

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590972

研究課題名(和文) アディポサイトカイン分泌異常に基づくNASH病態解析からの新規糖鎖マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of novel glyco-biomarkers for nonalcoholic steatohepatitis (NASH) based on the adipocytokine dysregulation

研究代表者

鎌田 佳宏 (KAMADA, YOSHIHIRO)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30622609

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：非アルコール性脂肪性肝炎(NASH)は現在増加の一途をたどっており、肝硬変・肝がんへと進展しうる。NASH診断は現在肝生検によってのみ可能であるが非侵襲的な血液診断が待望されている。我々は糖鎖とアディポサイトカインに着目してNASHの病態解析および新規バイオマーカー開発を行った。本研究でアディポサイトカインsecreted frizzled related protein 5 (Sfrp5)欠損が肝臓線維化を進展させることを明らかとし、またフコシル化ハプトグロビン、Mac-2 binding protein (Mac2bp)、フェチュインAが新規NASHバイオマーカーとなることを見いだした。

研究成果の概要(英文)：Nonalcoholic steatohepatitis (NASH) is a growing medical problem, and can progress to liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Now, liver biopsy remains the gold standard for the diagnosis and the grading liver disease severity in NASH patients. However, liver biopsy is an invasive test, and repeated liver biopsy for the estimation of NASH progression is hard to perform. Therefore, noninvasive NASH biomarkers are needed. We investigated pathophysiology of NASH focusing on adipocytokine and oligosaccharide. We found that lack of secreted frizzled related protein 5 accelerated the liver fibrosis progression. In addition, we established three glyco-biomarkers for NASH. Serum fucosylated haptoglobin and Mac-2 binding protein levels are useful for the NASH diagnosis, and suitable for the prediction of ballooning hepatocyte presence and liver fibrosis severity, respectively. We also found serum fetuin-A levels were decreased with the liver fibrosis progression of NASH patients.

研究分野：肝臓病学

キーワード：肝臓病 糖鎖 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

非アルコール性脂肪性肝疾患 (NAFLD) はメタボリックシンドロームの肝臓における表現系であり、現在増加の一途をたどっている。NAFLD の中でも非アルコール性脂肪性肝炎 (NASH) は進行性であり、肝硬変・肝がんへと進展しうる。とくに男性においては肝硬変に至る前に発がんする症例が多く (全体の半分) NASH を確実に診断することは非常に重要である。現在、NASH 診断は現在肝生検による組織学的診断によってのみ可能である。しかし、肝生検は侵襲的な方法であるため経過観察のために頻回に行うことは困難である。また現在我が国で 1000 万人を超える NAFLD 患者全員に肝生検を行うことは物理的、医療経済的にも困難と考えられる。そこで非侵襲的な診断方法、たとえば血液バイオマーカーによる NASH 診断が待望されている。一方、フコシル化は慢性炎症、がんに関連が深い糖鎖修飾の一つである。我々は最近フコシル化タンパクが細胞極性によって肝細胞では胆管側へと分泌されることを見いだした。NASH では肝臓に ballooning hepatocyte と呼ばれる細胞骨格の破綻した特徴的肝細胞が出現する。Ballooning hepatocyte では細胞極性が破綻していることがすでに知られていることから我々は NASH 肝臓で ballooning hepatocyte の出現・増加により血中フコシル化タンパクが増加するのではないかと仮説を立てた。この仮説および、これまでに我々が明らかとしてきた NASH 病態に重要であるアディポサイトカイン分泌異常の面から新規 NASH バイオマーカーを開発できるのではと考えた。

2. 研究の目的

本研究では糖鎖、アディポサイトカインの面から NASH 病態解析を行い、新規糖鎖バイオマーカー開発をすることを目的とした。

3. 研究の方法

アディポサイトカインとして最近同定された secreted frizzled related protein 5 (Sfrp5) に着目して検討を行った。Sfrp5 は従来 Wnt5a の生体内阻害物質としてすでに同定されている。In vivo の検討では Sfrp5 全身欠損 (KO) マウスと野生型 (WT) マウスを用いて四塩化炭素誘発肝線維化モデルでの検討を行った。リコンビナント Sfrp5、Wnt5a を用いて肝線維化進展過程で中心的役割を担う肝星細胞に対する効果を in vitro で検討した。

肝生検にて診断確定した NAFLD 患者血清を用いて糖鎖マーカーであるフコシル化ハプトグロビン (Fuc-Hpt) およびフコシル化標的タンパクである Mac-2 binding protein (Mac2bp) を我々の開発した ELISA キットを用いて測定し、NASH 診断、組織学的診断との関連を検討した。さらに 870 名の健診受診 NAFLD 患者血清を用いて現在最も NASH の肝線

維化進展予測に有用性が高い FIB-4 index と Fuc-Hpt の相関を検討した。また健診受診 NAFLD 患者 275 名の血清、肝生検による組織診断をした 82 名の NAFLD 患者血清を用いてフェチュイン A を測定し、肝線維化マーカーとの相関について検討を行った。

4. 研究成果

四塩化炭素誘発肝線維化モデルを用いた検討では Sfrp5 KO マウスで WT マウスに比べ肝線維化進展が有意に増悪した。In vitro の検討では Wnt5a により肝星細胞の遊走・増殖が促進され、Sfrp5 はそれらを完全に抑制した。C-jun N terminal kinase (JNK) リン酸化は肝線維化を促進的に作用することが知られている。Wnt5a は肝星細胞の JNK リン酸化を起こすが Sfrp5 はこれも抑制した。以上の検討により、新規アディポサイトカイン Sfrp5 は Wnt5a の作用を阻害することで肝線維化を抑制することが明らかとなった。肥満患者では血中 Sfrp5 濃度が Wnt5a 濃度に比べ低下することがわかっている。Sfrp5/Wnt5a 比が新たな NASH バイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

糖鎖バイオマーカー開発のためまず肝生検で組織診断のついでに 127 名の NAFLD 患者血清を用いて血中 Fuc-Hpt、Mac2bp を測定した。これら 2 つのマーカーは NASH 鑑別診断において従来有用性が最も高いとされている cytokeratin 18 fragment よりも鑑別能が優れていた。特に Fuc-Hpt は肝臓 ballooning hepatocyte スコアと有意な正の相関関係があり、Mac2bp は肝線維化進展と有意な正の相関関係を認めた。健診受診 NAFLD 患者 870 名で FIB-4 index と Fuc-Hpt 値は正の有意相関を示した。独立した別集団でも血中 Fuc-Hpt 値が NASH/NAFLD のバイオマーカーとなりうることを示された。一方血中フェチュイン A 値は代表的肝臓線維化マーカーであるヒアルロン酸値と逆相関し、肝臓線維化進展と逆相関することがすでに知られている血小板数と正の相関を示した。肝生検 NAFLD 症例では線維化の早期の段階で血中フェチュイン A 値が低下することがわかった。血中フェチュイン A は NAFLD の早期段階で低下することがわかった。肝星細胞を用いた細胞実験でフェチュイン A は線維化を促進する TGF- β (transforming growth factor- β) シグナルを負に制御することも明らかとした。以上の結果から血中フェチュイン A は NAFLD の肝線維化過程のなかでも特に早期の段階でその血中濃度が低下することが線維化進展を予測するバイオマーカーとなりうることを示唆された。

本研究によりアディポサイトカイン Sfrp5、フコシル化ハプトグロビン、Mac2bp、フェチュイン A の 4 つが新たな NASH バイオマーカーとなりうることを示された。

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 27 件)

1. Kamada Y, Miyoshi E. Value of Fetuin-A as a Predictor of Liver Fibrosis in Patients With Nonalcoholic Fatty Liver Disease. Author's reply. *Liver Int in press* 査読有り
2. Wang Y, Fukuda T, Isaji T, Lu J, Gu W, Lee HH, Ohkubo Y, Kamada Y, Taniguchi N, Miyoshi E, Gu J. Loss of 1,6-fucosyltransferase suppressed liver regeneration: implication of core fucose in the regulation of growth factor receptor-mediated cellular signaling. *Sci Rep in press* 査読有り
3. Kizu T, Yoshida Y, Furuta K, Ogura S, Egawa M, Chatani N, Hamano M, Takemura T, Ezaki H, Kamada Y, Nishida K, Nakaoka Y, Kiso S, Takehara T. Loss of Gab1 adaptor protein in hepatocytes aggravates experimental liver fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol in press* 査読有り
4. Terao N, Takamatsu S, Minehira T, Sobajima T, Nakayama K, Kamada Y, Miyoshi E. Fucosylation is common type of glycosylation in pancreatic cancer stem cell-like phenotypes. *World J Gastroenterol in press* 査読有り
5. Chatani N, Kamada Y, Kizu T, Ogura S, Furuta K, Egawa M, Hamano M, Ezaki H, Kiso S, Shimono A, Ouchi N, Yoshida Y, Takehara T. Secreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5) decreases hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Liver Int in press* 査読有り
6. Kamada Y, Sato M, Kida S, Akita M, Mizutani K, Fujii H, Sobajima T, Yoshida Y, Shinzaki S, Takamatsu S, Takehara T, Miyoshi E. N-Acetylglucosaminyltransferase V exacerbates concanavalin A-induced mouse hepatitis. *Mol Med Rep* ;11(5):3573-84, 2015 査読有り
7. Azuma K, Serada S, Takamatsu S, Terao N, Takeishi S, Kamada Y, Naka T, Miyoshi E. Identification of sialylated glycoproteins in doxorubicin-treated hepatoma cells with glycoproteomic analyses. *J Proteome Res* ;13(11):4869-77, 2014 査読有り
8. Kamada Y, Asazawa H* (equally contributed), Takeda Y, Takamatsu S, Shinzaki S, Kim Y, Nezu R, Kuzushita N, Mita E, Kat M, Miyoshi E. Serum fucosylated haptoglobin in chronic liver diseases as a potential biomarker of hepatocellular carcinoma development. *Clin Chem Lab Med* ;53(1):95-102, 2015 査読有り
9. Kamada Y, Sato M* (equally contributed), Takeda Y, Kida S, Ohara Y, Fujii H, Akita M, Mizutani K, Yoshida Y, Yamada M, Hougaku H, Takehara T, Miyoshi E. Fetuin-A negatively correlates with liver and vascular fibrosis in nonalcoholic fatty liver disease subjects. *Liver Int* ;35(3):925-35, 2015 査読有り
10. Tomita Y, Azuma K, Nonaka Y, Kamada Y, Tomoeda M, Kishida M, Tanemura M, Miyoshi E. Pancreas Fatty Degeneration and Fibrosis as Predisposing Factors of Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Development. *Pancreas* ;43(7):1032-41, 2014 査読有り
11. Azuma K, Shinzaki S, Asazawa H, Kuroki E, Kawamoto S, Kamada Y, Hayakawa K, Miyoshi E. Twin studies on the effect of genetic factors on serum agalactosyl immunoglobulin G levels. *Biomed Rep* ;2(2):213-216, 2014 査読有り
12. Nakayama K, Moriwaki K, Imai T, Shinzaki S, Kamada Y, Murata K, Miyoshi E. Mutation of GDP-Mannose-4,6-Dehydratase in Colorectal Cancer Metastasis. *PLoS One* ;29;8(7):e70298, 2013 査読有り
13. Kamada Y, Akita M, Takeda Y, Yamada S, Fujii H, Sawai Y, Doi Y, Asazawa H, Nakayama K, Mizutani K, Fujii H, Yakushijin T, Miyazaki M, Ezaki H, Hiramatsu N, Yoshida Y, Kiso S, Imai Y, Kawada N, Takehara T, Miyoshi E. Serum fucosylated haptoglobin as a novel diagnostic biomarker for predicting hepatocyte ballooning and nonalcoholic steatohepatitis. *PLoS One* ;Jun 21;8(6):e66328, 2013 査読有り
14. Kamada Y, Fujii H, Fujii H, Sawai Y, Doi Y, Uozumi N, Mizutani K, Akita M, Sato M, Kida S, Kinoshita N, Matuyama N, Yakushijin T, Miyazaki M, Ezaki H, Hiramatsu N, Yoshida Y, Kiso S, Imai Y, Kawada N, Takehara T, Miyoshi E. Serum Mac-2 binding protein levels as a novel diagnostic biomarker for prediction of disease severity and nonalcoholic steatohepatitis. *Proteomics Clin Appl in press* 査読有り

15. Takemura T, Yoshida Y, Kiso S, Kizu T, Furuta K, Ezaki H, Hamano M, Egawa M, Chatani N, Kamada Y, Imai Y, Higashiyama S, Iwamoto R, Mekada E, Takehara T. Conditional loss of heparin-binding EGF-like growth factor results in enhanced liver fibrosis after bile duct ligation in mice. *Biochem Biophys Res Commun* 437(2):185-91, 2013 査読有り
 16. Hamano M, Ezaki H, Kiso S, Furuta K, Egawa M, Kizu T, Chatani N, Kamada Y, Yoshida Y, Takehara T. Lipid overloading during liver regeneration causes delayed hepatocyte DNA replication by increasing ER stress in mice with simple hepatic steatosis. *J Gastroenterol* 49(2):305-16, 2014 査読有り
 17. Wang X, Sugimoto K, Fujisawa T, Shindo N, Minato S, Kamada Y, Hamano M, Ohishi M, Ikegami H, Rakugi H. Novel effect of ezetimibe to inhibit the development of non-alcoholic fatty liver disease in Fatty Liver Shionogi mouse. *Hepatol Res* 44(1):102-13, 2014 査読有り
 18. Kamada Y, Kinoshita N, Tsuchiya Y, Kobayashi K, Fujii H, Terao N, Kamihagi K, Koyama N, Yamada S, Daigo Y, Nakamura Y, Taniguchi N, Miyoshi E. Reevaluation of a lectin antibody ELISA kit for measuring fucosylated haptoglobin in various conditions. *Clin Chim Acta* 417:48-53, 2013 査読有り
 19. Shinzaki S, Kuroki E, Iijima H, Tatsunaka N, Ishii M, Fujii H, Kamada Y, Kobayashi T, Shibukawa N, Inoue T, Tsujii M, Takeishi S, Mizushima T, Ogata A, Naka T, Plevy SE, Takehara T, Miyoshi E. Lectin-based Immunoassay for Aberrant IgG Glycosylation as the Biomarker for Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 19(2): 321-31, 2013 査読有り
 20. Miyoshi E, Terao M, Kamada Y. Physiological roles of N-acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) in mice. *BMB Rep* 45(10):554-9, 2012 査読有り
 21. Kamada Y, Kiso S, Yoshida Y, Chatani N, Kizu T, Hamano M, Egawa M, Takemura T, Ezaki H, Furuta K, Hayashi N, Takehara T. Pitavastatin ameliorated the progression of steatohepatitis in ovariectomized mice fed high fat and high cholesterol diet. *Hepatol Res* 43(4):401-12, 2013 査読有り
 22. Takemura T, Yoshida Y, Kiso S, Saji Y, Ezaki H, Hamano M, Kizu T, Egawa M, Chatani N, Furuta K, Kamada Y, Iwamoto R, Mekada E, Higashiyama S, Hayashi N, Takehara T. Conditional knockout of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the liver accelerates carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Hepatol Res* 43(4):384-93, 2013 査読有り
 23. Hamano M, Kamada Y, Kiso S, Furuta K, Kizu T, Chatani N, Egawa M, Takemura T, Ezaki H, Yoshida Y, Watabe K, Hamasaki T, Umeda M, Furubayashi A, Kinoshita K, Kishida O, Fujimoto T, Yamada A, Tsukamoto Y, Tsutsui S, Takehara T, Hayashi N, Matsuzawa Y. Adiponectin negatively correlates with alcoholic and non-alcoholic liver dysfunction: Health check-up study of Japanese men. *Hepatol Res* 43(3): 238-48, 2013 査読有り
 24. Nakagawa T, Moriwaki K, Terao N, Nakagawa T, Miyamoto Y, Kamada Y, Miyoshi E. Analysis of polarized secretion of fucosylated alpha-fetoprotein in HepG2 cells. *J Proteome Res* 11(5):2798-806, 2012 査読有り
 25. Yamamoto S, Watabe K, Araki H, Kamada Y, Kato M, Kizu T, Kiso S, Tsutsui S, Tsujii M, Kihara S, Funahashi T, Shimomura I, Hayashi N, Takehara T. Protective role of adiponectin against ethanol-induced gastric injury in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302(8):G773-80, 2012 査読有り
 26. Miyoshi E, Moriwaki K, Terao N, Tan CC, Terao M, Nakagawa T, Matsumoto H, Shinzaki S, Kamada Y. Fucosylation Is a Promising Target for Cancer Diagnosis and Therapy. *Biomolecules* 2:34-45, 2012 査読有り
 27. Kamada Y, Mori K, Matsumoto H, Kiso S, Yoshida Y, Shinzaki S, Hiramatsu N, Ishii M, Moriwaki K, Kawada N, Takehara T, Miyoshi E. N-Acetylglucosaminyltransferase V regulates TGF- response in hepatic stellate cells and the progression of steatohepatitis. *Glycobiology* 22(6):778-87, 2012 査読有り
- 〔学会発表〕(計 10 件)
1. 鎌田佳宏、竹原徹郎、三善英知 肝臓癌におけるフコシル化ハプトグロビンのバイオマーカーとしての有用性に関する検討 2012/6/7 肝臓学会総会 東京
 2. 鎌田佳宏、竹原徹郎、三善英知 血中 Mac-2 binding protein 値は新たな NASH

- 鑑別、病期進展のマーカーである
2013/06/07 第 49 回日本肝臓学会総会
3. Yoshihiro Kamada, Kanako Mori, Hitoshi Matsumoto, Yuichi Yoshida, Shinichi Kiso, Shinichiro Shinzaki, Naoki Hiramatsu, Mayuko Ishii, Kenta Moriwaki, Norifumi Kawada, Tetsuo Takehara and Eiji Miyoshi. *N-Acetylglucosaminyltransferase V (GnT-V) prevents mice steatohepatitis progression through modulation of lymphocytes and hepatic stellate cells function.* 2013/09/23 ISCHS 2013 大阪国際会議場
 4. Kayo Mizutani, Yoshihiro Kamada, Hideki Fujii, Hironobu Fujii, Yoshinori Doi, Maaya Akita, Motoya Sato, Sachiho Kida, Noriaki Kinoshita, Nobuhiro Maruyama, Takayuki Yakushijin, Masanori Miyazaki, Hisao Ezaki, Naoki Hiramatsu, Yuichi Yoshida, Norifumi Kawada, Tetsuo Takehara and Eiji Miyoshi. *Serum Mac-2 binding protein levels as a novel diagnostic biomarker for prediction of disease severity and nonalcoholic steatohepatitis.* 2013/09/25 ISCHS 2013 大阪国際会議場
 5. Yoshihiro Kamada, Hideki Fujii, Hironobu Fujii, Yoshinori Doi, Kayo Mizutani, Maaya Akita, Motoya Sato, Sachiho Kida, Noriaki Kinoshita, Nobuhiro Maruyama, Takayuki Yakushijin, Masanori Miyazaki, Hisao Ezaki, Naoki Hiramatsu, Yuichi Yoshida, Shinichi Kiso, Norifumi Kawada, Tetsuo Takehara and Eiji Miyoshi. *Serum Mac-2 binding protein levels as a novel diagnostic biomarker for prediction of disease severity and nonalcoholic steatohepatitis.* The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2013/11/, Washington U.S.A.
 6. 鎌田佳宏、竹原徹郎、三善英知 血中フコシル化タンパクは肝臓 ballooning hepatocyte のバイオマーカーである 第 100 回日本消化器病学会 4/25 東京国際フォーラム
 7. 鎌田佳宏、竹原徹郎、三善英知 血清糖鎖バイオマーカーを用いた非侵襲的 Matteoni 分類による NASH 診断法の開発 第 50 回日本肝臓学会 2014/5/30 ホテルニューオータニ東京
 8. 鎌田佳宏、茶谷徳啓、古田訓丸、木津 崇、木曾真一、下野明彦、大内乗有、吉田雄一、三善英知、竹原徹郎 *アディポサイトカイン Secreted frizzled-related protein5 (Sfrp5) は肝線維化進展を抑制する* 第 1 回肝臓と糖尿病・代謝研究会

7/4 伊藤謝恩ホール、東京

9. 鎌田佳宏、竹原徹郎、三善英知 *NAFLD 患者の血中フェチイン A は肝臓線維化と動脈硬化の程度に逆相関する* 第 40 回日本肝臓学会東部会 11/27 京王プラザホテル、東京
10. Yoshihiro Kamada, Motoya Sato, Yuri Takeda, Sachiho Kida, Yuka Ohara, Hironobu Fujii, Maaya Akita, Kayo Mizutani, Yuichi Yoshida, Makoto Yamada, Hidetaka Hougaku, Tetsuo Takehara, Eiji Miyoshi. *Fetuin-A negatively correlates with liver and vascular fibrosis in NAFLD subjects* AASLD The Liver Meeting 2014, 2014/11/9, Boston, U.S.A.

〔図書〕(計 1 件)

1. Miyoshi E and Kamada Y. 2015/1/1, LXII, 1568 p. Springer
Glycobiology: Biology and Medicine Hepatosteatosis and Primary Hepatoma

〔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：
出願年月日：
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

鎌田 佳宏 (KAMADA YOSHIHIRO)
大阪大学・医学系研究科・准教授
研究者番号：30622609

(2) 研究分担者

三善 英知 (MIYOSHI EIJI)
大阪大学・医学系研究科・教授

研究者番号：20322183

(3)連携研究者
なし