

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19935

研究課題名(和文)急性肝不全の予後予測のための新規血清糖鎖マーカーの網羅的探索研究

研究課題名(英文)The usability of novel serum glycobiomarker for the prognosis of acute liver failure

研究代表者

吉屋 匠平(YOSHIYA, Shohei)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：20717079

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：マウス肝再生モデルを用いて肝再生血清糖鎖マーカーとしてWFA+-tenascinを同定した。生体肝移植ドナー術後保存検体およびCTでの肝再生率を検討し、ヒトにおいても有用な肝再生マーカーとなることが明らかとした。背景肝疾患での検討を行うと、劇症肝炎はWFA+-tenascinが高値であり、既知の予後予測との有意な正の相関を認め、予後予測として有用である可能性が示唆された。急性肝不全症例の死亡群ではWFA+-tenascin値が有意に高く、cut-off値を5700と決定した。予後予測式としての有用性を検討、特異度88%、感度53%であり急性肝不全の予後予測として有用であることが示された。

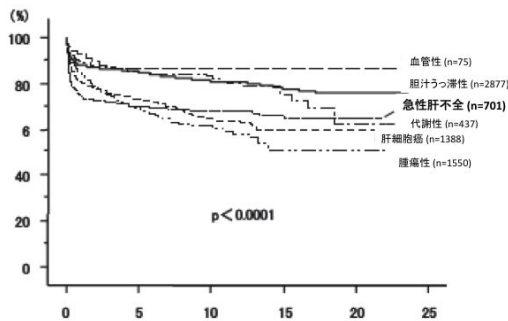
研究成果の概要(英文)：WFA+-tenascin was identified as a liver regenerating serum glycobiomarker using mouse liver regeneration model. We investigated the correlation between liver regeneration rate with 3D-CT volumetry or preserved blood specimens of living donor surgery and WFA+-tenascin, and which revealed that it is a useful liver regeneration marker in humans. In the study of liver diseases, fulminant hepatitis was high in WFA+-tenascin, and a significant positive correlation with previous prognostic prediction was found. The WFA+-tenascin value was significantly higher in the deceased group of acute liver failure cases, and the cut-off value was determined to be 5700. The usefulness as a prognostic prediction formula was examined, the specificity was 88%, sensitivity was 53%, and it was shown to be useful as prognostic prediction of acute liver failure.

研究分野：肝再生

キーワード：肝再生 糖鎖 急性肝不全 予後予測

1. 研究開始当初の背景

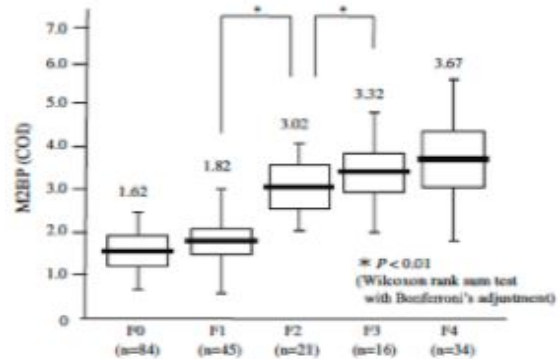
肝切除術後や急性肝不全時には肝組織の再生が起こり、その機能を代償することが知られている。急性肝不全の治療方法としては、自己肝の再生に期待する血漿交換を中心とした保存的治療と、絶対的治療法としての肝移植術(生体・脳死)が行われている。しかし、治療法の選択には明確な基準はなく、実臨床ではしばしば治療法の選択に難渋する。また肝移植の適応は保存的加療では救命できないと判断された時が適応であるが、不可逆的脳障害、コントロール不能な感染などを併発すれば肝移植施行は不可能であり、そのタイミングを逸しないことが重要である。そのため、保存的治療で救命可能か、早急な肝移植術が必要かの判断基準が確立されることは臨床上意義が大きい。保存的治療を選択した場合の本邦での救命率は、急性型約50%、亜急性型約20%となっているが、肝移植施行症例では高い確立で救命されており、その他の疾患に対する肝移植と同等の成績を有している(図1)。



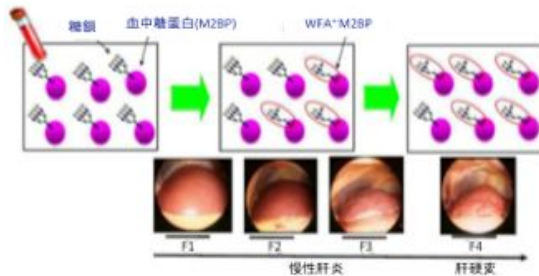
劇症肝炎の予後予測として、様々な予測式(King's College criteria, Clichy criteria, 日本急性肝不全研究会肝移植適応ガイドライン, 肝移植適応基準スコアリング(表1))が提唱されているが、いずれも評価時点での血液検査結果などから算出されるものであり、その患者自体の肝再生能力を評価しているわけではない。そのため、予後予測式により肝移植適応と判断された症例の中にも、肝再生の評価を行うことで肝移植を施行せず保存的加療で救命可能な症例を見出すことが可能となることが考えられる。脳死ドナーの件数が少ない本邦においては生体肝移植術施行の可能性が高くなるため潜在的には不必要となるドナー手術の減少につながることで、また症例の限られた脳死肝移植術をより必要性の高いと考えられる患者に施行することが可能となることが予想される。

スコア	0	1	2
発症・昏睡(日)	0~5	6~10	11≤
PT (%)	20 <	5 < ≤20	≤5
T.Bil (mg/dL)	< 10	10 ≤ < 15	15 ≤
D/T 比	0.7 ≤	0.5 ≤ < 0.7	< 0.5
血小板(万)	10 <	5 < ≤10	≤5
肝萎縮	なし	あり	

糖鎖とは各種の糖がグリコシド結合によってつながり合った化合物のことであり、核酸、タンパク質に次ぐ「第3の生命鎖」として注目されている。糖鎖とタンパク質の結合による糖タンパク質、脂質との結合による糖脂質は生体内で重要な生理作用を担っており、血液型(ABO型)の相違も糖鎖構造の相違によるものである。近年、我々はレクチンアレイ法にて肝線維化の血清糖鎖マーカーとして、Wisteria floribunda agglutinin-positive human Mac-2 binding protein (WFA+-M2BP)を同定した(図2)。



さらにその臨床的意義を明らかにし保険収載にまで至った(図3)。肝再生においても血清糖鎖マーカーが有用である可能性が考えられる。



2. 研究の目的

急性肝不全の治療方法として、自己肝再生に期待する保存的治療、肝移植術(生体・脳死)が行われるが、その選択には明確な基準はなく、実臨床ではしばしば治療法の選択に難渋する。そのため、治療法の判断基準が確立されることは臨床上意義が大きい。近年、レクチンアレイ法にて肝線維化の血清糖鎖マーカー(WFA+-M2BP)の有用性が報告され、肝再生においても血清糖鎖マーカーが有用である可能性が考えられる。本研究では、レクチンアレイ法にてマウス肝再生過程における糖鎖動態を解析し、肝再生に関する糖鎖を選別、生体肝移植ドナー患者の血液を用いて、ヒト肝再生血清糖鎖マーカーを同定する。急性肝不全において保存的治療症例における予後との相関を検討し、肝再生マーカーとしての有用性を検討する。

3. 研究の方法

(1)マウス 70%肝切除モデルを用いた肝再生過程における血清糖鎖動態の検討

肝再生モデルとして確立されている、マウス70%肝切除術後の再生肝および血液検体を経時的に（術後1時間、3時間、6時間、12時間、1日、2日、4日、7日）に採材し下記の検討を行う。

<検討項目>

a. マウス肝再生の評価

マウス70%肝切除では一般的に用いられる、左外側葉および中葉を切除する。肝再生の評価は採材時の肝重量/体重比を用いて行う。肝再生率は肝切除施行時の肝重量/体重比に対する評価時点の割合として算出する。

b. 肝再生中の血清糖鎖動態の網羅的検索

マウス70%肝切除術後の経時的血液検体を採材し、レクチンアレイ法を用いてマウス肝再生過程の血清中の糖鎖の動態を網羅的に検索する。レクチンとは糖鎖を特異的に認識する蛋白であり、レクチンアレイとは多様なレクチンがplatingされており、それぞれの糖蛋白に対する結合の違いを解析する手法である。レクチンアレイは国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・創薬基盤研究部門 糖鎖技術研究グループ（元糖鎖医学工学研究センター）にて施行する。

c. マウス肝再生血清糖鎖マーカーの同定

bで検索した糖鎖のうち経時的な変化を有するもの、aで求められた肝再生、肝再生率との相関を認めるものを血清糖鎖マーカーとして複数個を検出する。

(2) ヒト肝再生血清糖鎖マーカーの選別

マウス肝再生モデルにて検出された複数個の血清糖鎖マーカーから、ヒトの肝再生血清糖鎖マーカーに適した糖鎖を同定する。

<検討項目>

a. ヒト肝再生過程中的血清中糖鎖マーカー動態の解析

当科で施行した生体肝移植症例ドナー患者の術後の経時的な血液検体（術後1日目～7日目）を用いて、マウス肝再生血清糖鎖マーカーの中でヒト肝再生過程においても肝再生に相関する経時的変化を有する糖鎖を検出する。

b. ヒト肝臓切除術後肝再生の評価

肝再生の評価は術前および術後CTの画像データを用いた3D-CT volumetry (SYNAPSE VINCENTTM; FUJIFILM)にて行う。肝再生率は術前全肝容積に対する術後肝容積の割合として算出する。

c. ヒト肝再生血清糖鎖マーカーの同定

aで検出されたヒト血清糖鎖マーカーのうち、bで算出される肝再生率と相関する、また肝再生率を予測し得るものをヒト肝再生血清糖鎖マーカーとして同定する。

(3) ヒト肝再生血清糖鎖マーカーの有用性の検討

同定されたヒト肝再生血清糖鎖マーカーを用いて急性肝不全保存的加療症例の予後が予測可能であるかを検討する。

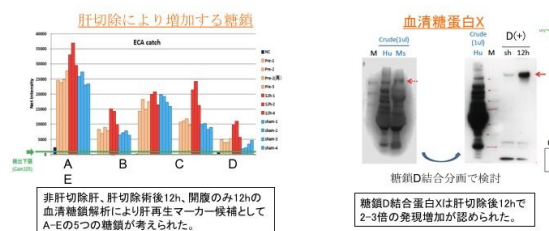
<検討項目>

急性肝不全保存的加療症例における経時的血液検体（初診時、加療期間中）における、ヒト肝再生血清糖鎖マーカーの血清中濃度を測定し、その治療経過・予後との相関に関して統計学的に解析する。急性肝不全保存的症例の予後予測に有用な初診時および治療経過中の血清中濃度の最適なcut off値を算出する。また既存の予後予測式と比較し、その有用性を明らかにする。

#### 4. 研究成果

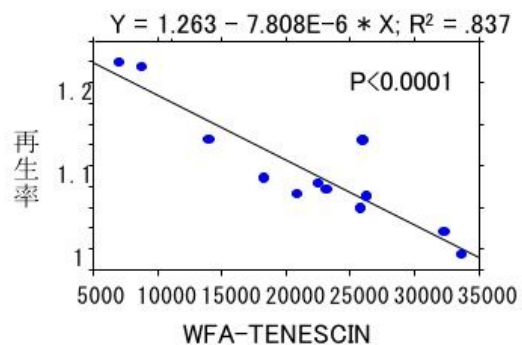
(1) マウス70%肝切除モデルを用いた肝再生過程における血清糖鎖動態の検討

マウス70%肝切除モデル術後血清における経時的な糖鎖動態をレクチンアレイ法にて解析、肝再生血清糖鎖マーカーとしてWFA+-tenascinを同定した。



(2) ヒト肝再生血清糖鎖マーカーの選別

生体肝移植ドナー術後保存検体（開腹時、閉腹時、術後1日目、3日目、7日目）を用いて、WFA+-tenascinの動態について検討したところ、術後1日目に有意な上昇を認め、ヒトにおいても有用な肝再生マーカーとなることが明らかとなった。生体肝移植ドナー術後CT-3DVolumetryを用いて肝再生率との相関を検討したところ、有意な負の相関(p<0.0001)を認めた。



背景肝疾患での検討を行うと、劇症肝炎は急性肝炎、重症肝炎に比べ有意にWFA+-tenascinが高値(8251 vs. 609, 2814, p=0.0003, p=0.0121)であった。

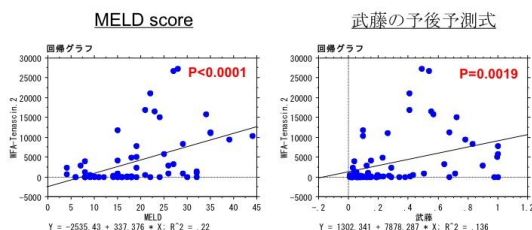
各種病態とWFA+-tenascin



(3) ヒト肝再生血清糖鎖マーカーの有用性の検討

WFA+-tenascin と既知の予後予測である、MELD score や武藤の予後予測式との相関を検討したところ、有意な正の相関( $p < 0.0001$ ,  $p = 0.0019$ )を認め、予後予測として有用である可能性が示唆された。

WFA+-tenascinと予後予測



最後に WFA+-tenascin 値と予後との関連(生存群、死亡群)を検討し、死亡群では WFA+-tenascin 値が有意に高い結果であった(6817 vs. 2679,  $p = 0.0211$ )。ROC より cut-off 値を 5700 と決定し、予後予測式との有用性を検討した。69 例の検討で、特異度 88%、感度 53% であり、急性肝不全における予後予測として有用であることが示された。

WFA+-tenascinの予後との相関



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況(計0件)

名称：

発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

[その他]  
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者  
 吉屋 匠平 (YOSHIYA, Shohei)  
 九州大学・医学研究院・共同研究員  
 研究者番号：20717079

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )