓に作用して肝臓からMac-2bpが産生を促しているものと考えている。

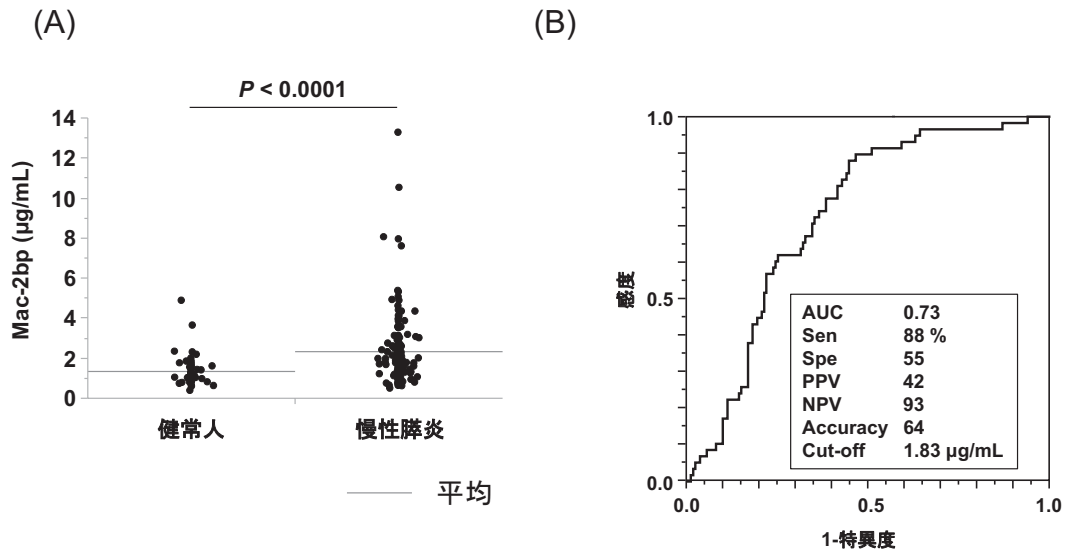
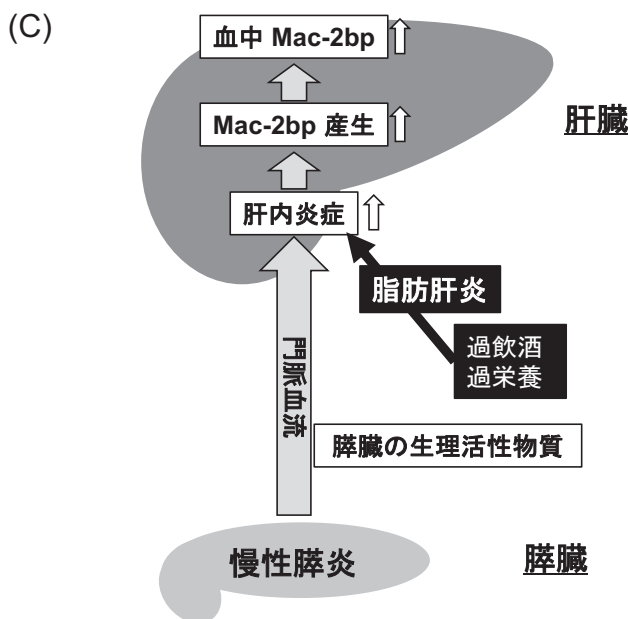


図4 慢性膵炎患者における血中Mac-2bp

- (A) 健常人と慢性膵炎患者での血中Mac-2bp濃度の比較
健常人に比べ慢性膵炎患者で血中Mac-2bp濃度は有意に上昇していた。
- (B) 血中Mac-2bp濃度の健常人から慢性膵炎患者を鑑別能



- (C) 慢性膵炎患者で血中Mac-2bp値が上昇する機序
慢性膵炎患者の膵臓で産生された生理活性物質が門脈血流によって肝臓へと運ばれ, 肝内に炎症を起こしMac-2bpが上昇すると考えている。さらに, 過飲酒や過栄養は脂肪肝を引き起こし, さらに肝臓でのMac-2bp産生を増強する。
(文献9より改変引用)

おわりに

Mac-2bpはヒトだけでなく、マウスでもNAFLD/NASHの有用なバイオマーカーとなることがわかった。また、ヒト慢性膵炎においてもMac-2bpがバイオマーカーとなることが今回わかった。慢性膵炎から膵がん発症、NAFLD/NASHから肝がん発症には共通したメカニズムが潜んでいることが想定される。開発したマウスMac-2bp測定系を用いた基礎研究で肥満関連消化器がん発症メカニズムを解明していきたい。

謝 辞

最後になりましたが、本総説で紹介させていただいた我々の研究を遂行するにあたり、公益財団法人総合健康推進財団より助成金を賜りましたことを厚く御礼申し上げます。