

〈特集：第27回生物試料分析科学学会（新潟）教育講演3〉

糖鎖構造解析技術が拓く新たな臨床検査

松崎 英樹

Development of “HISCL M2BPGi[®]”, a novel serum glyco-biomarker for assessing liver fibrosis

Hideki Matsuzaki

Summary Glyco-biomarkers are developed by utilizing the specific changes in the glycan structure on a glycoproteins, since the glycan structures generated by disease cells are distinguishable from those produced by healthy cells. Therefore, detection of the altered glycan structures is the most key point to developing a new glyco-biomarker. This paper describes a strategy for glyco-biomarker development, which was successfully applied in the development of Wisteria floribunda agglutinin-positive Mac-2 binding protein, HISCL M2BPGi[®], a unique liver fibrosis marker now commercially available for clinical use.

Key words: Sugar chain, Glyco-biomarker, HISCL M2BPGi[®], Liver fibrosis

I. はじめに

糖鎖マーカー（糖鎖変化を診るバイオマーカー）の開発コンセプトは、疾患の発症と進展に連動した、特定の糖タンパク質に見いだされる糖鎖構造変化に着目する点で、これまでのタンパク質の定量的な差を検出するバイオマーカーとは根本的に発想が異なる。

糖鎖を解析・分析する技術、“微量”な糖鎖構造変化を検出するための技術開発により、糖鎖マーカーという新たな臨床検査が可能となった。本稿では、糖鎖マーカーを活用した免疫検査試薬の開発背景と今後の臨床検査への展開について紹介する。

II. 糖鎖とは

糖鎖は、細胞内で合成されたタンパク質に、糖転移酵素の働きにより順次付加され鎖のように伸びていき、生理活性タンパク質として機能を発揮させるものである。現在、ヒトの糖転移酵素は、約200種類が知られている。細胞内で、このうちのどの糖転移酵素が、どれくらい発現しているかにより糖鎖の構造が決定される。

糖鎖は、機能が多様である。糖鎖は親水性であるため血清など体液中に溶けやすくなる。生体内に分泌されるタンパク質は、アルブミン以外のほとんどは糖鎖が結合した糖タンパク質であり、また細胞膜上のタンパク質もほとんどが糖タンパク質である。糖鎖が付加するとタンパク質分解酵素により分解されにくくなる。さらには糖タンパク質の代謝を制御する、細胞と細胞

シスメックス株式会社 第一エンジニアリング本部
タンパク質技術グループ
〒651-2271 兵庫県神戸市西区高塚台4丁目4番地の4

Sysmex Corporation, Protein Technology group,
Engineering 1
4-4-4 Takatsukadai, Nishi-ku, Kobe, Hyogo 651-2271
Japan

を接着する、病原菌やウイルスそのもの、あるいは毒素の受容体となるなど多くの機能がある。

糖鎖は、結合位置、分枝構造、立体異性により非常に多岐で複雑な構造になる。計算上、単糖3分子の組み合わせ数は、100,000通り強となる（実際には、生体内に存在する糖転移酵素の組み合わせで決まるので、計算上の数よりはかなり少ない）。糖鎖が、塩基鎖やペプチド鎖など他の生命鎖と比較し、いかに複雑な構造をしているかがわかる（Fig. 1）。

糖鎖構造は、個体差があり、外界からの刺激によっても糖鎖構造は大きく変化し、さらに臓器特異性もあり、タンパク部分は同じでも糖鎖構造は異なることなどが知られている。これらの特徴から糖鎖は非常に細胞特異的であり、かつ発生、分化特異的である。この特異性を利用すれば（することが可能となれば）、発生・分化や疾患状態を糖鎖構造が反映しているということで、糖鎖はバイオマーカーとして非常に有力な資質を有していると考えられる¹⁾⁻³⁾。

糖鎖マーカーの開発コンセプトは、糖鎖構造の複雑さ（情報量の多さ）を検出することが可能となれば、これまでのタンパク質を検出する情報からでは捉えきれなかった臓器情報や疾患状態を得られるようになるのではないかと、いう点である（Fig. 2）。

Ⅲ. 糖鎖マーカーによる免疫検査試薬の開発背景

Ⅲ-1. 肝線維化マーカーについて

肝臓の線維化は、肝炎ウイルスなどによって惹起される炎症による細胞の破壊により、その修復作用として、コラーゲンなどの細胞外マトリックスが肝臓へ蓄積することで起こる。肝臓の線維化の進展は、肝炎から肝硬変への病態の進行、肝細胞癌の発症へとつながることから、その線維化の進展を把握することは重要である。侵襲度の低い検査としては、超音波などを用いて物理学的に肝臓の硬さを測定する方法、ヒアルロン酸、などの血清マーカーを測定する方法があるが、それぞれ肥満の影響や食事などの影響を受けることが知られている。線維化診断のゴールドスタンダードは、肝生検による組織の病理学的な診断であるが、サンプリングエラーが起こることや、侵襲度が高いという難点がある。そこで、厚生労働省の「肝炎研究7ヵ年戦略」では「線維化の進展を非観血的に評価できる検査法の開発」が提示され、測定が簡単で正確度の高い新しいマーカーの開発が望まれていた。

このような背景から、産業技術総合研究所の糖鎖医工学研究センターにおいて、糖鎖に着目したバイオマーカー開発研究が行われ、その成果の一つとして、疾患に起因する糖鎖構造の変化に着目するという新しい概念の肝線維化マーカーが開発された⁴⁾。このマーカーについて実

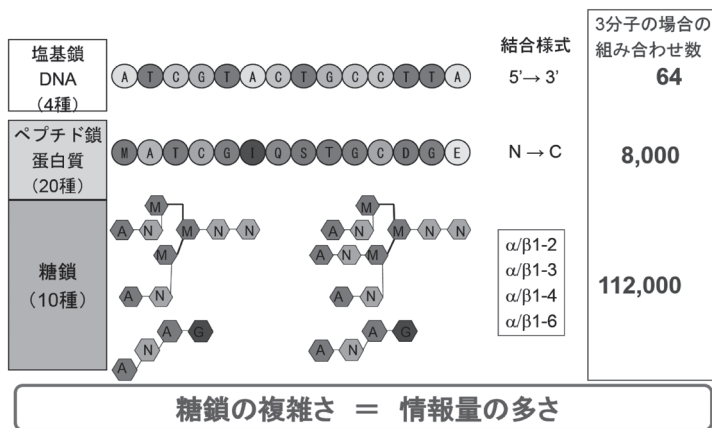


Fig. 1 糖鎖構造の複雑について

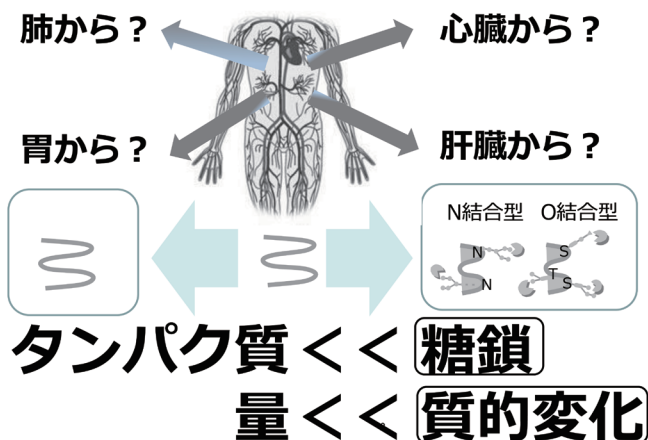


Fig. 2 糖鎖マーカーについて

用化に向けた共同研究を産業技術総合研究所とシスメックス社で推進するとともに、医療研究機関の先生方と産・学・官体制でその有用性を明らかにしてきた⁵⁾。線維化により変化した糖鎖の構造をレクチンにより検出することで、特異的に線維化の診断が可能となった試薬“HISCL M2BPGi[®]”（以下、M2BPGi[®]）について、その測定原理と臨床性能の概要を次に記載する。

Ⅲ-2. 糖鎖構造変化を検出する測定原理

シスメックス社は、化学発光酵素免疫測定法を原理とした全自動免疫血清装置 HISCLシリーズを2008年から上市している。HISCLシリーズは、高感度な測定系、高い特異性、微量検体

での測定、ワイドレンジ測定、短時間（17分）での測定を主な特徴としており、感染症、腫瘍マーカー、甲状腺、凝固分子マーカー関連などの検査項目に対応している。M2BPGi[®]についても他のマーカーと同様に17分での測定が可能となるように測定系を構築した。

M2BPGi[®]は、Mac2 binding protein (M2BP) glycosylation isomer (糖鎖構造異性体) からの略語である (Fig. 3)。本試薬では、M2BPというタンパク質上の糖鎖の構造が変化したものを特異的に検出するために、藤の種から取れるノダフジ (*Wisteria Floribunda*) レクチンを磁性粒子上に固層化し、血清中の構造が変化した糖鎖を持つタンパク質を捕捉する。その後2回の洗浄を行い、標識された抗M2BP抗体とサンド

M2BPGi (造語) = M2BP (Mac2 Binding Protein)
糖鎖修飾異性体 (Glycosylation isomer)

<p>HISCL M2BPGi → 疾患により糖鎖構造が変化したM2BPを特異的に測定</p> <p>糖鎖構造の変化 → レクチン (特定の糖鎖構造に結合するタンパク質) により検出</p> <p>M2BPタンパク質 → 抗M2BP抗体により検出</p>

Fig. 3 糖鎖マーカー M2BPGi[®]の名前について

イッチアッセイにより糖鎖構造の変化しているM2BP、すなわちM2BPGi[®]を検出する (Fig. 4)。

M2BPは、Mac-2 binding protein というタンパク質であり、このタンパク質は2009年にCheungらが血清の2次元電気泳動を行い、肝硬変患者の血清中でその量が増加することを報告している⁶⁾。M2BPGi[®]は、肝臓の線維化により、血清中のM2BPタンパクの量の変化だけではなく糖鎖の構造の変化という質的な変化も合わせ検出することで、より特異的に肝臓の線維化を診断できると考えている (Fig. 5)。

測定結果は陽性、陰性を分けるM2BPGi[®]キャリアプレートを用いてカットオフ値と陰性コン

トロール間の発光強度の差と検体を測定した際の発光強度と陰性コントロールの発光強度の差の比率をカットオフインデックス (COI) 値として示している。このCOI値が1.0未満であれば陰性、1.0以上3.0未満であれば1+ (慢性肝炎)、3.0以上であれば2+ (肝硬変) という判定となる (Fig. 6)。

Ⅲ-3. M2BPGi[®]の臨床性能について

1) 肝臓の線維化進展とM2BPGi[®]の測定値

M2BPGi[®]試薬を用いて、健常人、肝炎、肝硬変の患者血清を測定した結果、それらのCOI値は肝臓の線維化ステージの上昇とともに有意

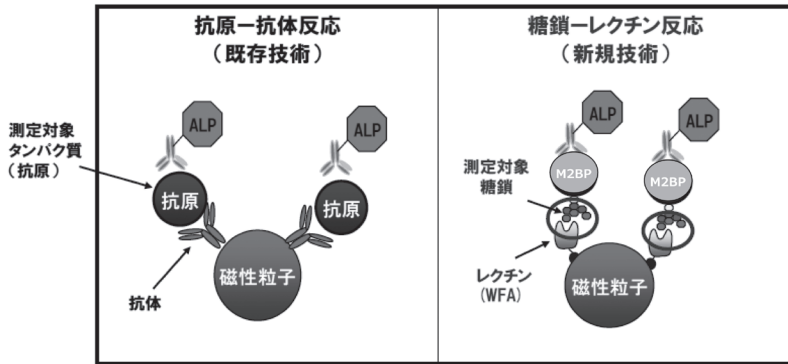


Fig. 4 抗原-抗体反応と糖鎖-レクチン反応の検出の違いについて

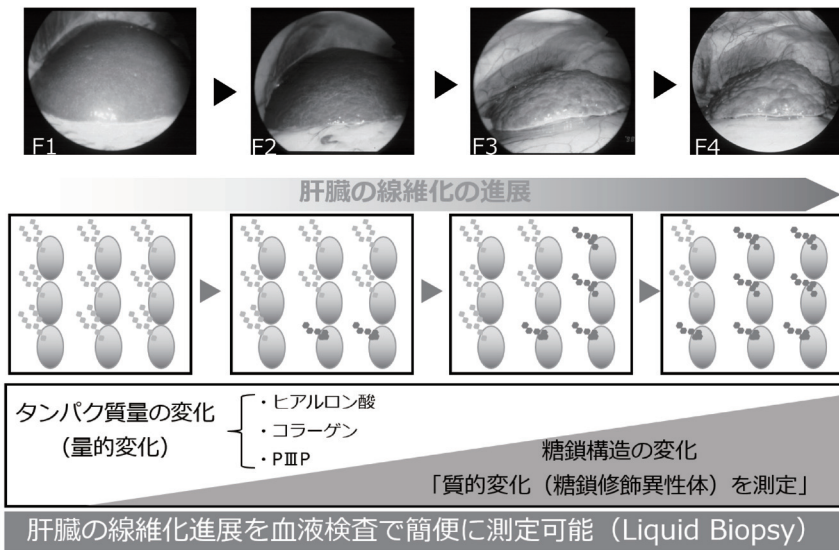


Fig. 5 肝線維化糖鎖マーカー M2BPGi[®]について

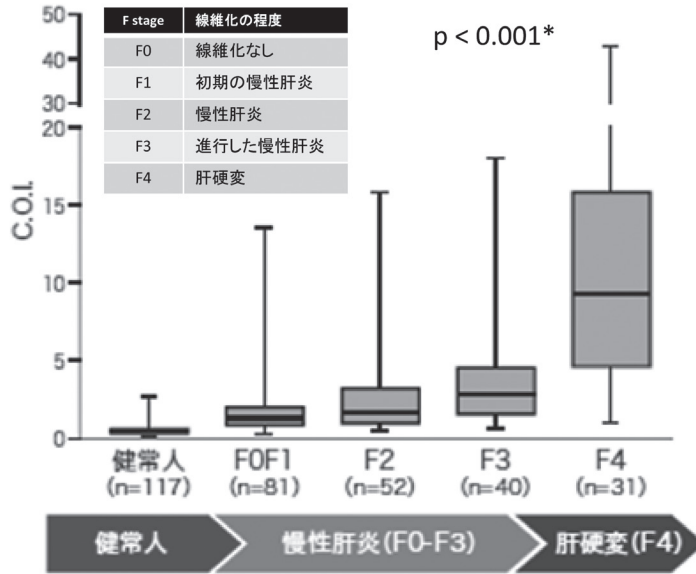


Fig. 6 肝線維化の進展度とM2BPGiのC.O.I.値との関係
線維化の進展度を示すF-stage (図中左上)の上昇に伴い、M2BPGi値も有意に高くなる。

* ANOVA

に ($p < 0.001$) 高くなった (Fig. 6)。

2) M2BPGi[®]についての最近の知見

最近、M2BPGi[®]の臨床性能評価の結果が次々と報告されており、その中でM2BPGi[®]値と発癌の関係が特に注目されている。Yamasakiらの報告では、10年間フォローアップが可能であったC型慢性肝炎患者について血清中M2BPGi[®]のCOI値と発癌の関係を報告している。M2BPGi[®]のCOI値が1未満、1～4未満、4以上の場合の発癌はそれぞれ1.1%、14.8%、54.1%とM2BPGi[®]のレベルに従って有意に ($p < 0.001$) 発癌率が上昇する。また、肝線維化のステージごとに評価した場合でもM2BPGi[®]のCOI値が高くなるに従い、(F0-F1、F2、F3とF4)、肝癌発生率も高くなった⁸⁾。

Tamakiらも、M2BPGi[®]のCOI値が4.2以上の場合には高頻度で発癌が認められたことを報告している⁸⁾。さらに、Sasakiらは、インターフェロン治療後のM2BPGi[®]のCOI値と発癌の関係を検討し、C型慢性肝炎の患者血清を用いてインターフェロン治療SVR24週後のM2BPGi[®] COI値が2.0以上の場合、肝発癌する可能性が有意に ($p < 0.001$) 高くなると報告している⁹⁾。

慢性肝炎患者における肝線維化の進展は肝発癌に関連する因子のひとつであるため、肝線維化の指標となるM2BPGi[®]が上記の知見、さらなるエビデンスの蓄積により、実臨床において客観的かつ簡便に高リスク患者の囲い込みに寄与できればと期待している。

Ⅳ. おわりに

HISCL M2BPGi[®]試薬は、産業技術総合研究所、国立国際医療研究センターをはじめとする医療研究機関、シスメックス社と産官学のオールジャパンの連携体制により開発された新しい試薬である。2015年1月には保険適応となり、国内の医療機関において保険診療のもとで測定を実施することができる。

本試薬は疾患に伴う糖鎖構造の変化に着目し、その変化を固層上に結合させたレクチンにより検出するという新しい技術を用いた試薬である。糖鎖を解析・分析する技術の進歩と蓄積した知識は、より迅速に有効な治療方針の決定や治療薬の効果判定などの医療ニーズを満たすための、新たな臨床検査のイノベーションへの

架け橋となる可能性を秘めていると考えている。疾患と糖鎖構造の変化については、肝臓の線維化に限ったものではないことから、今後も糖鎖構造解析技術を応用することで、新しいユニークな臨床検査の開発に貢献できればと考えている。

参考文献

- 1) 成松久：プロテオミクス、グライコミクス、そしてグライコプロテオミクスの時代へ。医学のあゆみ, 251: 925-931. 2014.
- 2) 梶裕之：グライコプロテオミクス技術開発と医療への応用「疾患糖鎖バイオマーカー開発におけるN-グライコプロテオミクス」。医学のあゆみ, 249: 655-660. 2014.
- 3) 久野敦：グライコプロテオミクス技術開発と医療への応用「肝線維化の進展を定量的に判断するための糖鎖バイオマーカーの実用化」。医学のあゆみ, 249: 666-670. 2014.
- 4) Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Ito K, Matsuda A, Sekiya S, Hige S, Sakamoto M, Kage M, Mizokami M and Narimatsu H. : A serum "sweet-doughnut" protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. *Sci Rep*, 3: 1065. 2013.
- 5) 溝上雅史：肝疾患の病態と糖鎖科学の意義。肝胆膵, 第70巻増刊号: 5-79. 2015.
- 6) Cheung KJ, Tilleman K, Deforce D, Colle I and Van Vlierberghe H: The HCV serum proteome: a search for fibrosis protein markers. *J Viral Hepat*, 16: 418-429. 2009.
- 7) Yamasaki K, Tateyama M, Abiru S, Komori A, Nagaoka S, Saeki A, Hashimoto S, Sasaki R, Bekki S, Kugiyama Y, Miyazoe Y, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Ocho M, Mizokami M, Narimatsu H and Yatsushashi H: Elevated serum levels of Wisteria floribunda agglutinin-positive human Mac-2 binding protein predict the development of hepatocellular carcinoma in hepatitis C patients. *Hepatology*, 60: 1563-1570. 2014.
- 8) Tamaki N, Kurosaki M, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Gotoh M, Nakakuki N, Takada H, Matsuda S, Hattori N, Yasui Y, Suzuki S, Hosokawa T, Tsuchiya K, Nakanishi H, Itakura J, Takahashi Y, Mizokami M, Narimatsu H and Izumi N: Wisteria floribunda agglutinin positive human Mac-2-binding protein as a predictor of hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res*, 45: E82-8. 2015.
- 9) Sasaki R, Yamasaki K, Abiru S, Komori A, Nagaoka S, Saeki A, Hashimoto S, Bekki S, Kugiyama Y, Kuno A, Korenaga M, Togayachi A, Ocho M, Mizokami M, Narimatsu H, Ichikawa T, Nakao K and Yatsushashi H: Serum Wisteria Floribunda Agglutinin-Positive Mac-2 Binding Protein Values Predict the Development of Hepatocellular Carcinoma among Patients with Chronic Hepatitis C after Sustained Virological Response. *PLoS One*, 10: e0129053. 2015.