

平成 26 年 4 月 30 日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591005

研究課題名(和文) 肝癌腫瘍マーカー PIVKA-II の産生機序に関する網羅的解析

研究課題名(英文) Comprehensive analyses for the mechanism of PIVKA-II production from hepatocellular carcinoma

研究代表者

村田 一素 (Murata, Kazumoto)

独立行政法人国立国際医療研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：40345971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000 円、(間接経費) 1,230,000 円

研究成果の概要(和文)：我々は今までの研究から肝癌が転移しやすい型に変化する際に細胞内骨格の障害が起こるため、ビタミンKの細胞内取り込み障害が起こり、プロトロンビンの代わりにPIVKA-IIが産生されることを報告してきた。今回の研究では、さらに低分化化することによって肝特異的蛋白が産生されない表現型に変化し、肝癌が増大しても PIVKA-II が産生されないことを肝癌細胞株を用いて証明した。さらに切除前の造影超音波による血流による分化度診断と切除肝癌の PIVKA-II 染色が関連することを確認した。これらのことから、PIVKA-II は単なる肝癌腫瘍マーカーではなく、肝癌の生物学的マーカーになり得ると考えられた。

研究成果の概要(英文)：PIVKA-II is generally used in hepatocellular carcinoma (HCC) clinic, but precise mechanism of PIVKA-II production is still unknown. We have demonstrated that PIVKA-II was produced when HCC became metastatic phenotype (epithelial mesenchymal transition: EMT) that was impaired uptake of vitamin K by actin rearrangement. In this project, we demonstrated that further EMT caused impairment of liver specific protein synthesis, resulting in impairment of PIVKA-II production even though HCC still grew. Moreover, findings in enhanced ultrasonography well-correlated with PIVKA-II production in surgically resected HCC. Taken together, PIVKA-II could be an biological marker for HCC as well as a tumor marker of HCC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝癌 腫瘍マーカー PIVKA-II

1. 研究開始当初の背景

PIVKA-II は 1984 年に初めて肝癌患者血清で有意に増加し、肝癌の腫瘍マーカーとして有用であることが報告された (Liebman H, et al. N Eng J Med 1984)。PIVKA-II は肝臓で生合成されるプロトロンビン前駆体であり、ビタミン K が γ -カルボキシラゼの補助因子として作用することによって生理活性をもつ正常プロトロンビンが生合成される。そのため肝癌のない正常人でもビタミン K の摂取不足時やビタミン K 利用障害を来すワルファリンの投与時には、血清 PIVKA-II 濃度は高値を示す。しかし、肝癌の PIVKA-II 産生機序については、肝癌細胞内の 1) ビタミン K 依存性 γ -カルボキシラゼ活性の低下、2) プロトロンビン前駆体の過剰生産、3) ビタミン K 濃度低下、など諸説が提唱されているが一定の見解は得られていない。一方、血清 PIVKA-II が高値の肝癌患者にビタミン K 製剤を投与すると肝癌の縮小効果の有無に関わらず、血清 PIVKA-II は低下し、ほとんどの例で正常化することは臨床でよく見られる現象である (Mizuta T, et al. Cancer 2006)。このことは肝癌細胞におけるビタミン K の取り込み障害を示唆する。一方、ビタミン K は脂溶性ビタミンであるため肝細胞内には clathrin-mediated endocytosis によって取り込まれ、その際にアクチン線維の重合が重要な働きをする (Smythe E, et al. J cell Sci 2006)。さらに血清 PIVKA-II が高値の肝癌患者では、低値の患者に比較し血管浸潤・転移・再発が多いとの報告されている (Koike Y, et al. Cancer 2001)。また、肝癌は再発・転移時に細胞接着因子である E-cadherin が低下し、epithelial mesenchymal transition (EMT) を来す過程でアクチン線維の断裂が生じる (Savagner P. BioEssays 2001)。これら

のことから、申請者は肝癌が EMT の過程で PIVKA-II を産生する phenotype に変化すると仮定し、肝癌細胞に TPA や TGF- β を用いて化学的に EMT を誘導することによって PIVKA-II を産生する phenotype に変化することを証明した (Murata K, et al. Int J Oncol 2008, 2009)。さらに、肝癌の EMT は虚血によっても PIVKA-II を産生する phenotype に変化することを証明した (Murata K, et al. Int J Oncol 2010)。これらのことは、肝癌の化学療法中に転移しやすい phenotype に変化することや大きな肝癌 (血流供給の相対的欠如が起こりやすい) で PIVKA-II が産生されるといった臨床所見に一致する。しかし、肝癌症例においても、ビタミン K 製剤を投与にて PIVKA-II が低下しない例や肝癌の経過中に PIVKA-II が上昇しない症例など例外も認められる。一般に癌細胞は低酸素かつ低栄養下では、生存のために蛋白合成といったエネルギー消費過程を省く (O_2 conformance) 性質を持ち、その機序として mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路の低リン酸化が考えられている (Wouters BG, et al. Nat Rev Cancer 2008)。プロトロンビン前駆体は、肝で合成される蛋白であることを考慮すると TAE (肝癌は虚血と低栄養に曝される) により肝癌が肉腫様変化により肝細胞機能を失う、または O_2 conformance によりエネルギー消費の高い蛋白合成能が mTOR 経路を介して停止するため、プロトロンビン前駆体の産生低下を来し、そのことによって PIVKA-II 産生が低下するものと考えた。

2. 研究の目的

申請者は PIVKA-II (protein induced by vitamin K absence or agonist factor II) の肝癌における産生機序として、肝癌が epithelial mesenchymal transition (EMT) の過程において細胞内骨格の変化 (特にアクチンの断裂) が引き起こさ

れ、ビタミンKの取り込みが不良となり、プロトロンビン前駆体のカルボキシ化が抑制されるためであることを報告してきた。申請者の提唱する産生機序仮説は、臨床における様々な事象を証明することが可能であるが、すべての症例に当てはまる訳ではなく、他機序の存在も想定される。本研究においては他機序の解明および臨床検体を用いた経時的観察によるPIVKA-II産生を中心とした肝癌の生活史に迫ることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 肝癌細胞株を用いて化学物質および虚血にてEMTを誘導し、そのPIVKA-II産生能およびビタミンKによるPIVKA-II低下作用の有無を確認するとともに、EMTを引き起こした細胞からDNAを抽出し、 γ -カルボキシラーゼ活性に関する遺伝子を検討する。
- (2) 肝細胞株に対し、低酸素・低栄養で培養した場合のPIVKA-II産生能、アルブミン産生能、mTOR活性を検討する。また、肝癌摘出標本を用いてPIVKA-II産生とHep Par 1(尿素回路の酵素を認識)との関係を検討する。
- (3) 肝癌患者において腫瘍生検を経時的に行い、肝癌におけるEMTとPIVKA-II産生についての検討を免疫組織染色にて行う。また、肝癌組織よりDNAを抽出し、 γ -カルボキシラーゼ活性に関する遺伝子を検討する。

4. 研究成果

肝癌がEMTの過程により細胞内骨格であるアクチンの重合障害によってビタミンKが取り込まれなくなることによりプロトロンビン前駆体が活性化プロトロンビンに変換されないため、PIVKA-IIが産生できないphenotypeになることは前回の研究にて明らかにした。今回の研究では、虚血および栄養障害といった強い刺激に肝癌細胞株を曝すことによって、さらにEMTが進み、低分化化することによって肝特異蛋白を産生できないphenotypeに変化するため、PIVKA-IIも産生されなくなることについてin vitroの系で証明した。さらに、造影エコーを用いた肝癌血流シグナルの相違から肝癌の分化度を想定し、同肝癌の切除標本にてPIVKA-IIを染色すると高分化癌ではPIVKA-IIは産生されず、中分化に変化することによって産生

され、さらに低分化化すると産生されないことが判明し、肝癌の血流診断からもin vitro実験と同様の所見が得られた。本件については、現在、論文化を行っている。

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)

1. Ito K, Higami K, Masaki N, Sugiyama M, Mukaide M, Saito H, Aoki Y, Sato Y, Imamura M, **Murata K**, Nomura H, Hige S, Adachi H, Hino K, Yatsushashi H, Orito E, Kani S, Tanaka Y, Mizokami M. Th rs8099917 polymorphism, determined by a suitable genotyping method, is a better predictor for response to pegylated interferon- α /ribavirin therapy in Japanese patients than other SNPs associated with IL28B. *J Clin Microbiol* 2011;49: 1853-1860. (doi: 10.1128/JCM.02139-10)
2. Suzuki H, **Murata K**, Gotoh T, Kusano M, Okano H, Oyamada T, Yasuda Y, Imamura M, Kudo M, Mizokami M, Sakamoto A. Phenotype-dependent production of des- γ -carboxy prothrombin in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2011;46:1219-29. (doi: 10.1007/s00535-011-0432-8)
3. Sugiyama M, Inui A, Shin-I T, Komatsu H, Mukaide M, Masaki N, **Murata K**, Ito K, Nakanishi M, Fujisawa T, Mizokami M. Easy-to-use phylogenetic analysis system for hepatitis B virus infection. *Hepatol Res* 2011;41:936-45. (doi: 10.1111/j.1872-034X.2011.00859.x)
4. Furui Y, Hoshi Y, **Murata K**, Ito K, Suzuki K, Uchida S, Satake M, Mizokami M, Tadokoro K. Prevalence of amino acid mutation in hepatitis C virus core region among Japanese volunteer blood donors. *J Med Virol* 2011;83:1924-1929. (doi: 10.1002/jmv.22216)
5. Zeissig S, **Murata K**, Sweet L, Publicover J, Hu Z, Kaser A, Bosse E, Hussain MM, Balschun K, Rocken C, Arlt A, Gunther R, Hampe J, Schreiber S, Baron JL, Moody DB, Liang TJ, Blumberg RS. Hepatitis B virus-induced lipid alterations contribute to natural killer T cell-dependent protective immunity.

- Nat Med* 2012;18:1060-1068. (doi: 10.1038/nm.2811)
6. Saito H, Ito K, Sugiyama M, Matsui T, Aoki Y, Imamura M, **Murata K**, Masaki N, Nomura H, Adachi H, Hige S, Enomoto N, Sakamoto N, Kurosaki M, Mizokami M, Watanabe S. Factors responsible for the discrepancy between IL28B polymorphism prediction and the viral response to peginterferon plus ribavirin therapy in Japanese chronic hepatitis C patients. *Hepatol Res* 2012;42:958-965. (doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01013.x)
 7. Sugiyama M, Kimura T, Naito S, Mukaide M, Shinauchi T, Ueno M, Ito K, **Murata K**, Mizokami M. Development of specific and quantitative real-time detection PCR and immunoassays for λ 3-interferon. *Hepatol Res* 2012;42:1089-1099. (doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01032.x)
 8. Ito K, Kuno A, Ikehara Y, Sugiyama M, Saito H, Aoki Y, Matsui T, Imamura M, Korenaga M, **Murata K**, Masaki N, Tanaka Y, Hige S, Izumi N, Kurosaki M, Nishiguchi S, Sakamoto M, Kage M, Narimatsu H, Mizokami M. LecT-Hepa, a glyco-marker derived from multiple lectins, as a predictor of liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 2012;56:1448-1456. (doi: 10.1002/hep.25815)
 9. Yoshio S, Kanto T, Kuroda S, Matsubara T, Higashitani K, Kakita N, Ishida H, Hiramatsu N, Nagano H, Sugiyama M, **Murata K**, Fukuhara T, Matsuura Y, Hayashi N, Mizokami M, Takehara T. Human BDCA3(+) dendritic cells are a potent producer of IFN- λ in response to hepatitis C virus. *Hepatology* 2013;57:1705-1715. (doi: 10.1002/hep.26182)
 10. **村田一素**. *In vitro* の系からみた PIVKA-II と脈管侵襲. *肝胆膵* 2013;66:909-915.
 11. **村田一素**. PIVKA-II の産生機序と癌転移能との関連. ウイルス肝炎・肝癌の病態と治療 (第 29 回犬山シンポジウム), p107-p113, 2013, 犬山シンポジウム記録刊行会.

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. **村田一素**. PIVKA-II の産生機序とその臨床的意義. 第 47 回日本肝癌研究会, 静岡, 2011.7.29.
2. **村田一素**. PIVKA-II の産生機序とその臨

床的意義. 第 48 回日本肝臓学会総会, 金沢, 2012.6.7.

3. **村田一素**. ソラフェニブ治療でなぜ PIVKA-II が上昇するのか? 第 6 回日本肝がん分子標的治療研究会, 神奈川, 2012.6.16
4. **村田一素**. 肝癌における PIVKA-II 産生機序とその臨床的意義. 第 29 回犬山シンポジウム, 岐阜, 2012.8.2
5. **村田一素**, 杉山真也, 溝上雅史. IL28B 遺伝子多型による治療効果予測不一致に寄与する宿主因子の検討. 第 16 回日本肝臓学会大会. 神戸, 2012.10.10
6. **Murata K**, Sugiyama M, Kimura T, Yoshio S, Kanto T, Aoki Y, Hiramane S, Matsui T, Korenaga M, Imamura M, Masaki N, Mizokami M. Interferon- λ 3 determines response to pegylated interferon/ribavirin therapy in chronic hepatitis C. The 63th annual meeting of the American association for the study of liver diseases. Nov 9-13, 2012. Boston
7. **村田一素**. PIVKA-II は、脈管侵襲のバイオマーカーになりうるか?. 第 16 回日本肝臓学会大会. 神戸, 2012.10.10
8. **Murata K**, Sugiyama M, Kimura T, Yoshio S, Kanto T, Asano M, Aoki Y, Takeda T, Korenaga M, Imamura M, Masaki N, Mizokami M. Different amount of IFN- λ 3 determines the outcome of Peg-IFN/RBV therapy in HCV patients. The 10th JSH Single Topic Conference "Hepatitis C: Best Practice Based on Science". Nov 21-22, 2012 in Tokyo

〔学会発表〕(計 8 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

村田一素 (MURATA Kazumoto)
国立国際医療研究センター
肝炎・免疫研究センター・室長
研究者番号：40345971

(2)研究分担者

今村雅俊 (IMAMURA Masatoshi)
国立国際医療研究センター
国府台病院・医長
研究者番号：60445129