

表 題 同種造血幹細胞移植後における Mac-2 binding
protein glycan isomer (M2BPGi) の移植片対宿主病
(GVHD) バイオマーカーとしての有用性

論文の区分 博士課程

著 者 名 赤星 佑

担当指導教官氏名 神田 善伸 教授

所 属 自治医科大学大学院医学研究科
地域医療学専攻
総合医学分野
内科系総合医学専攻

2021年1月8日申請の学位論文

内容

1. はじめに	2
2. 同種造血幹細胞移植後における GVHD バイオマーカーの検索	4
2.1 背景	4
2.2 マクロファージ関連バイオマーカー候補の選定	5
2.3 方法	7
2.3.1 患者選択	7
2.3.2 各バイオマーカーの測定	7
2.3.3 蛍光免疫染色	8
2.3.4 統計解析	9
2.4 結果	10
2.4.1 患者背景	10
2.4.2 各バイオマーカー候補と非再発死亡との関連	13
2.4.3 M2BPGi と死因の関連	18
2.4.4 異なるタイムポイントにおける M2BPGi と非再発死亡の関連	19
2.4.5 M2BPGi 値と臨床的特徴	21
2.4.6 剖検症例の患者背景・臨床経過	28
2.4.7 剖検症例の蛍光免疫染色：線維化の評価	29
2.4.8 剖検症例の蛍光免疫染色：WFA ⁺ -M2BP 陽性細胞の発現	30
3. 考察	34
4. おわりに	37
5. 文献	38

1. はじめに

同種造血幹細胞移植は白血病などの造血器疾患に対する標準療法の一つとして広く用いられている。本邦では、1974年に最初の同種造血幹細胞移植が実施されて以来、着実に件数が増加し、近年では年間3,500件以上実施されている。世界全体で見ても、年間50,000件以上の同種造血幹細胞移植が実施されており、その数は年々増加傾向である。

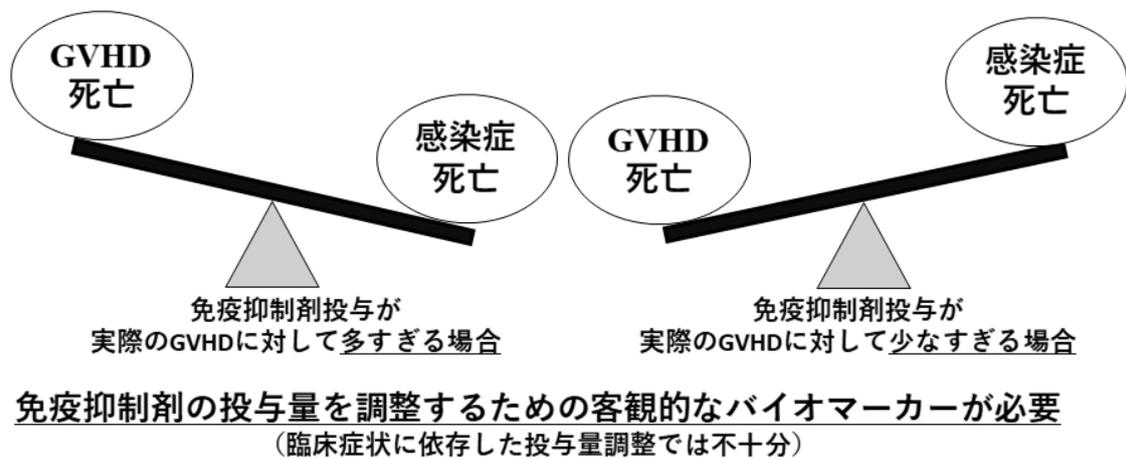
同治療法は、移植前に投与される大量抗癌剤の効果に加え、移植したドナー細胞が腫瘍を攻撃することで生じる移植片対白血病効果 (graft-versus-leukemia, GVL 効果) によって再発抑制が期待できる、強力な免疫療法でもある。しかし、ドナー細胞が患者臓器を攻撃することで引き起こされる移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) は、免疫抑制剤を用いた予防を行っても、完全には克服することができていない重要な移植後合併症であり¹、GVHDが最初に報告されてすでに40年以上が経過しているが、初期治療の第一選択肢は全身ステロイド投与のみである。

GVHDは臨床症状や病理組織像から、急性GVHDと慢性GVHDに分類することができる。急性GVHDは、移植後100日以内に発症することが多く、主に皮膚・消化管・肝臓が障害される。一方で、慢性GVHDは移植後100日以降に出現することが多く、多臓器に渡って線維化をはじめとする自己免疫疾患と類似した臨床症状を呈し^{2,3}、移植後非再発死亡の要因となるだけでなく、生活の質(QOL)を大きく損ねてしまうことが知られている^{4,5}。

GVHDを発症した場合、GVL効果も併せて増強されると考えられるが、一般的にはGVHDによるデメリットがGVL効果のメリットを上回ってしまうため^{6,7}、免疫抑制剤を使用してGVHDを抑え込む必要がある。不十分な免疫抑制剤投与が、重症かつ致死的なGVHDを誘発してしまう可能性がある一方で、免疫抑制

剤の過剰投与は易感染状態をもたらし、時に重篤な感染症を引き起こしてしまう (Figure 1)。そこで、免疫抑制剤投与量を適正に調整すれば、GVHD を最小限に抑えつつ、GVL 効果を最大限に期待することができると考えられる。したがって、侵襲性が少なく、客観的に GVHD の重症度や活動性を評価できるバイオマーカーが確立されれば、同種造血幹細胞移植成績の大幅な向上が期待できる。

Figure 1. 免疫抑制剤投与の調整について



2. 同種造血幹細胞移植後における GVHD バイオマーカーの検索

2.1 背景

治療成績を向上させるうえで GVHD の重症度や活動性を正確かつ客観的に評価することは重要であると考えられるが、移植後期に発症する慢性 GVHD は、移植早期に発症する急性 GVHD と比較して評価が難しい場合が多い。実際に急性 GVHD では、障害臓器が皮膚・消化管・肝臓に限定されており、画一的な臨床像を呈する 경우가多く⁸、米国ではすでに実臨床で使用可能なバイオマーカーも登場しているため⁹⁻¹¹、客観的な評価法が確立しつつある。一方で、慢性 GVHD では病態生理が不明な点が多いことに加えて、皮膚・口腔・眼・消化管・肝臓・肺・筋膜・関節・生殖器といった多くの臓器が障害され、多彩な症状を呈するため臨床症状による評価が難しいことが挙げられる^{12,13}。また、侵襲性を伴う組織診断が困難である場面も多く、線維化などで固定化してしまった病変と活動性病変を区別することが困難であることも、慢性 GVHD の評価を一層難しくしている¹⁴。

そこで本研究では、より評価が難しい慢性 GVHD に焦点を当て、侵襲性が低く、信頼性の高いバイオマーカーの確立を目指し、慢性 GVHD の進展に重要とされるマクロファージに関連した3つのバイオマーカー候補の GVHD 評価能を解析した。

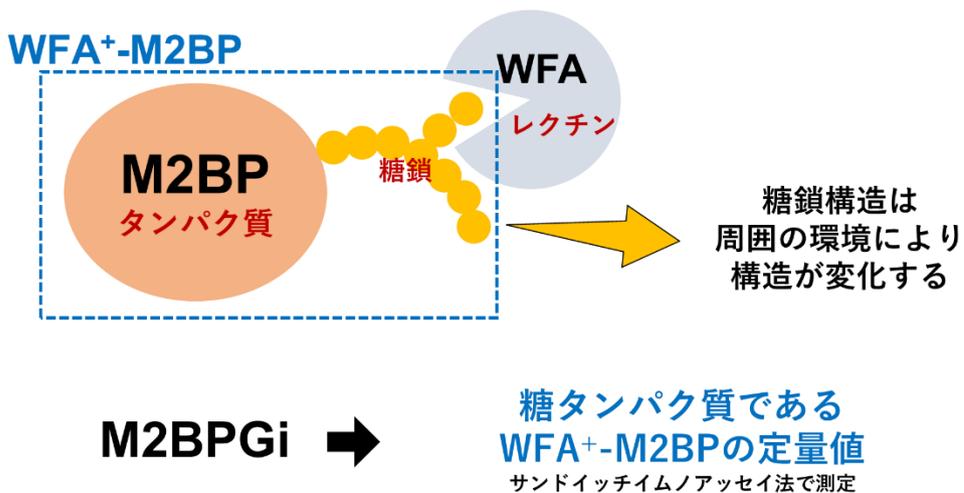
2.2 マクロファージ関連バイオマーカー候補の選定

近年、慢性 GVHD の病態が少しずつ明らかにされてきており、慢性 GVHD に特徴的な線維化の進展においては、マクロファージが重要な役割を担っていることが明らかにされてきた¹⁵。この中で、マクロファージが異常に活性化するメカニズムはまだ不明な点が多いものの、最終的に活性化したマクロファージが産出した Transforming Growth Factor- β (TGF β) などのサイトカインが線維芽細胞を活性化させ、細胞外マトリックスの過剰な蓄積が起こることで各臓器における線維化や臓器障害を引き起こされると考えられている。よって、マクロファージは慢性 GVHD を引き起こすトリガーというよりは、むしろ組織障害の進展に大きく寄与していると考えられ、慢性 GVHD の活動性や重症度を評価するうえで魅力的な免疫細胞サブセットであると考えられる。

今回我々はマクロファージの活性化に関連した①Glectin-3 (GAL3)、②Mac-2 Binding Protein (M2BP)、③Wisteria Floribunda Agglutinin (WFA)⁺-M2BP をバイオマーカーの候補とし、GVHD 評価能について解析を行った。GAL3 は細胞の増殖・接着・分化・血管新生・アポトーシスに関与しており、様々な線維化促進因子を活性化することで線維芽細胞の増加と形質転換を促進し、細胞外マトリックスの産出を増加させるタンパク質である¹⁶。M2BP はこの GAL3 のリガンドで単球/マクロファージ表面に高発現しており、GAL3 とともにコラーゲンやフィブロネクチンといった細胞外タンパク質に作用して線維化を促進させるだけでなく、マクロファージを活性化させることでインターロイキン-1 やインターロイキン-6 といった炎症性サイトカインを誘導する¹⁷。WFA⁺-M2BP は M2BP のタンパク質表面に存在する糖鎖構造が肝臓の線維化に伴い変化することに着目した、本邦で開発された肝線維化マーカーである¹⁸。具体的には、肝臓の線維化に伴いタンパク質である M2BP 表面の糖鎖構造の特徴的な変化を検出するレクチ

ン WFA と、抗 M2BP 抗体を用いたサンドイッチ免疫アッセイ法により WFA⁺-M2BP を定量化したものが M2BPGi である (Figure 2)。WFA は一般的に T リンパ球の活性化¹⁹ や血球凝集²⁰ を誘導することが知られ、N-アセチルガラクトサミンを末端に有する N-グリカンに結合するレクチンである²¹。WFA⁺-M2BP は M2BP glycan isomer (M2BPGi) と命名され、ウイルス性肝炎に対する肝線維化マーカーとして 2015 年より本邦で保険収載されている。

Figure 2. M2BPGi 測定の概要



2.3 方法

2.3.1 患者選択

2010年1月から2016年12月までに自治医科大学附属さいたま医療センターで初回同種造血幹細胞移植を行い、180日以上無病生存し、血液検体保存に同意をいただいた110例を対象とした。血液検体保存に同意いただけなかった2名は除外した。110名はDiscovery cohort (n = 55)とValidation cohort #1 (n = 55)へ乱数表を用いて著者がランダムに振り分けし、統計解析を行った。

さらに事後解析(post-hoc analysis)として、2010年1月から2016年12月までに2回目あるいは3回目の同種造血幹細胞移植を行った15名と2017年1月から2018年6月までに初回同種造血幹細胞移植を行った35名をValidation cohort #2 (n = 50)として追加解析を行った。また、健常人20名と自家造血幹細胞移植を行った11名(多発性骨髄腫5名、悪性リンパ腫5名、急性前骨髄球性白血病1名)をコントロールとして比較した。急性・慢性GVHDはNIH診断基準に沿って判定した¹⁴。

本研究は自治医科大学倫理委員会の承認を受け、研究計画書を遵守して実施された。ヘルシンキ宣言の精神に基づいて、検体を得たすべての患者から検体の保存、および研究使用について書面で同意を得た。

2.3.2 各バイオマーカーの測定

同種造血幹細胞移植後約90日、180日、365日後に採取し、-80°Cで保存していた血漿サンプルを用いた。GAL3とM2BPの血中濃度はThermo Fisher Scientific社のELISAキットを用いて測定した。検出限界はそれぞれ0.29 ng/mLと0.92 ng/mLであり、検量線は添付のプロトコールに従って作成した。M2BPGiはレクチンと抗体を用いたサンドイッチ免疫アッセイ法で測定した(HISCL-

2000i, Sysmex Co., Kobe, Japan) ^{18,22}。本アッセイを用いることで、M2BPGi は約 20 分程度で測定することが可能である。M2BPGi の実測値はコントロール値を用いた下記の計算式を用いて cut-off index (COI) として評価した。検出限界は COI で 0.1 であった。

$$\text{COI} = [(\text{M2BPGi})_{\text{Sample}} - (\text{M2BPGi})_{\text{NC}}] / [(\text{M2BPGi})_{\text{PC}} - (\text{M2BPGi})_{\text{NC}}]$$

$(\text{M2BPGi})_{\text{Sample}}$: M2BPGi 実測値

$(\text{M2BPGi})_{\text{PC}}$: ポジティブコントロール値

$(\text{M2BPGi})_{\text{NC}}$: ネガティブコントロール値

2.3.3 蛍光免疫染色

剖検症例における、肝臓と肺のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を対象に、下記の抗体及びレクチンを用いて蛍光免疫染色を行った。FFPE サンプルは脱パラフィンを行った後、100mM クエン酸緩衝液 (pH6.0) とともにマイクロウェーブで 5 分間抗原賦活処理を行った ²³。0.05M リン酸緩衝液 (pH7.6) で 3 回洗浄し、ブロッキング試薬 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を用いて非特異的蛋白吸収処理を行い、一次抗体とオーバーナイトで反応させた。0.05M リン酸緩衝液 (pH7.6) で 3 回洗浄し 2 次抗体反応を 1 時間かけて行い、洗浄後に DAPI を用いて核を染色した。蛍光免疫染色像は、蛍光顕微鏡 BZ-X700 (Keyence, Osaka, Japan) を用いて観察した。

一次抗体 :

ビオチン化 WFA レクチン (Vector Labs, CA, USA)

ウサギ 抗 M2BP 抗体 (Proteintech, IL, USA)

マウス 抗 CD68 抗体 (Dako, Glostrup, Denmark)

マウス 抗 α -smooth muscle actin (SMA) 抗体 (Dako, Glostrup, Denmark)

二次抗体 :

ストレプトアビジン Alexa Fluor 488 抗体 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)

Alexa Fluor 594 チキン 抗ウサギ IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)

Alexa Fluor 594 ヤギ 抗マウス IgG 抗体 (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)

2.3.4 統計解析

2 値変数の群間比較にはフィッシャーの正確確率検定、連続変数の比較には Mann-Whitney U 検定と Kruskal-Wallis 検定、順序変数の傾向は Jonckheere-Terpstra trend 検定を用いた。非再発死亡と GVHD の累積発症率は Gray 検定を使用し、再発と無 GVHD 死亡をそれぞれ競合イベントとして扱った。多変量解析では Fine-Gray 法を用い、Backward stepwise selection 法で調整因子を決定した。全ての検定は両側検定で P 値が 0.05 未満を統計学的有意差ありとした。統計処理は EZR version 1.37 (Jichi Medical University Saitama Medical Center) を用いて解析した²⁴。

2.4 結果

2.4.1 患者背景

Discovery cohort (n = 55)、Validation cohort #1 (n = 55)、Validation cohort #2 (n = 50)の患者背景を Table 1 に示す。当初より計画していた Discovery cohort と Validation cohort #1 を合わせた全体コホート (N = 110) では生存者の中央観察期間は 1729 日 (範囲 : 111-2737 日)、5 年全生存率は 72.1% (95%CI : 61.9-79.9%)、グレード 2-4 急性 GVHD 累積発症率 35.5% (95%CI : 26.9-44.8%)、慢性 GVHD5 年累積発症率 72.1% (95%CI : 62.5-79.6%)、慢性 GVHD の発症中央値は移植後 131 日 (範囲 : 47-890 日)であった。

Table 1. 患者背景

	Discovery cohort (n = 55)	Validation cohort #1 (n = 55)	Validation cohort #2 (n = 50)
Age at transplantation			
Median (range)	48 (18–65)	47 (18–66)	46 (18–68)
Recipient/donor sex			
Male/female	13 (23. 6)	14 (25. 5)	11 (22. 0)
Other combinations	42 (76. 4)	41 (74. 5)	39 (78. 0)
Underlying disease			
AL	30 (54. 5)	40 (72. 7)	31 (62. 0)
ML	5 (9. 1)	5 (9. 1)	6 (12. 0)
MDS/MPN	16 (29. 1)	5 (9. 1)	7 (14. 0)
AA	3 (5. 5)	5 (9. 1)	1 (2. 0)
CML	1 (1. 8)	0 (0)	3 (6. 0)
Others	0 (0)	0 (0)	2 (4. 0)
Disease risk*			
Low risk	51 (92. 7)	46 (83. 6)	46 (92. 0)
High risk	4 (7. 3)	9 (16. 4)	4 (8. 0)
Performance status †			
0–1	54 (98. 2)	54 (98. 2)	48 (96. 0)
2–4	1 (1. 8)	1 (1. 8)	2 (4. 0)
HCT–CI ‡			
0–1	48 (87. 3)	47 (85. 5)	42 (84. 0)
≥2	7 (12. 7)	8 (14. 5)	8 (16. 0)
Stem cell source			
BM	34 (61. 8)	31 (56. 4)	25 (50. 0)
PBSCT	16 (29. 1)	19 (34. 5)	24 (48. 0)
UCB	5 (9. 1)	5 (9. 1)	1 (2. 0)
HLA			
Match	31 (56. 4)	25 (45. 5)	30 (60. 0)
Mismatch	24 (43. 6)	30 (54. 5)	20 (40. 0)
Type of donor			
Related	16 (29. 1)	19 (34. 5)	21 (42. 0)
Unrelated	39 (70. 9)	36 (65. 5)	29 (58. 0)

Conditioning regimen §			
Myeloablative	39 (70.9)	39 (70.9)	34 (68.0)
Reduced intensity	16 (29.1)	16 (29.1)	16 (32.0)
GVHD prophylaxis			
CSA+MTX	47 (85.5)	50 (90.9)	44 (88.0)
TAC+MTX	8 (14.5)	5 (9.1)	6 (12.0)
Use of ATG/alemtuzumab			
No	49 (89.1)	44 (80.0)	37 (74.0)
Yes	6 (10.9)	11 (20.0)	13 (26.0)
Prior acute GVHD			
No	16 (29.1)	16 (29.1)	9 (18.0)
Yes	39 (70.9)	39 (70.9)	41 (82.0)
Prior chronic GVHD			
No	29 (52.7)	33 (60.0)	23 (46.0)
Yes	26 (47.3)	22 (40.0)	27 (54.0)
Median days from HSCT	179	178	181
to sample acquisition (range)	(133–266)	(168–274)	(168–267)

AL, 急性白血病； ML, 悪性リンパ腫； MDS, 骨髄異形成症候群； MPN, 骨髄増殖性疾患； AA, 再生不良性貧血； CML, 慢性骨髄性白血病； HCT-CI, 移植時合併症スコア； BM, 骨髄移植； PBSC, 末梢血幹細胞移植； UCB, 臍帯血移植； HLA, ヒト白血球抗原； GVHD, 移植片対宿主病 CSA, シクロスポリン； MTX, メトトレキサート； TAC, タクロリムス； ATG, 抗胸腺細胞免疫グロブリン； HSCT, 造血幹細胞移植.

*非寛解の造血器腫瘍を高リスク、それ以外を低リスクと定義

†パフォーマンスステータス： Eastern Cooperative Oncology Group scale に準じる

‡ HCT-CI の計算は既報に準じる²⁵

§ 前処置強度の定義は CIBMTR (Center for International Blood and Marrow Transplant Research) の基準に準じる²⁶

|| GVHD の有無はサンプル採取時点で評価

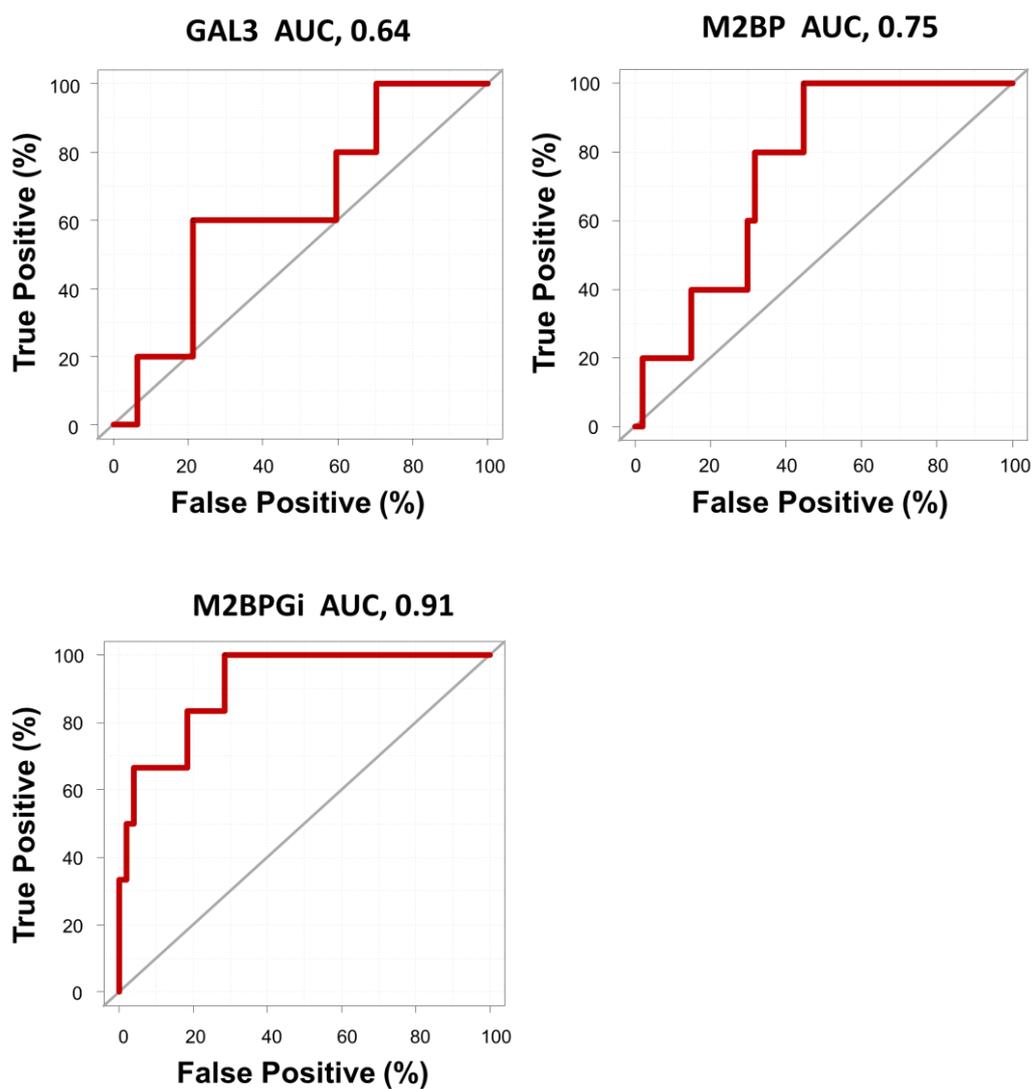
2.4.2 各バイオマーカー候補と非再発死亡との関連

最初に、移植後 180 日の検体を用いて各バイオマーカーと移植後非再発死亡の関連を評価した。Discovery cohort における ROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線を Figure 3 に示す。GAL3, M2BP, M2BPGi の AUC (Area Under Curve) はそれぞれ 0.64、0.75、0.91 であり、ROC 曲線の図の左上からの距離が最少となる値をカットオフ値として設定した。同カットオフを用いて各バイオマーカー値を高値・低値群に分け、Discovery cohort、Validation cohort#1、Validation cohort#2 それぞれで非再発死亡との関連を解析した。結果として 3 つのコホート全てで、下記の通り M2BPGi のみが移植後非再発死亡と統計学的に有意な相関を認めた (Table 2) (Figure 4)。さらに M2BPGi は肝線維化マーカーであることから、総ビリルビン値と ALT 値と移植後非再発死亡の関連を、全体コホート (N = 110) を用いて評価したが、ROC 曲線解析では AUC はそれぞれ 0.51、0.49 であり非再発死亡の予測能は乏しいと考えられた (Figure 5)。

Table 2. 移植後 5 年非再発死亡

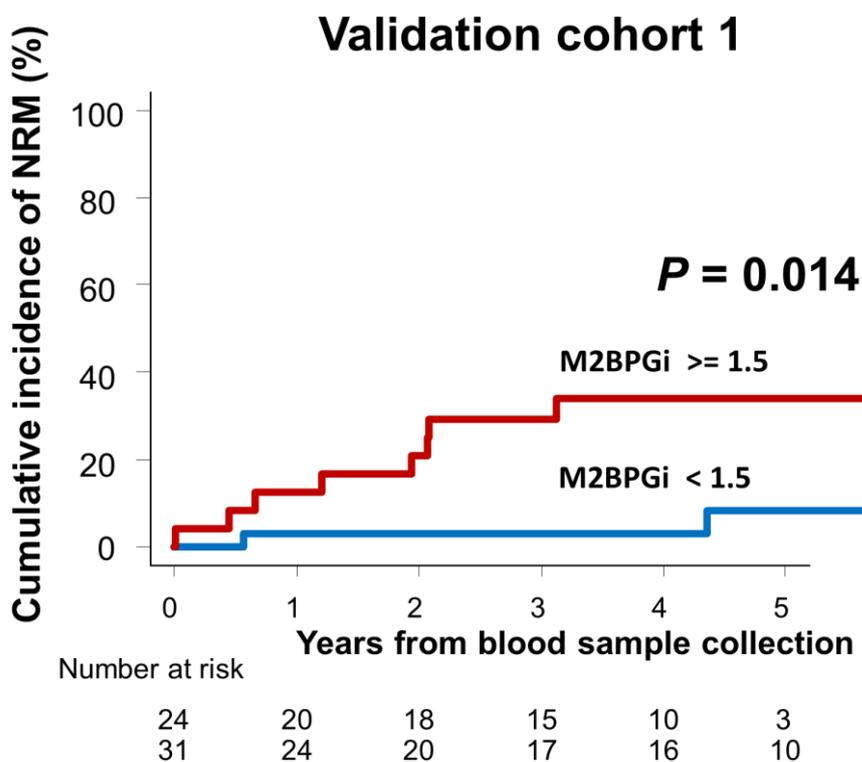
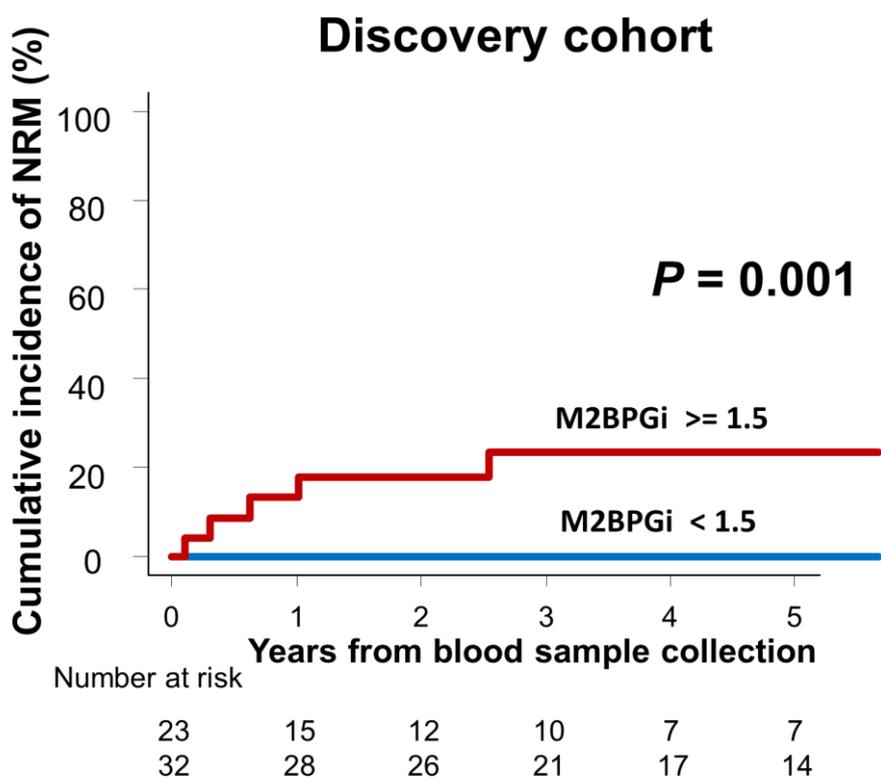
	M2BPGi 高値	M2BPGi 低値	<i>P</i> value
Discovery cohort	23.3%	0.0%	0.001
Validation cohort #1	34.0%	8.4%	0.014
Validation cohort #2	35.3%	4.0%	0.045

Figure 3. Discovery cohort における非再発死亡 (NRM) に対する ROC 曲線

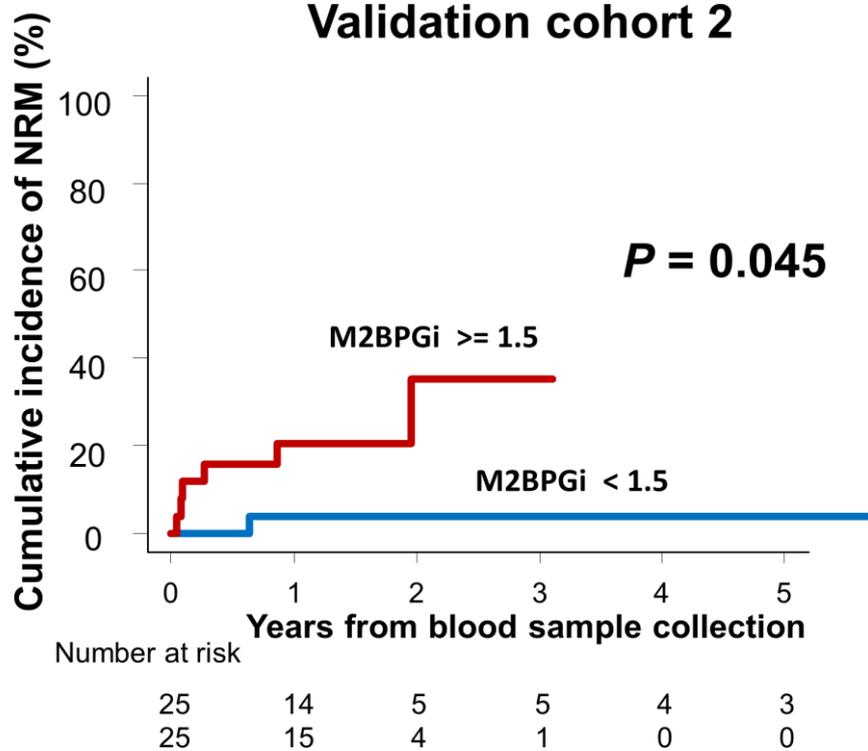


NRM: Nonrelapse mortality
ROC: Receiver Operating Characteristic
AUC: Area Under Curve

Figure 4. M2BPGi と非再発死亡 (NRM)

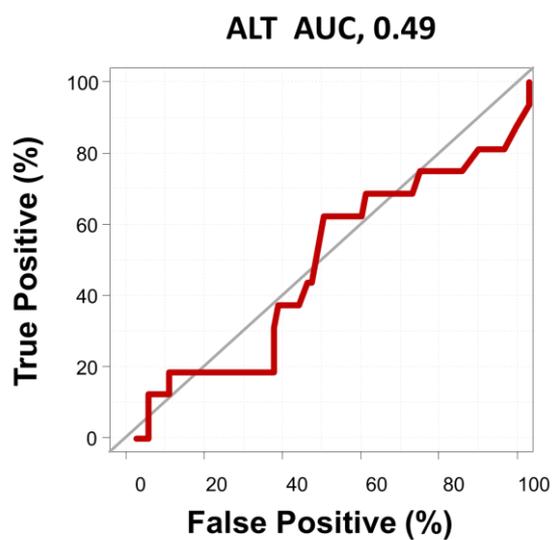
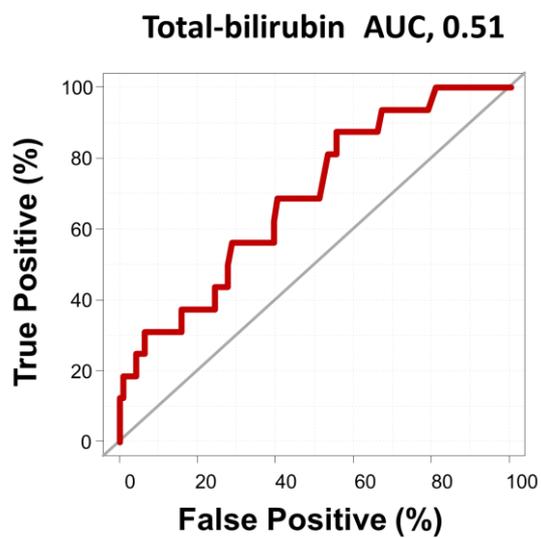


Validation cohort 2



NRM: Nonrelapse mortality

Figure 5. 総ビリルビン値、ALT 値の非再発死亡（NRM）に対する ROC 曲線



NRM: Nonrelapse mortality
ROC: Receiver Operating Characteristic
AUC: Area Under Curve
ALT: Alanine aminotransferase

2.4.3 M2BPGi と死因の関連

全体コホート (N = 110) における死因を確認したところ、M2BPGi 低値群で現病の再発以外で死亡した 2 症例はいずれも肺 GVHD によるものであった (Table 3)。一方で、M2BPGi 高値群では、約 2/3 は感染症あるいは GVHD で死亡していることが明らかになった。

Table 3. 死因

	Lower M2BPGi* (n = 11)	Higher M2BPGi (n = 19)
Relapse	9 (81.8)	4 (21.1)
Infection	0 (0)	3 (15.8)
Liver GVHD	0 (0)	3 (15.8)
Lung GVHD	2 (18.2)	4 (21.1)
GVHD except for liver and lung	0 (0)	2 (10.5)
Others	0 (0)	3 (15.8)

GVHD, 移植片対宿主病

* COI < 1.5

2.4.4 異なるタイムポイントにおける M2BPGi と非再発死亡の関連

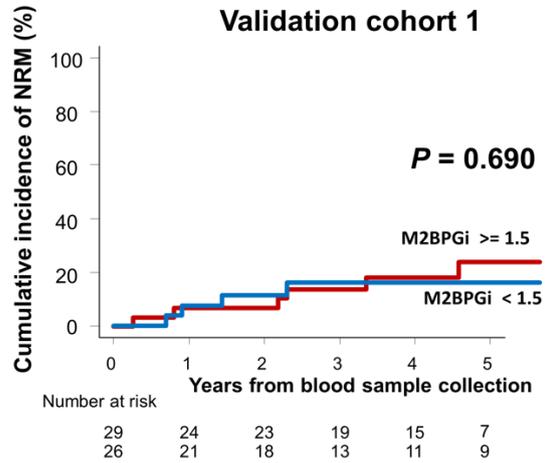
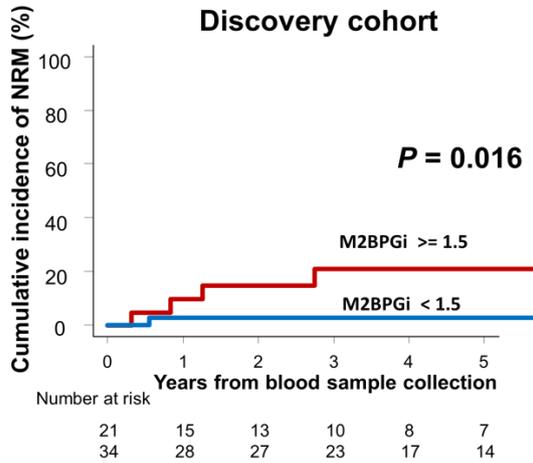
全体コホートにおいて、異なるタイムポイント(移植後 90 日、365 日)での M2BPGi と移植後非再発死亡の関連について評価を行った。移植後 90 日では Validation cohort#1 で有意差を認めなかったが、移植後 365 日のサンプルでは両群で移植後非再発死亡と強い相関を認めた(Table 4) (Figure 6)。

Table 4. 各タイムポイントにおける移植後 5 年非再発死亡

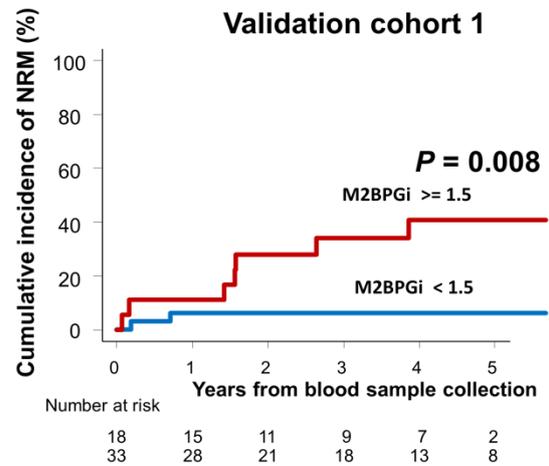
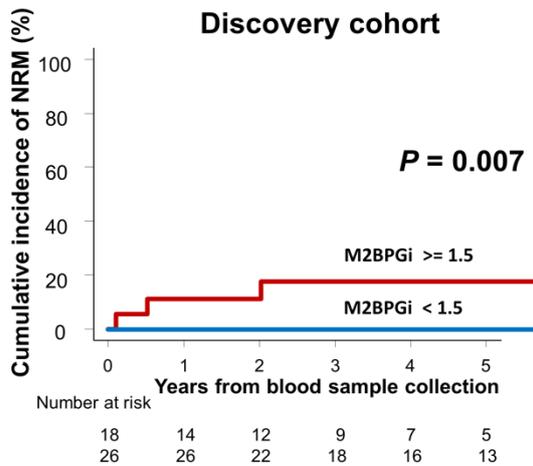
	M2BPGi 高値	M2BPGi 低値	P value
移植後 90 日サンプル			
Discovery cohort	20.9%	2.9%	0.016
Validation cohort #1	24.2%	16.1%	0.690
移植後 365 日サンプル			
Discovery cohort	17.60%	0.00%	0.007
Validation cohort #1	40.80%	6.10%	0.008

Figure 6. 移植後 90 日、365 日における M2BPGi と非再発死亡 (NRM) の相関

移植後 90 日サンプル



移植後 365 日サンプル



NRM: Nonrelapse mortality

2.4.5 M2BPGi 値と臨床的特徴

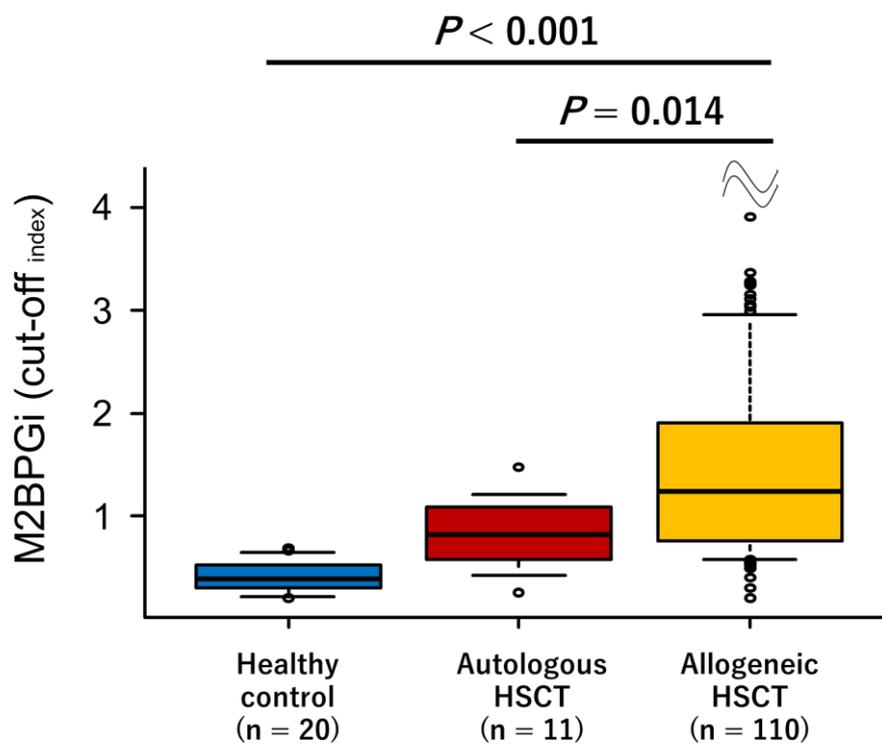
M2BPGi 値と臨床的特徴の関連について検討を行った。同種造血幹細胞移植症例 (N = 110) の移植後 180 日での M2BPGi 値 (COI) は中央値で 1.31 (範囲 : 0.21–16.25) であり、これは自家造血幹細胞移植症例 (中央値 : 0.82, 範囲 : 0.26–1.48)、健常人 (中央値 : 0.40, 範囲 : 0.20–0.69) と比較して有意に高値であった ($P < 0.001$) (Figure 7)。また、自家造血幹細胞移植症例および健常人において、Discovery cohort で同定した M2BPGi (COI) のカットオフ値 1.5 を超える症例は 1 例もいなかった。

次に移植後 180 日での M2BPGi 値と検体採取時の慢性 GVHD の臨床像との関連を評価した。結果として M2BPGi 値は肝臓 GVHD と有意な相関を認めたが ($P = 0.025$)、M2BPGi 低値群で非再発死亡の死因となった肺 GVHD とは統計学的相関を認めなかった (Figure 8)。さらに M2BPGi 値は慢性 GVHD 重症度¹⁴ ($P = 0.004$)、および肝臓 GVHD 重症度 ($P < 0.001$) と強い相関を認めた (Figure 9)。

以上より、M2BPGi 値は検体採取時の慢性 GVHD 重症度や肝臓 GVHD と強い相関を認めた。そこで、慢性 GVHD 重症度や肝臓 GVHD スコアといった検体採取時の臨床情報を調整因子として補正後も、M2BPGi 値が移植後非再発死亡と関連があるかどうかについて検討を行った。そのほか一般的に移植後非再発死亡のリスク因子である患者年齢、性別不一致移植、移植時合併症スコア (HCT-CI)、ヒト白血球抗原 (HLA) 不一致移植、体内 T 細胞除去移植 (in-vivo T-cell depletion) に加えて、慢性 GVHD 発症時の予後規定因子である血小板数を調整因子として多変量解析を行った。慢性 GVHD 重症度と肝臓 GVHD スコアには多重共線性があると考えられるため、それぞれ別々に解析を行ったが、いずれの場合でも M2BPGi 値は移植後非再発死亡と有意な相関を認めた ($P = 0.006$, and $P = 0.010$) (Table 5)。

さらに M2BPGi 値は検体採取時に肝臓 GVHD を発症していた症例だけでなく、肝臓 GVHD 未発症症例においても移植後非再発死亡と有意な相関を認めた (Figure 10)。

Figure 7. 同種移植・自家移植・健常人における M2BPGi 値



HSCT: hematopoietic stem cell transplantation

Figure 8. M2BPGi 値と慢性 GVHD の障害臓器

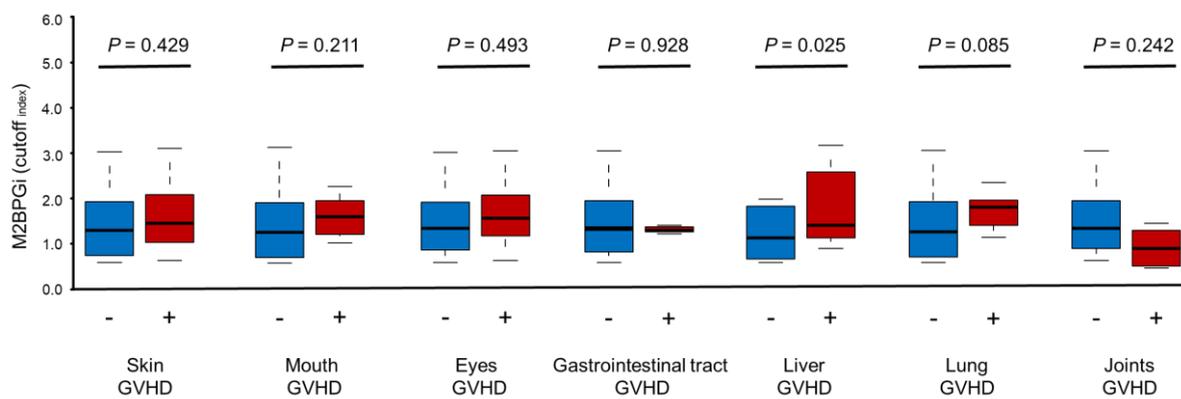


Figure 9. M2BPGi 値と慢性 GVHD の重症度

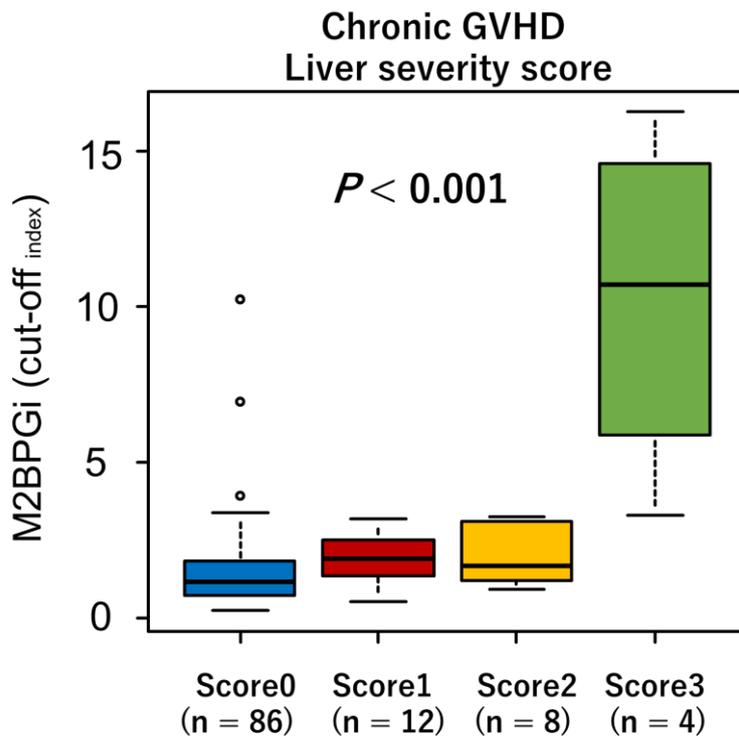
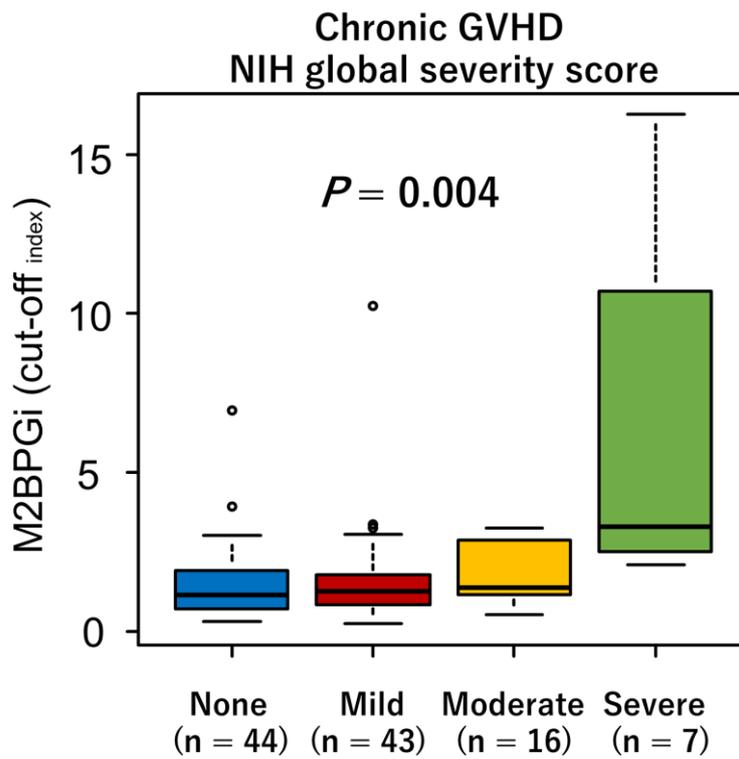


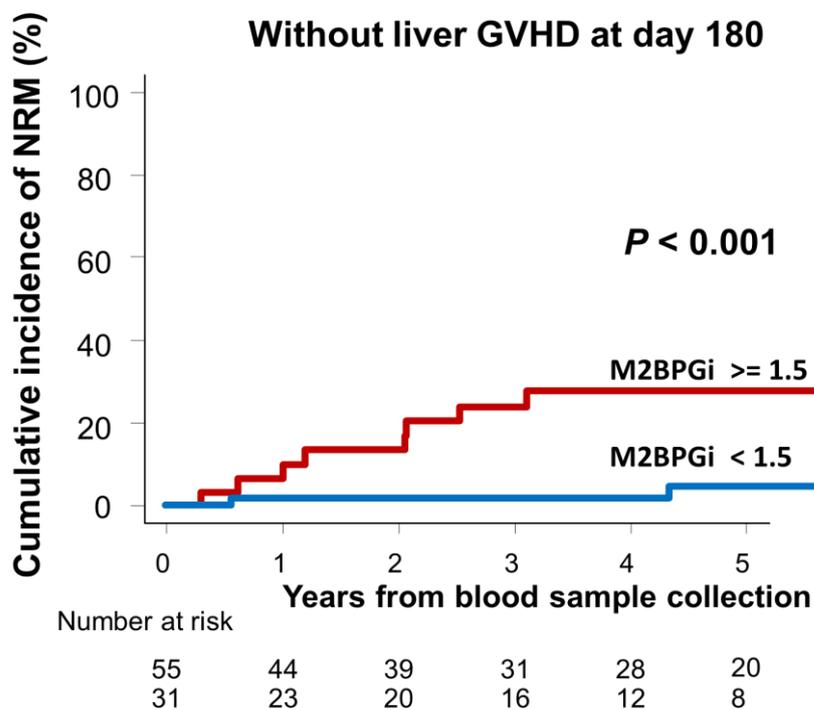
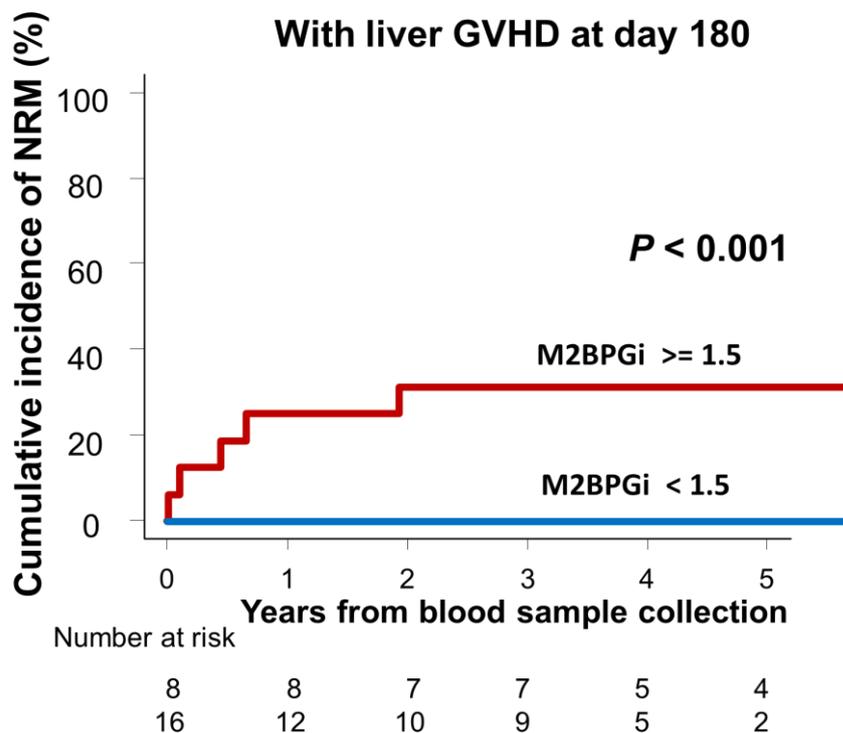
Table 5. 多変量解析による M2BPGi と非再発死亡 (NRM)

	Univariate analysis Hazard ratio (95% CI)	<i>P</i> value	Multivariate analysis* Hazard ratio (95% CI)	<i>P</i> value	Multivariate analysis* Hazard ratio (95% CI)	<i>P</i> value
M2BPGi						
COI < 1.5	1	Ref	1	Ref	1	Ref
COI ≥ 1.5	11.27 (2.61-48.67)	0.001	9.20 (1.87-45.26)	0.006	8.52 (1.67-43.51)	0.010
Thrombocytopenia						
No	1	Ref			1	Ref
Yes	3.40 (1.25-9.26)	0.017			3.60 (1.03-12.63)	0.045
NIH global severity score						
0/1/2	1	Ref	1	Ref		
3	13.8 (4.50-42.06)	<0.001	4.46 (1.44-13.84)	0.010		
Liver severity score						
0/1/2	1	Ref			1	Ref
3	12.2 (3.40-43.53)	<0.001			9.24 (2.06-41.40)	0.004
HCT-CI						
0-1	1	Ref	1	Ref	1	Ref
≥ 2	3.68 (1.25-10.89)	0.018	3.17 (1.16-8.69)	0.025	3.48 (1.12-10.87)	0.032

NRM, 非再発死亡; CI, 信頼区間.

*そのほか年齢, 性別, HCT-CI スコア, HLA 一致度, ATG あるいは alemtuzumab の使用を調整因子とした。

Figure 10. 肝臓 GVHD 有無別に見た M2BPGi 値と非再発死亡 (NRM)



NRM: Nonrelapse mortality

GVHD: Graft-versus-host disease

2.4.6 剖検症例の患者背景・臨床経過

WFA⁺-M2BP 陽性細胞の肝臓・肺における発現を評価するため、剖検症例 (n = 3) における蛍光免疫染色を実施した。各症例の患者背景を Table 6 に示す。各症例の臨床経過は下記の通りである。

Table 6. 剖検 3 症例の患者背景

Patient	Age	Primary disease	Hepatitis infections	Acute GVHD	Onset of chronic liver GVHD	Onset of chronic lung GVHD	Other chronic GVHD	Death
# 1	44	AML	HBsAg(+)	None	Day +94	None	Skin	Day +887
# 2	66	CMMoL	None	Grade I	Day +123	Day +186	Skin	Day +372
# 3	58	FL	None	None	None	Day +444	None	Day +618

AML, 急性骨髄性白血病; CMMoL, 慢性骨髄単球性白血病; FL, 濾胞性リンパ腫.

症例#1: 44 歳男性で急性骨髄性白血病に対して、血縁 HLA 一致同胞からシクロフォスファミド+全身放射線照射 (Cy/TBI) による骨髄破壊的前処置を用いた同種末梢血幹細胞移植を実施。HBs 抗原陽性の既感染パターンであったため、移植期間中は抗ウイルス薬エンテカビルを投与し、HBV-DNA は移植後も検出感度未滿を維持した。移植後現病は寛解を維持したが、皮膚と肝臓の慢性 GVHD を発症し (肺 GVHD 未発症)、最終的に移植後 887 日に肝不全で死亡した。移植後 180 日での M2BPGi 値 (COI) は 16.25 であった。

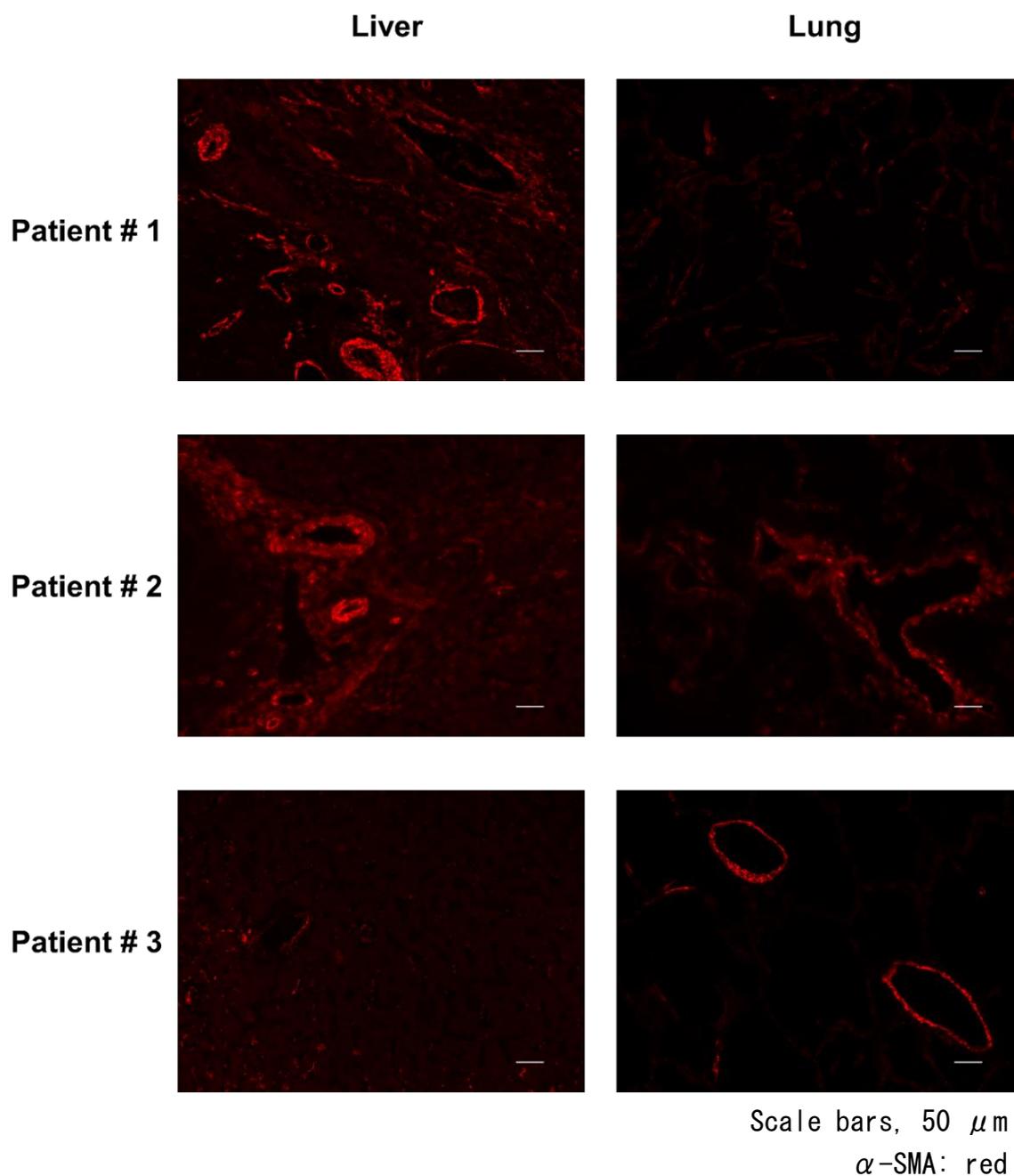
症例#2: 66 歳男性で慢性骨髄単球性白血病に対して血縁 HLA 一致同胞からフルダラビン+ブスルファン (Flu/Bu) による骨髄非破壊的前処置を用いた同種末梢血幹細胞移植を実施し、現病は寛解を維持。肝臓 GVHD はシクロスポリン増量で部分寛解したが、肺 GVHD である閉塞性細気管支炎 (bronchiolitis obliterans, BO) により移植後 372 日に死亡した。移植後 180 日での M2BPGi 値 (COI) は 1.9 であった。

症例#3: 58 歳男性で濾胞性リンパ腫に対して HLA 半合致血縁者からフルダラビン+メルファラン+全身放射線照射 (Flu/Mel/TBI) による骨髄非破壊的前処置を用いた同種末梢血幹細胞移植を実施し、現病は寛解を維持。肝臓 GVHD 発症はなかったが、BO を発症し、最終的に複数の感染症により死亡した。移植後 180 日での M2BPGi 値 (COI) は 2.08 であった。

2.4.7 剖検症例の蛍光免疫染色：線維化の評価

3 症例の肝臓・肺における線維化を評価するため、 α -SMA の染色を行った。予想通り、肝臓 GVHD を発症した症例#1、症例#2 の肝臓サンプル、肺 GVHD (B0) を発症した症例#2、症例#3 の肺で明らかな線維化を認めた (Figure 11)。

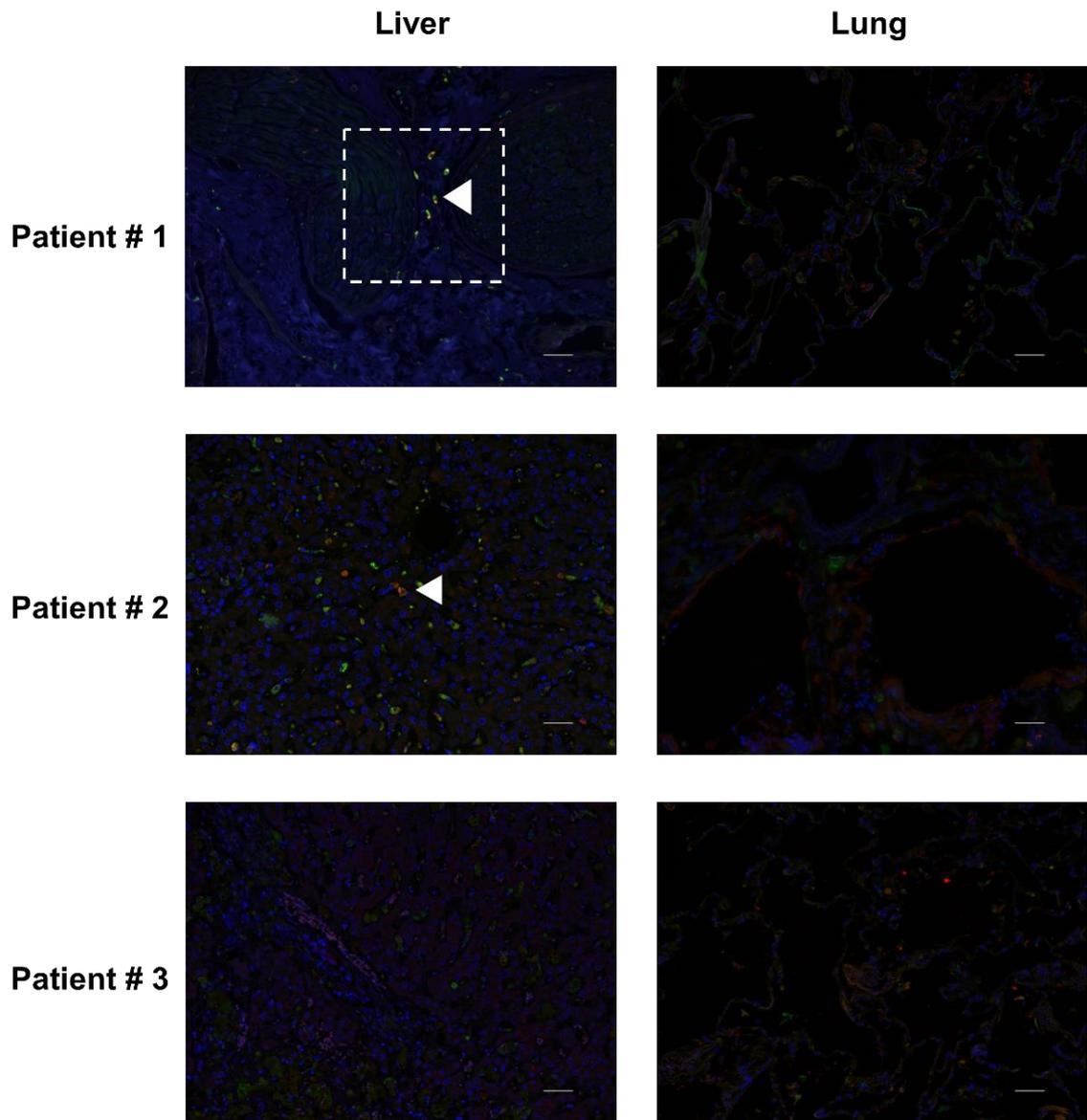
Figure 11. 各症例・臓器における線維化



2.4.8 剖検症例の蛍光免疫染色：WFA⁺-M2BP 陽性細胞の発現

3 症例の肝臓・肺における WFA⁺-M2BP 陽性細胞の発現をレクチンである WFA と抗 M2BP 抗体を用いて蛍光免疫染色で評価を行った。WFA、抗 M2BP 抗体、DAPI がすべて陽性の細胞を WFA⁺-M2BP 陽性細胞と定義した。WFA⁺-M2BP 陽性細胞（白矢印）は肝臓 GVHD を発症した症例#1、症例#2 の肝臓のみで発現し、肺では GVHD の発症にかかわらず発現を認めなかった (Figure 12)。また、症例#1 (治療不応性肝臓 GVHD) の肝臓では、症例#2 (治療により部分改善した肝臓 GVHD) と比較して WFA⁺-M2BP 陽性細胞数の有意な増加が認められた ($P < 0.001$) (Figure 13)。最後に、WFA⁺-M2BP 陽性細胞の細胞サブセットを同定するため、免疫染色を追加したところ、WFA⁺-M2BP 陽性細胞はマクロファージのマーカーである CD68 を発現していることが示された (Figure 14)。

Figure 12. 各症例・臓器における WFA⁺-M2BP 陽性細胞の発現



Scale bars, 50 μ m

WFA: green

M2BP: red

DAPI: blue

Figure 13. 各症例の肝臓における WFA⁺-M2BP 陽性細胞発現数

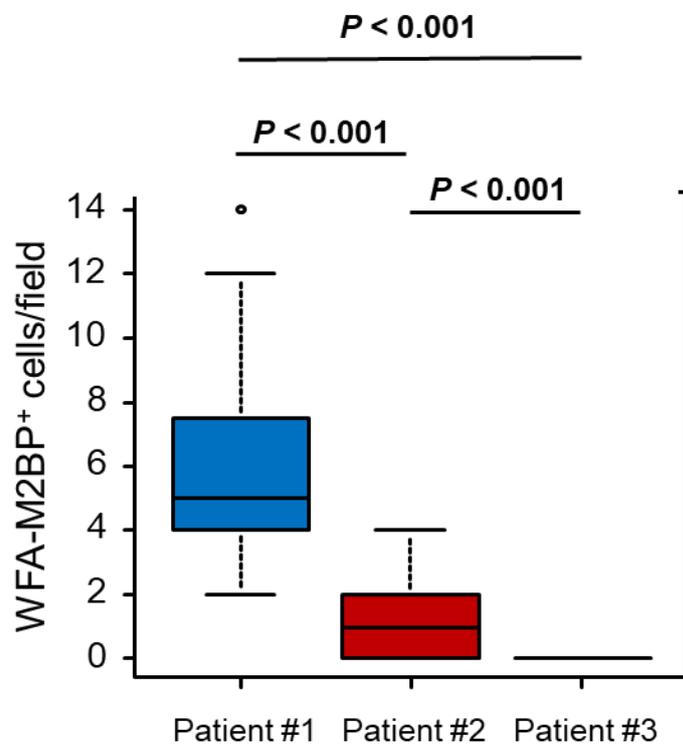
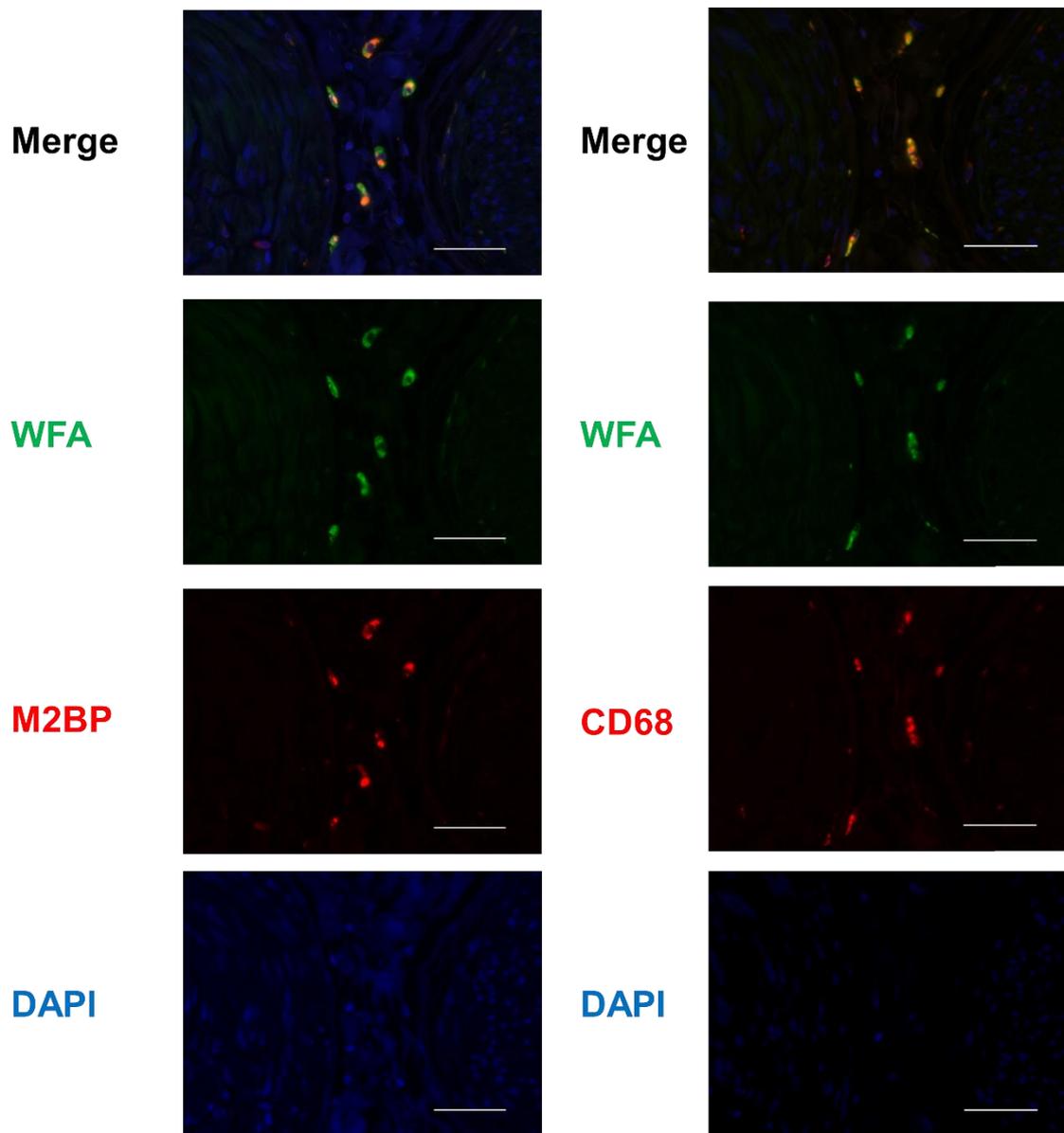


Figure 14. WFA⁺-M2BP 陽性細胞と CD68 の発現

症例#1 の肝臓切片 (左列と右列は連続切片)



Scale bars, 50 μ m

WFA: green

M2BP: red (左列)

CD68: red (右列)

DAPI: blue

3. 考察

本研究では、移植後後期（移植後 180 日、356 日）の M2BPGi 値が移植後非再発死亡の強力な予測因子であることを示した。さらに、M2BPGi 値は肝臓の慢性 GVHD と強い相関を認め、WFA⁺-M2BP 陽性マクロファージが肝臓 GVHD の進展や活動性に寄与している可能性が示唆された。

慢性 GVHD は非再発死亡の原因となるだけでなく、患者の QOL を著しく低下させる同種造血幹細胞移植後の重要な合併症であるが、現時点で臨床現場で使用可能なバイオマーカーは存在しない²⁷。これまでの GVHD バイオマーカー研究は、タンパク質や核酸をターゲットとして研究が行われてきた²⁸。一方で、タンパク質・核酸に次ぐ第 3 の生命鎖とされる糖鎖は、バイオマーカー研究において魅力的なターゲットであると考えられる。近年、レクチンマイクロアレイに代表される糖鎖解析技術が大幅に進歩したことで、いくつかの分野では糖鎖を用いたバイオマーカーの実用化がすでに実現している。例えば、AFP-L3 は肝細胞癌の糖鎖を利用したバイオマーカーとしてすでに FDA に承認され、広く臨床で用いられている²⁹。M2BPGi はこの新規糖鎖解析技術を用いて開発された、C 型肝炎ウイルスによる肝硬変の線維化マーカーである。M2BP は GAL3 のリガンドとして知られる、分泌型糖タンパクであり、生体内ではドーナツ状の多量体構造をとる。1 分子当たり 7 本の N-グリカン(アスパラギン結合型糖鎖)が M2BP 表面に存在するため、多量体表面には多数の糖鎖を有することになり、レクチンと強い親和性を示す。肝臓の線維化に伴い、これらの糖鎖構造が変化することが知られており、WFA はこの糖鎖構造変化を検出するレクチンとして、レクチンマイクロアレイを用いて同定された。本研究結果は、M2BPGi の慢性 GVHD バイオマーカーとしての実用化だけでなく、新たな GVHD バイオマーカー開発において糖鎖解析技術は非常に有望なツールである可能性も示唆している。

慢性 GVHD は多臓器に渡って多彩な症状を呈し、客観的な評価が難しいことが知られており、予後予測だけでなく、障害臓器別のバイオマーカーの開発が期待されている²⁷。本研究では、M2BPGi 値が肝臓 GVHD の重症度と非常に高い相関を認め、WFA⁺-M2BP 陽性マクロファージが、活動性の高い GVHD を有する肝臓でより多く発現していることを明らかにした。WFA⁺-M2BP は活性化された肝星細胞（肝臓内の線維芽細胞）より産出され、マクロファージを直接活性化することで線維化を促進するとする報告もあり²³、WFA⁺-M2BP 陽性マクロファージが肝臓の慢性 GVHD の進展に寄与していることが示唆された。一方で、マクロファージは肺の GVHD においても重要な役割を担っていると考えられているが³⁰、M2BPGi 値と肺 GVHD との間に有意な相関は認めず、肺組織においても WFA⁺-M2BP 陽性マクロファージの発現は認めなかった。WFA⁺-M2BP 陽性マクロファージが肝臓に特異的に発現する機序については今後さらなる研究が必要であると考えられるが、慢性 GVHD の進展において、各組織により異なる機序を有している可能性があり、これらは将来的な臓器毎のバイオマーカーや治療法の開発のターゲットになり得る重要な知見であると考えられる。

M2BPGi と移植後非再発死亡との相関が示された一方で、GAL3 と M2BP では相関は明らかにならなかった。バイオマーカーとして使用する場合、血中に十分量が分泌されるかどうか、ネガティブコントロールなどと比較して検出できるだけの差が十分に大きいかどうかなども重要であり、GAL3 はこれらの条件を満たすことができなかつたと考えられる。また、M2BP は比較的 AUC も高く、validation cohort では統計学的な有意差までは認めなかったが、移植後非再発死亡と相関する傾向を認め、同様の結果が最近シアトルのグループより報告された³¹。M2BP だけでもある程度の非再発死亡予測能を有するが、糖鎖の変化を組み合わせることでさらに予測能が向上していると考えられる。

今回我々の解析では移植後 180 日や 365 日といった移植後期の M2BPGi 値が強力な移植後再発死亡予測因子であることを示したが、比較的早期である移植後 90 日の M2BPGi 値は、非再発死亡との有意な相関を認めなかった。M2BPGi 値は肝臓の線維化だけでなく、急性肝障害でもいくらか上昇することがすでに報告されている^{32,33}。移植後後期の肝障害は大部分が慢性 GVHD によるものであるのに対し、移植後早期では、急性 GVHD やウイルス性肝炎、薬剤性肝障害、肝中心静脈閉塞症／類洞閉塞症候群(VOD/SOS)など多岐にわたる原因で急性肝障害が引き起こされるため、M2BPGi 値の上昇と非再発死亡との関連は、検体採取のタイミングによって異なる可能性が考えられる。

本研究にはいくつかのリミテーションが存在することを付け加えなければならない。1 点目として、本研究では 3 つのコホートを用いて M2BPGi 値の予後予測能を評価したものの、すべて自治医科大学附属さいたま医療センター単施設での検体であり、独立した多施設多数例での検証の必要性が上げられる。また、移植後の決まったタイミングで採取された検体を用いたが、慢性 GVHD 発症時や治療後などのタイミングによる予後予測能や、M2BPGi 値の変化についても検証が必要である。最後に、M2BPGi 値は肝臓 GVHD に特異的なバイオマーカーであることが示唆されたため、障害臓器などで分類した慢性 GVHD の表現型ごとの評価も必要かもしれない。

4. おわりに

同種造血幹細胞後の重要な合併症である慢性 GVHD の治療成績向上を目指すにあたり、マクロファージの活性化とタンパク質表面の糖鎖構造の変化に着目し、将来的な慢性 GVHD のバイオマーカー開発・実用化に寄与する重要な知見を示すことができた。特に、各臓器の慢性 GVHD では異なる臓器障害メカニズムを有し、糖鎖解析技術を用いてこの差異を検出することができる可能性を示したことは、バイオマーカー開発のみならず、慢性 GVHD の治療開発においても意義のある重要な結果であると考えられる。本研究を皮切りに、これまでのタンパク質や核酸をターゲットとしたバイオマーカー開発とは異なる、糖鎖をターゲットにした研究が、さらなる慢性 GVHD の治療成績向上につながっていくことを期待する。

5. 文献

1. Ferrara JL, Levine JE, Reddy P, Holler E. Graft-versus-host disease. *Lancet* 2009; **373**(9674): 1550-1561.
2. Flowers ME, Parker PM, Johnston LJ, Matos AV, Storer B, Bensinger WI, Storb R, Appelbaum FR, Forman SJ, Blume KG, Martin PJ. Comparison of chronic graft-versus-host disease after transplantation of peripheral blood stem cells versus bone marrow in allogeneic recipients: long-term follow-up of a randomized trial. *Blood* 2002; **100**(2): 415-419.
3. Anasetti C, Logan BR, Lee SJ, Waller EK, Weisdorf DJ, Wingard JR, Cutler CS, Westervelt P, Woolfrey A, Couban S, Ehninger G, Johnston L, Maziarz RT, Pulsipher MA, Porter DL, Mineishi S, McCarty JM, Khan SP, Anderlini P, Bensinger WI, Leitman SF, Rowley SD, Bredeson C, Carter SL, Horowitz MM, Confer DL. Peripheral-blood stem cells versus bone marrow from unrelated donors. *The New England journal of medicine* 2012; **367**(16): 1487-1496.
4. Lee SJ, Kim HT, Ho VT, Cutler C, Alyea EP, Soiffer RJ, Antin JH. Quality of life associated with acute and chronic graft-versus-host disease. *Bone marrow transplantation* 2006; **38**(4): 305-310.
5. Kurosawa S, Oshima K, Yamaguchi T, Yanagisawa A, Fukuda T, Kanamori H, Mori T, Takahashi S, Kondo T, Kohno A, Miyamura K, Umemoto Y, Teshima T, Taniguchi S, Yamashita T, Inamoto Y, Kanda Y, Okamoto S, Atsuta Y. Quality of Life after Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation According to Affected Organ and Severity of Chronic Graft-versus-Host Disease. *Biology of blood and marrow transplantation* 2017; **23**(10): 1749-1758.
6. Yeshurun M, Weisdorf D, Rowe JM, Tallman MS, Zhang MJ, Wang HL, Saber W, de Lima M, Sandmaier BM, Uy G, Kamble RT, Cairo MS, Cooper BW, Cahn JY, Ganguly S, Camitta B, Verdonck LF, Dandoy C, Diaz MA, Savani BN, George B, Liesveld J, McGuirk J, Byrne M, Grunwald MR, Drobyski WR, Pulsipher MA, Abdel-Azim H, Prestidge T, Wieduwilt MJ, Martino R, Norkin M, Beitinjaneh A, Seo S, Nishihori T, Wirk B, Frangoul H, Bashey A, Mori S, Marks DI, Bachanova V. The impact of the graft-versus-leukemia effect on survival in acute lymphoblastic leukemia. *Blood advances* 2019; **3**(4): 670-680.
7. Akahoshi Y, Igarashi A, Fukuda T, Uchida N, Tanaka M, Ozawa Y, Kanda Y, Onizuka M, Ichinohe T, Tanaka J, Atsuta Y, Kako S, Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Working Group of the Japan Society for Hematopoietic Cell T. Impact of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect based on minimal residual disease in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *British journal of haematology* 2020; **190**(1): 84-92.
8. MacMillan ML, Robin M, Harris AC, DeFor TE, Martin PJ, Alousi A, Ho VT, Bolanos-Meade J, Ferrara JL, Jones R, Arora M, Blazar BR, Holtan SG, Jacobsohn D, Pasquini M, Socie G, Antin JH, Levine JE, Weisdorf DJ. A refined risk score for acute graft-versus-host disease that predicts response to initial therapy, survival, and transplant-related mortality. *Biology of blood and*

marrow transplantation 2015; **21**(4): 761-767.

9. Levine JE, Braun TM, Harris AC, Holler E, Taylor A, Miller H, Magenau J, Weisdorf DJ, Ho VT, Bolanos-Meade J, Alousi AM, Ferrara JL, Blood, Marrow Transplant Clinical Trials N. A prognostic score for acute graft-versus-host disease based on biomarkers: a multicentre study. *The Lancet Haematology* 2015; **2**(1): e21-29.

10. Major-Monfried H, Renteria AS, Pawarode A, Reddy P, Ayuk F, Holler E, Efebera YA, Hogan WJ, Wolfl M, Qayed M, Hexner EO, Wudhikarn K, Ordemann R, Young R, Shah J, Hartwell MJ, Chaudhry MS, Aziz M, Etra A, Yanik GA, Kroger N, Weber D, Chen YB, Nakamura R, Rosler W, Kitko CL, Harris AC, Pulsipher M, Reshef R, Kowalyk S, Morales G, Torres I, Ozbek U, Ferrara JLM, Levine JE. MAGIC biomarkers predict long-term outcomes for steroid-resistant acute GVHD. *Blood* 2018; **131**(25): 2846-2855.

11. Srinagesh HK, Ozbek U, Kapoor U, Ayuk F, Aziz M, Ben-David K, Choe HK, DeFilipp Z, Etra A, Grupp SA, Hartwell MJ, Hexner EO, Hogan WJ, Karol AB, Kasikis S, Kitko CL, Kowalyk S, Lin JY, Major-Monfried H, Mielke S, Merli P, Morales G, Ordemann R, Pulsipher MA, Qayed M, Reddy P, Reshef R, Rosler W, Sandhu KS, Schechter T, Shah J, Sigel K, Weber D, Wolfl M, Wudhikarn K, Young R, Levine JE, Ferrara JLM. The MAGIC algorithm probability is a validated response biomarker of treatment of acute graft-versus-host disease. *Blood advances* 2019; **3**(23): 4034-4042.

12. Mitchell SA, Jacobsohn D, Thormann Powers KE, Carpenter PA, Flowers ME, Cowen EW, Schubert M, Turner ML, Lee SJ, Martin P, Bishop MR, Baird K, Bolanos-Meade J, Boyd K, Fall-Dickson JM, Gerber LH, Guadagnini JP, Imanguli M, Krumlauf MC, Lawley L, Li L, Reeve BB, Clayton JA, Vogelsang GB, Pavletic SZ. A multicenter pilot evaluation of the National Institutes of Health chronic graft-versus-host disease (cGVHD) therapeutic response measures: feasibility, interrater reliability, and minimum detectable change. *Biology of blood and marrow transplantation* 2011; **17**(11): 1619-1629.

13. Lee SJ. Classification systems for chronic graft-versus-host disease. *Blood* 2017; **129**(1): 30-37.

14. Jagasia MH, Greinix HT, Arora M, Williams KM, Wolff D, Cowen EW, Palmer J, Weisdorf D, Treister NS, Cheng GS, Kerr H, Stratton P, Duarte RF, McDonald GB, Inamoto Y, Vigorito A, Arai S, Datile MB, Jacobsohn D, Heller T, Kitko CL, Mitchell SA, Martin PJ, Shulman H, Wu RS, Cutler CS, Vogelsang GB, Lee SJ, Pavletic SZ, Flowers ME. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: I. The 2014 Diagnosis and Staging Working Group report. *Biology of blood and marrow transplantation* 2015; **21**(3): 389-401 e381.

15. MacDonald KP, Hill GR, Blazar BR. Chronic graft-versus-host disease: biological insights from preclinical and clinical studies. *Blood* 2017; **129**(1): 13-21.

16. Li LC, Li J, Gao J. Functions of galectin-3 and its role in fibrotic diseases. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2014; **351**(2): 336-343.
17. Hellstern S, Sasaki T, Fauser C, Lustig A, Timpl R, Engel J. Functional studies on recombinant domains of Mac-2-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 2002; **277**(18): 15690-15696.
18. Kuno A, Ikehara Y, Tanaka Y, Ito K, Matsuda A, Sekiya S, Hige S, Sakamoto M, Kage M, Mizokami M, Narimatsu H. A serum "sweet-doughnut" protein facilitates fibrosis evaluation and therapy assessment in patients with viral hepatitis. *Scientific reports* 2013; **3**: 1065.
19. Toyoshima S, Akiyama Y, Nakano K, Tonomura A, Osawa T. A phytomitogen from *Wistaria floribunda* seeds and its interaction with human peripheral lymphocytes. *Biochemistry* 1971; **10**(24): 4457-4463.
20. Baker DA, Sugii S, Kabat EA, Ratcliffe RM, Hermentin P, Lemieux RU. Immunochemical studies on the combining sites of Forssman hapten reactive hemagglutinins from *Dolichos biflorus*, *Helix pomatia*, and *Wistaria floribunda*. *Biochemistry* 1983; **22**(11): 2741-2750.
21. Haji-Ghassemi O, Gilbert M, Spence J, Schur MJ, Parker MJ, Jenkins ML, Burke JE, van Faassen H, Young NM, Evans SV. Molecular Basis for Recognition of the Cancer Glycobiomarker, LacdiNAc (GalNAc[beta1-->4]GlcNAc), by *Wisteria floribunda* Agglutinin. *The Journal of biological chemistry* 2016; **291**(46): 24085-24095.
22. Narimatsu H. Development of M2BPGi: a novel fibrosis serum glyco-biomarker for chronic hepatitis/cirrhosis diagnostics. *Expert review of proteomics* 2015; **12**(6): 683-693.
23. Bekki Y, Yoshizumi T, Shimoda S, Itoh S, Harimoto N, Ikegami T, Kuno A, Narimatsu H, Shirabe K, Maehara Y. Hepatic stellate cells secreting WFA(+)-M2BP: Its role in biological interactions with Kupffer cells. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2017; **32**(7): 1387-1393.
24. Kanda Y. Investigation of the freely available easy-to-use software 'EZR' for medical statistics. *Bone marrow transplantation* 2013; **48**(3): 452-458.
25. Sorrow ML, Maris MB, Storb R, Baron F, Sandmaier BM, Maloney DG, Storer B. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood* 2005; **106**(8): 2912-2919.
26. Giralt S, Ballen K, Rizzo D, Bacigalupo A, Horowitz M, Pasquini M, Sandmaier B. Reduced-intensity conditioning regimen workshop: defining the dose spectrum. Report of a workshop convened by the center for international blood and marrow transplant research. *Biology of blood and marrow transplantation* 2009; **15**(3): 367-369.
27. Paczesny S, Hakim FT, Pidala J, Cooke KR, Lathrop J, Griffith LM, Hansen J, Jagasia M, Miklos D, Pavletic S, Parkman R, Russek-Cohen E, Flowers ME, Lee S, Martin P, Vogelsang G, Walton M, Schultz KR. National Institutes of Health Consensus Development Project on Criteria

for Clinical Trials in Chronic Graft-versus-Host Disease: III. The 2014 Biomarker Working Group Report. *Biology of blood and marrow transplantation* 2015; **21**(5): 780-792.

28. Paczesny S. Biomarkers for posttransplantation outcomes. *Blood* 2018; **131**(20): 2193-2204.

29. Wong RJ, Ahmed A, Gish RG. Elevated alpha-fetoprotein: differential diagnosis - hepatocellular carcinoma and other disorders. *Clin Liver Dis* 2015; **19**(2): 309-323.

30. Du J, Paz K, Flynn R, Vulic A, Robinson TM, Lineburg KE, Alexander KA, Meng J, Roy S, Panoskaltis-Mortari A, Loschi M, Hill GR, Serody JS, Maillard I, Miklos D, Koreth J, Cutler CS, Antin JH, Ritz J, MacDonald KP, Schacker TW, Luznik L, Blazar BR. Pirfenidone ameliorates murine chronic GVHD through inhibition of macrophage infiltration and TGF-beta production. *Blood* 2017; **129**(18): 2570-2580.

31. Inamoto Y, Martin PJ, Lee SJ, Momin AA, Tabellini L, Onstad LE, Pidala J, Flowers MED, Lawler RL, Katayama H, Hanash S, Hansen JA. Dickkopf-related protein 3 is a novel biomarker for chronic GVHD after allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood advances* 2020; **4**(11): 2409-2417.

32. Morio K, Imamura M, Daijo K, Teraoka Y, Honda F, Nakamura Y, Kobayashi T, Nakahara T, Nagaoki Y, Kawaoka T, Tsuge M, Hiramatsu A, Kawakami Y, Aikata H, Nelson Hayes C, Tsugawa K, Yokozaki M, Chayama K. Wisteria floribunda agglutinin positive Mac-2-binding protein level increases in patients with acute liver injury. *Journal of gastroenterology* 2017; **52**(12): 1252-1257.

33. Yamada N, Katano T, Hirata Y, Okada N, Sanada Y, Ihara Y, Urahashi T, Ushijima K, Karasawa T, Takahashi M, Mizuta K. Serum Mac-2 binding protein glycosylation isomer predicts the activation of hepatic stellate cells after liver transplantation. *Journal of gastroenterology and hepatology* 2019; **34**(2): 418-424.