

機関番号：82610

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：平成 20 年度～平成 22 年度

課題番号：20590795

研究課題名（和文）肝癌腫瘍マーカー PIVKA-II の産生機序の解明

研究課題名（英文）Mechanism of PIVKA-II production in hepatocellular carcinoma

研究代表者 村田一素

（第四肝疾患室医長、Kazumoto Murata）

研究者番号：40345971

研究成果の概要（和文）：肝癌腫瘍マーカー PIVKA-II は、肝癌が積極的に産生するのではなく、epithelial mesenchymal transition (EMT) の過程においてアクチン線維が断裂することにより脂溶性ビタミンであるビタミン K の取り込みが不良となり（アクチンは脂質を細胞に取り込む際の clathrin-mediated endocytosis に重要な働きをする）、プロトロンビン前駆体から活性型プロトロンビンへの変換が不良となるため、PIVKA-II が産生されることを証明した。また、EMT の強力な誘因因子である虚血にても肝癌は PIVKA-II を産生する phenotype に変化することも証明した。腫瘍の急激な増大あるいは抗癌剤治療・肝動脈塞栓術など虚血と栄養障害を来す病態の場合は、さらなる phenotype の変化が起こり mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway を介して肝特異的蛋白産生が低下する。その場合、PIVKA-II の産生は逆に減少あるいは消失することになることを証明した。これらのことより、PIVKA-II は単なる肝癌腫瘍マーカーではなく、肝癌の phenotype を示すマーカーとして臨床的に有用であると論じた。

研究成果の概要（英文）：Protein induced by vitamin K absence or antagonist II (PIVKA-II) is an established tumor marker for hepatocellular carcinoma (HCC), but precise mechanism of its production is unknown. We recently demonstrated that cytoskeletal rearrangement during phenotypic changes involved in epithelial mesenchymal transition (EMT) plays a crucial role in PIVKA-II production through impairment of vitamin K uptake. In addition, we demonstrated that hypoxic stimulation induced HCC cells to produce PIVKA-II in the same way. We also demonstrated that further phenotypic changes by hypoxia with malnutrition attenuated protein synthesis in HCC cells through mTOR pathway, resulting in decrease of PIVKA-II production. Thus, our serial findings indicate that PIVKA-II could be a phenotypic marker of HCC as well as a tumor marker.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
平成 21 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
平成 22 年度	300,000	90,000	390,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医師薬学

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、PIVKA-II、EMT、転移

## 1. 研究開始当初の背景

本邦における肝臓癌 (HCC) による死亡者数は年間 約 3 万 4000 人であり、男性では肺癌、胃癌に次ぐ第 3 位を占めている。一方、慢性肝疾患のうち肝硬変に至った患者の HCC 年間発症率は約 8% であり、今後も増加する傾向にある。最近、手術療法とともに肝動脈塞栓療法・ラジオ波焼灼術など治療法の技術的な向上から予後はかなり改善されつつあるが、未だ進行癌に対する治療・再発など解決しなければならない問題は多々ある。

プロトロンビンは、肝で産生されるビタミン K 依存性血液凝固因子であるが、PIVKA-II はビタミン K の欠乏時またはビタミン K 拮抗剤であるワーファリンの投与により出現する非活性型プロトロンビンである。活性型プロトロンビンに含まれる $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸のカルボキシ基が欠如したプロトロンビンという意味で Des- $\gamma$ -carboxy prothrombin (DCP)とも称され、ビタミン K 欠乏のマーカーとして開発された。一方、1984 年に PIVKA-II が HCC で高頻度に出現することが報告され、以降 HCC の有用な腫瘍マーカーとして臨床で応用されている。しかし、HCC による PIVKA-II の産生機序は明らかにされていない。

最近、血清 PIVKA-II が異常高値を示す HCC の症例を経験したが、その病理学的検討にて癌細胞の一部に vimentin 陽性細胞を認めた。

Vimentin は間葉系細胞に特有な中間型フィラメントであり、一般に HCC など上皮系細胞では陰性を示す。ところが、癌細胞は上皮由来であるが転移など細胞が移動する場合には、一時的に間葉系細胞様に変化する。この現象は epithelial-mesenchymal transition (EMT)として知られており、癌の転移や浸潤との関連が報告されている。そこで、この症例から EMT が引き起こされた

HCC が PIVKA-II を産生するのではないかと仮説に至った。臨床的にも PIVKA-II 高値を示す HCC では転移、血管浸潤、再発の頻度が高いとの報告があり、この仮説を支持するものである。一方、血清 PIVKA-II が異常高値を示す HCC 患者に対してビタミン K2 製剤を投与すると抗腫瘍効果は顕著でないにも関わらず、血清 PIVKA-II が速やかに減少することが報告されている。さらに PIVKA-II はビタミン K 欠乏時やワーファリン投与時など良性疾患でも出現することから癌特有の物質ではない。これらのことから癌そのものが PIVKA-II を産生するというよりも、ビタミン K の肝臓細胞への取り込み障害が生じていると予想される。一方、EMT により細胞骨格の変化 (特にアクチン) が起きることが報告されている。ビタミン K などの脂溶性ビタミンは、low density lipoprotein (LDL) レセプターを介した clathrin-mediated endocytosis にて細胞内に取り込まれ、その時にアクチンが必要であることからアクチンが障害された場合、これらの物質は細胞内に取り込めなくなる。以上より、EMT を引き起こした HCC がアクチンを中心とした細胞骨格に変化を来し、ビタミン K の細胞内への取り込み障害を来した結果、PIVKA-II を産生するようになるとの仮説をたてた。

## 2. 研究の目的

今回の研究は、上記仮説を証明し、かつ EMT を引き起こす要因の検討を行う。さらに大きい HCC で PIVKA-II が高いと報告されていることから、肝臓が増殖する際、細胞は hypoxia にさらされ、そのことが原因で PIVKA-II が産生されるとの仮説を立て、hypoxia と PIVKA-II の関連についても検討する。

### 3. 研究の方法

血清 PIVKA-II 高値例の HCC 患者の切除標本を用いて PIVKA-II、vimentin (間葉系細胞のマーカー)、E-cadherin (上皮性細胞のマーカー) の免疫組織化学染色を行い、臨床例における EMT と PIVKA-II の関連を検討する。これらが仮説どおりに E-cadherin 陰性 HCC または vimentin 陽性 HCC が PIVKA-II を産生していれば培養細胞を用いてその確認をする。最近、肝細胞癌株に phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA) を投与することにより EMT が引き起こされるとの報告がなされたため、それを用いて TPA により EMT が誘導された肝細胞癌株が PIVKA-II を産生することを enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)、免疫組織化学染色、ウェスタン ブロットイングを用いて証明する。また、EMT を起こしている肝細胞癌株がビタミン K の取り込み障害を引き起こすことを 3,3'-dioctadecylindocarbocyanin (DiI)-LDL を用いて顕微鏡下に観察する (標識されたビタミン K は市販されていないため DiI-LDL にて代用する)。また、DiI-LDL の取り込み不良な細胞が PIVKA-II を産生することを蛍光免疫組織化学染色を同時に行い証明する。また、免疫組織化学染色にてアクチン・フィラメントと PIVKA-II 産生の関係を検討する。

### 4. 研究成果

肝癌腫瘍マーカー PIVKA-II は、肝癌が積極的に産生するのではなく、epithelial mesenchymal transition (EMT) の過程においてアクチン線維が断裂することにより脂溶性ビタミンであるビタミン K の取り込みが不良となり (アクチンは脂質を細胞に取り込む際の clathrin-mediated endocytosis に重要な働きをする)、プロトロンビン前駆体から活性型プロトロンビンへの変換が不良

となるため、PIVKA-II が産生されることを証明した。また、EMT の強力な誘因因子である虚血にても肝癌は PIVKA-II を産生する phenotype に変化することも証明した。腫瘍の急激な増大あるいは抗癌剤治療・肝動脈塞栓術など虚血と栄養障害を来す病態の場合は、さらなる phenotype の変化が起こり mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway を介して肝特異的蛋白産生が低下する。そのため、今度は PIVKA-II の産生は減少あるいは消失することになることを証明した。これらのことより、PIVKA-II は単なる肝癌腫瘍マーカーではなく、肝癌の phenotype を示すマーカーとして臨床的に有用であると論じた。

### 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 10 件)

1. Murata K, et al. Splenectomy improves liver function in patients with liver cirrhosis. *Hepato-Gastroenterology* 2008;55:1407-1411.
2. Yamamoto N, Murata K, et al. Protective role of interleukin-18 against Fas-mediated liver injury. *Int J Mol Med* 2008;22:43-48.
3. Murata K, Sakamoto A. Impairment of clathrin-mediated endocytosis via cytoskeletal change by epithelial to fibroblastoid conversion in HepG2 cells: A possible mechanism of des- $\gamma$ -carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol* 2008;33:1149-1155.
4. Atsushi S, Murata K, Suzuki H, et al. Immunohistochemical observation of Co-expression of E- and N-cadherin in rat. *Acta Histochem Cytoc* 2008;41:143-147.
5. 村田一素, 他. Letter to the Editor. *日本消化器病学会雑誌* 2009;106 (4): 98.
6. Suzuki H, Murata K, Sakamoto A. Fulminant sepsis due to

anaerobic bacterial infection in immuno-compromised state. Leg Med (Tokyo) 2009;11:237-240.

7. **Murata K**, et al. Primary malignant lymphoma of the ileum presenting as intussusception. Intern Med 2009;48:1559-1560.
8. **Murata K**, **Suzuki H**, et al. Cytoskeletal changes during epithelial-to-fibroblastoid conversion as a crucial mechanism of des- $\gamma$ -carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma. Int J Oncol 2009;35:1005-1014.
9. **Murata K**, **Suzuki H**, et al. Hypoxia-induced des- $\gamma$ -carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma. Int J Oncol 2010;36:161-170.
10. Ito K, Murata K, et al. Th rs8099917 polymorphism, determined by a suitable genotyping method, is a better predictor for response to pegylated interferon- $\alpha$ /ribavirin therapy in Japanese patients than other SNPs associated with IL28B. J Clin Microbiol (*in press*)

[学会発表] (計 6 件)

**第 44 回日本肝臓学会総会** 平成 20 年 6 月 5 日 松山  
Epithelial-mesenchymal transition 誘導肝細胞株における PIVKA-II の産生機序  
自治医科大学・地域医療学センター  
**村田 一素**、坂本敦司

**The 59th Annual Meeting of the American Association  
for the Study of Liver Diseases**  
(Oct 31-Nov 4, 2008, San Francisco)

A possible mechanism of des- $\gamma$ -carboxyprothrombin production in hepatocellular carcinoma.

**Murata K**, Atsushi Sakamoto  
Center for Community Medicine, Jichi Medical  
University, Shimotsuke, Japan

**第 45 回日本肝臓学会総会** 平成 21 年 6 月 4 日 神戸  
Epithelial-to-fibroblastoid conversion 誘導肝細胞癌株  
における PIVKA-II の産生機序  
自治医科大学・地域医療学センター、鈴鹿中央総合病院  
**村田一素**、岡野宏、坂本敦司

**The 60th annual meeting of the American association**

**for the study of liver diseases**  
(Oct 30 – Nov 3, 2009 in Boston)

Hypoxia-induced des- $\gamma$ -carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma\_

**Murata K**, Center for Community Medicine, Jichi Medical University, Shimotsuke, Japan\_

**第 28 回犬山シンポジウム** (平成 22 年 8 月 6 日 犬山)  
肝臓における phenotype 依存性 PIVKA-II の産生  
独立行政法人国立国際医療研究センター国府台病院  
**村田一素**

**The 4th annual meeting of International Liver Cancer Association (ILCA)** Sep 10 – Sep 12, 2010 in Montreal  
Phenotype-dependent production of des- $\gamma$ -carboxy prothrombin in hepatocellular carcinoma.

**Murata K**, The Research Center for Hepatitis and Immunology, National Center for Global Health and Medicine

[図書] (計 2 件)

1. **村田一素**、他. 急性肝障害の診断：急性肝障害時の生化学・血液検査、ウイルスマーカーの選択と解釈. 臨床消化器内科 2010;25 (11):1441-1445.
2. **村田一素**、他：肝胆膵薬物治療学の進歩—この 30 年—；強力ミノファージェンシー・グリチロン. 肝胆膵 2010;61 (6): 1016-1023.

[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（国際医療研究センター国府台病院・第四肝疾患室医長）

研究者番号：40345971

(2) 研究分担者

鈴木秀人（自治医科大学地域医療学センター・助教）

研究者番号：00508749

(3) 連携研究者 なし