

# 新規の再発・増殖因子としての異常プロトロンビン蛋白の分子機構とビタミンKの肝癌再発抑制の臨床研究

白鳥 康史、白羽 英則、鈴木真由美、  
藤川 達也、上田 直樹、高岡 伸行、坂口 孝作

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 消化器・肝臓・感染症内科

肝細胞癌は、予後不良な悪性腫瘍であり、年間約3万人が死亡している。ラジオ波焼灼療法を始めとした局所治療法の進歩により、根治可能な症例は増加している。しかしながら、肝癌の約8割はC型肝炎ウイルス、1-2割はB型肝炎ウイルスによる慢性肝疾患をその背景としており、再発の問題は避けられない。肝硬変においても年率約8%の肝細胞癌の発癌があるが、治療後の再発率は更に高率である。

肝細胞癌の中でも PIVKA-II (protein induced by vitamin K absence or antagonist) 陽性の肝細胞癌は、比較的予後が不良であることが知られている<sup>1,2)</sup>。PIVKA-II 陽性の肝細胞癌の特徴として単発で比較的サイズが大きく<sup>3)</sup>、門脈腫瘍浸潤をきたしやすい<sup>4)</sup>という特徴がある。PIVKA-II は1998年に Lieberman らにより肝細胞癌に特異的に発現することが報告され<sup>5)</sup>、現在では PIVKA-II は、約50%の肝細胞癌症例で陽性となることが知られ alpha-fetoprotein とは相関性がなく独立した腫瘍マーカーとして認知され、広く臨床現場で用いられている。

PIVKA-II とは、凝固因子であるプロトロンビン (II 因子) の未完成のものが何らかの原因で分泌されたものである。プロトロンビンは N 末端に41個のアミノ酸から構成される Gla ドメインが存在し、その凝固活性に重要な働きをしている。Gla ドメインには10箇所のグルタミン酸残基 (Glu) が存在する。翻訳後修飾として Glu は通常 gamma-glutamyl carboxylase (GGCX)

の働きにより vitamin K 存在の元で、 $\gamma$ -carboxy-glutamic acid (Gla) に変換される。Gla ドメインに存在する10個の Glu がすべて Gla に変換されることによりプロトロンビンは凝固活性を持つ。PIVKA-II では、Gla ドメインの Glu のうち1-9個が Gla に変換されずに残存している<sup>6)</sup>。

PIVKA-II およびプロトロンビン前駆体からプロトロンビンへの変換に重要な働きをしていると考えられる vitamin K は、1934年に Dam らにより発見された脂溶性ビタミンであり、主に3種類の K1、K2、K3が存在する。Vitamin K は植物で合成、もしくは腸内細菌を含む細菌で合成される。Vitamin K は、骨代謝に深く関与し、既に骨粗鬆症の治療薬として承認され、臨床現場でも使用されている。Vitamin K はプロトロンビンを含む凝固因子の活性化にも前述のように重要な働きを持ち、他に VII、IX、X 因子の活性化を促進する。

## 検討結果

PIVKA-II 陽性の癌では、増殖が亢進していることが考えられる。当該研究者らは PIVKA-II の産生が、細胞の増殖に関与しているとの仮説の元に、PIVKA-II の肝細胞癌増殖に対する影響についてまず初めに検討を行った。

## PIVKA-II の精製

PIVKA-II は肝細胞癌 cell line の PLC/PRF/5 に warfarin sodium を負荷することにより産生を亢進させた。PLC/PRF/5 は、6-Gla および8-Gla の

産生が比較的多かった。更に warfarin sodium の付加により、10-Gla の正常プロトロンビンはほとんど産生されなくなった。PIVKA-II は、warfarin sodium 付加 PLC/PRF/5 の培養上清より、プロトロンビン抗体を用いたアフィニティクロマトグラフィーにより分離、精製した。精製した PIVKA-II は、HPLC により正常プロトロンビンの混入が無いことを確認した上で以下の検討に使用した。

#### PIVKA-II の細胞表面受容体への結合

PIVKA-II およびプロトロンビンは、その肝細胞増殖因子に特徴的なクリングルドメイン<sup>7)</sup>を2つ保有していることより、肝細胞装飾因子受容体 Met への結合を予測した。PIVKA-II の細胞表面受容体 Met への結合は、PIVKA-II 産生性肝細胞癌細胞 Hep3B および PIVKA-II 非産生性肝細胞癌細胞 SK-Hep1 を用いて確認した。Far-Western blot analysis および、co-immunoprecipitation の結果、PIVKA-II は Hep3B および SK-Hep1 の双方の細胞において細胞表面受容体の Met に結合することが確認された。

#### PIVKA-II の細胞増殖亢進作用

次に実際に PIVKA-II が細胞増殖を亢進させるかどうかについて、Hep3B および SK-Hep1 を用いて検討した。細胞増殖能の評価は、<sup>3</sup>H-thymidine の incorporation により行った。これら2つの細胞は、PIVKA-II の刺激により、1.5倍 (Hep3B)、2.1倍 (SK-Hep1) の細胞増殖亢進作用が認められた。しかしながら、プロトロンビンでの刺激では、細胞増殖亢進作用は認められなかった。

#### PIVKA-II 増殖シグナルの検討 (図1)

PIVKA-II が癌細胞の増殖を亢進させることは確認できたので、更にその分子生物学的機構を解明するために、増殖シグナル伝達経路の検討を行った。通常細胞表面の増殖因子受容体はリガンド刺激を受けると、自己リン酸化により下流にシ

グナルを伝達する。PIVKA-II の刺激により、Met の自己リン酸化が誘導されることを、抗 Met 抗体で免疫沈降を行い更に抗リン酸化タイロシン抗体を用いた Western blot を行い確認した。更に Met から下流のシグナルについて、erk-MAPK系、myc系、JAK-STAT系の3つのシグナル伝達経路について Western blot による検討を行った。その結果、erk-MAPK系、myc系は、PIVKA-II の刺激により全く影響を受けないことが判明した。また、PIVKA-II の刺激は、JAK1-STAT3系を活性化していた。更に、erk-MAPK系、JAK-STAT系については、ルシフェラーゼジーンレポーターアッセイによるより詳細な検討を行った。この検討においても erk-MAPK系の活性化は PIVKA-II によって誘導されないことを確認した。JAK-STAT系については、そのシグナルが、約1.8倍亢進していることを確認した。

#### RNA 干渉およびシグナル伝達分子阻害剤によるシグナル伝達経路の確定 (図2)

これまでの検討により PIVKA-II は Met-JAK-STAT系を介してシグナルを伝達することが確認された。更に PIVKA-II のシグナル伝達経路を確定するために RNA 干渉により、Hep3B の Met および STAT を siRNA によりノックダウンした細胞を用いて検討を行った。Met のノックダウンにより、STAT3 活性は約70%抑制された。また、細胞増殖能は、約50%抑制された。STAT3 のノックダウンでは、STAT3活性は約80%抑制され、細胞増殖能は約67%抑制された。

#### Vitamin K の肝細胞癌増殖に対する効果

Vitamin K は Hep3B の PIVKA-II 産生を85%以上抑制し、細胞増殖能を約50%低下させた。Vitamin K の投与は HCC の PIVKA-II 産生量を低下させ、その結果 HCC の増殖を抑制した。

#### PIVKA-II の血管内皮細胞に対する効果

PIVKA-II はこれまでの検討により、肝細胞

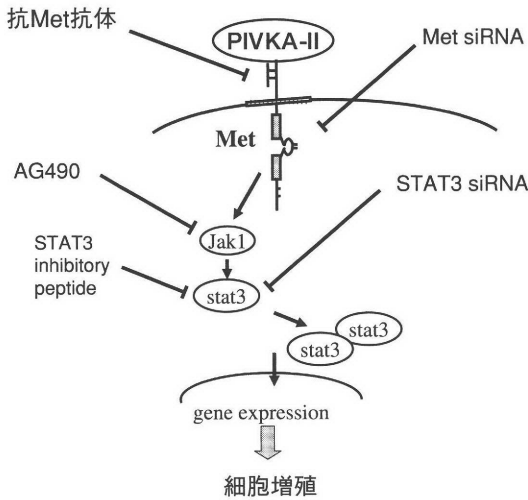


図1 PIVKA-II シグナル伝達経路

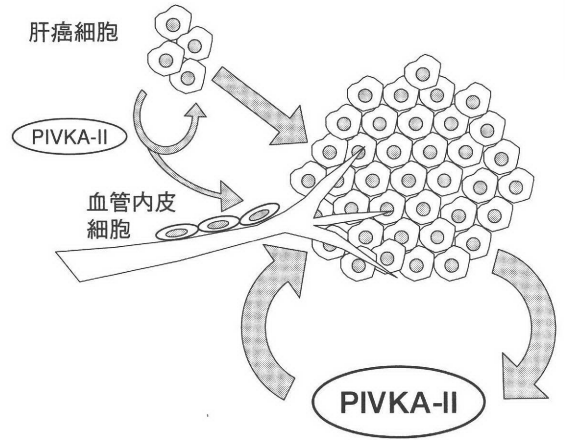


図2 PIVKA-II autocrine/paracrine loop と肝細胞癌増殖

癌細胞増殖亢進作用が認められた。この細胞増殖亢進作用が、他の細胞についても同様に起こり、肝細胞癌の進展に寄与しているかどうかの検討を行った。肝細胞癌は、血流に富む腫瘍であることが知られており、血管造影検査などでも hypervascular な腫瘍として描出される。PIVKA-II の血管新生に対する効果、特に血管内皮細胞の細胞増殖作用についての検討を行った。血管内皮細胞としては、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) を用いて細胞増殖能および細胞移動能の検討を行った。PIVKA-II は細胞 HUVEC の細胞増殖能を約1.5倍、細胞移動能を約2倍亢進させた。

以上の検討により、PIVKA-II は、肝細胞癌の進展に直接および間接的に関与していることが基礎的検討により証明された (図2)。また、vitamin K は肝細胞癌の進展に寄与する PIVKA-II の肝細胞癌細胞からの産生を抑制する<sup>8)</sup>ため、その進展を阻止する可能性が高い。Vitamin K は、既に骨粗鬆症の治療薬として臨床現場で使用されており、人体への影響、長期投与例における安全性などが確認されている。現在は、vitamin K 投与による肝細胞癌発癌抑制の臨床研究を行ってい

る。肝細胞癌治療例において、vitamin K 45mg/日を投与し、その再発率を確認するランダム化スタディであるが、その臨床症例での効果についても期待している。

#### 文献

- 1) M. Sakon, M. Monden, M. Gotoh, T. Kanai, K. Umeshita, Y. Nakano, T. Mori, M. Sakurai, K. Wakasa, Relationship between pathologic prognostic factors and abnormal levels of des-gamma-carboxy prothrombin and alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma, *Am J Surg*163 (1992) 251-256.
- 2) T. Suehiro, K. Sugimachi, T. Matsumata, H. Itasaka, A. Taketomi, T. Maeda, Protein induced by vitamin K absence or antagonist II as a prognostic marker in hepatocellular carcinoma. Comparison with alpha-fetoprotein, *Cancer* 73 (1994) 2464-2471.
- 3) K. Hamamura, Y. Shiratori, S. Shiina, M. Imamura, S. Obi, S. Sato, H. Yoshida, M. Omata, Unique clinical characteristics of patients with hepatocellular carcinoma who present with high plasma des-gamma-carboxy prothrombin and low serum alpha-fetoprotein, *Cancer* 88 (2000) 1557-1564.
- 4) Y. Koike, Y. Shiratori, S. Sato, S. Obi, T. Teratani, M. Imamura, H. Yoshida, S. Shiina, M. Omata,

Des-gamma-carboxy prothrombin as a useful predisposing factor for the development of portal venous invasion in patients with hepatocellular carcinoma: a prospective analysis of 227 patients, Cancer 91 (2001) 561-569.

- 5) H.A. Liebman, B.C. Furie, M.J. Tong, R.A. Blanchard, K.J. Lo, S.D. Lee, M.S. Coleman, B. Furie, Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma, N Engl J Med 310 (1984) 1427-1431.
- 6) S. Uehara, K. Gotoh, H. Handa, K. Honjo, A. Hirayama, Process of carboxylation of glutamic acid residues in the gla domain of human des-

gamma-carboxyprothrombin, Clin Chim Acta 289 (1999) 33-44.

- 7) T. Nakamura, T. Nishizawa, M. Hagiya, T. Seki, M. Shimonishi, A. Sugimura, K. Tashiro, S. Shimizu, Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor, Nature 342 (1989) 440-443.
- 8) M. Furukawa, T. Nakanishi, H. Okuda, S. Ishida, H. Obata, Changes of plasma des-gamma-carboxy prothrombin levels in patients with hepatocellular carcinoma in response to vitamin K, Cancer 69 (1992) 31-38.

# ソロンは、内因性プロスタグランジンを増加させます。

## SOLON

Refreshing!!



【効能・効果】  
下記疾患の胃粘膜病変(びらん、出血、発赤、浮腫)の改善  
急性胃炎、慢性胃炎の急性増悪期

胃潰瘍

【用法・用量】

通常、成人にはソファルコンとして1回100mgを1日3回経口投与する。  
なお、年齢、症状により適宜増減する。

【使用上の注意】

1.副作用 総症例22,583例中20例(0.09%)23件の副作用が認められた。  
その主なものは便秘7件、口渇2件、胸やけ2件であった。〔再審査終了時及び「錠50」承認時〕

(1)重大な副作用 肝機能障害、貧血(いずれも頻度不明):AST(GOT)、ALT(GPT)、γ-GTP、Al-Pの上昇等を伴う肝機能障害や貧血があらわれることがあるので、観察を十分に行い、異常が認められた場合には投与を中止するなど、適切な処置を行うこと。

(2)その他の副作用

過敏症等	0.1%未満	頻度不明
消化器	便秘、口渇、胸やけ	頻度不明
発疹		発疹

注)このような症状があらわれた場合には投与を中止すること。

2.妊婦、産婦、授乳婦等への投与

(1)妊婦又は妊娠している可能性のある婦人には治療上の有益性が危険性を上まわると判断される場合のみ投与すること。〔妊娠中の投与に関する安全性は確立していない。〕

(2)授乳中の婦人には本剤投与中は授乳を避けさせること。〔動物実験(ラット)で乳汁中へ移行することが報告されている。〕

3.小児等への投与 小児等に対する安全性は確立していない(使用経験が少ない)。

4.適用上の注意

薬剤交付時:PTP包装の薬剤はPTPシートから取り出して服用するよう指導すること。(PTPシートの剥離により、硬い鋭角部が食道粘膜へ刺入し、更には穿孔をおこして縦隔肺炎等の重篤な合併症を併発することが報告されている)

※詳細は製品添付文書をご参照下さい。

薬価基準収載

粘膜保護・組織修復 胃炎・胃潰瘍治療剤

**ソロン**® 錠50  
細粒100  
細粒20%

ソファルコン製剤

2005.04  
SL90B52J



発売【資料請求先】  
大正富山医薬品株式会社  
〒170-8635 東京都豊島区高田3-25-1



製造販売  
大正製薬株式会社  
〒170-8633 東京都豊島区高田3-24-1