

Fig. 2. Effect of bisindolylmaleimide I on HSP27 phosphorylation, and effects of TPA on HSP27 phosphorylation and PKC phosphorylation in HuH7 cells. HuH7 cells were cultured in DMEM containing 10% FCS for 7 days. After 7 days, the medium was exchanged for FCS-free DMEM. The cells were immediately used for experiments. (A) The extracts of cells were subjected to SDS-PAGE with subsequent Western blotting analysis with antibodies against phospho-PKC (pan) ( $\beta$ II Ser-660), phospho-PKC $\delta$  (Thr-505) and phospho-PKC $\theta$  (Thr-538). (B) The cultured cells were pre-treated with various doses of bisindolylmaleimide I for 60 min. The extracts of cells were subjected to SDS-PAGE with subsequent Western blotting analysis with antibodies against phospho-HSP27 (Ser-78), phospho-HSP27 (Ser-82) and total HSP27. (C, D) The cultured cells were stimulated with 0.1  $\mu\text{M}$  TPA for the indicated periods. The extracts of cells were subjected to SDS-PAGE with subsequent Western blotting analysis with antibodies against (C) phospho-HSP27 (Ser-15), phospho-HSP27 (Ser-78), phospho-HSP27 (Ser-82) and total HSP27, and (D) phospho-PKC (pan) ( $\beta$ II Ser-660), phospho-PKC $\delta$  (Thr-505) and phospho-PKC $\theta$  (Thr-538). Representative results from triplicate independent experiments with similar results are shown.

observed at a dose of 0.1  $\mu\text{M}$  (data not shown). In addition, TPA markedly enhanced the phosphorylation levels of novel PKC ( $\delta$ ,  $\epsilon$ ) in a time-dependent manner. On the contrary, the levels of both PKC $\alpha/\beta$  and PKC $\theta$  were not affected by TPA or were at least in part slightly enhanced by TPA (Fig. 2D).

#### Effects of bisindolylmaleimide I or PKC down-regulation on TPA-induced phosphorylation of HSP27 in HuH7 cells

We examined the effect of bisindolylmaleimide I on the TPA-induced phosphorylation of HSP27. Bisindolylmaleimide

I (30  $\mu\text{M}$ ) suppressed the TPA-induced phosphorylation of HSP27 (Fig. 3A). TPA-induced novel PKC( $\delta$ ,  $\epsilon$ ) phosphorylation was also suppressed by bisindolylmaleimide I (Fig. 3B).

It has been reported that treatment of TPA (0.1  $\mu\text{M}$ ) for 24 h down-regulates PKC (Blumberg, 1991). To clarify the role of PKC on the HSP27 phosphorylation in HuH7 cells, we examined the effect of TPA long term pre-treatment on the phosphorylation of HSP27. The effect of TPA on HSP27 phosphorylation was reduced in the PKC down-regulated cells compared with that in the cells without TPA treatment (Fig. 3C).

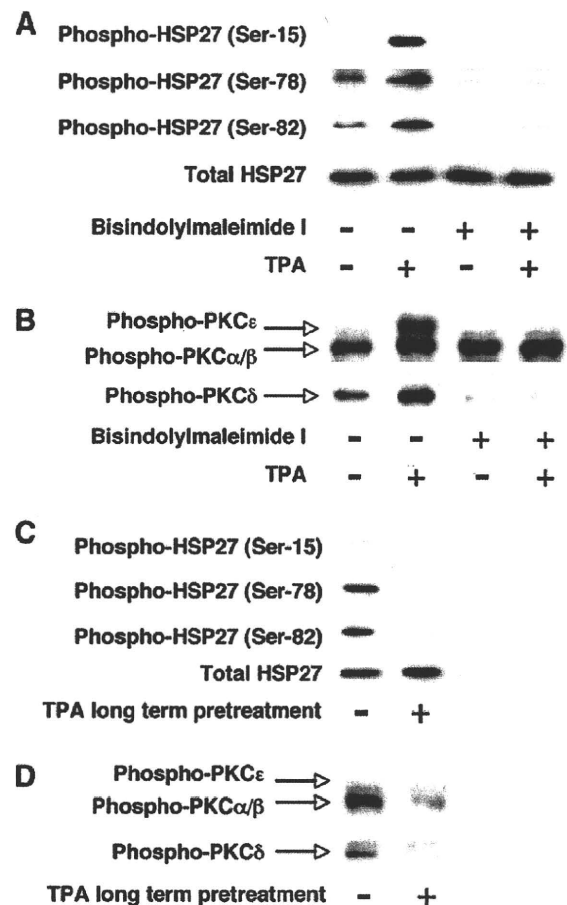


Fig. 3. Effects of bisindolylmaleimide I on TPA-induced HSP27 phosphorylation and PKC phosphorylation, and effect of PKC down-regulation on the phosphorylation of HSP27 in HuH7 cells. HuH7 cells were cultured in DMEM containing 10% FCS for 7 days. After 7 days, the medium was exchanged for FCS-free DMEM. The cells were immediately used for experiments. (A, B) The cultured cells were pre-treated with 30  $\mu\text{M}$  of bisindolylmaleimide I or vehicle for 60 min and then, stimulated by 0.1  $\mu\text{M}$  TPA or vehicle for 60 min. The extracts of cells were subjected to SDS-PAGE with subsequent Western blotting analysis with antibodies against (A) phospho-HSP27 (Ser-15), phospho-HSP27 (Ser-78), phospho-HSP27 (Ser-82) and total HSP27, and (B) phospho-PKC (pan) ( $\beta$ II Ser-660) and phospho-PKC $\delta$  (Thr-505). (C, D) The cultured cells were pre-treated with 0.1  $\mu\text{M}$  TPA or vehicle for 24 h. The extracts of cells were subjected to SDS-PAGE with subsequent Western blotting analysis with antibodies against (C) phospho-HSP27 (Ser-15), phospho-HSP27 (Ser-78), phospho-HSP27 (Ser-82) and total HSP27, and (D) phospho-PKC (pan) ( $\beta$ II Ser-660) and phospho-PKC $\delta$  (Thr-505). Representative results from triplicate independent experiments with similar results are shown.

We also found that TPA long term treatment down-regulated the phosphorylated levels of PKC $\alpha/\beta$ , PKC $\epsilon$  and PKC $\delta$  compared with those in these cells without TPA (Fig. 3D).

#### Effect of OAG on the HSP27 phosphorylation in HuH7 cells

OAG, a synthetic diacylglycerol (DAG), which is generally recognized to be a physiological activator of PKC (Nishizuka, 1991; Schutze et al., 1991), strengthened the phosphorylated levels of HSP27 in a time-dependent manner (Fig. 4A) as well as TPA. The phosphorylated levels reached its peak at 10 min after the stimulation and decreased thereafter (Fig. 4A). We next examined the effect of bisindolylmaleimide I on OAG-induced levels of HSP27 phosphorylation. Bisindolylmaleimide I (30  $\mu$ M) suppressed OAG-induced phosphorylated levels of HSP27 (Fig. 4B). In addition, OAG-induced phosphorylation of novel PKC( $\delta$ ,  $\epsilon$ ) was also suppressed by bisindolylmaleimide I (Fig. 4C).

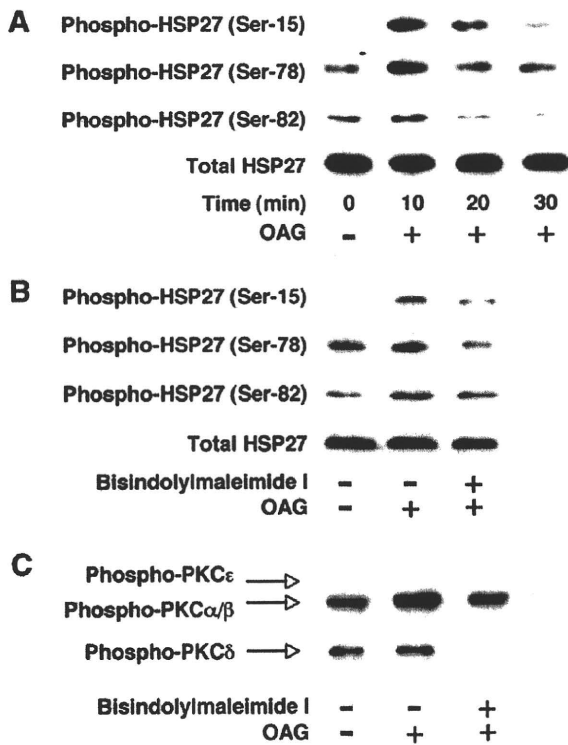


Fig. 4. Effect of OAG on the phosphorylation of HSP27, and effects of bisindolylmaleimide I on the OAG-induced HSP27 phosphorylation and PKC phosphorylation in HuH7 cells. HuH7 cells were cultured in DMEM containing 10% FCS for 7 days. After 7 days, the medium was exchanged for FCS-free DMEM. The cells were immediately used for experiments. (A) The cultured cells were stimulated with 100  $\mu$ M OAG for the indicated periods. (B, C) The cultured cells were pre-treated with 30  $\mu$ M of bisindolylmaleimide I or vehicle for 60 min, and then stimulated with 100  $\mu$ M OAG or vehicle for 10 min. The extracts of cells were subjected to SDS-PAGE with subsequent Western blotting analysis with antibodies against (A, B) phospho-HSP27 (Ser-15), phospho-HSP27 (Ser-78), phospho-HSP27 (Ser-82) and total HSP27, and (C) phospho-PKC (pan) ( $\beta$ II Ser-660) and phospho-PKC $\delta$  (Thr-505). Representative results from triplicate independent experiments with similar results are shown.

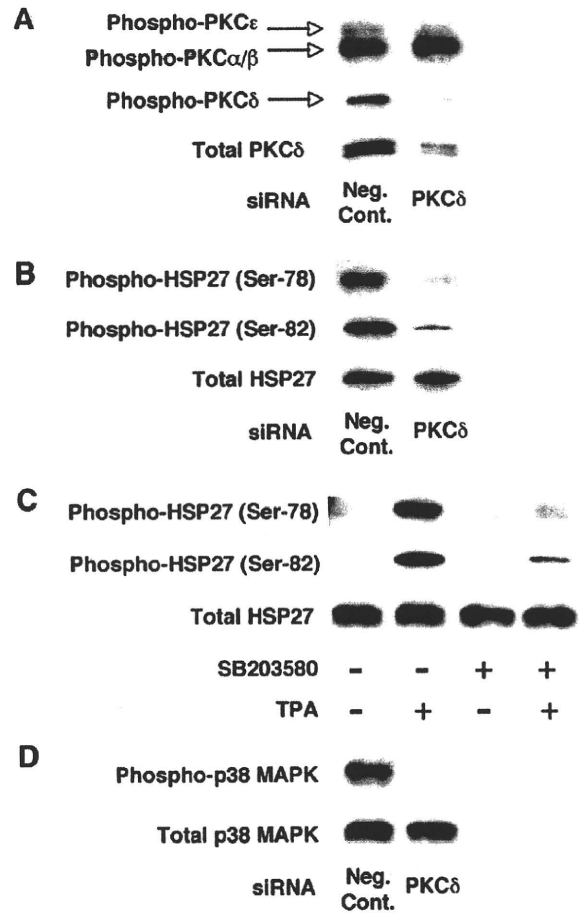


Fig. 5. Effect of gene silencing using PKC $\delta$ -siRNA-transfection into HuH7 cells and effect of SB203580 on the TPA-induced HSP27 phosphorylation in HuH7 cells. (A, B, D) HuH7 cells were cultured in DMEM containing 10% FCS for 24 h. After 24 h, the cells were incubated with 10 nM of PKC $\delta$  siRNA or negative control siRNA at 37  $^{\circ}$ C for 48 h in DMEM containing 10% FCS and subsequently harvested for preparation of Western blotting analysis. (C) HuH7 cells were cultured in DMEM containing 10% FCS for 7 days. After 7 days, the medium was exchanged for FCS-free DMEM. The cells were immediately used for experiments. The cultured cells were pre-treated with 30  $\mu$ M of SB203580 or vehicle for 60 min and then, stimulated by 0.1  $\mu$ M TPA or vehicle for 60 min. The extracts of cells were subjected to SDS-PAGE with subsequent Western blotting analysis with antibodies against (A) phospho-PKC (pan) ( $\beta$ II Ser-660), phospho-PKC $\delta$  (Thr-505) and total PKC $\delta$ , (B, C) phospho-HSP27 (Ser-78), phospho-HSP27 (Ser-82) and total HSP27, and (D) phospho-p38 MAPK and total p38 MAPK. The total PKC $\delta$  antibody confirms silencing of PKC $\delta$  protein expression, and total HSP27 antibody is used to control for loading and specificity of PKC $\delta$  siRNA. Representative results from triplicate independent experiments with similar results are shown. Neg. Cont.: negative control.

#### Effect of gene silencing using PKC $\delta$ -siRNA- or PKC $\epsilon$ -siRNA-transfection into HuH7 cells

Based on our findings, it is probable that phosphorylation of HSP27 is regulated by activation of novel PKC. To clarify which isoform of novel PKC acts in the phosphorylation of HSP27 in HuH7 cells, we examined the effect of gene silencing using PKC $\delta$ -siRNA-transfection into HuH7 cells. We found that PKC $\delta$  knock down selectively decreased expression of

PKC $\delta$  (Fig. 5A). In PKC $\delta$ -knocked down HuH7 cells, the phosphorylated levels of HSP27 were much reduced, while expression levels of total HSP27 were not changed (Fig. 5B). In addition, we examined the effect of gene silencing using PKC $\epsilon$ -siRNA-transfection into HuH7 cells. However, both phosphorylated levels of HSP27 and expression levels of total HSP27 were not changed in PKC $\epsilon$ -knocked down HuH7 cells (data not shown).

#### *Effect of SB203580 on TPA-induced HSP27 phosphorylation*

It is well-recognized that HSP27 is phosphorylated at serines 15, 78, and 82 by MAPKAP kinase 2 as a result of p38 MAPK pathway activation (Landry et al., 1992; Rouse et al., 1994). In contrast, a recent study showed that PKC $\delta$  directly binds to HSP27 and induces HSP27 phosphorylation (Lee et al., 2005). To determine whether p38 MAPK is involved in PKC $\delta$ -mediated HSP27 phosphorylation in HuH7 cells, we next investigated the effect of SB203580 (Cuenda et al., 1995), a specific inhibitor of p38 MAPK on TPA-induced HSP27 phosphorylation. SB203580 (30  $\mu$ M) almost completely suppressed TPA-induced phosphorylation of HSP27 (Fig. 5C).

To clarify whether PKC $\delta$  exerts its effect at upstream of p38 MAPK activation, we examined the effect of gene silencing of PKC $\delta$  by siRNA into HuH7 cells. PKC $\delta$  knock down markedly suppressed phosphorylation of p38 MAPK in these cells (Fig. 5D).

## **Discussion**

It has been shown that phosphorylation of HSP27 is mediated by the MAPK superfamily (Kyriakis and Avruch, 1996; Guay et al., 1997; Benjamin and McMillan, 1998). Although p44/p42 MAPK is highly activated in HCC (Ito et al., 1998; Iyoda et al., 2003), we demonstrated that phosphorylation of HSP27 was not correlated with p44/p42 MAPK activity. It has been reported that PKC is an upstream regulator of the MAPK superfamily cascade (Noguchi et al., 1993; Tanaka et al., 2003; Tokuda et al., 2003). Therefore, we examined whether PKC regulates the HSP27 phosphorylation in HCC cells. As expected, we found that the inhibition of PKC with bisindolylmaleimide I, and PKC down-regulation suppressed the basal level of HSP27 phosphorylation in HuH7 cells consistently with the previous reports (Faucher et al., 1993). In addition, the activation of PKC induced by TPA or OAG markedly strengthened HSP27 phosphorylation in HuH7 cells. Although, bisindolylmaleimide I does not seem nearly as effective as an inhibitor of HSP27 phosphorylation prior to OAG (Fig. 4B), when compared to TPA (Fig. 3A), particularly at Ser-15 and Ser-82. TPA, a phorbol ester, is known to activate PKC in an irreversible manner (Nishizuka, 1986). On the other hand, OAG is a physiological activator of PKC (Nishizuka, 1991; Schutze et al., 1991). Therefore, the effect of OAG to induce HSP 27 (shown in Fig. 4B, lane 2) was weaker than that of TPA (shown in Fig. 3A, lane 2), leading to the relative up-regulation of the band (Fig. 4B, lane 3) which shows the inhibitory effect of bisindolylmaleimide I on the OAG-induced HSP27 phosphorylation. Collectively, these findings suggest that PKC might

have a pivotal role in the HSP27 phosphorylation in human HCC.

The importance of PKC signaling in tumor cells is corroborated by investigations that characterized the roles of individual PKC isoforms in cell growth regulation and transformation (Hofmann, 1997; Mackay and Twelves, 2003). Since atypical PKC is insensitive to TPA (Nishizuka, 1991), our findings made us to speculate that classical PKC and novel PKC are the candidate for the regulator of HSP27 phosphorylation in HuH7 cells. In the present study, PKC $\delta$  and PKC $\epsilon$  were phosphorylated by TPA-stimulation and suppressed with bisindolylmaleimide I. In contrast PKC $\alpha/\beta$  were constitutively activated in HuH7 cells, and were not affected or were at least in part slightly enhanced by both TPA or bisindolylmaleimide I. Furthermore, PKC $\delta$  knock down significantly suppressed HSP27 phosphorylation in HuH7 cells. Taking these findings into account, it is most likely that activation of PKC $\delta$  regulates the phosphorylation of HSP27 in human HCC.

It is well-recognized that the MAPK cascade, in particular p38 MAPK, phosphorylates HSP27 via MAPK-activated protein kinase-2 (MAPKAPK-2), one of the substrates of p38 MAPK (Landry et al., 1992; Rouse et al., 1994; Guay et al., 1997). While, it has recently been reported that PKC $\delta$  directly binds to and phosphorylates HSP27 (Lee et al., 2005). Therefore, we next investigated whether p38 MAPK is involved in PKC $\delta$ -mediated HSP27 phosphorylation in HuH7 cells. We showed here that PKC $\delta$  knock down resulted in the suppression of p38 MAPK phosphorylation. In addition, we found that SB203580 significantly reduced the levels of HSP27 phosphorylation. Therefore, it is most likely that PKC $\delta$  mainly regulates HSP27 phosphorylation at a point upstream of p38 MAPK in human HCC.

Recent evidence suggests that PKC $\delta$  acts as a pro-apoptotic, tumor-suppressive molecule (Hofmann, 1997; Mackay and Twelves, 2003; Steinberg, 2004). Unlike PKC $\beta$  (which stimulates growth) and PKC $\epsilon$  (which acts as an oncogene when over-expressed in rat fibroblasts and promotes tumors in nude mice), PKC $\delta$  generally slows the proliferation, induces the cell cycle arrest, and/or enhances the differentiation of various undifferentiated cell lines (Steinberg, 2004). In addition, it has been reported that a PKC $\delta$ /p38 MAPK pathway mediates the pro-apoptotic effects in prostate cancer cells (Tanaka et al., 2003). Our present findings seem to be in accordance with these previous observations.

Although the role of phosphorylated HSP27 is not elucidated, it has been reported that p38 MAPK-mediated phosphorylation of HSP27 increases its association with I $\kappa$ B kinase complex to suppress TNF-mediated NF- $\kappa$ B activation (Park et al., 2003). In a previous study (Yasuda et al., 2005), we showed that attenuated phosphorylation of HSP27 correlates with the tumor progression in patients with HCC, i.e. the larger tumors exhibited lower levels of phosphorylated HSP27 than did the smaller tumors. In addition, it has been reported that the activation of p38 MAPK is inversely correlated with the tumor progression in patients with HCC (Iyoda et al., 2003). Based on these findings, it is speculated that PKC $\delta$  may prevent tumor progression through phosphorylation of HSP27. Further investigations would be required to clarify the detailed mechanism of

HSP27 phosphorylation and the role of phosphorylated HSP27 in human HCC.

In conclusion, our present results strongly suggest that PKC $\delta$  functions as an important regulator in the phosphorylation of HSP27 via p38 MAPK in human HCC.

## References

- Alessi, D.R., Cuenda, A., Cohen, P., Dulley, D.T., Sartiell, A.R., 1995. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase in vitro and in vivo. *Journal of Biological Chemistry* 270, 27484–27494.
- Arrigo, A.P., 1990. Tumor necrosis factor induces the rapid phosphorylation of the mammalian heat shock protein hsp28. *Molecular and Cellular Biology* 10, 1276–1280.
- Benjamin, I.J., McMillan, D.R., 1998. Stress (heat shock) proteins molecular chaperones in cardiovascular biology and disease. *Circulation Research* 83, 117–132.
- Blumberg, P.M., 1991. Complexities of the protein kinase C pathway. *Molecular Carcinogenesis* 4, 339–344.
- Cuenda, A., Rouse, J., Doza, Y.N., Meier, R., Cohen, P., Gallagher, T.F., Young, R.R., Lee, J.C., 1995. SB203580 is a specific inhibitor of a MAP kinase homologue which is stimulated by cellular stresses and interleukin-1. *FEBS Letters* 364, 229–233.
- Faucher, C., Capdevielle, J., Canal, I., Ferrà, P., Mazarguli, H., McGuire, W.L., Darbon, J.M., 1993. The 28-kDa protein whose phosphorylation is induced by protein kinase C activators in MCF-7 cells belongs to the family of low molecular mass heat shock proteins and is the estrogen-regulated 24-kDa protein. *Journal of Biological Chemistry* 268, 15168–15173.
- Geum, D., Son, G.H., Kim, K., 2002. Phosphorylation-dependent cellular localization and thermoprotective role of heat shock protein 25 in hippocampal progenitor cells. *Journal of Biological Chemistry* 277, 19913–19921.
- Guay, J., Lambert, H., Gingras-Breton, G., Lavoie, J.N., Huot, J., Landry, J., 1997. Regulation of actin filament dynamics by p38 MAP kinase-mediated phosphorylation of heat shock protein 27. *Journal of Cell Science* 110, 357–368.
- Hofmann, J., 1997. The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB Journal* 11, 649–669.
- Iweda, K., Saitoh, S., Koida, I., Arase, Y., Tsubota, A., Chayama, K., Kumada, H., Kawanishi, M., 1993. A multivariate analysis of risk factor for hepatocellular carcinoma: a prospective observation of 795 patients with viral and alcoholic cirrhosis. *Hepatology* 18, 47–53.
- Ito, Y., Sasaki, Y., Horimoto, M., Wada, S., Tanaka, Y., Kasahara, A., Ueki, T., Hirano, T., Yamamoto, H., Fujimoto, J., Okamoto, E., Hayashi, N., Hori, M., 1998. Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 27, 951–958.
- Iyoda, K., Sasaki, Y., Horimoto, M., Toyama, T., Yakushijin, T., Sakakibara, M., Takehara, T., Fujimoto, J., Hori, M., Wands, J.R., Hayashi, N., 2003. Involvement of the p38 mitogen-activated protein kinase cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer* 97, 3017–3026.
- Kato, K., Ito, H., Hasegawa, K., Inaguma, Y., Kozawa, O., Asano, T., 1996. Modulation of the stress-induced synthesis of hsp27 and  $\alpha$ B-crystallin by cyclic AMP in C6 glioma cells. *Journal of Neurochemistry* 66, 946–950.
- Keränen, L.M., Dutil, E.M., Newton, A.C., 1995. Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Current Biology* 5, 1394–1403.
- Koda, M., Murawaki, Y., Mitusda, A., Horie, Y., Suou, T., Kawasaki, H., Ikawa, S., 2000. Predictive factors for intrahepatic recurrence after percutaneous ethanol injection therapy for small hepatocellular carcinoma. *Cancer* 88, 529–537.
- Kumada, T., Nakano, S., Takeda, I., Sugiyama, K., Osada, T., Kiriya, S., Sone, Y., Toyoda, H., Shimada, S., Takahashi, M., Sassa, T., 1997. Patterns of recurrence after initial treatment in patients with small hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 25, 87–92.
- Kyriakis, J.M., Avruch, J., 1996. Sounding the alarm: protein kinase cascades activated by stress and inflammation. *Journal of Biological Chemistry* 271, 24313–24316.
- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Landry, J., Lambert, H., Zhou, M., Lavoie, J.N., Hickey, E., Weber, L.A., Anderson, C.W., 1992. Human HSP27 is phosphorylated at serines 78 and 82 by heat shock and mitogen-activated kinases that recognize the same amino acid motif as S6 kinase II. *Journal of Biological Chemistry* 267, 794–803.
- Lee, Y.J., Lee, D.H., Cho, C.K., Bae, S., Jhon, G.I., Lee, S.J., Soh, J.W., Lee, Y. S., 2005. HSP25 inhibits protein kinase C delta-mediated cell death through direct interaction. *Journal of Biological Chemistry* 280, 18108–18119.
- Mackay, H.J., Twelves, C.J., 2003. Protein kinase C: a target for anticancer drugs? *Endocrine-Related Cancer* 10, 389–396.
- Maizels, E.T., Peters, C.A., Kline, M., Cutler Jr., R.E., Shanmugam, M., Hunzicker-Dunn, M., 1998. Heat-shock protein-25/27 phosphorylation by the delta isoform of protein kinase C. *Biochemical Journal* 332 (Pt 3), 703–712.
- Nishizuka, Y., 1991. Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* 233, 305–312.
- Noguchi, T., Metz, R., Chen, L., Mattei, M.G., Carrasco, D., Bravo, R., 1993. Structure, mapping, and expression of erp, a growth factor-inducible gene encoding a nontransmembrane protein tyrosine phosphatase, and effect of ERP on cell growth. *Molecular and Cellular Biology* 13, 5195–5205.
- Park, K.J., Gaynor, R.B., Kwak, Y.T., 2003. Heat shock protein 27 association with I kappa B kinase complex regulates tumor necrosis factor alpha-induced NF-kappa B activation. *Journal of Biological Chemistry* 278, 35272–35278.
- Rouse, J., Cohen, P., Trigon, S., Morange, M., Alonso-Llamazares, A., Zamaniillo, D., Hunt, T., Nebreda, A.R., 1994. A novel kinase cascade triggered by stress and heat shock that stimulates MAPKAP kinase-2 and phosphorylation of the small heat shock proteins. *Cell* 78, 1027–1037.
- Saito, K., Kikkawa, U., Nishizuka, Y., 2001. The family of protein kinase C and membrane lipid mediators. *Diabetes Complications* 16, 4–8.
- Schutze, S., Berkovic, D., Tomsing, O., Unger, C., Kronke, M., 1991. Tumor necrosis factor induces rapid production of 1 $\alpha$ 25-dihydroxycholesterol by a phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *Journal of Experimental Medicine* 174, 975–988.
- Shiratori, Y., Yoshida, H., Omata, M., 2001. Different clinicopathological features of hepatocellular carcinoma in relation to causative agents. *Journal of Gastroenterology* 37, 73–78.
- Shimada, M., Takenaka, K., Taguchi, K., Fujiwara, Y., Kajiyama, K., Maeda, T., Shirabe, K., Yanaga, K., Sugimachi, K., 1998. Prognostic factors after repeat hepatectomy for recurrent hepatocellular carcinoma. *Annals of Surgery* 227, 80–85.
- Steinberg, S.F., 2004. Distinctive activation mechanism and function for protein kinase C $\delta$ . *Biochemical Journal* 384, 449–459.
- Tanaka, Y., Gavrielides, M.V., Mitsuuchi, Y., Fujii, T., Kazanietz, M.G., 2003. Protein kinase C promotes apoptosis in LNCaP prostate cancer cells through activation of p38 MAPK and inhibition of the Akt survival pathway. *Journal of Biological Chemistry* 278, 33753–33762.
- Tokuda, T., Harada, A., Hirade, K., Matsuno, H., Ito, H., Kato, K., Oiso, Y., Kozawa, O., 2003. Incadronate amplifies prostaglandin F2 alpha-induced vascular endothelial growth factor synthesis in osteoblasts. Enhancement of MAPK activity. *Journal of Biological Chemistry* 278, 18930–18937.
- Toullec, D., Pianetti, P., Coste, H., Bellevergue, P., Grand-Perret, T., Ajakane, M., Baudet, V., Boissin, P., Boursier, E., Loriolle, L., Duhamel, L., Charon, D., Kirlowsky, J., 1991. The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 266, 15771–15781.
- Welch, W.J., 1985. Phorbol ester, calcium ionophore, or serum added to quiescent rat embryo fibroblast cells all result in the elevated phosphorylation of two 27,000-dalton mammalian stress proteins. *Journal of Biological Chemistry* 260, 3058–3062.
- Yasuda, E., Kumada, T., Takai, S., Ishisaki, A., Noda, T., Matsushima-Nishiwaki, R., Yoshimi, N., Kato, K., Toyoda, H., Kaneoka, Y., Yamaguchi, A., Kozawa, O., 2005. Attenuated phosphorylation of heat shock protein 27 correlates with tumor progression in patients with hepatocellular carcinoma. *Biochemical Biophysical Research Communications* 337, 337–342.

## PIVKA-IIと治療：内科系

熊田 卓\* 豊田 秀徳\* 桐山 勢生\*  
 曾根 康博\* 谷川 誠\* 久永康 宏\*  
 金森 明\* 中野 聡\*

索引用語：PIVKA-II，肝細胞癌，門脈腫瘍塞栓，ラジオ波焼灼術（RFA）

### はじめに

肝細胞癌(HCC)には $\alpha$ -fetoprotein (AFP), lens culinaris agglutinin A-reactive  $\alpha$ -fetoprotein (AFP-L3分画) および protein induced vitamin K absence-II (PIVKA-II) の3種類の腫瘍マーカーがあり，日常臨床においては適宜組み合わせて測定されている。

PIVKA-IIは1984年にLiebmanらにより初めてHCCの新しい腫瘍マーカーとして有用であることが報告された<sup>1,2)</sup>。本邦ではFujiyamaらによりモノクローナルのPIVKA-II抗体を用いて同様の結果が報告され，しかもAFPとの相関性がないことからAFPに加え同時測定の実用性が強調されてきた<sup>3,4)</sup>。そして1989年3月に保険収載となり，その後HCCの腫瘍マーカーとして広く普及するに至った。現在は電気化学発光免疫測定法(electrochemiluminescence immunoassay; ECLIA法)を用いた高感度PIVKA-II測定

キット(最小検出感度10 mAU/ml)が主に用いられている<sup>5-7)</sup>。本稿ではこの高感度PIVKA-II測定キット(ピコルミPIVKA-II，エーザイ株式会社)を用いて治療効果判定における有用性につき自験例を中心に検討した。

### 2 切除標本例での血中PIVKA-II

背景因子が最も正確なHCC切除例134例での血中PIVKA-II陽性例と陰性例での臨床的病理学的特徴について検討した。

背景因子では性別，年齢，成因，基礎の肝機能(Child-Pugh分類)は陽性例と陰性例で差を認めなかった(表1)。HCCのサイズとPIVKA-II値との関係では，陽性例で $4.5 \pm 3.5$  cm，陰性例で $2.4 \pm 1.7$  cmと陽性例で有意に大きかった( $p < 0.0001$ )。また腫瘍個数は陽性例で $1.5 \pm 1.1$ 個，陰性例で $1.2 \pm 0.4$ 個と陽性例で有意に多かった( $p = 0.0408$ )。さらにstageが進行するにつれて血中PIVKA-IIの陽性例は増加した( $p < 0.0001$ )。図1は腫瘍の

Takushi KUMADA: Evaluation of therapeutic efficacy by PIVKA-II

\*大垣市民病院消化器科 [〒503-8502 岐阜県大垣市南頬町4-86]

表1 切除例134例での背景

	PIVKA-II陽性 ≥40 mAU/ml (n=71)	PIVKA-II陰性 <40 mAU/ml (n=63)	p value
性別 (男/女)	55/16	41/22	NS <sup>1</sup>
年齢 (歳)	65.1 ± 7.3	63.4 ± 7.4	NS <sup>1</sup>
肝炎ウイルス (B/C/B+C/非B非C)	13/45/1/12	12/45/1/5	NS <sup>1</sup>
Child-Pugh分類 (A/B)	56/15	53/10	NS <sup>1</sup>
平均腫瘍径 (cm)	4.5 ± 3.5	2.4 ± 1.7	<0.0001
腫瘍個数	1.5 ± 1.1	1.2 ± 0.4	0.0408
Stage (I/II/III/IVA)	12/25/27/7	34/21/8/0	<0.0001

1: NS: not significant.

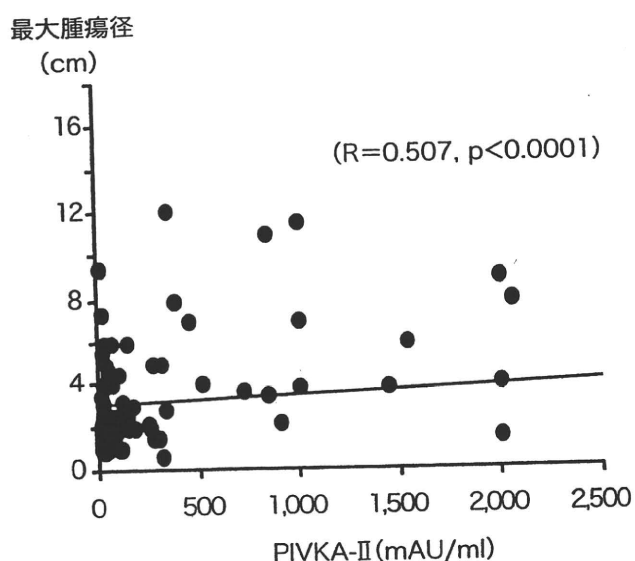


図1 腫瘍サイズとPIVKA-II

最大径と血中PIVKA-IIの相関を見たものである。弱いながらも正の相関を示している ( $R = 0.507, p < 0.0001$ )。

一方、病理組織学的な検討では発育様式 (膨張性/浸潤性), 被膜形成 (+/-), 胆管侵襲 (+/-), 分化度 (高分化型/中分化型/低分化型) で差は認めなかった (表2)。一般に高分化型では陽性率が低く, 中・低分化型では陽性率が高いとされているが<sup>8)</sup>, 今回の検討では差は認めなかった。これに対して被膜浸潤の有無, 隔壁形成の有無では血中PIVKA-II陽性例が陰性例に比して有意に高率となっていた ( $p = 0.0403, p = 0.0221$ )。さら

表2 組織学的所見 (n = 134)

	PIVKA-II陽性 ≥40 mAU/ml (n=71)	PIVKA-II陰性 <40 mAU/ml (n=63)	p value
発育様式 (膨張性/浸潤性)	64/ 7	59/ 4	NS <sup>1</sup>
被膜形成 (+/-)	44/27	37/26	NS <sup>1</sup>
被膜浸潤 (+/-)	15/56	5/58	0.0403
隔壁形成 (+/-)	37/34	20/43	0.0228
門脈侵襲 (+/-)	19/52	3/60	0.0008
肝静脈侵襲 (+/-)	8/63	1/62	0.0358
胆管侵襲 (+/-)	3/68	0/63	NS <sup>1</sup>
肝内転移 (+/-)	14/57	3/60	0.0099
分化度 (高/中/低)	12/51/8	15/46/2	NS <sup>1</sup>

1: NS: not significant.

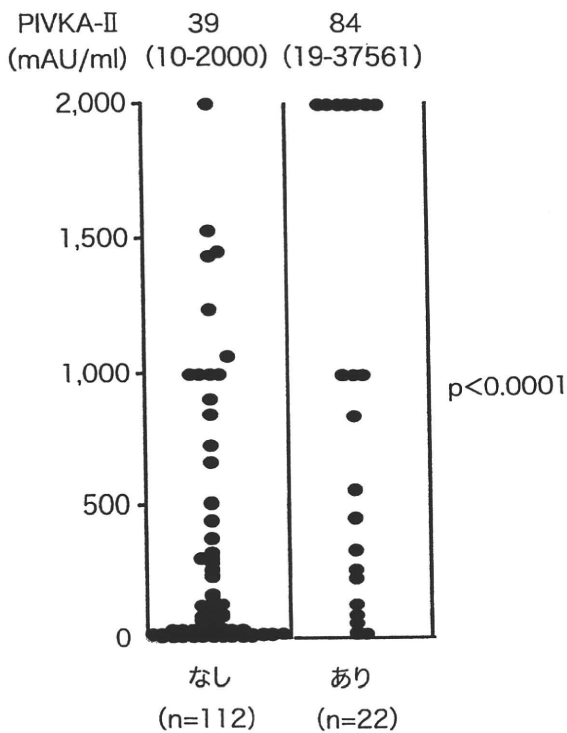


図2 門脈侵襲とPIVKA-II

に門脈侵襲，肝静脈侵襲，肝内転移を有する例では血中PIVKA-II陽性例が陰性例に比して有意に高率となっていた( $p = 0.0008$ ,  $p = 0.0358$ ,  $p = 0.0099$ )。図2は門脈侵襲がある例とない例での血中PIVKA-IIを比較したものである。門脈侵襲(-)例では39 mAU/ml (10-2000)，門脈侵襲(+ )例では84 mAU/ml (19-37561)と後者が有意に高値であった。

すなわち血中PIVKA-II陽性例は生物学的に悪性度の高い症例が多いといえる<sup>9~11)</sup>。

### 3 治療前血中PIVKA-IIと予後

それでは血中PIVKA-II値と予後はどのような関係であるのか？この疑問に答えるためCox比例ハザードモデルを用いて検討した。対象は1990年から2004年までに経験したHCC中，治療前にAFP，AFP-L3，PIVKA-IIを同時に測定した756例である。検討した因子は年齢(65歳未満，65歳以上)，性(男性，女性)，HBV(B型肝炎，あり，なし)，

HCV(C型肝炎，あり，なし)，アルコール歴(なし，常習飲酒家，大酒家)，胃食道静脈瘤(あり，なし)，Child-Pugh分類(A，B，C)，腫瘍サイズ(3 cm以下，3 cmを越える)，腫瘍個数(単発，多発)，門脈腫瘍塞栓(あり，なし)，肝切除(あり，なし)，ラジオ波焼灼術(RFA，あり，なし)，経皮的エタノール注入療法(PEIT，あり，なし)，肝動脈塞栓術(TAE，あり，なし)，治療前AFP(20 ng/ml未満，20 ng/ml以上)，治療前AFP-L3(10%以下，10%以上)，治療前PIVKA-II(40 mAU/ml未満，40 mAU/ml以上)の17因子である。なお治療は初回の主治療を対象としている。変数増加法で検討するとHCV，Child-Pugh分類，腫瘍径，腫瘍個数，門脈腫瘍塞栓，肝切除，RFA，治療前AFP-L3，治療前PIVKA-IIが有意となった(表3， $p = 0.002 \sim < 0.001$ )。治療前PIVKA-IIが40 mAU/ml以上であることは40 mAU/ml未満であることよりハザード比として1.400(95%信頼区間1.104-1.776)倍，死亡のリスクが高かった。また治療前のPIVKA-II値が40 mAU/ml未満の群と40 mAU/ml以上の群の3年，5年，10年の生存率はそれぞれ73.7%と43.6%，50.4%と31.8%，30.0%と18.3%と40 mAU/ml未満の群が有意に長期間生存した( $p < 0.0001$ ，図3)。

### 4 治療後血中PIVKA-IIと予後

治療により腫瘍マーカーが低下したこと(カットオフ値以下)と予後の関係を検討した。治療前と同様の対象で治療後1~3カ月後に3種類の腫瘍マーカーを同時に測定した689例である。検討したのは17因子で腫瘍マーカーのみ治療後AFP(20 ng/ml未満，20 ng/ml以上)，治療後AFP-L3(10%以下，10%以上)，治療後PIVKA-II(40 mAU/ml未

表3 予後に関する因子(腫瘍マーカーは治療前, n = 756)

		ハザード比(95%信頼区間)	P
HCV	陰性	1	
	陽性	1.465 (1.146-1.873)	< 0.001
Child-Pugh分類	A	1	< 0.001
	B	2.218 (1.722-2.855)	< 0.001
	C	3.774 (2.650-5.373)	< 0.001
腫瘍径	3 cm以下	1	
	3 cmを越える	1.654 (1.278-2.141)	< 0.001
個数	1個	1	
	2個以上	1.458 (1.151-1.848)	= 0.002
門脈腫瘍塞栓	なし	1	
	あり	2.312 (1.704-3.136)	< 0.001
肝切除	なし	1	
	あり	0.441 (0.319-0.611)	< 0.001
RFA (治療前)	なし	1	
	あり	0.399 (0.291-0.548)	< 0.001
AFP-L3 (治療前)	10%未満	1	
	10%以上	1.582 (1.243-2.013)	< 0.001
PIVKA-II (治療前)	40 mAU/ml未満	1	
	40 mAU/ml以上	1.400 (1.104-1.776)	< 0.001

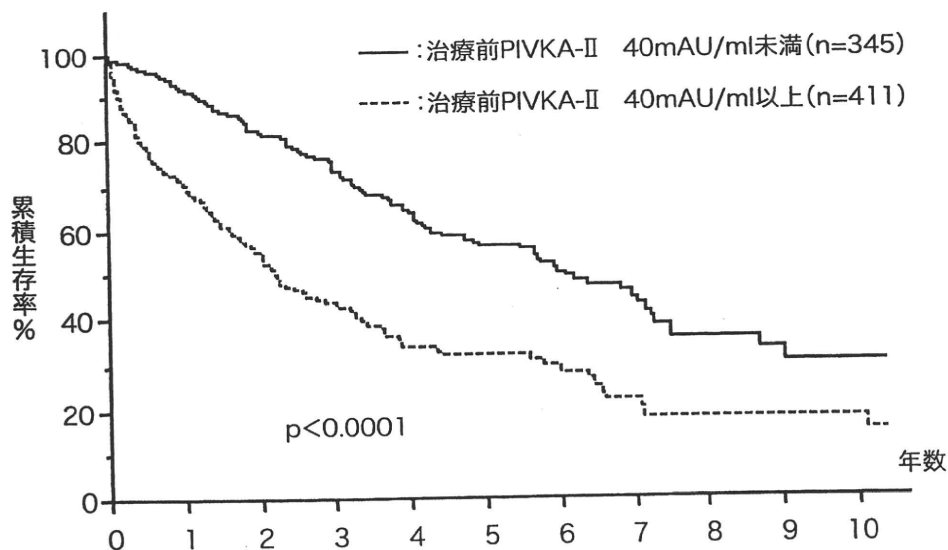


図3 治療前 PIVKA-II と生存率

満, 40 mAU/ml以上)と変更した. 変数増加法で検討するとChild-Pugh分類, 腫瘍径, 腫瘍個数, 門脈腫瘍塞栓, 肝切除, RFA, 治療後AFP, 治療後AFP-L3, 治療後PIVKA-II

が有意で, 治療後AFPが新たに加わった(表4,  $p = 0.027 \sim < 0.001$ ). 治療後PIVKA-IIが40 mAU/ml以上であることは40 mAU/ml未満であることよりハザード比として1.828



表4 予後に関する因子(腫瘍マーカーは治療後, n = 689)

		ハザード比(95%信頼区間)	P
Child-Pugh分類	A	1	< 0.001
	B	1.875 (1.414-2.488)	< 0.001
	C	3.407 (2.205-5.263)	< 0.001
腫瘍径	3 cm 以下	1	
	3 cm を越える	1.431 (1.072-1.911)	= 0.015
個数	1個	1	
	2個以上	1.359 (1.036-1.483)	= 0.027
門脈腫瘍塞栓	なし	1	
	あり	2.728 (1.941-3.835)	< 0.001
肝切除	なし	1	
	あり	0.630 (0.136-0.910)	= 0.014
RFA	なし	1	
	あり	0.471 (0.335-0.662)	< 0.001
AFP (治療後)	20 ng/ml 未満	1	
	20 ng/ml 以上	1.460 (1.066-2.001)	= 0.018
AFP-L3 (治療後)	10% 未満	1	
	10% 以上	2.398 (1.712-3.360)	< 0.001
PIVKA II (治療後)	40 mAU/ml 未満	1	
	40 mAU/ml 以上	1.828 (1.357-1.462)	< 0.001

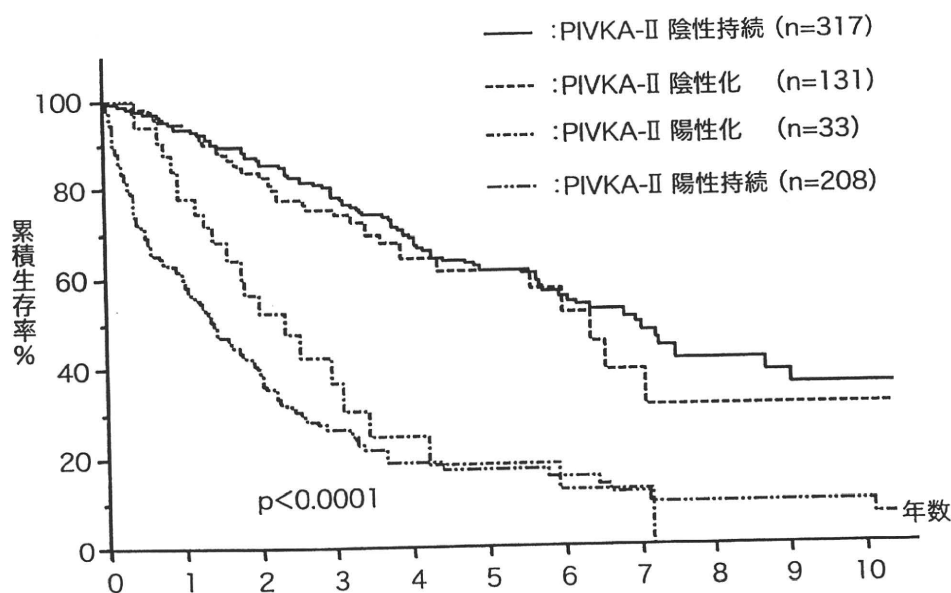


図4 治療前後のPIVKA II値と生存率

(95%信頼区間 1.357-1.462)倍死亡のリスクが高いといえる。

一方, 治療前後のPIVKA- II値に注目して

4群に分類し検討した(図4)。陰性持続群(治療前後のPIVKA- IIが40 mAU/ml未満, n = 317), 陰性化群(治療前のPIVKA- IIが40

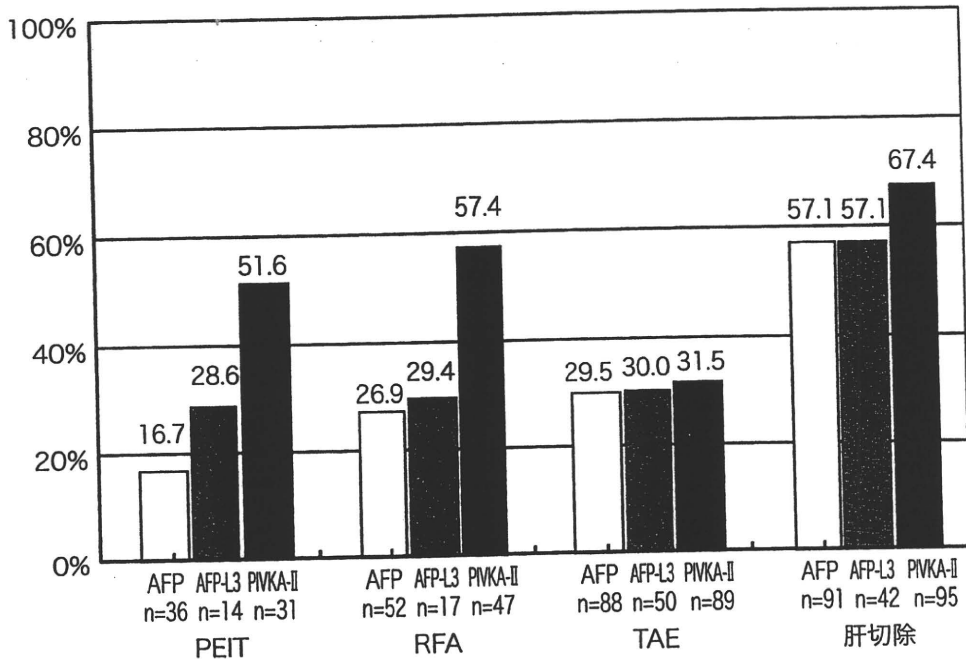


図5 腫瘍マーカー陽性例での各種治療後の陰性化率

mAU/ml以上で治療後のPIVKA-II値が40 mAU/ml未満, n = 131), 陽性化群(治療前のPIVKA-IIが40 mAU/ml未満で治療後のPIVKA-II値が40 mAU/ml以上, n = 33), 陽性持続群(治療前後のPIVKA-IIが40 mAU/ml以上, n = 208)の4群である。陰性持続群と陰性化群と陽性化群と陽性持続群の3年, 5年, 10年の生存率はそれぞれ75.0%と78.5%と36.4%と26.4%, 61.1%と61.2%と18.2%と17.0%, 30.9%と35.3%と0.0%と9.2%を示し, 陰性持続群と陰性化群は陽性化群と陽性持続群より有意に長期間生存した(p < 0.0001, 図5)。しかし, 陰性持続群と陰性化群, 陽性化群と陽性持続群の間には差を認めなかった。治療後PIVKA-II値が40 mAU/ml未満であることが長期生存を得るために必須条件と考えられた<sup>11)</sup>。

## 5 各種治療法前後の血中PIVKA-II値

初回の主治療がPEIT, FFA, TAE, 肝切除で治療前にAFP, AFP-L2, PIVKA-IIが陽性であった症例の治療後の陰性化率を検討し

た(図5)。いずれの腫瘍マーカーも肝切除での陰性化率が高く(57.1-67.4%)で, 次いでRFAで, PIVKA-IIの陰性化率が高かった(57.4%)。

肝切除例とRFA例で治療前後の腫瘍マーカー値を含めてCox比例ハザードモデル(変数増加法)を用いて検討した。使用した因子は前回検討した17因子から治療の4因子を減じた13因子である。

まず肝切除についてみると治療前に選択された因子はChild-Pugh分類, 腫瘍個数, 門脈腫瘍塞栓であった(表5, p = 0.012 ~ < 0.0001)。治療後には門脈腫瘍塞栓, AFP(治療後), AFP-L3(治療後), PIVKA-II(治療後)が選択され(p = 0.019 ~ < 0.0001)腫瘍マーカーの陰性化が良い予後を得るための必要条件であることがわかる。

一方, RFAについてみると治療前に選択された因子はChild-Pugh分類, PIVKA-II(治療前)で(p = 0.030 ~ 0.0001), 治療後には腫瘍個数, AFP(治療後), PIVKA-II(治療後)が選択された(表6)。RFAの場合治療前後に

表5 治療前後の予後に関する因子(肝切除例, n = 208)

		オッズ比(95%信頼区間)	P
治療前	Child-Pugh分類	A	1
		B	3.134 (1.446-6.792)
	個数	1個	1
		2個以上	2.132 (1.180-3.851)
	門脈腫瘍塞栓	なし	1
		あり	1.882 (2.218-10.746)
治療後	門脈腫瘍塞栓	なし	1
		あり	5.333 (2.234-12.735)
	AFP (治療後)	20 ng/ml未満	1
		20 ng/ml以上	3.926 (1.729-8.915)
	AFP-L3 (治療後)	10%未満	1
		10%以上	2.935 (1.1.196-7.204)
	PIVKA- II (治療後)	40 mAU/ml未満	1
		40 mAU/ml以上	3.422 (1.697-6.899)

表6 治療前後の予後に関する因子(RFA, n = 127)

		オッズ比(95%信頼区間)	P
治療前	Child-Pugh分類	A	1
		B	2.297 (1.084-4.866)
		C	19.146 (2.150-170.488)
	PIVKA- II (治療前)	40 mAU/ml未満	1
		40 mAU/ml以上	3.973 (1.822-8.667)
治療後	個数	1個	1
		2個以上	2.331 (1.076-5.051)
	AFP (治療後)	20 ng/ml未満	1
		20 ng/ml以上	2.174 (1.044-4.525)
	PIVKA- II (治療後)	40 mAU/ml未満	1
		40 mAU/ml以上	4.091 (1.900-8.809)

PIVKA- IIが選択されており、予後を推定するマーカーとして極めて重要であると考えられた。

## 6 おわりに

肝細胞癌におけるPIVKA- IIの予後推定における有用性を検討した。PIVKA- IIはAFPやAFP-L3分画と比較して感度および特異性

が優れたマーカーである。PIVKA- II高値例の予後は不良で治療により陰性化することが良い予後を得るための必要条件となる。特にRFA治療前後のマーカーとしてPIVKA- IIの果たす役割は大きいと思われる。

## 文献

- 1) Liebman HA, Furie BC, Tong MJ et al : Des-gam-

- ma-carboxy (abnormal) prothrombin as a serum marker of primary hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* 31; 310 : 1427-1431, 1984
- 2) Weitz IC, Liebman HA : Des-gamma-carboxy (abnormal) prothrombin and hepatocellular carcinoma: a critical review. *Hepatology* 18 : 990-997, 1993
  - 3) Fujiyama S, Morishita T, Hashiguchi O et al : Plasma abnormal prothrombin (des-gamma-carboxy prothrombin) as a marker of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 15; 61 : 1621-1628, 1988
  - 4) 藤山重俊 : V, 肝細胞癌の診断, 腫瘍マーカー, PIVKA-II, 高感度PIVKA-II. *日本臨牀* 59巻増刊号6 : 349-355, 2001
  - 5) Kuromatsu R, Tanaka M, Shimauchi Y et al : Usefulness of ED036 kit for measuring serum PIVKA-II levels in small hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 32 : 507-512, 1997
  - 6) Mita Y, Aoyagi Y, Yanagi M et al : The usefulness of determining des-gamma-carboxy prothrombin by sensitive enzyme immunoassay in the early diagnosis of patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer* 1; 82 : 1643-1648, 1998
  - 7) Sassa T, Kumada T, Nakano S et al : Clinical utility of simultaneous measurement of serum high-sensitivity des-gamma-carboxy prothrombin and Lens culinaris agglutinin A-reactive alpha-fetoprotein in patients with small hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 11 : 1387-1392, 1999
  - 8) Saitoh S, Ikeda K, Koida I et al : Serum des-gamma-carboxyprothrombin concentration determined by the avidin-biotin complex method in small hepatocellular carcinomas. *Cancer* 1; 74 : 2918-2923, 1994
  - 9) 熊田 卓, 石黒裕規 : 肝癌腫瘍マーカーの有用性. *医学の歩み* 200 : 131-136, 2002
  - 10) 熊田 卓, 豊田秀徳, 葛谷貞二他 : 腫瘍マーカーからみた肝細胞癌治療方針の考え方. *医学と薬学* 50 : 50-21, 2003
  - 11) 熊田 卓, 豊田秀徳, 桐山勢生, 他 : 肝癌の診断, 3, 腫瘍マーカー診断と予後推定における意義. *臨床消化器内科* 31 : 923-930, 2006

\*

\*

\*

## 特集II

## 初発 B 型肝炎細胞癌治療後の ラミブジン投与の有用性\*

葛谷貞二\* 片野義明\*\*  
熊田 卓\*\* 豊川秀徳\*\*  
上居崎正雄\*\* 岩田浩史\*\*  
後藤新太郎\*\* 館 佳彦\*\*  
竹田泰史\*\* 西野正路\*\*  
森井正哉\*\* 本多 隆\*\*  
林 和彦\*\* 石上雅敏\*\*  
中野 功\*\* 後藤秀実\*\*

Key Words : hepatitis B virus, hepatocellular carcinoma, lamivudine, recurrence, survival

## はじめに

B 型肝炎慢性肝炎および肝硬変患者の予後延長には、肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma : HCC) の発癌予防や再発予防が重要である。また同時に背景の肝予備能を良好に維持することも重要である<sup>1)</sup>。肝予備能が良好に維持されれば、肝不全死のリスクが減り、HCC の治療方針を決定する際、治療の選択肢が増える<sup>2)3)</sup>。

ラミブジンなどの核酸アナログ製剤は、インターフェロン (IFN) に比して優れた抗ウイルス効果を持ち、副作用も少ないため、現在では B 型肝炎慢性肝炎患者に対する治療の中心となっている。ラミブジンは、慢性肝炎ばかりではなく非代償性肝硬変患者に対しても投与され、肝予備能を改善し、予後延長に有効であるとの報告が散見される<sup>4)5)</sup>。

また最近 Liaw ら、Matsumoto らによってラミブジンは発癌抑制においても有効であると報告された<sup>6)7)</sup>。しかし、これらの報告はいずれも初発 HCC の発癌抑制に対する検討である。

われわれは、B 型肝炎 HCC 治療後にラミブジンを

投与することの有用性を報告したが<sup>8)</sup>、本稿ではその成績を中心にラミブジンが HCC の再発予防や予後において有用であるかについて述べる。

## 対象および方法

1998 年 12 月から 2004 年 12 月に名古屋大学医学部付属病院消化器内科または大垣市民病院消化器科で初発 B 型肝炎 HCC と診断された 105 例のうち、①初発 HCC 治療前からラミブジンを投与されていた症例、②初回治療が肝切除またはラジオ波焼灼療法 (radiofrequency ablation : RFA) 以外であった症例、③初発 HCC 治療後の効果判定で治療が不十分であると判定された症例、のいずれかに該当する症例を除外した 49 例を今回の検討の対象とした。

HCC の治療効果判定は、治療終了 1 か月後に腹部造影 CT 検査を施行し、HCC 治療部位に腫瘍濃染が残存している場合を治療効果不十分とし、腫瘍濃染が認められない場合を治療効果十分と判定した。以後の経過観察は、腫瘍マーカーを含む血液検査および腹部超音波検査を 1-3 か月ごとに施行し、HCC の再発が疑われた場合は、腹部造影 CT 検査を施行した。

49 例の内訳は、男性 41 例、女性 8 例で平均年齢は 60.6 ± 9.2 歳であった。初発 HCC の治療法は

\* Efficacy of lamivudine therapy after initial treatment for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma.

\*\* Teiji KUZUYA, M.D., Yoshiaki KATANO, M.D., Masao DOIZAKI, M.D., Hiroshi IWATA, M.D., Shintaro GOTO, M.D., Yoshihiko TACHI, M.D., Yasushi TAKEIDA, M.D., Masamichi NISHINO, M.D., Masaya MORII, M.D., Takashi HONDA, M.D., Kazuhiko HAYASHI, M.D., Masatoshi ISHIGAMI, M.D., Isao NAKANO, M.D. & Hidemi GOTO, M.D.: 名古屋大学大学院医学系研究科消化器内科 (〒466-8550 名古屋市昭和区鶴舞町 65); Department of Gastroenterology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya 466-8550, JAPAN

\*\*\* Takashi KUMADA, M.D. & Hidenori TOYODA, M.D.: 大垣市民病院消化器科

表 1 両群の背景因子の比較

	ラミブジン群 (n=16)	コントロール群 (n=33)	P 値
年齢(歳)	59.8±7.8	61.1±9.8	N.S.
性別(男性/女性)	14/2	27/6	N.S.
HBeAg (陽性/陰性)	4/12	2/27	N.S.
HBV-DNA (log copies/mL)	6.2 (2.8-8.3)	4.1 (2.6-7.1)	0.003
ALT (IU/L)	56.6±25.7	54.2±44.8	N.S.
T-Bil (mg/dL)	0.8±0.3	0.9±0.4	N.S.
Alb (g/dL)	3.7±0.6	3.7±0.5	N.S.
PT (%)	85.3±15.4	85.0±15.1	N.S.
血小板数 (×10 <sup>4</sup> /mL)	10.8±4.2	12.1±5.4	N.S.
腹水 (なし/あり)	14/2	32/1	N.S.
肝性脳症 (なし/あり)	15/1	32/1	N.S.
Child-Pugh score	5 (5-10)	5 (5-8)	N.S.
Stage (初発HCC) (I/II/III)	12/3/1	13/16/4	N.S.
初回治療(肝切除/RFA)	13/3	18/15	N.S.
観察期間(月)	38.0±21.6	32.6±18.9	N.S.

(文献<sup>7)</sup>より引用(一部改変)

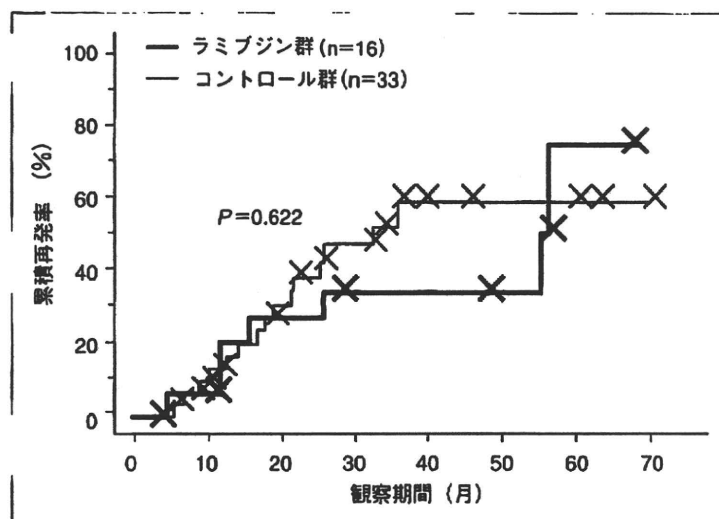


図 1 HCCの累積再発率(文献<sup>7)</sup>より引用(一部改変)

肝切除が31例, RFAが18例であった。初発HCC治療時のHBV-DNA量は49例中46例で検出可能であった(PCR法, 検出感度下限は2.6 log copies/ml未満)。

初回HCC治療後にラミブジン投与が開始された症例は16例であり, ラミブジン群(lam群)とした。ラミブジン投与は1日100mg内服とし, 原則中止せず可能な限り継続した。またラミブジン投与を行わなかった症例は33例であり, コントロール群(con群)とした。平均観察期間はlam群38.0±21.6か月, con群32.6±18.9か月であった

(P=0.378)。

両群のHCC再発率, 肝予備能の推移, 生存率についてretrospectiveに比較検討した。

### 成 績

#### 1. 両群の背景因子

初回HCC治療時における両群の背景因子の比較を表1に示す。HBV-DNA量以外の背景因子において両群間に有意差は認められなかった。HBV-DNA量はlam群が6.2 log copies/mlに対し, con群が4.1 log copies/mlであり, lam群が有意

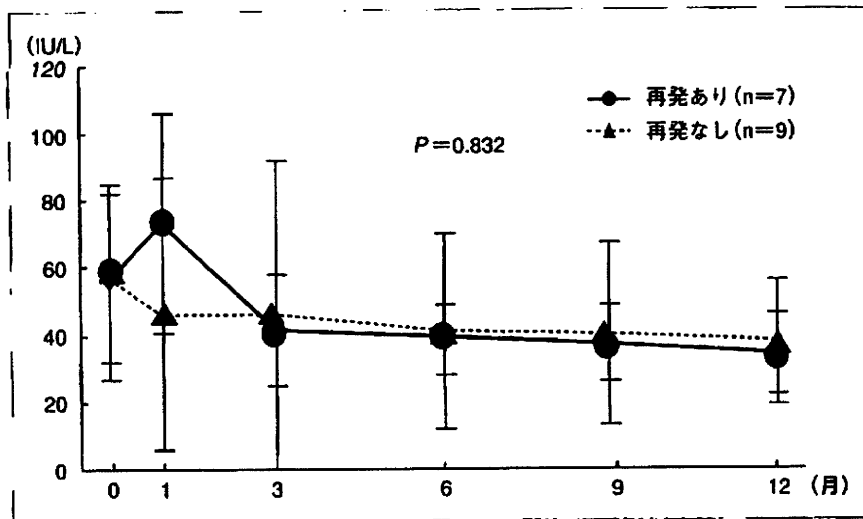


図2 ラミブジン群におけるHCC再発有無別にみたALT値の推移(文献より引用一部改変)

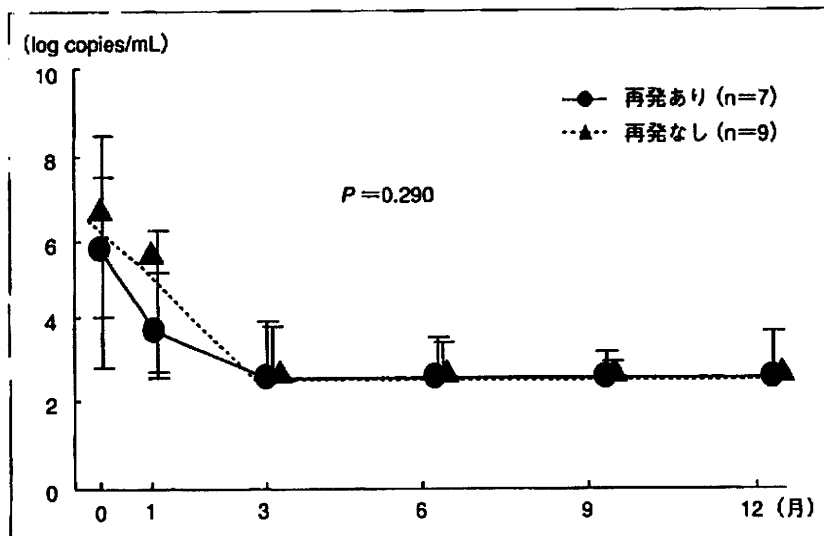


図3 ラミブジン群におけるHCC再発有無別にみたHBV-DNA量の推移  
(文献より引用一部改変)

に高値であった( $P=0.003$ )。

## 2. HCCの累積再発率

HCCが再発した症例は22例であった(lam群7例, con群15例)。再発部位はいずれも初回HCCの治療部位とは異なっており, 全例局所再発ではなく異所再発であった。両群のHCCの累積再発曲線を図1に示す。lam群の累積再発率は1年13.5%, 2年35.1%, 3年35.1%であった。一方, con群の累積再発率は1年13.4%, 2年39.2%, 3年53.2%であった。HCCの累積再発率の比較で

は両群間に有意差を認めなかった( $P=0.622$ )。

## 3. HCC再発の有無別にみたラミブジン投与後のALT値およびHBV-DNA量の推移

Lam群16例において, ラミブジン投与後のALT値とHBV-DNA量の推移に関してHCCが再発した症例7例と再発しなかった症例9例とに分けて比較検討した。ALT値の推移を図2に, HBV-DNA量の推移を図3に示す。ALT値の推移は再発した症例と再発しなかった症例との間に有意差は認められず, どちらも治療前に比して低下して

表2 HCC初回治療時と再発治療時の比較(ラミブジン群で再発した7例)

	初回治療時	再発治療時	P値
HBV-DNA (log copies/mL)	6.3 (4.2-8.3)	<2.6	0.018
ALT (IU/L)	56.1±25.3 (32-104)	36.3±8.1 (22-48)	0.028
Child-pugh score	5.0 (5-10)	5.0 (5-6)	N.S.
HCC stage (I/II/III)	5/1/1	4/3/0	N.S.
HCC治療 (肝切除/RFA/TAE/なし)	5/2/0/0	2/5/0/0	N.S.

(文献<sup>2)</sup>より引用一部改変)

表3 HCC初回治療時と再発治療時の比較(コントロール群で再発した15例)

	初回治療時	再発治療時	P値
HBV-DNA (log copies/mL)	4.9 (3.2-6.4)	4.2 (2.6-6.1)	N.S.
ALT (IU/L)	66.1±49.2 (17-207)	58.4±41.2 (18-160)	N.S.
Child-pugh score	5.0 (5-8)	7.0 (5-12)	0.013
HCC stage (I/II/III)	5/6/4	7/8/0	N.S.
HCC治療 (肝切除/RFA/TAE/なし)	5/10/0/0	0/5/7/3	0.001

(文献<sup>2)</sup>より引用一部改変)

いた。またHBV-DNA量の推移も同様に2群間に差はみられなかった。

#### 4. 再発した症例における初発治療時および再発治療時のデータの比較

HCCが再発した22例(lam群7例, con群15例)において初回治療時と再発治療時のHBV-DNA量, ALT値, Child-Pugh score, HCC stage, およびHCCの治療法について比較検討した。

Lam群で再発した7例における検討を表2に示す。HBV-DNA量は初回治療時6.3 log copies/mlに対し, 再発治療時は全例が2.6 log copies/ml未満であり有意に低値であった( $P=0.018$ )。ALT値は初回治療時56.1±25.3 IU/lに対し, 再発治療時は36.3±8.1 IU/lであり有意に低値であった( $P=0.028$ )。Child-Pugh scoreは初回治療時が5点(5-10点)に対し, 再発治療時も5点(5-6点)であり有意差を認めなかった。また, 再発したHCCの治療法として全7例で肝切除もしくはRFAが選択できた。これらの治療後の効果判定は全例で効果十分であった。

Con群で再発した15例における検討を表3に

示す。HBV-DNA量およびALT値はいずれも初回治療時と再発治療時では有意な差はみられなかった。Child-Pugh scoreは初回治療時が5点(5-8点)に対し, 再発治療時は7点(5-12点)であり有意にscoreの上昇が認められた( $P=0.013$ )。また, 再発したHCCの治療法として5例でRFAを選択できたが, 残りの10例では肝予備能の悪化のため肝切除またはRFAが選択できなかった。経カテーテル的肝動脈塞栓術(transcatheter arterial embolization: TAE)を選択した7症例のうち4症例は, 肝予備能が悪く十分にTAEを施行することはできなかった。残りの3例は肝予備能が不良のため再発時の治療としていずれの治療法も選択できなかった。

#### 5. 生存率

Lam群とcon群の累積生存率を図4に示す。平均観察期間はlam群38.0±21.6か月およびcon群32.6±18.9か月であった。Lam群は全例が生存しているのに対し, con群では6例が死亡した。死因は3例がHCCの増大による癌死であり, 残りの3例は背景の肝予備能の悪化による肝不全死であっ



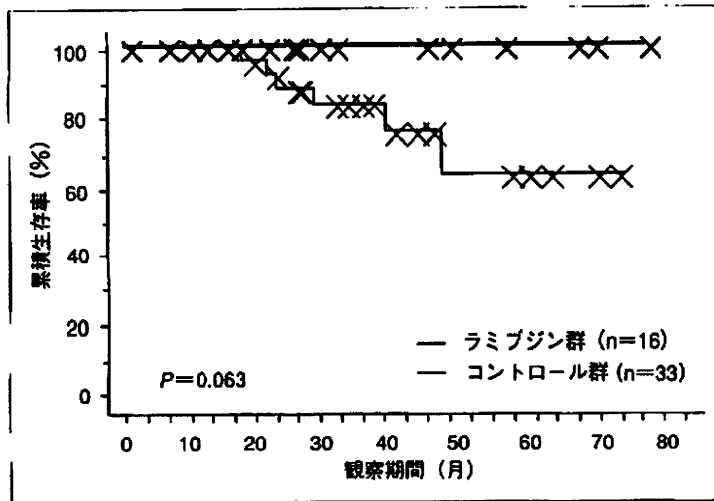


図4 累積生存率(文献<sup>7)</sup>より引用一部改変)

た。Con群の累積生存率は1年86.6%，2年61.8%，3年47.8%であった。両群間の累積生存率を比較するとlam群がcon群に比して予後良好である傾向が認められた( $P=0.063$ )。

### 考 察

従来IFNによる治療効果が低いこともあり、B型肝炎患者に対する抗ウイルス療法の発癌予防や再発予防を検討した報告は少ない。抗ウイルス効果として著効が得られた場合には、発癌および再発予防に有用であるという報告がある<sup>100, 101</sup>。一方、現在治療の中心となったラミブジンは、発癌予防に有効であるとの報告がある<sup>102</sup>。IFNよりも抗ウイルス効果が強いHCCの再発予防においても有用性が期待される。しかしながら、今回の検討ではlam群とcon群との累積再発率に有意差はみられず、ラミブジンによる再発予防効果は認められなかった。また、lam群のALT値およびHBV-DNA量の推移は、再発の有無にかかわらず、治療前に比して有意に低下しており、HCC治療後のALT値やHBV-DNA量の低下による再発への影響はみられなかった。今回、再発抑制効果がみられなかった原因の一つには、発癌のメカニズムが初発と再発とは異なることが考えられる<sup>103</sup>。初回発癌では多中心発生であるが、治療後のHCC再発には局所再発、多中心性再発、肝内転移再発の3様式を考える

必要がある。今回の検討では局所再発の除外はされているが、多中心性発生と肝内転移再発の区別はできていない。通常のB型肝炎からの発癌率が年率2~5%であるという報告<sup>104</sup>と比べると今回の検討での再発率は高く、いくつかの症例は肝内転移再発を含んでいる可能性がある。ラミブジンは多中心発生発癌予防には有効だが、肝内転移再発予防(つまりすでにある癌の芽も含め)には有効ではないとも考えられる。しかし、今回は少数例での検討であり、また観察期間も短いため、結論づけるには多数例でのprospectiveな長期間の検討が必要である。

一方、ラミブジンが肝予備能を改善するという報告はいくつかみられる<sup>105</sup>。今回の検討でも、HCCが再発した22例において、初回治療時と再発治療時の肝予備能や治療法について比較したところ、lam群は再発治療時の肝予備能が良好に保たれており、それにより再発時の治療法として、肝切除あるいはRFAを全例で選択できた。一方、con群においては再発治療時に初回治療時よりも肝予備能が悪化した症例を認め、それにより再発時の治療選択において、TAEや無治療といった選択肢を取らざるを得なかった症例も認められた。生存率に関しては、lam群がcon群に比して予後良好な傾向であった。この結果は、ラミブジン投与によって、肝予備能が改善もしくは良好に維持でき、またそれによりHCCが再発し

た症例においても根治の可能性が高いと考えられている治療法(肝切除およびRFA)を選択でき、十分な治療を受けることができたからであると考えられた。

### おわりに

初発B型HCC治療後にラミブジンを投与することは、背景の肝予備能を良好に維持あるいは改善させ、またそれにより仮にHCCが再発したとしても治療選択の幅が広がるため有用であると考えられた。

### 文 献

- 1) Lok AS. Prevention of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 2004 ; 127 : S303-9.
- 2) 國土典宏, 幕内雅敏. 肝癌治療法選択のアルゴリズム. *臨床消化器内科* 2006 ; 21(7) : 1051-7.
- 3) 藁谷貞二, 熊田 卓, 豊田秀徳, ほか. 肝細胞癌 初回治療における肝切除と局所療法との長期予後の比較とその治療選択—JIS score, CLIP score, AFP-L3分画別に検討—. *消化器科* 2004 ; 38(5) : 504-12.
- 4) Kapoor D, Guptan RC, Wakil SM, et al. Beneficial effects of lamivudine in hepatitis B virus-related decompensated cirrhosis. *J Hepatol* 2000 ; 33 : 308-12.
- 5) Liaw YF, Sung JJ, Chow WC, et al. Lamivudine for patients with chronic hepatitis B and advanced liver disease. *N Engl J Med* 2004 ; 351 : 1521-31.
- 6) Matsumoto A, Tanaka E, Rokuhara A, et al. Efficacy of lamivudine for preventing hepatocellular carcinoma in chronic hepatitis B : A multicenter retrospective study of 2795 patients. *Hepatol Res* 2005 ; 32 : 173-84.
- 7) Kuzuya T, Katano Y, Kumada T, et al. Efficacy of antiviral therapy with lamivudine after initial treatment for hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol*. In press 2007.
- 8) Lin SM, Lin CJ, Hsu CW, et al. Prospective randomized controlled study of interferon-alpha in preventing hepatocellular carcinoma recurrence after medical ablation therapy for primary tumors. *Cancer* 2004 ; 100 : 376-82.
- 9) Lin SM, Sheen IS, Chien RN, et al. Long-term beneficial effect of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology* 1999 ; 29 : 971-5.
- 10) Camma C, Giunta M, Andreone P, et al. Interferon and prevention of hepatocellular carcinoma in viral cirrhosis : an evidence-based approach. *J Hepatol* 2001 ; 34 : 593-602.
- 11) Kumada T, Nakano S, Takeda I, et al. Patterns of recurrence after initial treatment in patients with small hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1997 ; 25 : 87-92.
- 12) Liaw YF, Lin DY, Chen TJ, et al. Natural course after the development of cirrhosis in patients with chronic type B hepatitis : a prospective study. *Liver* 1989 ; 9 : 235-41.

\* \* \*

## 第4章 肝 臓

## 4. インターフェロンによるC型肝炎ウイルス感染排除後の発癌

熊田 卓\* 豊田 秀徳\* 桐山 勢生\*  
曾根 康博\* 谷川 誠\* 久永 康宏\*

〔Key point〕

## はじめに

インターフェロン(IFN)

sustained viral response(SVR)

本邦で1992年にC型肝炎に対してインターフェロン(IFN)治療が認可されて14年が経過した。当初はsustained virological response (SVR, IFN治療後6カ月の時点で血中のhepatitis C virus(HCV)-RNAが陰性)であれば発癌のリスクは消失すると考えられた。しかしその後、SVR後の発癌症例の報告は日本が主体であるが多数報告されるようになり<sup>1)~3)</sup>、現在では終生の経過観察が必要とする意見が多い<sup>4)</sup>。本稿では自験例を中心にデータを示し、最近の考え方について概説する。

## I. C型肝炎での発癌率

まずC型肝炎で発癌に関与する因子について検討した。対象は1995年から2003年の間に経験したC型肝炎4,620例中、3年以上の経過観察がなされかつ経過観察開始後3年まで発癌を認めなかった1,704例である。うちIFN使用例は594例(SVR 271例, non-

**Key words:** 肝細胞癌, インターフェロン治療, ALT, 肝発癌, sustained virological response(SVR)

Hepatocarcinogenesis after Eradication of Hepatitis C Virus by Interferon Therapy  
Takashi Kumada/Hidenori Toyoda/Seiki Kiriya/Yasuhiro Sone/Makoto Tanikawa  
Yasuhiro Hisanaga

\*大垣市民病院消化器科 (〒503-8502 岐阜県大垣市南頓町4-86)

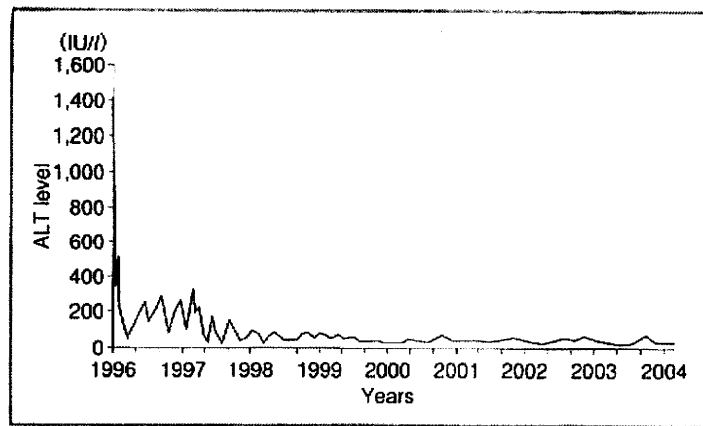


図2 ALTの積分平均値と単純加算平均値  
71歳, 男性, 積分平均値は76.6 IU/l, 単純加算平均値は144.4 IU/lであった。

表1 発癌に関する因子  
(n=1,704, Cox 比例ハザードモデル [変数増加法])

		Relative risk(95% CI <sup>a</sup> )	p
Age	≤ 65 yrs	1	
	> 66 yrs	1.860(1.363~2.537)	< 0.001
Sex	Women	1	
	Men	1.509(1.122~2.018)	0.007
Average integration value of ALT (IU/l)	≤ 20 IU/l	1	< 0.001
	21~40 IU/l	4.874(1.499~15.851)	0.008
	41~60 IU/l	6.453(1.994~20.884)	0.002
	61~80 IU/l	11.682(3.589~38.012)	< 0.001
	≥ 81 IU/l	24.265(7.422~79.335)	< 0.001
ALP	≤ 338 IU/l	1	
	> 338 IU/l	1.970(1.455~2.666)	< 0.001
Cholinesterase	≥ 432 IU/l	1	
	< 432 IU/l	8.406(1.962~36.013)	0.004
Albumin	≥ 3.5 g/dl	1	
	< 3.5 g/dl	4.036(2.775~5.870)	< 0.001
Total cholesterol	≥ 130 mg/dl	1	
	< 130 mg/dl	9.988(1.395~71.525)	0.022
IFN therapy	No therapy	1	0.003
	Non-SVR	0.732(0.357~1.501)	0.395
	SVR	0.475(0.308~0.732)	0.001

<sup>a</sup> : 95% confidence interval, IFN : interferon, SVR : sustained virological response, ALT : alanine aminotransferase, ALP : alkaline phosphatase