

ーフェロンによりインスリン抵抗性増大が引き起こされることが報告されている<sup>10)</sup>。インターフェロン投与により、同時に副腎皮質ホルモン、成長ホルモン、グルカゴンのインスリン拮抗ホルモンが分泌されることが、インスリン抵抗性を惹起する原因とされている<sup>10)</sup>。一方、今野らは、C型肝炎患者にインターフェロンを2週間投与した時点でOGTTとeuglycemic hyperinsulinemic clampを行ったところ、血糖、インスリン値に影響を及ぼすエピネフリン、ノルエピネフリン、副腎皮質ホルモン、成長ホルモンは治療前と変化がないが、肝臓と末梢組織での糖取り込みが減少したと報告している<sup>11)</sup>。インターフェロンによるインスリン感受性低下の機構は明らかではなく、これらの拮抗ホルモンの関与も議論の分かれるところである。

#### b. インスリン分泌不全による1型糖尿病

インターフェロン投与により、自己免疫疾患や自己抗体の陽性化をしばしば起こすことが知られている(表1)。その中では、甲状腺機能異常が最も多いが、まれに1型糖尿病を発症することがあり(0.1%未満)、注意が必要である。インターフェロン治療前後で、抗膵島細胞質抗体(ICA)、抗GAD抗体を調べた9試験の484例をまとめると、HCV陽性が440例、HBV陽性が44例であった。インターフェロン治療前の膵自己抗体陽性率はそれぞれ3%(12/440)と2%(1/44)であり、一般と同様であった。インターフェロン治療後には膵自己抗体陽性率は、それぞれ8%(34/440)と5%(2/44)と上昇した。

インターフェロン治療により1型糖尿病を発症した31例の報告では、25例がHCV感染者、3例がHBV感染者、その他3例は癌に対するアジュバントとしてインターフェロンが使用されていた。9症例では糖尿病の家族歴があり、インターフェロン治療前に検査がされていた18例中9例(50%)では、既に膵自己抗体が少なくとも1つは陽性であった。評価可能であった30症例中、糖尿病発症時には77%(23/30)で膵自己抗体が陽性であった(抗GAD抗体陽性18例、ICA陽性11例、その他のマーカー陽性3例)。HLAクラスII抗原の解析が行われた18例中16例に

は、1型糖尿病の疾患感受性のあるDR4などのHLAハプロタイプが認められた。1型糖尿病を発症した時期は、インターフェロン治療開始後10日から4年と開きがあった<sup>12)</sup>。

Stewartらは、膵β細胞にインターフェロンα遺伝子を発現させたトランスジェニックマウスで膵島炎と糖尿病が発症し、抗インターフェロンα抗体の投与により、糖尿病の発症が抑制されたと報告した<sup>13)</sup>。インターフェロンのマクロファージ活性化作用によりインターロイキン1が産生され、膵β細胞を傷害する機序が考えられている。

#### 4. インターフェロンによる耐糖能障害の対策

肝炎に対してインターフェロン治療を行ったことで糖尿病が新たに発症する頻度は少ない。むしろ潜在化していた糖尿病が発症または悪化する場合はほとんどである。したがって、インターフェロン投与前には、糖尿病の既往、家族歴などの調査により糖尿病の素因の有無を確認し、血糖値・HbA1c値・尿糖測定などにより耐糖能異常の有無を調べておく。耐糖能異常が疑われる場合には、OGTTにより耐糖能やインスリン分泌能を評価する。インターフェロン投与中には、空腹時血糖、食後尿糖、グリコアルブミンなどの指標を用いてフォローする。HbA1c値では投与後早期の耐糖能の変化を検出するのは困難である。慢性肝炎・肝硬変で門脈圧亢進症を伴っている場合には、赤血球寿命が短縮しており、HbA1c値は低値を示すことに注意が必要である。また、グリコアルブミンも、肝線維化が進行した場合には低値となる可能性がある。

インターフェロン投与により惹起された耐糖能異常が軽度の場合には、インターフェロン治療を継続することが可能である。食後高血糖のみの場合には、食事療法で経過観察すると、インターフェロン投与終了によりインスリン抵抗性は改善し、耐糖能異常が軽快するのが一般的である。しかし、耐糖能異常が高度な場合や1型糖尿病発症の場合には、早期にインスリン療法を開始する。肝疾患が進行した症例では、肝

のグリコーゲン蓄積が低下していることから低血糖が発症しやすいことに注意が必要である<sup>1,14,15)</sup>。

糖尿病を合併している肝炎患者のインターフェロン治療において特に注意すべき点として、脳出血と眼底出血があげられる。C型肝炎に対してインターフェロンとリバビリン併用療法中に脳出血を起こした症例が報告されている。いずれの症例もC型肝炎に高血圧または糖尿病または両者を合併しており、リバビリンとインターフェロンによる併用治療と脳出血の因果関係は不明とされている。従来行われていたインターフェロン単剤による治療でも脳出血の報告(0.1%未満)はあり、リバビリンとの併用により頻度が高くなることはないようだが、高血圧症または糖尿病を合併している症例では脳出血のリスクが高いので事前に十分説明を行い、特に慎重に投与を行うべきである。

また、厚生省難治性肝炎調査研究班調査報告書によると、インターフェロンの副作用として0.34%に眼底出血などの眼症状が起こるとされている<sup>8)</sup>が、軽症例を含めると頻度はより高い。

機序については、インターフェロンの血管攣縮作用、免疫複合体による血管障害、あるいはC型肝炎ウイルスによる網膜障害などが考えられている。糖尿病合併慢性肝炎患者では非合併例に比べ眼底出血の頻度が高く、糖尿病はインターフェロンによる網膜症進展の危険因子であることから、インターフェロン治療の際には特に注意が必要である。

## おわりに

ウイルス性慢性肝炎患者にインターフェロン治療を行う際には、耐糖能障害が悪化しやすい。インターフェロンによる耐糖能の増悪は、主にインスリン抵抗性の増大により2型糖尿病の病態を呈するが、まれに自己免疫を惹起してインスリン分泌低下による1型糖尿病を起こし重篤化する。インターフェロン投与に際しては、製剤・併用療法のいかんにかかわらず、耐糖能異常の有無を確認するとともに、投与中には、血糖・尿糖の測定とグリコアルブミンなどにより病態の把握を行うことが重要である。

## 文 献

- 1) 河盛隆造：インターフェロンに起因する糖尿病の悪化とその対策。Pharma Medica 14: 155-160, 1996.
- 2) 今野英一, 神田 勤：肝疾患に併発した糖尿病の管理。Medical Practice 18: 1671-1673, 2001.
- 3) Caronia S, et al: Further evidence for an association between non insulin dependent diabetes mellitus and chronic hepatitis C virus infection. Hepatology 30: 1059-1063, 1999.
- 4) Arao M, et al: Prevalence of diabetes mellitus in Japanese patients infected chronically with hepatitis C. J Gastroenterol 38: 355-360, 2003.
- 5) Weinman SA, Belalcazar LM: Hepatitis C: a metabolic liver disease. Gastroenterology 126: 917-919, 2004.
- 6) Shintani Y, et al: Hepatitis C virus infection and diabetes: Direct involvement of the virus in the development of insulin resistance. Gastroenterology 126: 840-848, 2004.
- 7) Aytug S, et al: Impaired IRS-1/PI3-kinase signaling in patients with HCV: A mechanism for increased prevalence of type 2 diabetes. Hepatology 38: 1384-1392, 2003.
- 8) 飯野四郎：アンケート調査集計：インターフェロンの副作用。厚生省難治性肝炎調査研究班，平成5年度研究報告，p7, 1993.
- 9) Mofredj A, et al: Diabetes mellitus during interferon therapy for chronic viral hepatitis. Dig Dis Sci 47: 1649-1654, 2002.
- 10) Koivisto VA, et al: Effect of interferon on glucose tolerance and insulin sensitivity. Diabetes 38: 641-647, 1989.
- 11) Imano E, et al: Interferon induces insulin resistance in patients with chronic active hepatitis C. J Hepatol 28: 189-193, 1998.
- 12) Fabris P, et al: Review article: Type 1 diabetes mellitus in patients with chronic hepatitis C before

- and after interferon therapy. *Aliment Pharmacol Ther* 18: 549-558, 2003.
- 13) Stewart TA, et al: Induction of type I diabetes by interferon- $\alpha$  in transgenic mice. *Science* 260: 1942-1946, 1993.
  - 14) 上原総一郎ほか：インターフェロンと耐糖能異常. *日本臨牀* 56: 661-665, 1998.
  - 15) 笹岡利安：耐糖能異常. *総合臨牀* 52: 2610-2615, 2003.

## 肝癌の再発予防

吉田晴彦\* 建石良介\*  
赤松雅俊\* 小俣政男\*

索引用語：intrahepatic metastasis, multicentric carcinogenesis, interferon therapy, transplantation

## 1 はじめに

わが国の肝細胞癌(以下、肝癌と呼ぶ)症例の約8割はC型肝炎ウイルス(HCV)感染、約1割はB型肝炎ウイルス(HBV)感染を有しており、肝癌の実に9割は環境的発癌因子であるウイルス感染症に起因している。したがって、肝炎ウイルス感染の有無を診断することで肝癌発生の高危険度群を識別することが可能であり、重点的に肝癌のスクリーニングを行うことによって、効率的に肝癌の早期発見、早期治療を行うことができる(二次予防)。また、肝炎ウイルス感染の防止およびウイルス慢性肝炎の治療によって、肝癌発生を予防することも可能である(一次予防)。

われわれは慢性C型肝炎に対するインターフェロン療法によって、HCV持続陰性化群では肝癌発生リスクが無治療群の5分の1に低下することを、約3,000人を対象としたコホート研究において示した<sup>1)</sup>。インターフェロン療法の肝癌発生抑止効果はわが

国の他のグループからも示されており、すでに確立している<sup>2,3)</sup>。HCVに対するインターフェロン療法は、近年、リバビリン併用療法の導入とPEG(ポリエチレングリコール)インターフェロンの開発によって著効率が向上した。PEGインターフェロンとリバビリンの併用療法は国際的にはすでに標準的治療法となっているが、2004年末頃にわが国でも健康保険適応になると予想されている。持続陰性化率の上昇に伴って肝癌発生抑止効果も増強されるはずである。しかし、インターフェロン未治療患者および非著効患者、また、少数とはいえ著効患者の中からも、肝癌が今後も発生し続けることは間違いない。肝癌の診断と治療は格段に進歩したが、治療後の再発が重大な問題として残っている。本稿では肝癌治療後の再発予防策(三次予防)を中心に検討する。

## 2 肝癌の特徴

肝癌の多くが肝硬変から生じることは以前から知られていたが、HCV関連肝癌(以下C

Haruhiko YOSHIDA et al : Prevention of Hepatocellular Carcinoma Recurrence

\*東京大学大学院医学系研究科消化器内科学教室 [〒113-8655 東京都文京区本郷7-3-1]

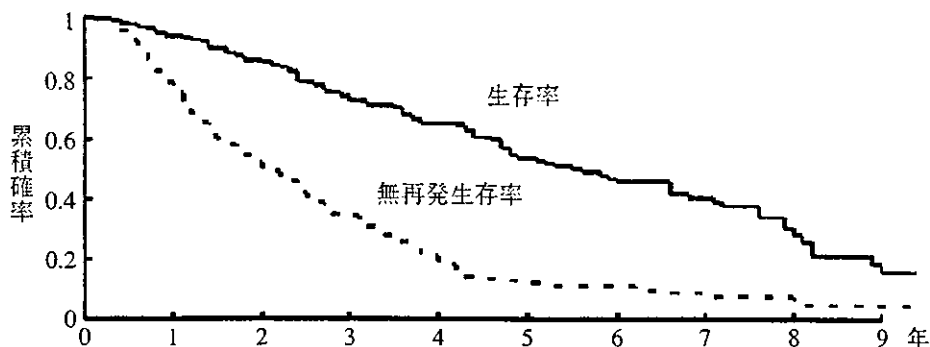


図1 C型肝癌根治的焼灼療法後の予後

東京大学消化器内科でエタノール、マイクロ波またはラジオ波で根治的に焼灼した初発単発C型肝細胞癌279名の予後を示す。肝癌治療後にインターフェロン療法によってHCVが持続陰性化した症例を除いた。

型肝癌とする)では特にその傾向が強い。われわれの施設で加療した初発C型肝癌患者621名の背景肝線維化進行度を調べると、F4(肝硬変)が68%、F3(高度の線維化を伴う慢性肝炎)が21%であり、併せて9割を占めていた。また、C型慢性肝炎・肝硬変患者の肝発癌を前向きに調べると年発癌率は表1のとおりであり<sup>4)</sup>、線維化の進行に伴って肝発癌リスクが加速度的に高まることがわかる。線維化の進行度は肝生検によって診断されるが、非侵襲的には血小板数、プロトロンビン時間などから推測可能である。線維化の進行したC型慢性肝炎患者および肝硬変患者は肝癌の超高危険度群に属していることを認識して、腹部超音波検査、CTなどの画像診断を定期的に行い、肝癌の早期発見に努めなければならない。現在では、早期に発見された肝癌は、肝機能の許す限り、外科的肝切除術や内科的局所焼灼療法によって完全に除去することが可能である。

診断および治療技術の向上により、肝癌患者の生存期間は明らかに延長した。しかし、「根治」した肝癌患者の治療後生存率を調べると、初回治療後長期間が経過した後も死亡が発生し続ける(図1)。これには、肝癌病変を除去した後の残存肝が決して正常肝では

なく、多くの場合肝硬変またはこれに近い状態であることが関係している。すなわち、残存肝は引き続いて肝発癌の高危険度状態にあり、実際、肝癌は「根治」的な外科的切除後ないし内科的焼灼後においても極めて高頻度で再発する。また、肝炎の持続に伴って肝機能もさらに低下していく場合が多く、再発した肝癌を早期に発見しても肝機能の悪化のために、根治的治療を繰り返すことができなくなることも多い。肝癌の発生数と死亡者数はほぼ同数であると推測されており、実際には肝癌病巣の局所的「根治」は肝癌の根治に結びつかない。肝癌患者の長期予後を改善するためには、原発病巣の完全除去のみでは不十分であり、肝癌再発抑制と肝機能改善が伴わなければならない。

### 3 再発肝癌

肝癌再発には、肝内転移と(異時性)多中心性発癌の2つの様式が考えられている。初発肝癌治療時に画像診断では検出しえない微小な肝内転移があって、その後増大して検出されたものが肝内転移であり、肝内他所に初発癌とは別個にあらたに生じたものが多中心性発癌である<sup>5)</sup>。実際の個々の再発肝癌について、どちらの様式による再発であるかを

表1 性・年齢・肝線維化ステージで層別化したC型肝癌発生率(年率)

男 性				
年齢	F0/1	F2	F3	F4
～ 39	0.05 %	0.13 %	0.28 %	0.56 %
40～ 49	0.35 %	1.00 %	2.16 %	4.26 %
50～ 59	0.82 %	2.33 %	5.06 %	10.0 %
60+	1.03 %	2.93 %	6.35 %	12.5 %
女 性				
年齢	F0/1	F2	F3	F4
～ 39	0.02 %	0.07 %	0.14 %	0.29 %
40～ 49	0.18 %	0.51 %	1.10 %	2.17 %
50～ 59	0.42 %	1.19 %	2.57 %	5.08 %
60+	0.52 %	1.49 %	3.23 %	6.37 %

平均観察期間7.4年の間にインターフェロン無効患者1,556名中214例で肝癌が発生した。人年法によって求めた層別化発癌率を比例ハザード性を仮定して最小二乗法で調整した。(文献4から引用)

決定することは多くの場合不可能であるが、理論上これら2つの様式を区別することは肝癌再発防止策を考える上で重要である。

肝癌では比較的早期から腫瘍灌流門脈を介した肝内転移が生じやすいとされている。したがって、解剖学的な門脈支配に基づいて系統的肝切除を行えば、原発巣と同じ門脈灌流領域に生じている肝内微小転移巣を同時に除去することができるはずである。ただし、切除可能な肝容積は残存肝機能によって規定され、十分な系統的切除を行うためには良好な肝機能が必要である。また、門脈灌流領域を超えた肝内転移が稀ならず存在することも事実であり、系統的肝切除後の再発においても、その約半数は肝内転移によると推測されている<sup>6)</sup>。肝内転移のリスクは腫瘍径や病理学的悪性度によって規定されると考えられるが、再発に関して系統的肝切除が内科的焼灼よりも優れているかどうかは、同一門脈灌流領域への転移が始まるステージと、門脈灌流領域を超えた肝内転移が始まるステージとの間に

どれだけの間隔があるかによって決まるであろう。いずれにせよ系統的肝切除では対応できない肝内転移が高頻度で存在することは明らかである。

一方、多中心性発癌は残存肝からの新規発癌であり、そのリスクは初発癌の腫瘍ステージの影響を受けないと考えられる。60歳以上の男性C型肝硬変患者の初発肝癌発生率は年率10%を超えている(表1)。現在、C型初発肝癌患者の平均年齢は60歳台後半であるから、治療後の残存肝からも同率以上の頻度で新たな癌が発生することが予想される。実際に発癌した患者の残存肝発癌リスクは、前向き調査の平均発癌率よりもさらに高いことも考えられる。実際に、初発肝癌「根治」後長期間が経過しても、年20%前後の高率で再発が生じている。肝癌再発の予防のためには、肝内転移のみでなく多中心性発癌に対する対策も必要である。

#### 4 肝移植

肝癌症例に対して肝移植を施行すれば、微小肝内転移巣をすべて除去するとともに、線維化のすすんだ肝臓は正常肝に置き換えられて、多中心性発癌も抑制されると考えられ、肝癌再発予防に関しては理論上理想的な治療法といえる。また、外科的肝切除術や内科的焼灼療法と異なり、肝移植ではレシピエントの肝機能不良は禁忌とならず、むしろ腫瘍とともに肝不全の根治療法ともなる。ただし、脳死臓器ドナーの数はわが国では極めて限られており、2004年7月までに脳死肝移植は25件行われたにすぎない。このような状況下では脳死肝移植を前提として治療計画を立てることは現実的でない。そのような状況もあって、わが国では生体部分肝移植が発達し、2003年までに2,600件以上行われている。

## 5 抗ウイルス療法

初期は小児に対する成人肝の移植が主であったが、その後成人間の移植も多く行われるようになった。2004年からは、成人への生体部分肝移植に健康保険が適用されるようになり、肝癌合併症例でも最大腫瘍径3 cm以下かつ腫瘍数3個以内、または単発径5 cm以下であれば健康保険の対象となる。これにより、肝癌患者が肝移植を受ける機会はさらに増えると考えられる。ちなみに、この腫瘍条件はミラノ基準<sup>7)</sup>と呼ばれるものと同一であり、これを超えると癌の再発の可能性が高く、免疫抑制剤使用下の再発は一般に進行が早く、予後不良となる。

生体部分肝移植においてはドナーに関して身体的および社会的制約があり、適切なドナーが存在しない場合も多い。また、ウイルス性肝炎を基盤とする肝癌症例に固有の重要な問題として、移植後の肝炎再発と、免疫抑制剤使用による増悪の危険性があげられる。HBVでは最悪の場合劇症肝炎の発症も考えられるが、HBV陽性レシピエントに対しては移植後に抗HBVヒト免疫グロブリン(HBIG)や抗ウイルス剤ラミブジンを用いることによって大部分の症例が良好にコントロールされている。ラミブジン耐性のHBV変異株が出現する問題も、現在ではアデフォビルによって対応可能である。現時点では、むしろHCV対策に問題が残されている。C型慢性肝炎は本来進行の緩徐な疾患であり、自然経過では肝硬変に至るのに早くても20年、平均では40年程かかると考えられているが、移植後の免疫抑制下では10年で完成した肝硬変に至ることも少なくない。PEGインターフェロンとリバビリンによる抗ウイルス療法などが試されている。

肝移植を別とすると、現在のところ直接に肝細胞を再生させたり、蓄積した線維を溶解せしめるような治療法は存在しない。肝硬変とは肝臓における壊死、炎症が持続して膠原線維の蓄積が進み、肝小葉構造の改築に至った状態であり、原因の如何を問わず慢性肝疾患の終末像とされてきた。慢性肝炎の原因が不明であった時代には、肝硬変は臨床的にも終末期であったといえよう。しかし、慢性肝炎の主な原因としてのHCV、HBVが明らかとなり、特にHCVにおいては抗ウイルス療法による実質的な駆除が可能となった今でも肝硬変は不可逆なのであろうか。われわれはC型慢性肝炎・肝硬変に対するインターフェロン療法を受けた患者について、治療前後の肝生検像を比較、報告したが、HCVが持続陰性化した症例では炎症のみでなく線維化も有意に改善していた。特に肝硬変症例においては、平均3.2年の観察期間中に24名中11名で組織学的に非肝硬変に移行した<sup>8)</sup>。また、前向きコホート研究では、肝硬変であってもHCV持続陰性化によって肝癌発生の抑止と肝不全死の阻止が可能であることを示した<sup>9)</sup>。そこで、同様の効果は肝癌治療後の患者においても期待できると考え、われわれは肝癌治療後症例についてインターフェロン治療の無作為化比較対照試験(RCT)を行った<sup>9)</sup>。エタノール注入療法によって局所的に「根治」したC型肝癌患者を対象としたが、当時のインターフェロン単独療法の著効率を鑑みて、対象は比較的低ウイルス量の症例に限り、また、非代償性肝硬変を除外した。治療群49名は600万単位週3回のインターフェロン投与を48週続け、その結果14名でHCV持続陰性化が得られ、他の7名がHCV陽性

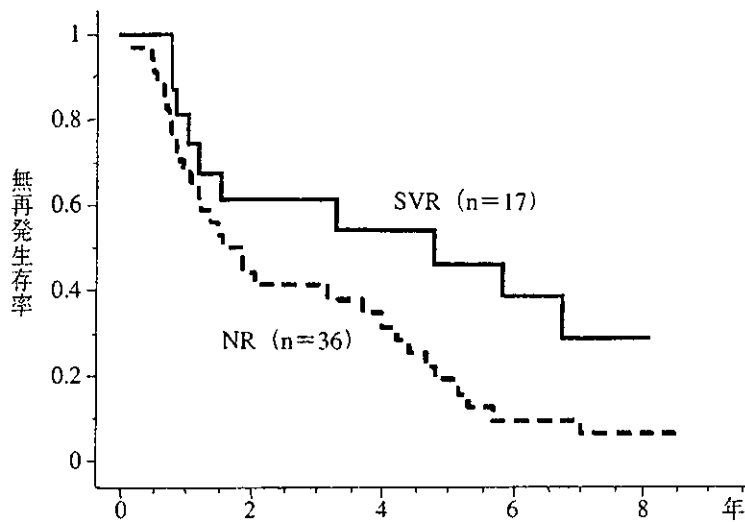


図2 C型肝癌治療後のインターフェロン療法と肝癌再発

東京大学消化器内科でC型肝癌の根治的焼灼療法後、インターフェロン療法を行った53症例の無再発生存率。

SVR：HCV持続陰性化，NR：HCV陽性。当初の再発には差がないが、2年目以降SVR群で再発が少ない傾向がみられる。

ながらALTの持続正常化を示した。他に25名は非治療群に割り付けられた。累積生存率では治療群が有意に良好であったが治療後最初の再発は、治療群においても5年間で80%という高率で発生し、両群間に統計的有意差は認められなかった。治療群の生存率改善については、特にHCV持続陰性化例で肝機能の悪化がみられず、たとえ肝癌を再発しても十分な治療を繰り返すことができたためと考えられる。肝癌再発について、その後観察期間を伸ばしていくと、初発治療後後期の再発はHCV持続陰性化例で少ない傾向がみられるようになった(図2)。インターフェロン療法が肝内転移巣に対して抗腫瘍効果を有することを示唆する報告もあるが<sup>10)</sup>、上記の成績からわれわれはインターフェロン単独療法の肝内転移に対する効果は限定的であるが、多中心性発癌に対する抑止効果を持つと考えている。なお、外科切除術後症例に対するRCTにおいて、インターフェロン療法による生存率の改善も報告されている<sup>11)</sup>。現行の健康保険の規定では肝硬変はインターフェロンの禁忌事項となっているが、肝癌再発と肝不全死のリスクが最も高いのが肝癌治療後の患者であり、その多くが肝硬変を伴っていることを考えると、この規定には再検討

が必要だと思われる。

## 6 その他の再発予防療法

臨床の場合には、インターフェロンによる抗ウイルス療法以外にも、ウルソ、SNMCなどの肝庇護療法や瀉血療法などが炎症の沈静化を目的として行われており、それらは初発肝癌の抑止に寄与していると考えられる。これらの治療には多中心性発癌による再発を抑える効果も期待できるであろう<sup>12)</sup>。しかし、すでに微小肝内転移が存在する場合には、転移巣に作用して再発の顕在化を阻止するような効果は期待できないであろう。初発肝癌切除後に再発が頻発することは以前から知られており、外科切除例を中心に補助療法の試みがなされてきた。術前肝動脈塞栓術<sup>13)</sup>、術後肝動注化学療法<sup>14,15)</sup>などが行われているが、再発予防および生存率の改善効果についての評価は定まっていない。肝癌症例では肝機能自体が良好でない場合が多く、肝機能を悪化させるような補助療法は生存率を低下させる可能性がある。副作用の比較的少ない薬剤として、非環式レチノイドの肝癌再発抑止効果が報告されており<sup>16)</sup>、肝内転移巣に作用する可能性が考えられている。また、肝発癌予防効果が報告されているビタミンK<sup>17)</sup>を用



いて、肝癌再発予防の試みも行われている。

## 7 おわりに

肝癌の診断と治療には大きな進歩があったが、初発癌「根治」後の再発肝癌対策が重要な課題として残っている。肝移植は肝内転移、多中心性発癌、肝不全のすべてに対する有効な治療法であるが、生体部分肝移植においてもドナーの問題が残る。C型肝癌治療後のインターフェロン療法は生命予後を改善するが、肝内転移への効果は明らかでなく、肝臓への負担の少ない補助療法の確立が望まれる。

### 文 献

- 1) Yoshida H, Shiratori Y, Moriyama M et al : Interferon therapy reduces the risk for hepatocellular carcinoma: national surveillance program in Japan of cirrhotic and non-cirrhotic patients with chronic hepatitis C. *Ann Int Med* 131 : 174-181, 1999
- 2) Kasahara A, Hayashi N, Mochizuki K et al : Risk factors for hepatocellular carcinoma and its incidence after interferon treatment in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 27 : 1394-1402, 1998
- 3) Imai Y, Kawata S, Tamura S et al : Relation of interferon therapy and hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis C. *Ann Intern Med* 129 : 94-99, 1998
- 4) Yoshida H, Tateishi R, Arakawa Y et al : Benefit of interferon therapy in hepatocellular carcinoma prevention for individual patients with chronic hepatitis C. *Gut* 53 : 425-430, 2004
- 5) 日本肝癌研究会編：原発性肝癌取扱い規約，第4版，金原出版，東京，2001
- 6) Sakon M, Umeshita K, Nagano H et al : Clinical significance of hepatic resection in hepatocellular carcinoma: analysis by disease-free survival curves. *Arch Surg* 135 : 1456-1459, 2000
- 7) Mazzaferro V, Regalia E, Doci R et al : Liver transplantation for the treatment of small hepatocellular carcinomas in patients with cirrhosis. *N Engl J Med* 334 : 693-699, 1996
- 8) Shiratori Y, Imazeki F, Moriyama M et al : Histologic improvement of fibrosis in patients with hepatitis C who have sustained response to interferon therapy. *Ann Int Med* 132 : 517-524, 2000
- 9) Shiratori Y, Shiina S, Teratani T et al : Interferon therapy after tumor ablation improves prognosis in patients with hepatocellular carcinoma associated with hepatitis C virus. *Ann Int Med* 138 : 299-306, 2003
- 10) Ikeda K, Arase Y, Saitoh S et al : Interferon beta prevents recurrence of hepatocellular carcinoma after complete resection or ablation of the primary tumor: a prospective randomized study of hepatitis C virus-related liver cancer. *Hepatology* 32 : 228-232, 2000
- 11) Kubo S, Nishiguchi S, Hirohashi K et al : Randomized clinical trial of long-term outcome after resection of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma by postoperative interferon therapy. *Br J Surg* 89 : 418-422, 2002
- 12) Tarao K, Rino Y, Ohkawa S et al : Close association between high serum alanine aminotransferase levels and multicentric hepatocarcinogenesis in patients with hepatitis C virus-associated cirrhosis. *Cancer* 94 : 1787-1795, 2002
- 13) Harada T, Matsuo K, Inoue T et al : Is preoperative hepatic arterial chemoembolization safe and effective for hepatocellular carcinoma. *Ann Surg* 224 : 4-9, 1996
- 14) Nonami T, Isshiki K, Katoh H et al : The potential role of postoperative hepatic artery chemotherapy in patients with high-risk hepatomas. *Ann Surg* 213 : 222-226, 1991
- 15) Izumi R, Shimizu K, Iyobe T et al : Postoperative adjuvant hepatic arterial infusion of lipiodol containing anticancer drugs in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 20 : 295-301, 1994
- 16) Muto Y, Moriwaki H, Ninomiya M et al : Prevention of second primary tumors by an acyclic retinoid, polyprinoic acid, in patients with hepatocellular carcinoma. Hepatoma Prevention Study Group. *N Engl J Med* 334 : 1561-1567, 1996
- 17) Habu D, Shiomi S, Tamori A et al : Role of vitamin K2 in the development of hepatocellular carcinoma in women with viral cirrhosis of the liver. *JAMA* 292 : 358-361, 2004



## Vitamin K2 binds 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 4 and modulates estrogen metabolism

Motoyuki Otsuka<sup>a,\*</sup>, Naoya Kato<sup>a</sup>, Tohru Ichimura<sup>b</sup>, Shinya Abe<sup>c</sup>, Yasuo Tanaka<sup>c</sup>, Hiroyoshi Taniguchi<sup>a</sup>, Yujin Hoshida<sup>a</sup>, Masaru Moriyama<sup>a</sup>, Yue Wang<sup>a</sup>, Run-Xuan Shao<sup>a</sup>, Dharel Narayan<sup>a</sup>, Ryosuke Muroyama<sup>a</sup>, Fumihiko Kanai<sup>a</sup>, Takao Kawabe<sup>a</sup>, Toshiaki Isobe<sup>b</sup>, Masao Omata<sup>a</sup>

<sup>a</sup>*Department of Gastroenterology, Graduate School of Medicine, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan*

<sup>b</sup>*Department of Chemistry, Graduate School of Science, Tokyo Metropolitan University, 1-1 Minami Osawa, Hachioji-shi, Tokyo 192-0364, Japan*

<sup>c</sup>*Tsukuba Research Laboratories, Eisai Co., Ltd., 5-1-3 Tokodai Tsukuba-shi, Ibaragi 300-2635, Japan*

Received 25 September 2004; accepted 21 December 2004

### Abstract

Vitamin K is a cofactor for  $\gamma$ -glutamyl carboxylase, an enzyme that is important for blood coagulation. Recent studies have shown that vitamin K has other roles, in addition to post-transcriptional modification, such as bone metabolism and antitumoral actions; these findings have indicated that there might be unknown intracellular binding proteins that are specific for vitamin K. In this study, vitamin K-binding proteins were characterized by pull-down experiment using a chemically synthesized biotinylated vitamin K followed by mass spectrometric identification of the pull-downed components. The results indicated that 17 $\beta$  hydroxy steroid dehydrogenase 4, apolipoprotein E, and 40S ribosomal proteins S7 and S13 might be the candidates of the vitamin K-binding proteins. Subsequent experiments showed that vitamin K2 binds 17 $\beta$  hydroxysteroid dehydrogenase 4 and decreases the intracellular estradiol:estrone ratio, which resulted in the inhibition of the

\* Corresponding author. Tel.: +81 33 815 5411; fax: +81 33 814 0021.  
E-mail address: [motoootsuka-gi@umin.ac.jp](mailto:motoootsuka-gi@umin.ac.jp) (M. Otsuka).

amount of estrogen receptor  $\alpha$ -binding to its target DNA. These results suggest a possible novel role for vitamin K in modulating estrogen function.

© 2005 Elsevier Inc. All rights reserved.

*Keywords:* Vitamin K; 17 $\beta$ -HSD4; Estrogen; Mass spectrometry

---

## Introduction

Vitamin K is crucial for blood coagulation. The role of vitamin K as a cofactor in normal blood coagulation involves the post-translational modification of several plasma proteins including prothrombin, coagulation factors, and proteins C, S, and Z. The enzymatic carboxylation of these proteins by  $\gamma$ -glutamyl carboxylase depends on the vitamin K-dependent  $\gamma$  carboxylase, which requires the reduced hydroquinone form of vitamin K as a cofactor (Dahlback, 2000).

In addition to the aforementioned functions of vitamin K, recent studies by us and others have revealed that vitamin K plays a role in several functions that do not involve post-transcriptional modification, such as acting as a cofactor in bone metabolism and having antitumor actions in various cancer cells (Habu et al., 2004; Otsuka et al., 2004; Lamson and Plaza, 2003; Zittermann, 2001). Although the precise mechanisms that underlie these functions of vitamin K are largely unknown, these functions suggest that there might be specific intracellular binding proteins for vitamin K (Carlberg, 1999). The purpose of this study was to elucidate the intracellular binding proteins of vitamin K<sub>2</sub>.

## Materials and methods

### *Chemicals*

Vitamin K<sub>2</sub> (menatetrenone), spacer-conjugated vitamin K<sub>2</sub>, and biotinylated vitamin K<sub>2</sub> were synthesized chemically by a commercial vendor (Eisai, Tsukuba, Japan).

### *Cell lines*

The human hepatoblastoma cell line HepG2 and the human embryonic kidney cell line 293T were obtained from the Riken cell bank (Tsukuba Science City, Japan) and were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (Gibco, Gaithersburg, MD) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum.

### *Effect of vitamin K<sub>2</sub> on des- $\gamma$ -carboxy prothrombin production*

To compare the effects of biotinylated vitamin K<sub>2</sub> with those of natural (non-biotinylated) vitamin K<sub>2</sub>, des- $\gamma$ -carboxy prothrombin (DCP) production by HepG2 cells was measured after the addition of the aforementioned vitamins. On the first day,  $5 \times 10^4$  cells/well were seeded onto 6-well plates. The

culture medium was changed the next day for medium that contained 0, 10, or 50  $\mu\text{M}$  vitamin K2. Two days later, the concentration of DCP in the medium was measured using the commercial services of SRL laboratories (Tokyo, Japan).

#### *Precipitation and peptide sequencing*

To examine the binding proteins of vitamin K2,  $4 \times 10^5$  HepG2 cells were incubated for 6 h with or without 50  $\mu\text{M}$  biotinylated vitamin K2. Cell extracts were prepared in 200  $\mu\text{l}$  of precipitation buffer that contained 50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 0.1% NP-40, 1 mM EDTA, 0.25% gelatin, 0.02% sodium azide, 100  $\mu\text{g/ml}$  phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1  $\mu\text{g/ml}$  aprotinin. Proteins were precipitated by the addition of 20  $\mu\text{l}$  NeutrAvidin (Pierce, Rockford, IL), which is an avidin derivative with exceptionally low nonspecific binding properties. After 4 washes with precipitation buffer, the precipitated proteins were resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and were visualized with silver staining, as described previously (Ichimura et al., 1995). The protein bands that appeared only in the vitamin K2-treated sample lane were excised from the gel, and in-gel digested as described previously (Ichimura et al., 1995; Taoka et al., 2003). The peptide mixture was applied to a direct nano-flow liquid chromatography - high-resolution quadrupole time-of-flight hybrid mass spectrometer (Q-TOF; Micromass) system, and assigned to proteins by database search as described (Natsume et al., 2002).

#### *Construction of mammalian expression plasmids for 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 4*

The mammalian expression plasmid pcDNA3-h17 $\beta$ -HSD4 that was used for recombinant expression of human full-length 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 4 (17 $\beta$ -HSD4) was provided by Prof. Adamski (GSF-National Research Center, Neuherberg, Germany) (Adamski and Jakob, 2001). A 17 $\beta$ -HSD4 protein expression plasmid (pTri-HA-17 $\beta$ -HSD4) tagged at the N-terminal with hemagglutinin (HA) (YPYDVPDYA) was made by subcloning a polymerase chain reaction (PCR)-amplified 17 $\beta$ -HSD4 cDNA fragment obtained by digestion with *Sma*I and *Not*I into the pTriEx-1.1 vector (Novagen, San Diego, CA). pcDNA3-h17 $\beta$ -HSD4 was used as the template. The reconstructed plasmids were sequenced using an autosequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA) to confirm appropriate gene integration. Expression of the cloned gene was confirmed by immunoblotting extracts of the transfected 293T cells with an anti-HA antibody (Roche, Mannheim, Germany).

#### *Transfection, precipitation, and Western blot*

Precipitation and Western blot analysis was performed to confirm the results of the peptide sequencing. HepG2 cells were seeded onto 6-well plates ( $5 \times 10^4$  cells/well). One day later, the cells were transfected with 1  $\mu\text{g}$  of the pTri-HA-17 $\beta$ -HSD4 or pTri vector using the FuGENE 6 Transfection Reagent (Roche), according to the manufacturer's instructions. After 36 h, cells were incubated for 6 h with or without 50  $\mu\text{M}$  biotinylated vitamin K2 before being harvested. Cell extracts were prepared in 200  $\mu\text{l}$  of precipitation buffer, and were precipitated by the addition of 20  $\mu\text{l}$  NeutrAvidin. After washing with precipitation buffer, the precipitated proteins were probed by



## Results

### *Biotinylated vitamin K2 maintained $\gamma$ -carboxylase cofactor activity*

To examine whether the synthetic biotinylated vitamin K2 maintained  $\gamma$ -carboxylase cofactor activity (a well-known function of natural vitamin K2), the conversion of DCP to prothrombin was measured by incubating DCP-producing HepG2 cells with natural or biotinylated vitamin K2 (Fig. 1). As shown in Table 1, biotinylated vitamin K2 decreased the production of DCP but did not affect alpha-

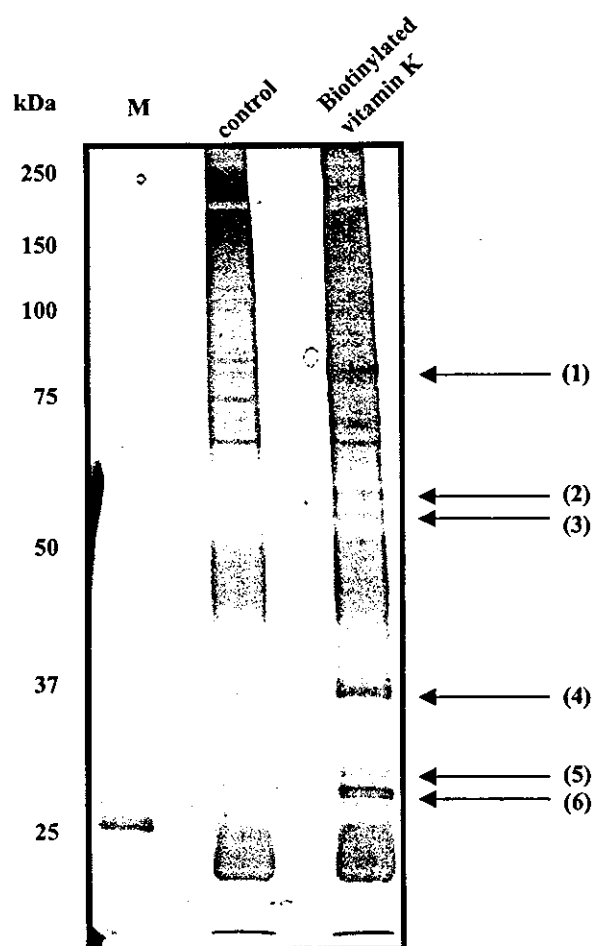


Fig. 2. The bands for mass spectrometric analysis. HepG2 cells were incubated for 6 h with or without 50  $\mu$ M biotinylated vitamin K2. Cell lysates were precipitated, resolved by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, and visualized with silver staining. Six protein bands that appeared only in the samples from vitamin K2-treated cells were excised and analyzed by the LC-MS system. Arrows indicate the bands that were sequenced. The bands corresponded to the following proteins: (1) 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 4 (17 $\beta$ -HSD4); (2) apolipoprotein E; (3) 17 $\beta$ -HSD4; (4) 17 $\beta$ -HSD4; (5) 40S ribosomal protein S7; and (6) 40S ribosomal protein S1.

fetoprotein (AFP) production; both of these effects resembled the effects of natural vitamin K2. Therefore, we concluded that biotinylated vitamin K2 mimicked the effects of natural vitamin K2.

#### Identification of vitamin K2-binding proteins

Precipitation and mass spectrometric peptide analysis were carried out to identify vitamin K2-binding proteins. We noted six protein bands that appeared only in the protein extracts from cells treated with biotinylated vitamin K2 (Fig. 2). Sequencing of each of these bands and comparison of the sequences with a protein sequence database revealed that the bands corresponded to 17 $\beta$ -HSD4, apolipoprotein E, 40S ribosomal protein S7 and S13. Among these proteins, 17 $\beta$ -HSD4 was examined further.

17 $\beta$ -HSD4 was identified from the bands (1), (3) and (4) (Fig. 2). The data base analysis of the MS/MS spectrum of the peptide obtained from band (1) showed that it corresponded to the sequence LLGTIYTAAEEIEAVGGK, ATSTATSGFAGAIGQK, and KVNAVFEWHITK of 17 $\beta$ -HSD4 at residues 50–67, 316–331, and 645–656, respectively. They covered 6.3% of the full-length 17 $\beta$ -HSD4 amino acids. From band (3) and (4), the peptides corresponding to the sequence

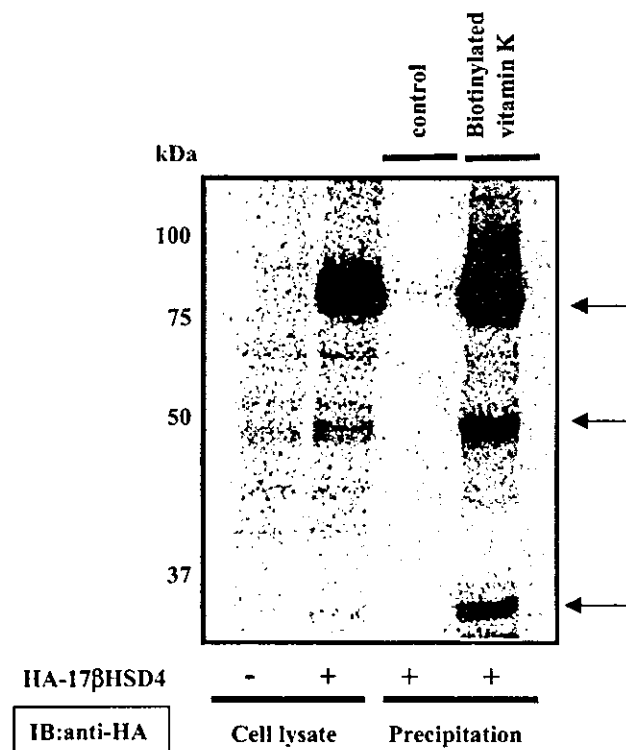


Fig. 3. Confirmation of binding of vitamin K2 and 17 $\beta$ -HSD4 using heterologous expression. HepG2 cells were transfected with pTri-HA-17 $\beta$ -HSD4 (see Methods) and were incubated with or without 50  $\mu$ M biotinylated vitamin K2 for 6 h. Cell lysates were prepared and precipitated proteins were resolved by immunoblotting with an anti-HA antibody. For reference, a fraction (1/20) of the lysate from cells that did and cells that did not express 17 $\beta$ -HSD4 were used as a reference. Arrows indicate HA-17 $\beta$ -HSD4.

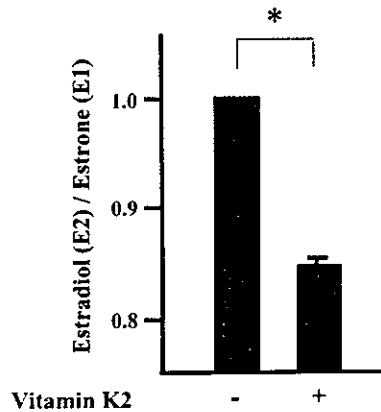


Fig. 4. Intracellular concentrations of estrone and estradiol after treatment with vitamin K2. HepG2 cells were exposed to vitamin K2 for 6 h before cell extracts were prepared to measure the concentrations of estrone (E1) and estradiol (E2). Each experiment was carried out in duplicate. \*,  $p < 0.05$ .

GALVVVNDLGGDFKGVGK, IIMTASASGIYGNFGQANYSAK, and LGLLGLANSLAIEGR of 17 $\beta$ -HSD4 at residues 33–50, 146–168, and 169–183, respectively, were obtained. They covered 5.6% and 2.0% of the full length 17 $\beta$ -HSD4 amino acids, respectively.

To confirm the MS/MS identification, an HA-tagged 17 $\beta$ -HSD4 expression plasmid was transfected into HepG2 cells, which were incubated in the presence of biotinylated vitamin K2. After precipitation, proteins were probed with an anti-HA antibody. As shown in Fig. 3, 17 $\beta$ -HSD4 was confirmed to bind vitamin K2. Consistent with a previous report (Carstensen et al., 1996), 17 $\beta$ -HSD4 was present in three bands: one band was at 80 kDa, while the other two bands were at ~46 and ~32 kDa. Each of the three forms of 17 $\beta$ -HSD4 bound vitamin K2.

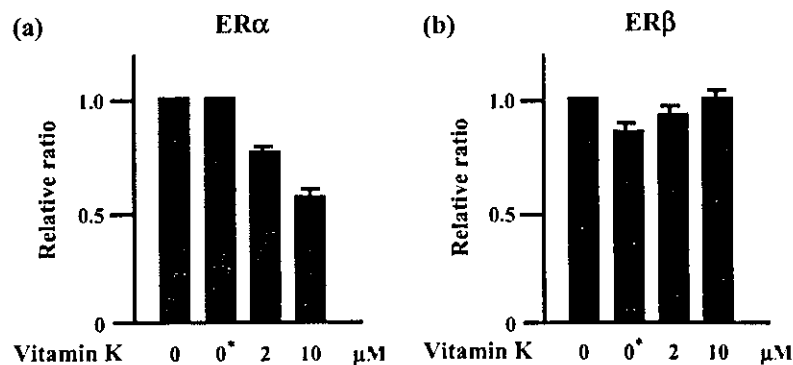


Fig. 5. Vitamin K2 decreased the amount of estrogen receptor  $\alpha$ -DNA binding. HepG2 cells were treated with vitamin K2 for 6 h and nuclear extracts were incubated with oligonucleotides containing consensus binding sequences of the estrogen receptor. The bound transcriptional factors were incubated with an anti-ER $\alpha$  antibody and binding was quantified using chemiluminescence. The absorbance of the control sample was defined as 1.0. Each experiment was carried out in duplicate. \*, control (vehicle; ethanol). \*\*,  $p < 0.05$ .



### *Vitamin K2 decreased intracellular estrogen concentrations*

Because 17 $\beta$ -HSD4 converts E2 to E1, we quantified intracellular estrogen concentrations in HepG2 cells following treatment with vitamin K2 by measuring the E2:E1 ratio. As shown in Fig. 4, 10  $\mu$ M vitamin K2 decreased the E2:E1 ratio in cells by ~25%.

### *Vitamin K2 decreased the amount of ER $\alpha$ -DNA binding*

Because E2 binds the ER, and the activated ER binds to the E2 response element (ERE) in the promoter regions of target genes (Buller and O'Malley, 1976), we examined whether vitamin K2 modulated the amount of ER-DNA binding. As shown in Fig. 5, vitamin K2 inhibited ER $\alpha$ -binding to its target DNA in a dose-dependent manner.

## **Discussion**

In the present study, we used chemically synthesized vitamin K2 and peptide sequencing to identify novel vitamin K2-binding proteins. We demonstrated that vitamin K2 bound 17 $\beta$ -HSD4 and decreased the E2:E1 ratio in vitro, which resulted in an inhibition of ER $\alpha$ -DNA binding ability.

Vitamin K is an essential nutrient associated mainly with the clotting cascade, in which it acts as a cofactor for  $\gamma$ -glutamyl carboxylase. In addition, recent studies have revealed that vitamin K is also involved in bone metabolism and has an inhibitory effect on the growth of cancerous cells. Because these functions do not require that vitamin K act as a cofactor for  $\gamma$ -glutamyl carboxylase, it was suggested that there might be unknown proteins that bind vitamin K. Indeed, we identified several novel intracellular vitamin K2-binding proteins.

Our strategy to identify the vitamin K2-interacting molecules was based on the tandem affinity purification of the newly synthesized biotinylated vitamin K2 complex with a followed by protein identification by mass spectrometry. The method enabled us to isolate a sufficient amount of the vitamin K2 complex for characterization by nanospray tandem mass spectrometry. This affinity-tag technique coupled with mass spectrometry proved to be a useful method to detect novel protein interactions.

Among the several proteins identified as vitamin K2 binding proteins, we examined 17 $\beta$ -HSD4 further in this study. From the results of peptide sequences and immunoblots after biotinylated vitamin K2 precipitation, vitamin K seemed to bind each of the known three forms of 17 $\beta$ -HSD4. However, there remains a possibility that the smaller proteins were produced during the precipitation procedures.

17 $\beta$ -HSD4 is a key enzyme that regulates important redox reactions at the C17 position of steroid hormones, converting E2 to E1 (Adamski and Jakob, 2001). ER $\alpha$  is an E2-activated transcriptional factor that binds to the ERE in the promoter regions of target genes. We found in the present study that vitamin K2 decreased E2:E1 ratio and inhibited the amount of ER $\alpha$ -DNA binding in a dose-dependent manner, although the precise relationship between the binding and functional modulation of vitamin K2 by 17 $\beta$ -HSD4 remains to be elucidated. These results may provide new knowledge of the linkage between vitamin K and estrogen function.

Recently, vitamin K was reported to have a beneficial effect on the outcome of hepatocellular carcinoma (Habu et al., 2004; Otsuka et al., 2004). Recent studies have shown that locally elevated estrogen formation in malignant human liver tissues and cells may have a role in the development and/or

maintenance of human HCC (Castagnetta et al., 2003; Tanaka et al., 2000). Our finding using HepG2 cells, a hepatocellular carcinoma cell line, may provide one of the clues to the mechanisms of beneficial vitamin K-effect on the outcome of hepatocellular carcinoma.

On the other hand, vitamin K is also reported to be useful for osteoporosis (Zittermann, 2001). This phenomenon seems to be inconsistent to the results that vitamin K decreased E2:E1 ratio in this study. However, as recently reported, estrogen related biological functions are highly divergent in different tissues (Hurst et al., 2004; Matthews and Gustafsson, 2003; Kian Tee et al., 2004). Therefore, based on our finding that vitamin K might modulate the metabolism of estrogen, clarifying the effect of vitamin K on estrogen related function in various cells and tissues might provide some opportunities for the use of vitamin K in the treatment of estrogen-mediated states.

## Conclusion

We newly identified 17 $\beta$ -HSD4 as an intracellular vitamin K binding protein using a chemically synthesized biotinylated vitamin K followed by mass spectrometric analysis. These results may provide new knowledge of the linkage between vitamin K and estrogen function.

## References

- Adamski, J., Jakob, F.J., 2001. A guide to 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol. Cell Endocrinol.* 171 (1–2), 1–4.
- Buller, R.E., O'Malley, B.W., 1976. The biology and mechanism of steroid hormone receptor interaction with the eukaryotic nucleus. *Biochem. Pharmacol.* 25 (1), 1–12.
- Carlberg, C., 1999. Lipid soluble vitamins in gene regulation. *Biofactors* 10 (2–3), 91–97.
- Carstensen, J.F., Tesdorpf, J.G., Kaufmann, M., Markus, M.M., Husen, B., Leenders, F., Jakob, F., de Launoit, Y., Adamski, J., 1996. Characterization of 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase IV. *J. Endocrinol.* 150, S3–S12.
- Castagnetta, L.A., Agostara, B., Montalto, G., Polito, L., Campisi, I., Sactta, A., Itoh, T., Yu, B., Chen, S., Carruba, G., 2003. Local estrogen formation by nontumoral, cirrhotic, and malignant human liver tissues and cells. *Cancer Res.* 63 (16), 5041–5045.
- Dahlback, B., 2000. Blood coagulation. *Lancet* 355 (9215), 1627–1632.
- Habu, D., Shiomi, S., Tamori, A., Takeda, T., Tanaka, T., Kubo, S., Nishiguchi, S., 2004. Role of vitamin K2 in the development of hepatocellular carcinoma in women with viral cirrhosis of the liver. *JAMA* 292 (3), 358–361.
- Hurst, A.G., Goad, D.W., Mohan, M., Malayer, J.R., 2004. Independent downstream gene expression profiles in the presence of estrogen receptor {alpha} or {beta}. *Biol. Reprod.* 71 (4), 1252–1261.
- Ichimura, T., Uchiyama, J., Kunihiro, O., Ito, M., Horigome, T., Omata, S., Shinkai, F., Kaji, H., Isobe, T., 1995. Identification of the site of interaction of the 14-3-3 protein with phosphorylated tryptophan hydroxylase. *J. Biol. Chem.* 270 (48), 28515–28518.
- Kian Tee, M., Rogatsky, I., Tzagarakis-Foster, C., Cvorovic, A., An, J., Christy, R.J., Yamamoto, K.R., Leitman, D.C., 2004. Estradiol and selective estrogen receptor modulators differentially regulate target genes with estrogen receptors alpha and beta. *Mol. Biol. Cell* 15 (3), 1262–1272.
- Lamson, D.W., Plaza, S.M., 2003. The anticancer effects of vitamin K. *Altern. Med. Rev.* 8 (3), 303–318.
- Matthews, J., Gustafsson, J.A., 2003. Gustafsson, estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol. Interv.* 3 (5), 281–292.
- Mindnich, R., Moller, G., Adamski, J., 2004. The role of 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol. Cell Endocrinol.* 218 (1–2), 7–20.
- Natsume, T., Yamauchi, Y., Nakayama, H., Shinkawa, T., Yanagida, M., Takahashi, N., Isobe, T., 2002. A direct nanoflow liquid chromatography-tandem mass spectrometry system for interaction proteomics. *Anal. Chem.* 74 (18), 4725–4733.

- Otsuka, M., Kato, N., Shao, R.X., Hoshida, Y., Ijichi, H., Koike, Y., Taniguchi, H., Moriyama, M., Shiratori, Y., Kawabe, T., Omata, M., 2004. Vitamin K2 inhibits the growth and invasiveness of hepatocellular carcinoma cells via protein kinase A activation. *Hepatology* 40 (1), 243–251.
- Schreiber, E., Matthias, P., Muller, M.M., Schaffner, W., 1989. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 17 (15), 6419.
- Tanaka, K., Sakai, H., Hashizume, M., Hirohata, T., 2000. Serum testosterone: estradiol ratio and the development of hepatocellular carcinoma among male cirrhotic patients. *Cancer Res.* 60 (18), 5106–5110.
- Taoka, M., Ichimura, T., Wakamiya-Tsuruta, A., Kubota, Y., Araki, T., Obinata, T., Isobe, T., 2003. V-1, a protein expressed transiently during murine cerebellar development, regulates actin polymerization via interaction with capping protein. *J. Biol. Chem.* 278 (8), 5864–5870.
- Zittermann, A., 2001. Effects of vitamin K on calcium and bone metabolism. *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 4 (6), 483–487.

## LIVER

# Proposal of a new prognostic model for hepatocellular carcinoma: an analysis of 403 patients

R Tateishi, H Yoshida, S Shiina, H Imamura, K Hasegawa, T Teratani, S Obi, S Sato, Y Koike, T Fujishima, M Makuuchi, M Omata

*Gut* 2005;54:419–425. doi: 10.1136/gut.2003.035055

**Background:** The prognosis of hepatocellular carcinoma (HCC) is highly dependent on tumour extension and liver function. Recently, two new prognostic scoring systems—the CLIP score, developed by Italian investigators and the BCLC score, developed in Barcelona—have been widely used to assess prognosis in patients presenting with hepatocellular carcinoma. Each system has its own relative limitations.

**Aims:** To create a new prognostic scoring system which is simple, easy to calculate, and suitable for estimating prognosis during radical treatment of early HCC.

**Methods:** A total of 403 consecutive patients with HCC treated by percutaneous ablation at the Department of Gastroenterology, University of Tokyo Hospital, between 1990 and 1997 were used as the training sample to identify prognostic factors for our patients and used to develop the Tokyo score. As a testing sample, 203 independent patients who underwent hepatectomy at the Department of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery were studied. Prognostic factors were analysed by univariate and multivariate Cox proportional hazard regression.

**Results:** The Tokyo score consists of four factors: serum albumin, bilirubin, and size and number of tumours. Five year survival was 78.7%, 62.1%, 40.0%, 27.7%, and 14.3% for Tokyo scores 0, 1, 2, 3, and 4–6, respectively. The discriminatory ability of the Tokyo score was internally validated by bootstrap methods. The Tokyo score, CLIP score, and BCLC staging were compared by Akaike information criterion and Harrell's c index among training and testing samples. In the testing sample, the predictive ability of the Tokyo score was equal to CLIP and better than BCLC staging.

**Conclusions:** The Tokyo score is a simple system which provides good prediction of prognosis for Japanese patients with HCC requiring radical therapy.

See end of article for authors' affiliations

Correspondence to: Dr H Yoshida, Department of Gastroenterology, University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8655, Japan; yoshida-2im@h.u-tokyo.ac.jp

Revised version received 17 June 2004  
Accepted for publication 19 June 2004

The prognosis of hepatocellular carcinoma (HCC) depends on tumour extension as well as liver function. Worldwide, most patients with hepatocellular carcinoma have cirrhosis caused by chronic viral hepatitis (hepatitis C (HCV), hepatitis B virus).<sup>1</sup> Assessment of tumour related factors in isolation, such as the tumour node metastasis (TNM) staging,<sup>2</sup> does not accurately predict the prognosis of patients who have HCC and cirrhosis.<sup>3</sup> The Child-Pugh classification has been widely used to evaluate liver function in cirrhotic patients, and has a relatively good correlation with prognosis,<sup>4</sup> but cannot be used to predict survival in patients with HCC.

Okuda staging of HCC, established in 1985, is based on tumour size and liver function, as assessed by three of the four factors used in the Child Pugh score—namely, serum albumin, bilirubin, and the presence of ascites—and for some time has been used as the gold standard for prognostic assessment of HCC patients.<sup>5</sup> However, this prognostic system was established by analysing patients mostly at an advanced stage of HCC, with a median survival of 4.1 months. With current advances in clinical practice, survival of HCC patients is now much longer, and the Okuda staging is unable to accurately predict prognosis in these patients.

Recently, several groups from Italy,<sup>6</sup> Spain,<sup>7</sup> France,<sup>8</sup> Austria,<sup>9</sup> and China<sup>10</sup> proposed new prognostic systems for HCC. While the latter three were developed using a sample of patients with advanced disease (median survival 4–8 months), the CLIP and BCLC systems developed scores based on patients with early disease. The CLIP (Cancer of the Liver Italian Program) score showed a good correlation with

the prognosis of HCC patients receiving various treatments, including surgery, percutaneous ablation, transarterial chemo-embolisation, and liver transplantation.<sup>11–14</sup> Along with liver function, as assessed by Child-Pugh stage, three tumour factors were included. Tumour morphology was divided into three categories: a single tumour  $\leq 50\%$  of the size of the liver (score 0); multinodular HCC  $\leq 50\%$  of the size of the liver (score 1); and massive HCC or tumour  $>50\%$  of the size of the liver (score 2). As in Okuda staging, tumour size was broadly divided at 50% of liver volume. Seropositivity for  $\alpha$  fetoprotein (AFP) and the presence of portal vein thrombosis were also included. However, due to advances in liver imaging techniques, especially ultrasound and computed tomography, HCC can now be detected at a much smaller size, usually smaller than 5 cm in diameter, and tumours smaller than 2 cm are frequently diagnosed. Tumour size is associated with the pathological grade of HCC, the probability of vascular invasion, and also with the prognosis of HCC patients after potentially curative treatments such as surgical resection and medical ablation.<sup>15–18</sup> However, it is not known whether a HCC of 2 cm is a determinant of prognosis as previous models have not discriminated between large and small tumours.

**Abbreviations:** HCC, hepatocellular carcinoma; TNM, tumour node metastasis; CLIP, Cancer of the Liver Italian Program; BCLC, Barcelona Clinic Liver Cancer; AIC, Akaike information criterion; PEIT, percutaneous ethanol injection therapy; PMCT, percutaneous microwave coagulation therapy; TAE, transcatheter arterial embolisation; AST, aspartate aminotransferase; AFP,  $\alpha$  fetoprotein; HCV, hepatitis C virus; HVPG, hepatic venous pressure gradient

www.gutjnl.com