

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：肝疾患病態指標血清マーカーの開発と低侵襲かつ効率的に評価・予測する新規検査系の実用化
2. 研究開発代表者： 成松 久（国立研究開発法人産業技術総合研究所）
3. 研究開発の成果

本課題では、肝炎から肝細胞がんが発生するまでの病態の進展や予後予測、治療効果を判定する一助となりうる新しい検査薬の実用化を目指し、3つの開発項目を設定し、研究開発を行っている。①これまで肝線維化マーカー開発で実績がある独自の糖鎖バイオマーカー開発プラットフォームに更なる改良を加え、あらたな糖鎖バイオマーカーを探索し、検証する。②取得バイオマーカーの測定系を構築し、安定供給する。③構築した測定系で多施設多検体解析を行い、当該バイオマーカーの臨床的意義を明確にする。それぞれの進捗状況は以下のとおりである。

開発項目 1: 肝がん分子病態マーカー探索

病理学的に肝がんと診断された組織標本のきわめて微小な領域 (<0.5mm²) を単離し、レクチンアレイによる比較糖鎖解析で、肝がんの特徴的な糖鎖変化を検出し、最適なプローブ(レクチンN)を選抜した(平成 26 年度)。この妥当性を組織染色、生化学的な実験により検証した。その結果、レクチン N 反応性の糖鎖(糖タンパク質等)は病変ごとに細胞内の局在が異なり、がん部では細胞膜や細胞外基質に染色が確認された。抽出物の生化学実験により、レクチン N に結合するタンパク分子ががん部で有意に多いことを確認した。組織標本から肝がんマーカー候補糖タンパク質を探索し、検証するために、予め分析技術の微小化、高感度化、高効率化を行った(平成 26 年度)。これをもとに、上述の通り選択されたレクチンNを用い、標的糖タンパク質を捕集し、グライコプロテオミクスにより同定した。同定された分子をバイオインフォマティクス解析により約 40 分子まで絞り、マーカー候補とした。その一部を生化学解析による正当性検証試験を行い、有力候補を2分子まで絞り込んだ(平成 27 年度)。

開発項目 2: 微量迅速測定キット開発・供給

取得糖鎖バイオマーカーの迅速測定キットの開発と供給を行っている。まず、「肝硬変マーカー(WFA+-CSF1R)」の簡易測定系と、糖タンパク質標準品の生産手法を構築した(平成 26 年度)。取得した糖タンパク質標準品が測定用のキャリブレーターとして利用可能なことを実験的に証明した。2施設 1500 検体を測定するためのキットの安定供給を進めた(平成 27 年度)。

開発項目 3: 微量迅速測定系の多施設多検体解析

国立国際医療研究センターを中核とした 15 施設の共同研究体制を構築し、臨床情報が整った 6000 検体を収集・保管した(平成 26 年度)。開発項目 2 より供給される「肝硬変マーカー(WFA+-CSF1R)」の簡易測定系を用い、2施設 1500 検体の実測をした。施設 1 の検体群の解析では、肝細胞がん診断時より 3 年前の血清における WFA+-CSF1R/ total-CSF1R 値の AUC は発がん群(vs 非発がん群)で 0.8379(0.7756-0.8855)と他のマーカーに比して最も良好であった。また、施設 2 の検体群の解析では、肝線維化ステージ(F stage、特に後期)に伴い WFA(+)-CSF1R 値は上昇することがわかり、かつ WFA(+)-CSF1R 値が肝発がん率あるいは生命予後の予測に有用であることが示唆された(平成 27 年度)。

次に、肝がん組織の染色性を示す膜タンパク質 M に着目し、肝細胞がん特異的な糖鎖変化の探索を行い、肝がん患者約 100 検体のレクチンアレイ解析を行うことで、がん再発反応性を示すレクチン(=糖鎖変化)を新たに発見することができた。この臨床的有用性を検討するために、簡易測定系を構築し、2施設で収集された肝がん患者血清 225 検体の測定を行った。現在詳細な統計解析を行っているところである(平成 27 年度)。