



66

PIVKA-IX, PIVKA-Xに対するモノクローナル抗体の作製と、
肝細胞癌におけるPIVKAの産生機序

研究課題番号 02670325

平成3年度科学研究費補助金(一般研究C)
研究成果報告書

平成4年2月



研究代表者 奥田博明

(東京女子医科大学医学部講師)

平成3年度科学研究費補助金一般研究C
研究成果報告書

(1) 「研究課題」

PIVKA-IX、PIVKA-Xに対するモノクローナル抗体の作製と肝細胞癌におけるPIVKA
の産生機序

「課題番号」

02670325

(2) 「標題」

平成3年度一般研究C

平成4年2月

(3) 「研究代表者」

奥田博明 (東京女子医科大学医学部講師)

(4) 「研究分担者」

飯塚文瑛 (東京女子医科大学医学部助手)

小幡 裕 (東京女子医科大学医学部教授)

(5) 「研究経費」

平成2年度 900千円

平成3年度 900千円

合計 1800千円

(6) 「研究発表」

ア. 学会誌等

- 1) Furukawa M, Nakanishi T, Okuda H, Furukawa R, Iizuka B, Obata H, Suzuki K. Abnormal vitamin K-dependent proteins produced by human hepatoma cells in culture. Mechanism of formation and sensitivity to vitamin K. *Hepatology* 8:1296, 1988. (9-10月)
- 2) Furukawa M, Okuda H, Nakanishi T, Furukawa R, Iizuka B, Obata H. Warfarin inhibits synthesis of vitamin K dependent proteins in human hepatoma cells in culture. *Hepatology* 8:1442, 1988. (9-10月)
- 3) 古川みどり, 中西敏己, 奥田博明, 小幡 裕. 肝細胞癌におけるPIVKA-IIのvitamin K感受性に関する検討. *日消誌* 85:2583-2589, 1988. (12月, 別添)
- 4) 奥田博明. 肝細胞癌における異常プロトロンビンPIVKA-IIの産生に関する臨床的, 実験的研究. 昭和62・63年度科学研究費補助金一般研究(C) 研究成果報告書P. 1-29 1989. (2月)
- 5) 中西敏己, 古川みどり, 奥田博明, 飯塚文瑛, 小幡 裕. ヒト肝癌培養細胞におけるPIVKA-IIの減少からみたメナキノン-4とメナキノン-7の効果の比較. *ビタミン* 63:253-257, 1989. (5-6月)
- 6) Okuda H, Nakanishi T, Furukawa M, Iizuka B, Furukawa R, Obata H, Suzuki K. Production of abnormal vitamin K-dependent proteins by hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 10:673, 1989. (10月)
- 7) 奥田博明, 中西敏己, 古川みどり, 小幡 裕, 鈴木宏治. 肝細胞癌の腫瘍マーカーとしての PIVKA₂. *衛生検査* 38:1654-1660, 1989. (12月)
- 8) 古川みどり, 中西敏己, 奥田博明, 小幡 裕, 鈴木宏治, 西岡淳二. 肝細胞癌における各種PIVKA の産生に関する検討. *肝臓* 31:110, 1990. (1月, 別添)
- 9) 古川みどり, 中西敏己, 奥田博明, 小幡 裕. 肝細胞癌におけるPIVKA-II. *日本臨床内科医会誌* 4:177-178, 1990. (5-6月, 別添)
- 10) 福里利夫, 町並隆生, 富松昌彦, 奥田博明, 小幡 裕, 大久保昭行. 異常プロトロンビン(PIVKA-II) の肝癌細胞内局在の臨床的及び病理学的意義. *肝臓* 31:714 1990. (6月, 別添)
- 11) 福里利夫, 町並隆生, 富松昌彦, 奥田博明, 小幡 裕, 大久保昭行. 異常プロトロンビン(PIVKA-II) の免疫組織化学的同定は肝細胞癌のマーカーとなり得るか. 第10回腫瘍マーカー研究会記録: 88-89, 1990. (7月, 別添)
- 12) Fukusato T, Machinami R, Tomimatsu M, Okuda H, Iizuka B, Obata H, Ohokubo A. Des- γ -carboxy prothrombin in tissues of hepatocellular carcinoma : Immunohistochemical and immunoelectron microscopical studies. *Hepatology* 12:404, 1990. (8月)
- 13) 奥田博明, 中西敏己, 古川みどり, 飯塚文瑛, 小幡 裕. 肝細胞癌における異常プロトロンビン(PIVKA-II) の臨床的意義と基礎的知見. *東京女子医科大学雑誌* 60: 978-979, 1990. (9月)

- 14) 奥田博明. 肝細胞癌における腫瘍マーカー PIVKA_s の研究 —臨床的意義と産生機序—. 東京女子医科大学雑誌61:286-287, 1991. (3月)
- 15) Okuda H, Nakanishi T, Furukawa M, Yamagata H, Obaña H. Abnormal prothrombin(PIVKA-II) and hepatocellular carcinoma. Trop Gastroenterol 12:59-66, 1991. (3-4月, 別添)
- 16) Okuda H, Nakanishi T, Furukawa M, Furukawa R, Iizuka B, Obata H, Suzuki K. Production of abnormal vitamin K-dependent proteins by hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol Hepatol.6:297, 1991. (5-6月)
- 17) Okuda H, Nakanishi T, Furukawa M, Obata H. Vitamin K dependent proteins and hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol Hepatol.6:392-399, 1991 (7-8月, 別添)
- 18) 奥田博明. 肝細胞癌における腫瘍マーカーPIVKA-IIの臨床と基礎. 東京女子医科大学雑誌 61:948, 1991. (9月)
- 19) Okuda H, Nakanishi T, Yoshida K, Furukawa M, Yamagata H, Ajima T, Tomimatsu M, Iizuka B, Obata H. Sensitivity of Des- γ -carboxy prothrombin to vitamin K in hepatocellular carcinoma. Hepatology 14:106A, 1991 (10月)
- 20) Furukawa M, Nakanishi T, Okuda H, Ishida S, Obata H. Changes of plasma des- γ -carboxy prothrombin levels in patients with hepatocellular carcinoma in response to vitamin K. Cancer 69:31-38, 1992. (1月, 別添)
- 21) 山縣英晴, 吉田錦吾, 中西敏己, 奥田博明, 飯塚文瑛, 小幡 裕. ノードマウスを利用したPIVKA-IIの薬剤感受性の検討. 肝臓 (発表予定)
- 22) 五十嵐裕章, 山縣英晴, 奥田博明, 小幡 裕. PIVKA-IIの肝癌診断と治療における有用性の検討とその産生機序の解明. 第19回大和証券ヘルス財団調査研究助成金研究成果報告書. (発表予定)

イ. 口頭発表

- 1) 奥田博明, 古川みどり, 中西敏己, 古川隆二, 飯塚文瑛, 小幡 裕. 各種ヒト肝癌培養細胞株におけるPIVKA の産生に関する検討. 第24回日本肝臓学会総会. 1988年7月8日
- 2) Nakanishi T, Furukawa M, Furukawa T, Okuda H, Iizuka B, Obata H. Biosynthesis and secretion of prothrombin by human hepatoma cells in culture. International Congress of Biochemistry 1988年7月11日
- 3) 古川みどり, 中西敏己, 古川隆二, 奥田博明, 飯塚文瑛, 小幡 裕. ヒト肝癌細胞株におけるプロトロンビンの生成と分泌. 第47回日本癌学会総会. 1988年9月22日
- 4) 古川みどり, 中西敏己, 古川隆二, 奥田博明, 飯塚文瑛, 小幡 裕, 鈴木宏治. 肝細胞癌における各種PIVKA の産生に関する検討. 第30回日本消化器病学会大会. 1988年10月20日
- 5) Furukawa M, Okuda H, Nakanishi T, Furukawa R, Iizuka B, Obata H. Warfarin inhibits synthesis of vitamin K dependent proteins in human hepatoma cells in culture. International Association for the Study of the Liver. 1988年11月4日

- 6) Okuda H. Abnormal prothrombin and hepatocellular carcinoma. Invited Lecture. Mount Sinai Medical Center. New York, U. S. A. 1988年11月10日
- 7) 奥田博明, 中西敏己, 古川みどり, 古川隆二, 飯塚文瑛, 小幡 裕, 鈴木宏治. 肝細胞癌における各種PIVKA の産生に関する検討. 第25回日本肝癌研究会. 1989年5月31日
- 8) 古川みどり, 中西敏己, 奥田博明, 飯塚文瑛, 小幡 裕. 肝癌組織におけるF-II, PIVKA-IIの産生. 第25回日本肝癌研究会. 1989年5月31日
- 9) 富松昌彦, 吉田錦吾, 古川みどり, 中西敏己, 奥田博明, 小幡 裕, 山本雅一, 高崎 健, 小林誠一郎, 中野雅行. PIVKA-IIと肝細胞癌組織像. 第25回日本肝癌研究会. 1989年5月31日
- 10) 奥田博明. 肝細胞癌とPIVKA-II. 第25回日本肝臓学会総会. 第1回日本肝臓学会研究奨励賞記念講演. 1989年6月2日
- 11) 古川みどり, 中西敏己, 古川隆二, 奥田博明, 飯塚文瑛, 小幡 裕, 鈴木宏治. Warfarinによるvitamin K dependent proteinsの産生と分泌の抑制機序に関する検討. 第25回日本肝臓学会総会. 1989年6月2日
- 12) 古川みどり, 中西敏己, 奥田博明, 飯塚文瑛, 小幡 裕. Vitamin K のプロトロンビンの産生と分泌に対する影響. 日本ビタミン学会第41回大会. 1989年6月8日
- 13) 中西敏己, 古川みどり, 奥田博明, 飯塚文瑛, 小幡 裕. ヒト肝癌培養細胞を用いたビタミンK 同族体の活性比較. 日本ビタミン学会第41回大会. 1989年6月8日
- 14) 奥田博明. 肝癌培養細胞におけるPIVKA-II産生の検討. 第1回PIVKA-II全国研究会 1989年8月4日
- 15) 奥田博明, 小幡 裕. 肝細胞癌におけるPIVKA-IIの臨床的意義と基礎的知見. 第31回日本消化器病学会大会. 1989年10月6日
- 16) 富松昌彦, 吉田錦吾, 中西敏己, 奥田博明, 小幡 裕, 林 俊之, 山本雅一, 高崎 健, 小林誠一郎, 中野雅行. 肝細胞癌とPIVKA-IIの関連に関する病理組織学的検討 第31回日本消化器病学会大会. 1989年10月6日
- 17) 古川隆二, 中西敏己, 古川みどり, 奥田博明, 飯塚文瑛, 小幡 裕. 肝細胞癌におけるPIVKA-II産生機序に関する検討. 第36回日本臨床病理学会総会1989年10月6日
- 18) 中西敏己, 古川隆二, 吉田錦吾, 古川みどり, 奥田博明, 飯塚文瑛, 小幡 裕. 肝細胞癌におけるPIVKA-IIとプロトロンビンの産生に関する検討. 第36回日本臨床病理学会総会1989年10月6日
- 19) 古川みどり, 中西敏己, 奥田博明, 飯塚文瑛, 小幡 裕. 肝細胞癌におけるPIVKA-II. 第3回日本臨床内科医学会. 1989年10月22日
- 20) 中西敏己, 古川みどり, 奥田博明, 飯塚文瑛, 小幡 裕. 肝細胞癌の診断におけるプロトロンビン抗原/ コリンエステラーゼ比の有用性. 第48回日本癌学会総会. 1989年10月23日
- 21) 古川みどり, 長原 光, 酒井かがり, 安部康二, 中西敏己, 奥田博明, 小幡 裕. 肝細胞癌におけるPIVKA-IIの産生機序に関する検討. 第48回日本癌学会総会. 1989年10月24日

- 22) Okuda H. Abnormal prothrombin and hepatocellular carcinoma. Invited Lecture. Tulane Medical Center. New Orleans, U. S. A. 1989年11月 2日
- 23) 奥田博明. 肝細胞癌の腫瘍マーカーとしての PIVKA₂. ラジオ短波放送講演. 臨床検査アワー. 1989年12月27日
- 24) 奥田博明. PIVKA-IIの基礎と臨床. 特別講演. 多摩地区内科領域エイテストモノP-II (PIVKA-II) 協同臨床研究検討会. 1990年 1月30日
- 25) Okuda H, Nakanishi T, Furukawa M, Furukawa R, Iizuka B, Obata H, Suzuki K. Production of abnormal vitamin K-dependent proteins by hepatocellular carcinoma. 7th Biennial Asian Pacific Association for the Study of the Liver 1990年 2月20日
- 26) 奥田博明, 古川みどり, 中西敏己, 飯塚文瑛, 小幡 裕. 肝細胞癌における異常プロトロンビン (PIVKA-II) の臨床的意義と基礎的知見. 第 5回東京女子医科大学血拴止血研究会. 1990年 3月 9日.
- 27) 奥田博明. 肝細胞癌におけるPIVKA-IIの産生に関する臨床研究. 特別講演. 神奈川県PIVKA-II研究会. 1990年 5月15日.
- 28) 福里利夫, 町並隆生, 奥平剛史, 富松昌彦, 奥田博明. 肝癌細胞内異常プロトロンビン (PIVKA-II) の局在に関する免疫組織化学的及び免疫電顕的研究. 第26回日本肝臓学会総会. 1990年 6月15日.
- 29) 福里利夫, 町並隆生, 奥平剛史, 富松昌彦, 奥田博明, 小幡 裕, 大久保昭行. 異常プロトロンビン (PIVKA-II) の免疫組織化学的同定は肝細胞癌のマーカーとなり得るか. 第10回腫瘍マーカー研究会. 1990年 7月 2日.
- 30) 中西敏己, 古川みどり, 奥田博明, 古川隆二, 飯塚文瑛, 小幡 裕. ヒト肝細胞癌におけるPIVKA-IIの産生機序に関する検討. 第49回日本癌学会総会. 1990年 7月 4日.
- 31) Okuda H. Production of abnormal prothrombin by hepatoma cells in culture and its metabolic basis. 1990 FASEB Summer Conference: Synthesis and function of vitamin K-dependent proteins. 1990年 7月24日
- 32) Fukusato T, Machinami R, Tomimatsu M, Okuda H, Obata H, Ohokubo. Des- γ -carboxy prothrombin in tissues of hepatocellular carcinoma: Immunohistochemical and immunoelectron microscopical studies. International Association for the Study of the Liver. 1990年 9月 4日.
- 33) 山縣英晴, 中西敏己, 吉田錦吾, 古川みどり, 富松昌彦, 奥田博明, 小幡 裕. 肝細胞癌におけるPIVKA-IIのビタミンK 感受性に関する検討. 第 6回東京女子医科大学血拴止血研究会. 1990年11月 9日.
- 34) 山縣英晴, 中西敏己, 吉田錦吾, 古川みどり, 富松昌彦, 奥田博明, 小幡 裕. 肝細胞癌におけるPIVKA-IIのビタミンK 感受性に関する検討. 第25回日本肝臓学会東部会. 1990年11月17日.
- 35) 奥田博明. 肝細胞癌における腫瘍マーカーPIVKA-IIの臨床と基礎. 第22回東京女子医科大学消化器病センター例会指定講演 2. 1991年 1月27日.

- 36) 山縣英晴, 中西敏己, 吉田錦吾, 奥田博明, 飯塚文瑛, 小幡 裕. 肝細胞癌の PIVKA-II 産生機序とその問題点. 第 7 回東京女子医科大学血栓止血研究会. 1991 年 2 月 8 日.
- 37) 奥田博明. 肝細胞癌における腫瘍マーカー PIVKA_s の研究 — 臨床的意義と産生機序 —. 東京女子医科大学学会第 285 回例会第 2 回 (1989 年度) 山川寿子研究奨励金受賞者研究発表. 1991 年 2 月 21 日.
- 38) 中西敏己, 奥田博明, 飯塚文瑛, 小幡 裕, 古川みどり. プロトロンビン産生に対するビタミン K の作用. 日本ビタミン学会第 43 回大会. 1991 年 5 月 31 日.
- 39) 山縣英晴, 中西敏己, 古川みどり, 奥田博明, 飯塚文瑛, 小幡 裕. 肝細胞癌における PIVKA-II 産生とビタミン K 依存性 γ - γ -カルボキシレーションシステムの検討. 第 50 回日本癌学会総会. 1991 年 9 月 12 日.
- 40) Yamagata H, Nakanishi T, Furukawa M, Okuda H, Iizuka B, Obata H. Vitamin K metabolism and the γ -carboxylation system in hepatocellular carcinoma. The First International Congress on "Vitamins and Biofactors in Life Science" (ICVB). 1991 年 9 月 19 日.
- 41) 山縣英晴, 安島豊子, 吉田錦吾, 中西敏己, 奥田博明, 小幡 裕. ノードマウスを利用した PIVKA-II の薬剤感受性の検討. 第 8 回東京女子医科大学血栓止血研究会. 1991 年 9 月 27 日.
- 42) 中西敏己, 古川隆二, 吉田錦吾, 奥田博明, 小幡 裕. 血清検体を用いた PIVKA-II 測定についての検討. 第 38 回日本臨床病理学会総会. 1991 年 10 月 10 日.
- 43) 山縣英晴, 中西敏己, 古川みどり, 安島豊子, 奥田博明, 小幡 裕. 肝細胞癌における PIVKA-II とビタミン K 依存性 γ - γ -カルボキシレーションシステムの検討. 第 33 回日本消化器病学会大会. 1991 年 10 月 24 日.
- 44) Okuda H, Nakanishi T, Yoshida K, Furukawa M, Yamagata H, Ajima T, Tomimatsu M, Obata H. Sensitivity of des- γ -carboxy prothrombin to vitamin K to hepatocellular carcinoma. The 42nd American Association for the Study of Liver Diseases. 1991 年 11 月 4 日.
- 45) 山縣英晴, 中西敏己, 吉田錦吾, 奥田博明, 飯塚文瑛, 小幡 裕. ノードマウス移植肝癌を用いた PIVKA-II 産生と γ -carboxylation system の検討. 第 9 回東京女子医科大学血栓止血研究会. (1992 年 3 月発表予定)
- 46) Yamagata H, Nakanishi T, Okuda H, Obata H. Study of production of des- γ -carboxy prothrombin by hepatocellular carcinoma using a nude mouse model. International Association for the Study of the Liver. (1992 年 6 月発表予定)
- 47) 山縣英晴, 中西敏己, 吉田錦吾, 奥田博明, 小幡 裕. ノードマウスを用いた肝癌の PIVKA-II 産生機序の検討. 第 28 回日本肝臓学会総会. (1992 年 6 月発表予定)

(7) 「研究成果」

I はじめに

肝細胞癌(HCC)の腫瘍マーカーには様々なものが知られているが、臨床的に広く利用されているものは少ない。従来肝癌細胞が産生する胎児性蛋白 α -fetoprotein(AFP)が比較的広く利用されていたが、肝炎や肝硬変などの肝疾患でも上昇がみられ、特異性の点では問題があった。このためさらに特異性が高い実用性のあるHCCの腫瘍マーカーが必要と考えられていた。

血液凝固第II因子のプロトロンビンは肝で産生されるvit. K 依存性凝固因子の1つであり、その産生にはプロトロンビン前駆体のグルタミン残基(Glu)の γ 位のCがカルボキシル化を受け、Gla(γ -carboxyglutamic acid residue)に変換されることが必要である。正常プロトロンビンはそのN末端に10個のGla残基を有し、これらを介してカルシウムイオンとの強い結合能を持つことで凝固因子として機能する。このカルボキシル化にはvit. Kが必要であり、vit. K 欠乏状態などでは、カルボキシル化を受けないGluを含み、Glaを欠くかGlaの含有の少ないプロトロンビンが血中に出現してくる。この異常プロトロンビンはprotein induced by vitamin K absence or antagonist- II (PIVKA-II)¹⁾ またはdes- γ -carboxy prothrombin(DCP)と呼ばれている。PIVKA-IIはカルシウムイオンとの結合能に欠けるため正常な凝固活性を示さない。

1984年にLiebmanらはポリクローナル抗体によるRIA法²⁾でHCC患者76例の血中DCPまたはPIVKA-IIを測定して、69例(91%)に検出され51例(67%)で300ng/ml以上の有意の高値を示したことからPIVKA-IIが新しいHCCの腫瘍マーカーと成り得ると発表した³⁾。その後いくつかの検討によりPIVKA-IIはHCCの腫瘍マーカーとして有用性が高いと認識され、本原はモノクローナル抗体によるELISA法にてPIVKA-IIの測定を確立した⁴⁾。またHCC患者血中ではPIVKA-II以外のPIVKA 即ちPIVKA-IXやPIVKA-X等が出現することを我々は報告し^{5, 6)}、これらもPIVKA-IIと同様にHCCの腫瘍マーカーと成り得るかの検討の必要性もできた。今回、我々はこのような背景のもとに肝癌におけるPIVKA-IIの産生機序の解明と、PIVKA-IX, PIVKA-Xの検討に重要なモノクローナル抗体の作製を目的として、肝癌組織や肝癌培養細胞を用いて以下の実験的研究を行った。

II PIVKA-IX, Xに対するモノクローナル抗体の作製について

ヒト肝癌細胞株はPIVKA-IIのみでなく, Factor-IX, Protein C, Protein S, Protein Z等のPIVKAも独自性をもって産生している. また, HCC患者においてPIVKA-II陰性例でもPIVKA-IXが高頻度に血中に出現していた^{5, 6)}. これらの事実はHCCの診断において, PIVKA-II以外のPIVKAの測定も有用なことを示唆している.

そこで, まずPIVKA-IX, Xのモノクローナル抗体を作製し, HCCの診断率の向上を目指すのみでなく, それらの抗体を用いてより詳細な産生機序の解明を目指した.

現在, PIVKA-IIに対するモノクローナル抗体は, 本原らが作製したMU-3⁴⁾があるのみである. このMU-3株が産生する抗体は, カルボキシル化の程度の低いPIVKA-IIに強く反応するが, すべてのPIVKA-IIとは反応しない. これは彼らが免疫源に用いたPIVKA-IIが化学的に脱カルボキシル化されたものであるためと考えられ, すべてのPIVKA-IIを検出するためにはnativeなPIVKA-IIを免疫源として用いることが必要と考えられる.

以上のことからすべてのPIVKA-IIに対して反応するモノクローナル抗体およびPIVKA-II以外のPIVKAに対するモノクローナル抗体の作製を行うことにした.

なお当初は, PIVKA-IX, Xに対するモノクローナル抗体の作製の方針であったが, 以上のような状況を考慮して, すべてのPIVKA-IIに対して反応するモノクローナル抗体およびPIVKA-IXに対するモノクローナル抗体の作製に変更した.

a. PIVKA-II, PIVKA-IXの精製

NativeなPIVKA-II, PIVKA-IXは肝癌培養細胞株の培養上清から精製した. 肝癌培養細胞株としてはhuH-2を, 培養液にはFCSを含有しないASF104(味の素)を使用した. 培養条件は, 5% CO₂存在下, 37°Cとし, 3-10日間の培養後の培養上清を採取し, 精製まで-80°Cで保存した.

b. 抗F-II, 抗F-IXモノクローナル抗体の作製

F-IX(DACO)50 μgを同容量のComplete Freund's adjuvant(DIFCO)と共にBALB/Cマウス(メス, 5週齢)の腹腔内に投与し, さらに2週および3週後にF-IX 25 μgと同容量のComplete Freund's adjuvantを腹腔内に投与した. 最終投与3日後に摘脾し, 脾細胞1×10⁸個とP3U-1ミエローマ細胞2×10⁷個をポリエチレングリコール(mw 1500, Boehringer Mannheim社)を用いて, Köhler and Milsteinの方法により細胞融合させた. これをHAT培地で10日間CO₂インキュベーター内で培養し, その後HT培地, そしてRPMI 1640培養液と交換し, 培養上清に対してF-IX 100ng/0.1ml/Well coatingしたアッセイプレートを用いたELISA法で抗F-IX抗体産生クローンを検索した. 抗F-IX抗体産生クローンを限界希釈法により2回クローニングを行った. 以上の操作により24種類の抗体産生株が確立された. この内3種類についてそれぞれ細胞5×10⁶個をマウス腹腔内に投与し, 腹水を採取して, 50%硫酸塩析を行い, そのpelletをPBSで透析後, Protein AのAffinityカラムで精製した. この精製抗F-IX抗体でF-IXに対するAffinityカラムを作製した. このカラムを用いて肝癌培養細胞株のhuH-2の培養上清からnativeなPIVKA-IXを精製して, これにたいするモノクローナル抗体を作製する予定である.

抗F-IIモノクローナル抗体の作製は抗F-IXモノクローナル抗体と同様に行い, 16種類の

抗体産生株を確立した。この内 3種類から Affinity カラムを作製し、huh-2 培養上清から native な PIVKA-II を精製し、すべての PIVKA-II に対するモノクローナル抗体を作製する予定である。

Ⅲ 肝細胞癌におけるPIVKA-IIの産生機序の検討

HCC の診断において血中PIVKA-IIの測定は既に広く行われており、その腫瘍マーカーとしての有用性は確立したと考えられる。⁷⁻⁹⁾ HCC患者の血中のPIVKA-IIは、腫瘍の切除や化学療法によって低下する事実から肝癌細胞が産生していると研究初期からLiebmanらにより推測されていた³⁾。我々は肝癌培養細胞株のhu-H1 とhu-H2 の培養上清中にPIVKA-IIが出現すること、およびHCC 患者から切除された癌組織の免疫染色で癌細胞中にPIVKA-IIが存在することを確認している¹⁰⁻¹²⁾。このことからPIVKA-IIは肝癌が産生していることが事実となったがその産生機序については完全な解明には至っていない。癌細胞においてビタミンK 依存性凝固因子の産生に変化がおきていることは、癌部の局所的環境に様々の影響をもたらしている可能性もある。こうしたことからPIVKA-II産生機序の解明は癌の基礎的研究として重要性が高いと考えられる。

現在、肝癌細胞のPIVKA-IIの産生機序として(1) プロトロンビン前駆体の過剰産生、(2) vit. K cycleの異常 (vit. K 代謝酵素系の異常)、(3) vit. K 依存性 γ -glutamyl-carboxylase の障害、(4)肝癌のvit. K の取り込み障害などが考えられている。これらについて我々は以下の実験的検討を行った。

a. γ -glutamyl carboxylase 活性の測定

我々は既にHCC 患者の血中に出現するPIVKA-IIがvit. K の投与で減少すること、および肝癌培養細胞huH-1 とhuH-2 の産生するPIVKA-IIもvit. K の添加培養では低下することを示し^{11,13,14)}、このことから肝癌においてvit. K 依存性カルボキシル化には大きな障害はないと推測した。これに対して Liebmanらは肝癌の産生するPIVKA-IIはvit. K に非感受性であり vit. K依存性カルボキシル化に何らかの欠損があると推測していた³⁾。現在では多くの施設での検討でHCC 患者の血中に出現するPIVKA-IIはvit. K 感受性があることが確認されており γ -carboxylation system に関与する何らかの酵素の欠損が肝癌にあるとは考えにくい。しかし γ -carboxylation system のkey enzymeである γ -glutamyl carboxylase の活性は直接的には肝癌では確認されていなかった。そこでHCC 患者から手術で摘出された肝癌組織を用いてこの活性を測定した。

[方法]

手術で摘出された肝癌組織を25mM imidasole, pH7.20, 25M sucrose, 1mM dithiothreitol中でホモジナイズ後 10000 × gで10分遠心した上清を105000 × gで60分超遠心して得たマイクロソームを2% Triton X-100 で可溶化し、蛋白濃度を5mg/ml buffer に調製した。 γ -glutamyl carboxylase 活性はSuttieらの方法¹⁵⁾ に準じ、この可溶化マイクロソーム分画に還元型vit. K と¹⁴COOHを添加してincubateして取り込まれる¹⁴COOHの放射活性を液体シンチレーションカウンターで計測した。(Fig. 1) 同様にして非癌部組織(全て硬変肝)についても測定を行った。またマイクロソーム中と患者血中のPIVKA-IIをEIA 法で併せて測定した。

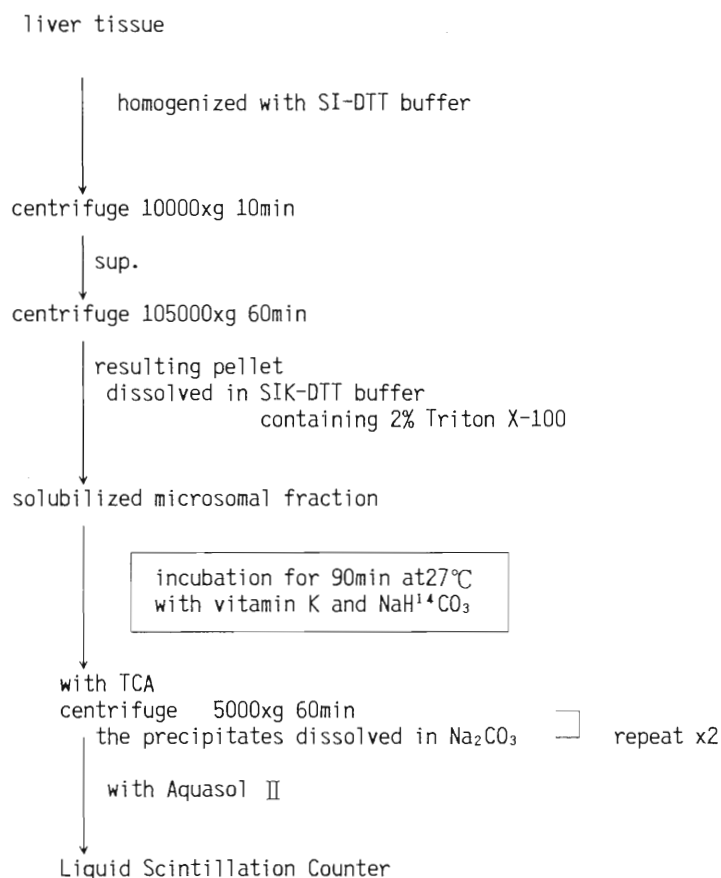


Fig.1 γ -glutamyl carboxylase 活性の測定手順

[結果]

癌部18例中12例, 非癌部11例中 5例で γ -glutamyl carboxylase 活性が認められた. 癌部の活性は非癌部に比して高い傾向があった. マイクロソーム中のPIVKA-IIが多いものでは γ -glutamyl carboxylase 活性も高い傾向がみられた. なお血中PIVKA-IIと γ -glutamyl carboxylase 活性には相関は認めなかった. (Table 1) またマイクロソーム中のPIVKA-IIが多いものでは γ -glutamyl carboxylase 活性も高いものが多かった.

Table 1 肝癌の γ -glutamyl carboxylase 活性

pt.	plasma PIVKA-II (AU/ml)	tissue	microsomal PIVKA-II (μ g/mg protein)	14 C incorporation (cpm/mg protein)
1	5.4	HCC	0.84	3003
2	0.66	HCC	4.15	3561
3	0.1	HCC	130	5838
4	0.64	HCC	0.30	1260
5	0.8	HCC	0.80	2326
6	4.2	HCC	0.31	3240
7	0.1	HCC	0.81	3650
8	0.1	HCC	0.23	2870
9	0.1	HCC	0.32	3023
10	2.3	HCC	1.62	4380
11	1.6	HCC	0.21	3121
12	0.3	HCC	0.26	4720

1'	5.4	LC	0.62	900
6'	4.2	LC	0.21	860
8'	0.1	LC	0.13	1156
10'	2.3	LC	0.31	1672
13	1.4	LC	0.41	1275

(1' は 1と同一患者の非癌肝組織を示す)

[考察]

以上の結果から肝癌においても γ -glutamyl carboxylase は欠損していないことが直接的に確認された。癌部の活性が非癌部に比してむしろ高いが、これは基質として内因性基質を利用したからと考えられる。即ちプロトンビン前駆体の過剰産生を間接的に示していると考えられる。現在 γ -glutamyl carboxylase の精製は成功しておらず、その質的な変化が活性に変化を及ぼすかどうかは不明である。しかし十分な vit. K と基質の存在下ではカルボキシル化は活発にみられることから、この可能性は低いと思われる。

b. 外因性基質を用いた γ -glutamyl carboxylase 活性の測定

a に示したように肝癌においても γ -glutamyl carboxylase 活性は確認されたが、その変化の詳細な検討にはさらに外因性基質を添加した活性測定も必要と考えられる。Suttieらのラットでの検討¹⁵⁾ に準じて我々は上記の可溶性マイクロソームに、基質として penta-peptide である Phe-Leu-Glu-Glu-Leu を添加して 14 COOH の取り込みが上昇するか検討した

が、非添加群に比して有意な上昇は認めなかった。可溶化の方法等の実験系について検討の余地はあるが、ヒト γ -glutamyl carboxylase の基質特異性は他の動物に比して高いと考えられる。 γ -glutamyl carboxylase はプロトンピン前駆体の propeptide lesion を recognition site としている報告¹⁶⁾があるが、我々の検討からもこの可能性は十分にあり得ると推測される。

c. 肝癌組織の vit. K 濃度についての検討

vit. K 欠乏症患者や warfarin の投与を受けている患者の血中には高レベルの PIVKA-II が出現する。このことから肝癌においても何らかの原因による vit. K 欠乏状態がおきており、PIVKA-II が産生されるという可能性が考えられる。我々の以前の検討で HCC 患者の血中の vit. K を測定し、これを血中 PIVKA-II 陽性例と陰性例に分けて比較してたところ両者で大きな差はみられなかった^{17,18)}。そこで今回は肝癌局所において vit. K 濃度の低下がおこっているかを検討した。

[方法]

HCC 患者から手術にて摘出された肝癌組織および非癌肝組織の vit. K₁ および MK-4 の含有量を HPLC 法にて測定した。組織からの vit. K の抽出は平内らの方法¹⁹⁾に準じて行った。対象は血中 PIVKA-II 陽性 (0.1 AU/ml <) 患者 8 例と陰性患者 4 例の計 12 例である。

[結果]

測定結果を Table 2 に示した。血中 PIVKA-II の陽性と陰性では癌部、非癌部共に有意な濃度差はみられなかったが、癌部の vit. K は低い傾向はみられた。

Table 2 HCC 患者における肝組織中の vitamin K 濃度

plasma PIVKA-II	癌部		非癌部	
	K ₁	MK-4	K ₁	MK-4
陽性 (n=8)	3.12 ± 1.88	2.30 ± 1.29	5.71 ± 2.56	2.23 ± 1.11
陰性 (n=4)	6.00 ± 2.77	4.15 ± 1.36	8.90 ± 3.41	4.70 ± 2.11

mean ± SD : K₁, MK-4 ng/g liver

[考察]

血中 PIVKA-II の出現に vit. K の欠乏が関与している可能性は直接的には確認されなかったが、大量の vit. K を負荷した場合は肝癌における vit. K の取り込みに変化がみられる可能性は否定できない。この点を明らかにするためさらに以下の実験を行った。

d. vit. K 負荷時における肝癌組織のvit. K 濃度の測定

[方法]

HCC患者に肝切除術施行 1週間前から連日vit. K₂ 20mg をi. v. して切除肝のvit. K 濃度を c と同様にHPLC法で測定した。

[結果]

測定結果をFig. 2 に示した。Vit. K 濃度はPIVKA-II 陽性例の癌部で最も低値を示した。

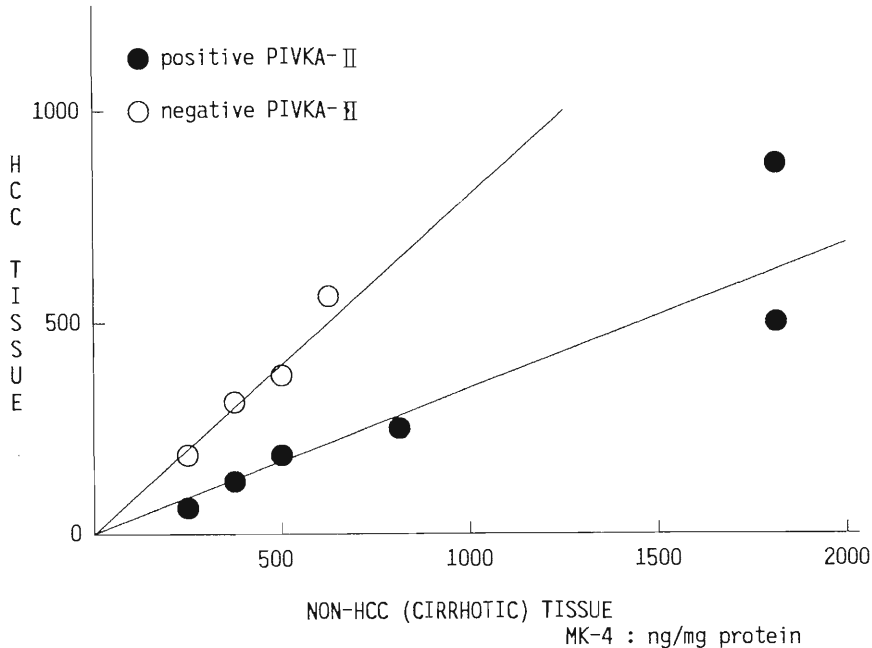


Fig.2 Vit. K負荷時の肝癌および非癌肝組織のvit. K の取り込み

[考察]

通常量のvit. K が体内に存在する時は肝癌におけるPIVKA-II の産生にvit. K 欠乏が関与している可能性は低いですが、大量のvit. K 負荷時にはPIVKA-II 陽性の肝癌ではvit. K の取り込みは低下していた。このことは肝癌のPIVKA-II 産生の直接的な原因ではないが、PIVKA-II の産生に対して、より産生を促進させる因子として働いていると考えられる。この性質が肝癌細胞自体の特性か、それとも癌組織の持つ特性かについては今後の検討が必要と考えられる。

e. ノードマウスを用いた新しいPIVKA-II 研究実験系の作製

手術により摘出された癌組織では、その鮮度や内因性基質の含有量などが様々であり、このことが γ -glutamyl carboxylase 活性測定をはじめ各種の検討に影響を及ぼしていると考えられる。このような影響を除き、より客観的な実験を進めるためにノードマウスに肝癌培養細胞を移植した実験モデルを作製し、これがPIVKA-II の研究に有用性があるかを検討した。

〔方法〕

BALB/Cヌードマウス4週齢雄に肝癌培養細胞のhuH-1 約 1×10^4 個を生理的食塩水に懸濁して胸背部皮下に注入し、同時に抗アジアロGMI $50 \mu\text{g}/0.2 \text{ ml}$ を腹腔内に投与した。huH-2も同様にしてマウスに注入した。移植後経時的に尾動静脈から採血して血中のヒトPIVKA-IIをEIA法(エイテストモノP-IIエーザイ)で測定した。移植後60日にvit.Kとしてmenaquinone4 $50 \mu\text{g}$ を腹腔内投与し、その前後での血中PIVKA-IIの変動をみた。さらに移植後70日にwarfarin $100 \mu\text{g}$ を腹腔内投与しPIVKA-IIの変動をみた。

〔結果〕

培養細胞移植前のヌードマウスの血中にはヒトPIVKA-IIは検出されず、移植後2週で検出されるようになりその後は腫瘍の増大に伴い経時的に増加した。肉眼的にhuH-2移植マウスのほうが腫瘍の増大速度が速く、血中PIVKA-IIも高値を示した(Fig.3)。いずれの細胞を移植したマウスもvit.Kの投与後48時間でPIVKA-IIは投与前値の5~10%まで低下し、投与後3~4日目より再上昇が認められた(Fig.4A)。Warfarinでは投与後48時間でPIVKA-IIは投与前値の4倍以上に上昇し、この傾向は4日間以上続いた(Fig.4B)。

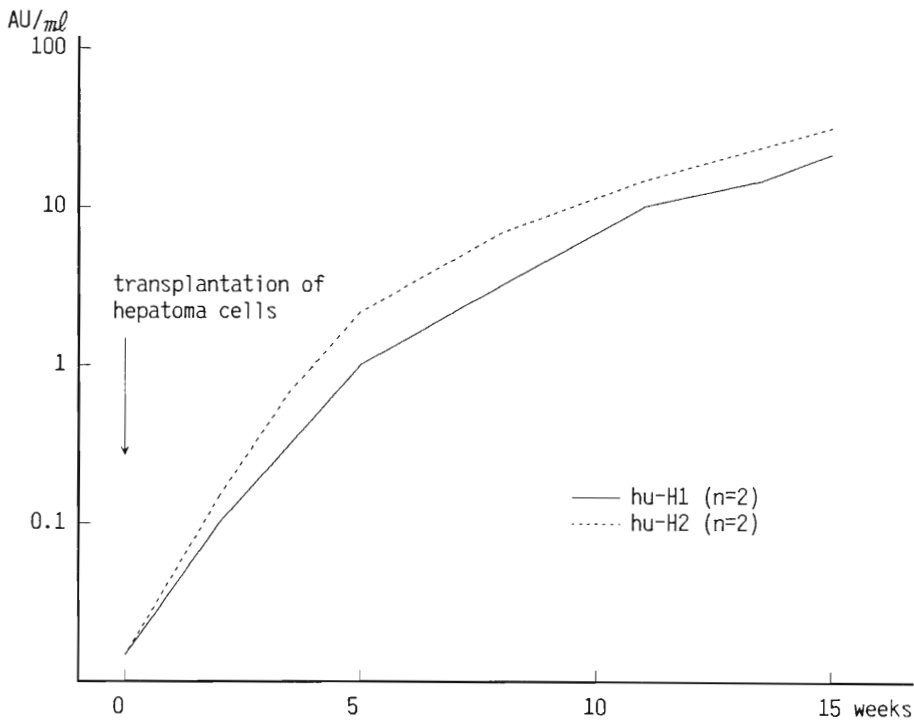


Fig.3 肝癌移植ヌードマウスの血中PIVKA-II

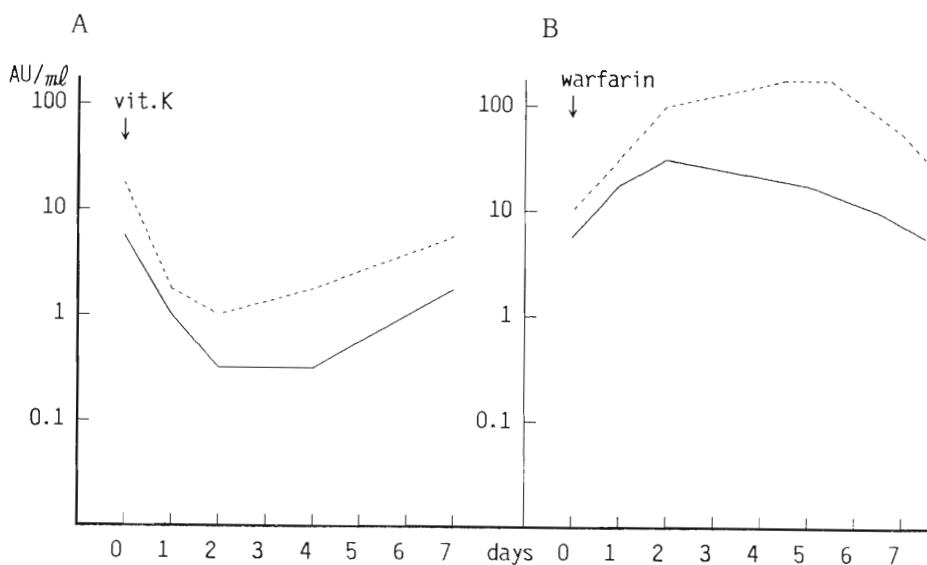


Fig.4 薬物投与に対するヌードマウス血中PIVKA-IIの変動
 A: vit.K投与 B: warfarin 投与

〔考察〕

ヌードマウスに腫瘍を移植して増殖させることは種々の研究に利用されている。この実験系では腫瘍の産生物質はマウスの血中に高濃度に蓄積されると考えられ、腫瘍マーカーの研究にも適していると思われる。また非癌組織の影響を除ける利点もある。結果のごとく腫瘍の増大に伴いヌードマウス血中のヒトPIVKA-IIは増加し、これは全て癌組織が産生していると考えられる。Vit.K投与でPIVKA-IIが減少することは肝癌患者での検討^{13,14)}と同様であった。Warfarin投与でのPIVKA-IIの増加は、腫瘍の増大に伴うPIVKA-IIの上昇に比して急激で、癌組織で作動している γ -carboxylation systemがブロックされたためと考えられ、癌組織でも同システムの作動に極度の低下がないことを間接的に示唆していると考えられた。肝癌細胞移植ヌードマウス血中のPIVKA-IIは薬物の投与に対し反応性が高くヒトでは困難な感受性の詳細な検討においても本実験系は有用性が高いと考えられた。

文献

- 1) Hemker HC, Muller AD : Kinetic aspects of the interaction of blood-clotting enzymes. VI. localization of the site of blood-coagulation inhibition by the protein induced by vitamin K absence (PIVKA). *Thrombos Diathes Haemorrh* 20: 78-87, 1968.
- 2) Blanchard RA, Furie BC, Jorgensen M, et al.: Acquired vitamin K-dependent carboxylation deficiency in liver disease. *N Engl J Med* 305:242-248, 1981.
- 3) Liebman HA, Furie BC, Tong MJ, et al.: Des- γ -carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 310: 1427-1431, 1984.
- 4) Motohara K, Kuroki Y, Kan H, et al.: Detection of vitamin K deficiency by use of an enzyme-linked immunosorbent assay for circulating abnormal prothrombin. *Pediatr Res* 19:354-357, 1985.
- 5) 奥田博明, 中西敏己, 古川みどり, 小幡 裕, 鈴木宏治: 肝細胞癌の腫瘍マーカーとしての PIVKA. *衛生検査* 38:1654-1660, 1989.
- 6) 古川みどり, 中西敏己, 奥田博明, 小幡 裕, 鈴木宏治, 西岡淳二: 肝細胞癌における各種PIVKA の産生に関する検討. *肝臓* 31:110, 1990.
- 7) Okuda H, Obata H, Nakanishi T, et al.: Production of abnormal prothrombin (des- γ -carboxy prothrombin) by hepatocellular carcinoma — A clinical and experimental study. *J Hepatol* 4:357-363, 1987.
- 8) Fujiyama S, Morishita T, Sagara K, et al.: Clinical evaluation of plasma abnormal prothrombin (PIVKA-II) in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepato-gastroenterol* 33:201-205, 1986.
- 9) Soulier J-P, Cozin D, Lefrere J-J: A new method to assay des- γ -carboxy prothrombin. Results obtained in 75 cases of hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 91:1258-1261, 1986.
- 10) 奥田博明, 中西敏己, 古川隆二, 他.: 肝細胞癌における異常プロトロンビンPIVKA-II の産生に関する臨床的および実験的研究. *肝臓* 27:1697-1702, 1986.
- 11) 奥田博明, 中西敏己, 古川隆二, 他.: 肝細胞癌における異常プロトロンビンPIVKA-II の産生に関する検討. *肝臓* 29:47-51, 1988.
- 12) 福里利夫, 町並隆生, 富松昌彦, 他.: 異常プロトロンビン(PIVKA-II) の肝癌細胞内局在の臨床的及び病理学的意義. *肝臓* 31:714, 1990.
- 13) Furukawa M, Nakanishi T, Okuda H, et al.: Changes of plasma des - γ -carboxy prothrombin levels in patients with hepatocellular carcinoma in response to vitamin K. *Cancer* 69:31-38, 1992.
- 14) 古川みどり, 中西敏己, 奥田博明, 他.: 肝細胞癌におけるPIVKA-IIのvitamin K 感受性に関する検討. *日消誌* 85:2583-2589, 1988.

- 15) Suttie JW, Preusch PC. : Studies of the vitamin K dependent carboxylase and vitamin K epoxide reductase in rat liver. *Haemostasis* 16:193-215, 1986.
- 16) Hubbard BR, Jacobs M, Furie BC : Vitamin K dependent carboxylation. In vitro modification of synthetic peptides containing the γ -carboxylation recognition site. *J Biol Chem* 264:14145-14150, 1989.
- 17) 奥田博明. :肝細胞癌における異常プロトロンビンPIVKA-IIの産生に関する臨床的, 実験的研究. 昭和62・63年度科学研究費補助金一般研究(C) 研究成果報告書P1-29 , 1989.
- 18) Okuda H, Nakanishi T, Furukawa M, et al. : Vitamin k dependent proteins and hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol.* 6:392-399, 1991.
- 19) Sakano T, Nagaoka T, Hirauchi K : Measurement of K vitamins in human and animal feces by high-performance liquid chromatography with fluorometric detection. *Chem Pharm Bull* 34: 4322, 1986.