

- ウイルス性肝炎では、肝線維化の進行が肝癌発症リスクと相関する。
- 非侵襲的に肝線維化を診断する新しい検査法が開発されている。
- 肝弾性度の測定は、肝線維化の評価に有用である。

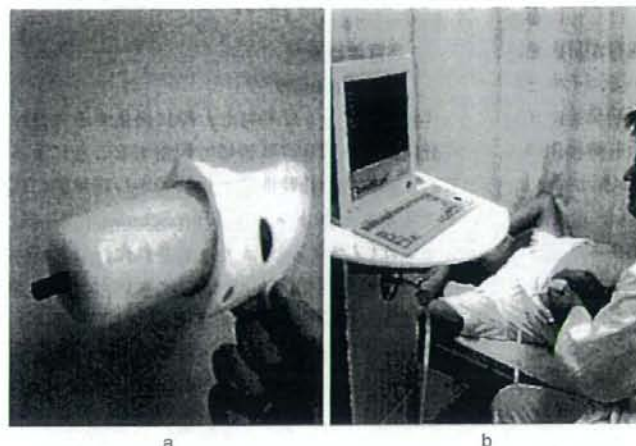


図1 FibroScan502®の実施例
 a FibroScan502®のプロブ。左側先端の黒い突起の部分から振動波を発生する。
 b 右肋間より通常の体外超音波の要領で肝右葉に対して振動波を発生する。当科では、超音波検査の台間に実施している。

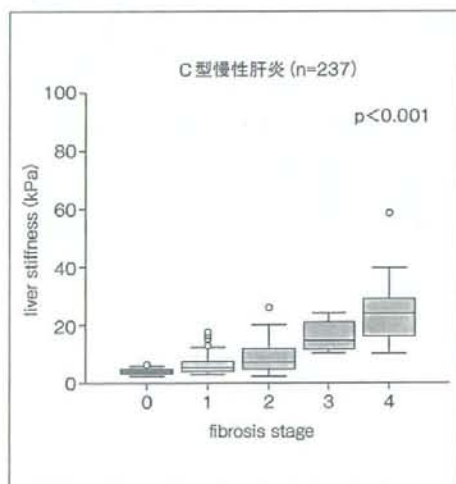


図2 当科でのC型慢性肝炎 237 症例における肝弾性度と線維化
 C型慢性肝炎症例において、FibroScan502®を用いて測定した肝弾性度と肝生検による新大分分類のF stageとは相関する。(文献2)より引用)

れている。今後のさらなる解析により画像データの定量化も可能であると考えられる。

3. MRI, CT

MRIやCTを用いた肝線維化の評価が試みられている。最近、Hepatologyで紹介された論文によると、Contrast-Enhanced MRI, Diffusion-Weighted MRI, MR-Spectroscopy, MR Elastography³⁾, FibroCT⁴⁾など新しい手法が開発されており、それぞれ肝生検での線維化ステージと相関することが示されている。

肝癌スクリーニングへの応用●

慢性肝炎における肝線維化の評価は、病態の進行のみでなく、肝細胞癌・静脈瘤など合併症を予測するうえでも有用である。Foucherらは、144例のC型慢性肝炎患者(F3あるいは4)に対してFibroScan502®を用いて肝の弾性度(kPa)を測定し、合併症の出現との相関を調べたところ、食道静脈瘤(stage 2あるいは3)の出現、腹水、肝細

- FibroScan502[®] は定量的な肝弾性度測定装置であり、弾性度は線維化ステージと相関する。
- Real-time Tissue Elastography[®] は、臓器の弾性度を色調で捉える超音波診断装置である。
- 肝弾性度の測定は、肝癌や静脈瘤など合併症を予測するうえでも有用である。

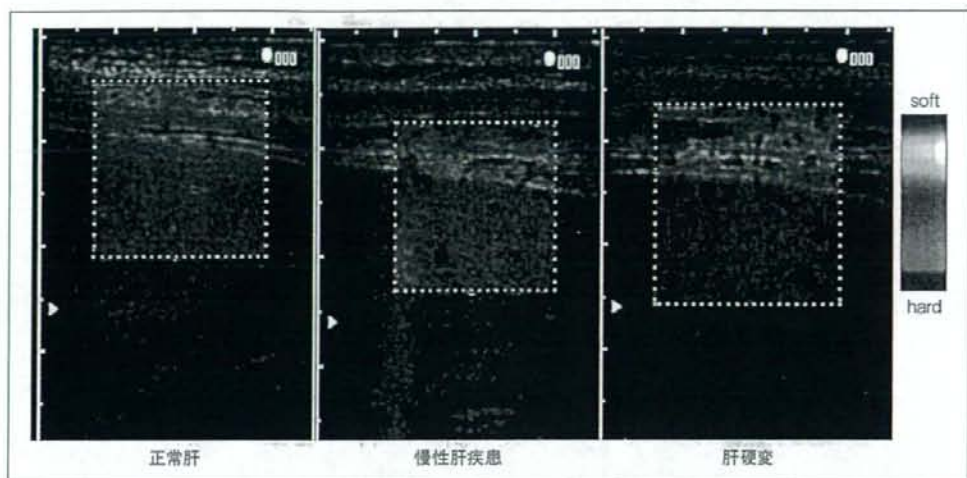


図3 Real-time Tissue Elastography[®]

柔らかい組織は赤、硬い組織は青で表示され、肝硬変は画像として捉えられる。正常肝から慢性肝疾患、肝硬変へと進行するにつれ、青い部分が多くなる。

胞癌の出現、食道静脈瘤の破裂のカットオフ値は、それぞれ27.5、49.1、53.7、62.7であったことを報告している⁵⁾。これら新しい検査法は、繰り返して施行することが可能であるため、肝癌スクリーニング法としての可能性が期待される。

おわりに●

ウイルス性肝炎から発癌をより早期発見するために、非侵襲的な肝線維化診断は今後ますます注目されるであろう。日常診療においては、患者それぞれの疾患や病態など多様であるが、いくつかの検査を組み合わせることでより精度の高い線維化評価および発癌の早期発見につながる事が期待される。

文 献

- 1) Rockey, D.C. : Noninvasive assessment of liver fibrosis and portal hypertension with transient elastography. *Gastroenterology* 134 : 8-14, 2008
- 2) Takeda, T. et al. : Usefulness of noninvasive transient elastography for assessment of liver fibrosis stage in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 48 : 7768-7773, 2006
- 3) Jayant, A. et al. : Magnetic resonance imaging of hepatic fibrosis : emerging clinical applications. *Hepatology* 47 : 332-342, 2008
- 4) Romero-Gómez, M. et al. : Optical analysis of computed tomography images of the liver predicts fibrosis stage and distribution in chronic hepatitis C. *Hepatology* 47 : 810-816, 2008
- 5) Foucher, J. et al. : Diagnosis of cirrhosis by transient elastography (FibroScan) : a prospective study. *Gut* 55 : 403-408, 2006

肝線維化と細胞間ネットワーク

小川 智弘* 河田 則文*

索引用語：星細胞，Kupffer細胞，酸化ストレス，NASH

1 はじめに

近年、食生活の欧米化に伴い、わが国における非アルコール性脂肪肝炎(NASH)の患者数は年々増加傾向にある。また、C型肝炎やB型肝炎などのウイルス性肝炎から肝硬変、肝癌を発症し、死亡するケースも少なくない。これらの病態では、肝障害によって肝細胞が壊死を起し、壊死局所にコラーゲンなどの細胞外マトリックスが過剰に蓄積することによって線維化が引き起こされる(図1)。肝障害が軽度の場合、残存していた肝細胞が増殖し、肝臓が修復され肝再生が起こる。しかし障害が重度であったり、持続する場合には肝臓の破壊と再生のバランスが崩れ、その代償として肝線維化が惹起される。肝線維化を引き起こす要因の一つとしては、肝臓の星細胞の活性化が重要な役割を担っていることは広く認知されている。そして星細胞の活性化は、肝臓を構成する肝細胞やKupffer細胞、類洞内皮細胞との密接な相互作用によって生じている。本稿では肝線維化における星

細胞の役割を中心に、最近の報告もふまえ概説したい。

2 肝線維化における星細胞の位置づけ(図2)

肝線維化は活性化星細胞より産生されたI型コラーゲンを主体とする細胞外マトリックスが、門脈域を主とした肝実質に過剰蓄積することで引き起こされる病態である。そのため、星細胞の活性化を抑制させ、細胞外マトリックスの産生を抑えることが肝線維化の治療に有効であると考えられている。

星細胞(stellate cell, ito cell, fat-storing cell, lipocyte, perisinusoidal cellとも呼ばれる)は類洞の肝細胞側のDisse腔に位置し、細胞から伸びる枝状の突起で類洞内皮細胞を取り囲むように存在し、一方で肝細胞とも接している。本細胞の主な機能は正常肝では大量のビタミンAを貯蔵することである。体内の全ビタミンA量の50~80%は肝臓に存在し、その約90%が星細胞に貯えられており、必要に応じて肝細胞あるいは全身へと運搬され

Tomohiro OGAWA et al: Fibrosis and cell network

*大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学 [〒545-8585 大阪市阿倍野区旭町 1-4-3]

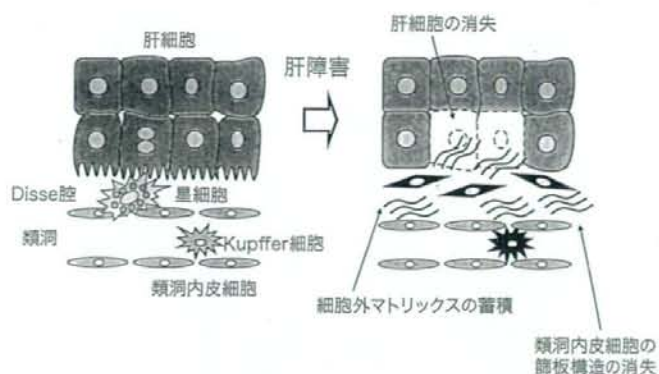


図1 肝線維化における類洞構造の変化

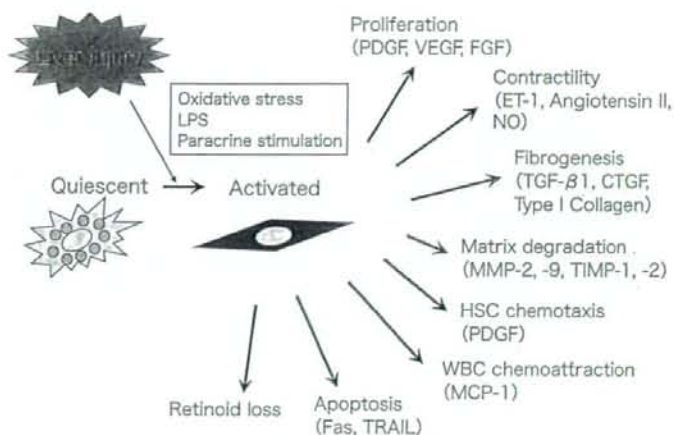


図2 星細胞の活性化機構 (文献3より)

る¹⁾。その他の星細胞機能として、肝特異的な pericyte としての機能も有しており、星細胞は収縮や弛緩することにより類洞の微小循環を調節する²⁾。しかしながら、この細胞は肝臓が障害を受けると、細胞の機能や形態を劇的に変化させ性質の全く異なる筋線維芽細胞 (= 活性化星細胞) へと形質転換する³⁾。星細胞は肝の炎症により活性化した Kupffer 細胞や、単球由来のマクロファージにより放出

された platelet-derived growth factor (PDGF) や、transforming growth factor- β 1 (TGF- β 1) の働きにより活性化する。活性化した星細胞では貯蔵していたビタミン A が減少・消失し、細胞骨格タンパク質である desmin や α -smooth muscle actin が増加することで収縮能が増強し、コラーゲンなどの細胞外マトリックスを過剰に産生する。産生されるコラーゲンはタイプ I が主体となり、星細胞は

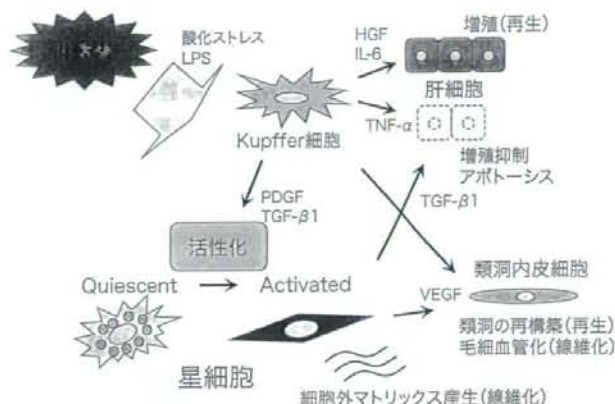


図3 壊死局所における線維化, 再生の細胞間ネットワーク

活性化するとTGF- β 1をおのずから発現するようになり, オートクライン的に作用することでタイプIコラーゲンの発現がさらに亢進する。この機構は, NASHやアルコール性肝障害(ASH)などの肝線維化を生じる病態で共通のメカニズムであると考えられている。しかしながら, 病態によっては肝線維化にまで至るプロセスが異なっており, 星細胞と他の肝臓構成細胞の相互作用が重要となる(図3)。

3 肝線維化の発症・進展

肝線維化の発症・進展には, 炎症性サイトカインや酸化ストレスが関与していると考えられている。炎症性サイトカインは主に肝臓のマクロファージであるKupffer細胞によって産生され, 肝細胞のアポトーシスや星細胞の活性化を誘導する(図3)。

Kupffer細胞は肝臓に常在しているマクロファージで, 肝臓に生じた老廃物を貪食する作用を持つ。肝障害が起こると, 酸化ストレスや腸内細菌由来のLipolysaccharide (LPS)によりKupffer細胞は活性化され, tumor necrosis factor (TNF)- α やinterleukin-6 (IL-6),

IL-1 β などの炎症性サイトカインを産生する。TNF- α はウイルス性肝炎やアルコール性肝障害などの肝障害への関与が知られており⁴⁾, NASHにおいても肝細胞のアポトーシスを誘導することが知られている⁵⁾。さらに, 活性化したKupffer細胞はPDGFやTGF- β 1を産生し, これらが星細胞の活性化を誘導する。

また, 肝線維化の発症と進展には酸化ストレスが関与しており, 肝細胞内のミトコンドリアなどから産生される過剰な活性酸素種(reactive oxygen species; ROS)がKupffer細胞や星細胞の活性化の一因となる³⁾。酸化ストレスの要因はさまざまであるが, その一つに鉄がある。鉄は生体にとって必須の元素であるが, 鉄, 特に2価鉄(Fe²⁺)の過剰蓄積は正常な細胞にとって障害となる。実際, NASH患者では肝細胞やKupffer細胞への鉄の過剰蓄積が報告されており^{6,7)}, 鉄制限による食事療法や瀉血によって線維化が改善する^{8,9)}。肝内に蓄積した鉄がフェントン反応により強力な酸化作用を持つ \cdot OHを産生するため, 肝細胞のアポトーシスを誘導し, 星細胞の活性化を介して線維化を促進すると考えられ

る。

4 肝線維化における再生と破壊

肝障害が起こると、肝細胞壊死が生じる。その壊死局所では残存していた肝細胞が増殖し、組織修復が開始される。肝臓は再生能力の強い臓器であり、障害が軽度で一過性である場合は再生する。しかしながら、NASHやウイルス性肝炎では障害が何十年にもわたって持続するため、細胞外マトリックス産生が過剰になる一方で、tissue inhibitor of matrix metalloproteinase (TIMP)のようなコラーゲンナーゼ阻害蛋白が増加して分解機構を上回るため、肝の修復機転のバランスが崩壊して肝線維化が引き起こされる。

肝再生過程ではhepatocyte growth factor (HGF)やIL-6などのサイトカインにより肝細胞の増殖が促進されるが、線維化過程ではこれら増殖因子の発現が減少し、TGF- β 1など抑制性因子により肝細胞の増殖は負に制御される(図3)。NASHでは肝細胞の増殖不全が起き、肝再生の遅延がしばしばみられる^{10,11)}。NASHの場合、肝細胞の脂肪化が再生を阻害し、酸化ストレスなどの要因によって肝臓の破壊が亢進するため線維化が進行すると考えられる。

5 肝線維化における類洞の毛細血管化

類洞内皮細胞には径100 nm程度の小孔が多数存在しており、これを篩板構造(sieve plate)と呼んでいる。類洞には基底膜が存在していないため、ある分子量以下の血しょう成分は類洞内皮細胞の小孔を通過して類洞から、Disse腔を介して肝細胞へと自由に移行できる。肝障害が起こると、上述したように各種サイトカインや酸化ストレスなどにより

星細胞が活性化する。活性化星細胞によって産生されたラミニンを含む細胞外マトリックスがDisse腔の内皮細胞側に沈着し、基底模様の構造を形成するようになると類洞内皮細胞は篩板構造を失う。この一連の過程を類洞の毛細血管化と呼び、活性化したKupffer細胞や星細胞から分泌されたvascular endothelial cell growth factor (VEGF)が、PDGFやbasic fibroblast growth factor (b-FGF)とともに類洞内皮細胞の増殖を促し、類洞の毛細血管化をさらに進行させる(図3)¹²⁾。この過程が線維化時における肝細胞機能不全の引き金になることも推測される。

6 おわりに

星細胞を中心に肝線維化における肝内ネットワークについて、基礎的な概念から最近の研究成果をふまえて紹介した。近年、食生活の欧米化に伴って年々患者数が増加傾向にあるNASHが着目されており、肝臓細胞間の相互作用も含めNASHの発症・進展のメカニズムの解明に関する研究が進んでいる。NASH症例などは糖尿病や高脂血症などを合併したケースが多く、今後の肝線維化治療は個々の細胞をターゲットとするのではなく、臓器全体、もしくは身体全体を治療する戦略も念頭にする必要があると思われる。

文 献

- 1) Wake K: Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs. *Int Rev Cytol* 66: 303-353, 1980
- 2) Kawada N, Klein H, Decker K: Eicosanoid-mediated contractility of hepatic stellate cells. *Biochem J* 285: 367-371, 1992
- 3) Friedman SL: Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue

- injury. *J Biol Chem* 275 : 2247-2250, 2000
- 4) Schwabe RF, Brenner DA : Mechanisms of Liver Injury. I. TNF-alpha-induced liver injury : role of IKK, JNK, and ROS pathways. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 290 : 583-589, 2006
 - 5) Begriche K, Igoudjil A, Pessayre D et al : Mitochondrial dysfunction in NASH : causes, consequences and possible means to prevent it. *Mitochondrion* 6 : 1-28, 2006
 - 6) Sumida Y, Nakashima T, Yoh T et al : Serum thioredoxin levels as a predictor of steatohepatitis in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *J Hepatol* 38 : 32-38, 2003
 - 7) Otagawa K, Kinoshita K, Fujii H et al : Erythrophagocytosis by liver macrophages (Kupffer cells) promotes oxidative stress, inflammation, and fibrosis in a rabbit model of steatohepatitis : implications for the pathogenesis of human nonalcoholic steatohepatitis. *Am J Pathol* 170 : 967-980, 2007
 - 8) Otagawa K, Ogawa T, Shiga R et al : Attenuation of acute and chronic liver injury in rats by iron-deficient diet. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 294 : 311-320, 2008
 - 9) Sumida Y, Kanemasa K, Fukumoto K et al : Effect of iron reduction by phlebotomy in Japanese patients with nonalcoholic steatohepatitis : A pilot study. *Hepato Res* 36 : 315-321, 2006
 - 10) DeAngelis RA, Markiewski MM, Taub R et al : A high-fat diet impairs liver regeneration in C57BL/6 mice through overexpression of the NF-kappaB inhibitor, IkappaBalpha. *Hepatology* 42 : 1148-1157, 2005
 - 11) Yamamoto K, Takada Y, Fujimoto Y et al : Non-alcoholic steatohepatitis in donors for living donor liver transplantation. *Transplantation* 83 : 257-262, 2007
 - 12) Ishikawa K, Mochida S, Mashiba S et al : Expressions of vascular endothelial growth factor in non-parenchymal as well as parenchymal cells in rat liver after necrosis. *Biochem Biophys Res Commun* 254 : 587-593, 1999

*

*

*

ウイルス性肝炎のプライマリケア

Key Words

トピックス

肝炎の進行と線維化マーカー

肝線維化
線維化マーカー
肝生検
Fibroscan
血小板

.....
* 大阪市立大学大学院医学研究科
肝胆臓病態内科学

.....
森川浩安・河田則文

はじめに

肝臓の線維化は肝内の炎症に伴う肝細胞脱落とその修復過程に生ずる。現在までの臨床知見、基礎実験から肝線維化は可逆的で極めて動的であることが認識されつつある。肝臓の炎症時、肝細胞障害にて肝細胞は脱落して非生理的スペースができる。そのスペースを埋め、肝細胞の再生を促すために細胞外マトリックスが沈着し、再生が促される。線維系も働き、肝組織が通常状態へと修復される。この細胞外マトリックスをおもに産生するのは類洞壁細胞の一つである星細胞である。T細胞、NK細胞、Kupffer細胞の活性化に伴うサイトカイン産生もしくは障害肝細胞との細胞間相互作用により、星細胞が活性型に形質転換（筋線維芽様細胞に転換）され、細胞外マトリックスを産生する。炎症が一過性であった場合、肝細胞の再生に伴い活性化星細胞は静止期の状態に復するかアポトーシスに陥って排除される。しかしながら、肝炎が持続する場合、星細胞の活性化状態は維持され、また線維系の障害が生じ、肝細胞脱落部のスペースは線維に置換されていく。臨床的には

線維が蓄積していくことにより、最終的に肝硬変に進展する。肝硬変の原因の約7割がHCVである。C型慢性肝炎患者での肝線維化進展速度は肝線維化の程度により異なり、F1以下では進行が緩徐であるが、F2以上では進行が早く、さらに肝癌発癌率も高くなる。また、インターフェロン治療により、ウイルスが排除されると、肝に蓄積した線維は減少する（F因子、新犬山分類、表1）。

C型肝炎において、PEG-インターフェロン（IFN）・リバビリン療法で6割以上の人でウイルス排除が可能となった。この現況において、治療時期の決定、リスクとコストを含めた効果予測のためのより正確な肝線維化診断が必要とされている。

肝線維化進展に伴う病態への影響

進行した慢性肝炎から初期肝硬変の状態までは、肝線維化が患者の病状に大きな影響を及ぼすことはほほない。しかしながら、上に述べたように、PEG-IFNとリバビリンの併用療法が画期的なウイルス排除をもたらした現在、その抗ウイルス療法の効果を規定する因子としての高齢、女性、F因子が問題となっ

表1 肝生検組織分類

<新犬山分類 (1996) >

慢性肝炎とは、臨床的には6か月以上の肝機能検査値の異常とウイルス感染が持続している病態をいう。組織学的には、門脈域にリンパ球を主体とした細胞浸潤と線維化を認め、肝実質内には種々の程度の肝細胞の変性・壊死所見を認める。そして、その組織所見は線維化と壊死・炎症所見を反映させ、各々線維化 (staging) と活動性 (grading) の各段階にわけ表記する。			
staging	線維化の程度は、門脈域から線維化が進展し小葉が改築され肝硬変へ進展する段階を線維化なし (F0)、門脈域の線維性拡大 (F1)、bridging fibrosis (F2)、小葉のひずみを伴う bridging fibrosis (F3) までの4段階に区分する。さらに結節形成傾向が全体に認められる場合は肝硬変 (F4) と分類する。		
grading	壊死・炎症所見はその程度により、活動性なし (A0)、軽度活動性 (A1)、中等度活動性 (A2)、高度活動性 (A3) の4段階に区分する。すなわち、活動性の評価はピースミールネクロシス (piecemeal necrosis)、小葉内の細胞浸潤と肝細胞の変性ならびに壊死 (spotty necrosis, bridging necrosis など) で行う。		
付記	<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;"> F0：線維化なし F1：門脈域の線維性拡大 F2：線維性架橋形成 F3：小葉のひずみを伴う線維性架橋形成 F4：肝硬変 </td> <td style="width: 50%;"> A0：壊死・炎症所見なし A1：軽度の壊死・炎症所見 A2：中等度の壊死・炎症所見 A3：高度の壊死・炎症所見 </td> </tr> </table>	F0：線維化なし F1：門脈域の線維性拡大 F2：線維性架橋形成 F3：小葉のひずみを伴う線維性架橋形成 F4：肝硬変	A0：壊死・炎症所見なし A1：軽度の壊死・炎症所見 A2：中等度の壊死・炎症所見 A3：高度の壊死・炎症所見
F0：線維化なし F1：門脈域の線維性拡大 F2：線維性架橋形成 F3：小葉のひずみを伴う線維性架橋形成 F4：肝硬変	A0：壊死・炎症所見なし A1：軽度の壊死・炎症所見 A2：中等度の壊死・炎症所見 A3：高度の壊死・炎症所見		

ている。肝線維化はIFNの抗ウイルス作用を減弱させる因子であることが示唆され、IFN治療導入には線維蓄積の病態把握が重要となっている。

また、進行した肝硬変（非代償期肝硬変）では、肝細胞総数の低下による肝細胞機能不全と線維化に伴う門脈圧亢進による血流動態の変化により様々な症状（脳症、黄疸、浮腫、腹水、静脈瘤形成等）が引き起こされる。これら症状の回避、早期予防のためにも肝線維化診断は欠かせないものである。

肝線維化診断と線維化マーカー

肝線維化診断のゴールドスタンダードは、肝生検であることはいままでの間もないが、肝線維化は動的であるため、時期ごとに繰り返し診断が必要となる場合がある。ここでは肝生検を含め、各検査の特徴を述べる。

1. 肝生検

現在、肝生検は腹腔鏡下と超音波下で行われている。侵襲性や美容上の側面を除けば腹腔鏡検査を施行すれば肝表面の性状や結節形成の有無、その大小、均一性を観察でき、よ

り正確な肝線維化診断が可能となる。しかしながら、設備、人力的な問題もあるため大多数の症例は超音波下で肝生検が行われている。

肝生検は、肝線維化診断のゴールドスタンダードであり、ほかの線維化診断も肝生検結果との比較により成り立っている。しかしながら、肝生検を繰り返し施行することは侵襲性や入院のコストから妥当ではない。また、肝生検についてはサンプリングエラーの可能性が常に存在する。

サンプリングエラーについては、2003年にSiddiqueらがC型慢性肝疾患患者を対象として報告している。超音波下で肝右葉より15mm以上の長さで2個肝生検した組織（門脈域4個以上存在）をKnodelのhistological activity indexにて評価した。その結果によると38%の症例でstage分類の違いが認められた。このようなサンプリングエラーを減らすためには生検組織サイズを大きくすることが必要であるが、これは合併症のリスクを引き上げる結果を招いてしまう。Bedossaらは肝線維化組織診断において最小限必要な生検サイズをC型慢性肝疾患患者からの切除肝を

表2 ヨーロッパ分類

score	表現	線維化の程度	小葉構造
0	線維化なし	なし	正常
1	軽度線維化	軽度	Glisson 鞘の拡大ほとんどなし 隔壁形成なし
2	中等度線維化	主として Glisson 鞘周囲	Glisson 鞘の拡大, Glisson 鞘周囲の線維化, あるいは, P-P bridging による隔壁形成, しかし小葉構造保つ
3	高度線維化	隔壁形成	P-C bridging による著しい隔壁形成性線維化, 小葉構造の破壊, 肝硬変に至らず ほぼ/明らかな肝硬変
4	肝硬変	肝硬変	

用いて、線維化の画像解析から検討している。それによれば肝生検組織 25 mm 以上が肝線維化の正確な評価に必要であるとしている²⁾。

得られた肝生検組織の評価は段階式的の分類にて評価される。その結果は半定量であり、どの分類を適応させるか、病理医間の診断の差、同一病理医でも経時的な差が存在する。大規模なスタディーでは病理医の診断精査をより高めることが重要であることが警鐘されている。わが国においては、肝生検組織分類は新犬山分類とヨーロッパ分類がよく使用されている (表 1, 2)³⁾。

肝生検を行ううえで、腹腔内出血や気胸等の重篤な合併症があること、死亡例が存在すること (10,000 ~ 12,000 人に 1 人) は忘れてはいけない事象である。

2. 臨床検査所見 (血液・生化学検査)

a) 血小板

C 型慢性肝疾患において血小板値の低下が肝線維化の進行度によく相関することは広く知られている。個人差によるばらつきがあることや血小板の減少が肝線維化の実際よりも遅れて現れてくることは熟知すべきであるが、一般プライマリケア医にとっては臨床現場における最も簡便でわかりやすい指標と考えられる。特に、血小板値 10 万以下で肝硬変への進展が強く示唆されることは有用なポイントである。筆者らの施設での線維化ステージ別の血小板値は図 1

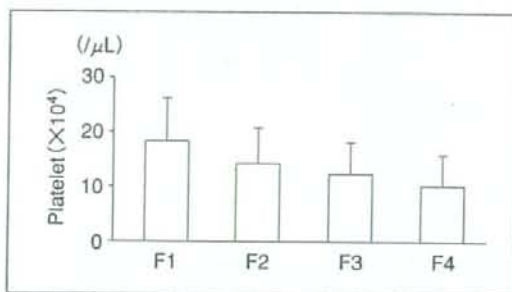


図1 肝生検による線維化ステージ別の血小板値
C 型慢性肝疾患 113 例の F1 症例, 68 例の F2 症例, 18 例の F3 症例, 38 例の F4 症例の血小板平均値 (F1; 18.0 ± 8.0, F2; 13.9 ± 6.6, F3; 12.1 ± 5.7, F4; 9.9 ± 5.6 万 / μL)

のとおりであった。

b) 肝線維化マーカー

現在、わが国では IV 型コラーゲン EIA, IV 型コラーゲン 7S RIA, III 型プロコラーゲン N 末端ペプチド, ヒアルロン酸が肝線維化マーカーとして臨床応用されている。つまり細胞外マトリックスの産生に伴い増加する物質やその分解産物を血清中で測定している。その測定値は産生と分解代謝のバランスの総和であること、肝線維化の進展スピードや肝硬変に近い高度な状態で上昇してくることに留意しなければならない。

● IV 型コラーゲン EIA, IV 型コラーゲン 7S RIA

IV 型コラーゲンは基底膜の主要構成成分である。肝線維化の過程で肝類洞の基底膜化が起こり, IV 型コラーゲンが産生される。

その一部が血清中に出現し、測定が可能となっている。一般には主要部分を認識する抗体を用いているⅣ型コラーゲンEIA法が定量性および測定感度に優れている。7SはN末端の7S領域を認識する抗体を用いた測定法である。慢性肝疾患においてその進行とともに値は上昇し、炎症所見に影響を受けないとされている。測定値200 ng/mL以上はほぼ肝硬変とみなしてよい。

●Ⅲ型プロコラーゲンN末端ペプチド (PⅢP)

コラーゲン分子はコラーゲン産生細胞(線維芽細胞)からプロコラーゲンとして産生され、プロテアーゼによりN末端、C末端ペプチドが切断され、コラーゲンとなる。このPⅢPはⅢ型コラーゲンの切断されたペプチドで各臓器より大循環中に移行し、Ⅲ型コラーゲンの産生量を反映し、活動性線維増生の評価に役立つ。Ⅲ型コラーゲンを産生する他臓器線維化も影響することに注意が必要である。

●ヒアルロン酸

酸性ムコ多糖類で活性化星細胞から産生され、肝類洞内皮で分解、異化される。線維化の指標というより類洞内皮機能を反映している側面も併せもつ。また、炎症性変化に影響を受けやすい。

c) 肝線維化マーカーインデックス

個別の線維化マーカー単独では詳細な肝線維化診断が把握できないため、線維化マーカー同士や他の肝疾患関連血液・生化学検査を各種組み合わせたものでインデックスを作成する検討が盛んに行われている。Partelらはヒアルロン酸、tissue inhibitors of metalloproteinase-1 (TIMP-1)、 α 2-macroglobulin (α 2M)の組み合わせがC型慢性肝炎でのF1とF2以上の判別に有用であったと報告した。Arthurらの欧州のグループから年齢、ヒアルロン酸、PⅢP、

tissue inhibitors of metalloproteinase-1を組み合わせたインデックスが、LeroyらからはPⅢPとMatrix metalloproteinase-1を組み合わせたインデックスがC型慢性肝疾患患者において肝線維化診断に有用と報告されている⁴⁻⁶⁾。しかしながら、肝線維化マーカー測定は高価であるため、一般普及に至らない側面がある。

現在注目され、今後普及が期待されるものとして、Poynardらのグループが報告したFibroTestがある。FibroTestはマーカーとして、 α 2M, haptoglobin, γ -GTP, T-bil, Apolipoprotein A1, 年齢, 性別を用い、数式に当てはめ得られるインデックスで、欧米において大規模臨床試験が行われ良好な結果が2001年に報告されている。ほかに、より簡便な指標としてWaiらが報告しているAST、血小板比 (AST to platelet ratio index:APRI)がある。上記2指標のF1とF2以上の鑑別能はROC曲線下面積(AUROC)では、0.84と0.80であり、肝硬変鑑別能はAUROC 0.92と0.89であり、高い診断能が示唆された^{7,8)}。

3. Fibroscanによる肝線維化の評価

肝臓の弾性度は肝線維化の程度と正の相関があるとされ、肝臓の弾性度を体外から測定するエラストグラフィがフランスのエコセン社により開発された(Fibroscan)。その測定値は弾性値としてあらわされる(単位kilopascal:kPa)(図2)。

この装置は体表から肝臓に向けて低周波弾性波を送り、それが肝臓内を伝播する振動を超音波で捉え、その伝播速度を計算することで肝臓の弾性値を測定し、定量化するものである。

フランスにおいて、大規模な臨床試験が行われ、線維化ステージとの良好な相関が2005年に報告されている⁹⁾。具体的なF因子のステージ別弾性値(中間値)はF1;5.5kPa, F2;

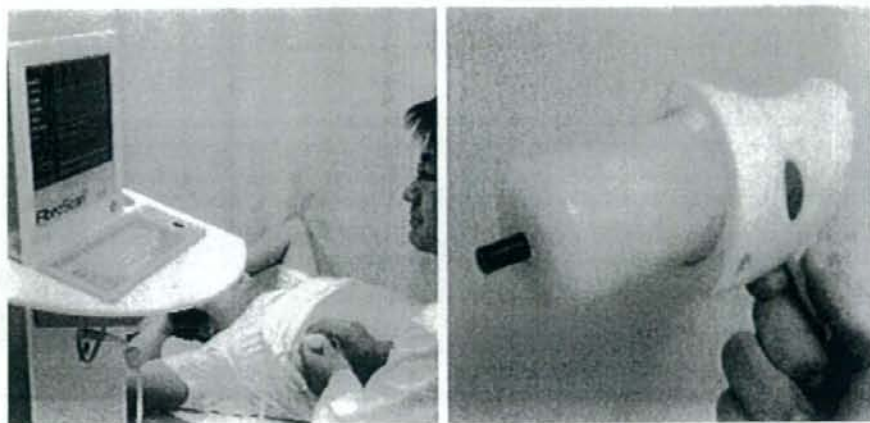


図2 Fibroscan 本体とプローベ (トランスデューサー)

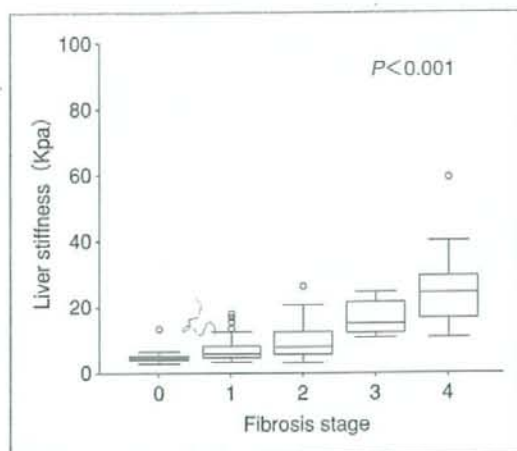


図3 線維化ステージ別の Fibroscan による弾性値
C 型慢性肝炎 32 例の F0 症例, 56 例の F1 症例, 42 例の F2 症例, 8 例の F3 症例, 28 例の F4 症例の弾性値

6.6 kPa, F3; 10.3 kPa, F4; 30.8 kPa であった。筆者らの施設でも, 2004 年より臨床検討をしており, その検討結果 (中央値) は F1; 6.3 kPa (113 例), F2; 8.8 kPa (68 例), F3; 14.6 kPa (18 例), F4; 22.2 kPa (38 例) であり, ステージ分類と良好な相関関係を認めた (図 3)¹⁰⁾。

筆者らの施設での実際の使用法は, 超音波検査時, 通常の超音波にて脈管や腫瘍のない肝臓の奥域のある部分を肋間操作にて測定ポイントとし, Fibroscan のプローベを皮膚に垂直に当て適当な圧を加えてスイッチを押して低周波を送る。適当な圧であるかは画面上にイ

ンジケータが表示される。一人につき 10 回測定し, その中央値が表示される。測定時間は 1 回につき 30 秒以内である。検査は無痛で, 軽い振動を自覚する程度である。

上記から, Fibroscan は肝線維化を無侵襲に, かつ繰り返し, 検査施行者の差なく定量的に測定できうる装置と考えられる。しかしながら, 装置は依然として高価であり, 保険適応には至っておらず, 一部の施設でしか導入されていないのが現状である。また, 使用上の問題点として, ①皮下脂肪が厚い症例, ②腹水がある症例, ③肝萎縮が高度な症例, ④肋間が狭い症例では測定不能となることがあげられる。

Fibroscan の症例が蓄積されるにつれ, 高度脂肪肝や急性肝障害時等において線維化ステージとの乖離例が報告されている。さらなる診断精度のアップを目指した乖離症例の検討, さらに肝癌発癌時期や肝硬変合併症の発現時期の前向き研究を含めた検討が今後期待される。また, Fibroscan は肝臓の弾性度を測定する新しい線維化指標であり, 線維化そのものを表すものでないことに留意したい。そのため Castera らは Fibroscan と FibroTest を組み合わせることにより, AUROC が上昇し線維化診断能の向上を認めたことを報告している¹¹⁾。

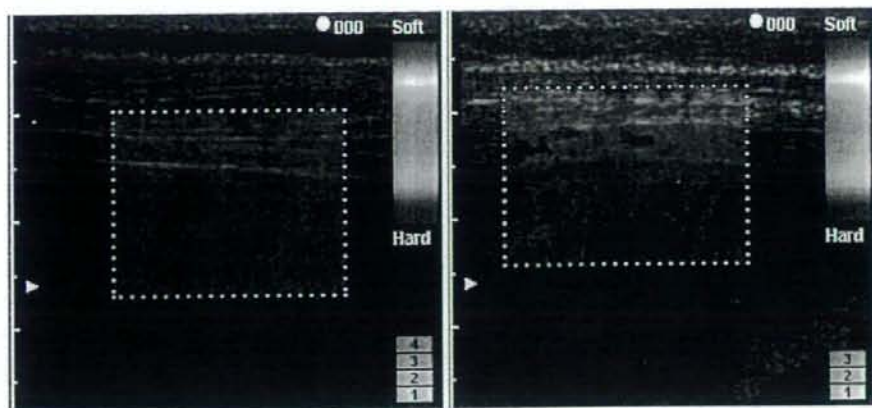


図4 Real-Time Elastography像

左図がC型慢性肝疾患F1症例，右図がF4症例．線維化が進行するにつれ，歪み像がまだら化し，周囲組織と比べて硬い領域（青い領域）が増加する．

おわりに

肝硬変の診断に止まらず，肝炎の進行に伴う肝線維化診断の非侵襲的な方法が確立されつつある．特に Fibroscan の登場は線維化の臨床診断法をかえつつあるが，現時点では，肝生検を凌駕するものでなく，今後のさらなる検討によりインデックスの精度向上，機器の開発が期待される．実際，最新の知見では，MRI を用いたエラストグラフィーが報告されており，また，筆者らのグループでは乳癌診療時に用いる Real-time Tissue Elastography® を用いた肝線維化診断の臨床応用に取り組んでいる．Real-time Tissue Elastography® は日立メディコが開発したわが国発信の超音波診断法であり，臓器の弾性度を超音波画像として捉えることができる画期的な装置である(図4)．

文献

- 1) Siddique I, et al.: Sampling variability on percutaneous liver biopsy in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Scand J Gastroenterol* 38 (4): 427-432, 2003
- 2) Bedossa P, et al.: Sampling variability of liver fibrosis in chronic hepatitis C. *Hepatology* 38: 1449-1457, 2003
- 3) Desmet VJ, et al.: Classification of chronic hepatitis: diagnosis, grading and staging. *Hepatology* 19

(6): 1513-1520, 1994

- 4) Patel K, et al.: Evaluation of a panel of noninvasive serum markers to differentiate mild from moderate-to-advanced liver fibrosis in chronic hepatitis C patients. *J Hepatol* 41: 935-994, 2004
- 5) Leroy V, et al.: Circulating matrix metalloproteinases 1, 2, 9 and their inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 as serum markers of liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C: comparison with PIINP and hyaluronic acid. *Am J Gastroenterol* 99 (2): 271-279, 2004
- 6) Rosenberg WM, et al.: Serum markers detect the presence of liver fibrosis: a cohort study. *Gastroenterology* 127: 1704-1713, 2004
- 7) Imbert-Bismut F, et al.: Biochemical markers of liver fibrosis in patients with hepatitis C virus infection: a prospective study. *Lancet* 357: 1069-1075, 2001
- 8) Wai CT, et al.: A simple noninvasive index can predict both significant fibrosis and cirrhosis in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 38: 518-526, 2003
- 9) Ziol M, et al.: Noninvasive assessment of liver fibrosis by measurement of stiffness in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 41: 48-54, 2005
- 10) Takeda T, et al.: Usefulness of noninvasive transient elastography for assessment of liver fibrosis stage in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol* 48: 7768-7773, 2006
- 11) Castera L, et al.: Prospective comparison of transient elastography, Fibrotest, APRI, and liver biopsy for the assessment of fibrosis in chronic hepatitis C. *Gastroenterology* 343-350, 2005

著者連絡先

(〒545-8585)
 大阪府大阪市阿倍野区旭町 1-4-3
 大阪市立大学大学院医学研究科肝胆脾病態内科学
 森川浩安
 [HP: <http://www.med.osaka-cu.ac.jp/syoukaki/>]

肝疾患と門脈圧亢進症

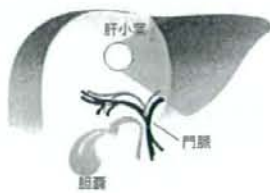
● 河田則文 大阪市立大学 大学院医学研究科 肝臓病態内科学

炎症局所で筋線維芽細胞へと活性化した星細胞は、収縮能を獲得して門脈圧を亢進させる。よって星細胞の活性化と収縮能をターゲットとした拮抗剤が検討されてきた。ここでは、星細胞の活性化に関与する分子群とその微小循環動態への関与について最近の知見を報告する。

はじめに

肝臓の類洞を構成する星細胞は、生理的状況下ではビタミンA貯蔵を主機能としているが、炎症局所では筋線維芽細胞へと“活性化”される。この活性化星細胞の特徴は、細胞外マトリックスを過剰産生する、自らサイトカインを産生して活性化を持続させる、増殖活性をもつことであると同時に、収縮タンパク質の発現増強がみられることである。γ-アクチンと平滑筋型α-アクチンがその代表であり、とくに後者は星細胞活性化マーカーとして汎用される。収縮能を獲得した星細胞が、肝微小循環ユニットである類洞あるいは前類洞門脈枝を“しめつける”ことが門脈圧亢進に寄与することは明白で、星細胞の活性化と収縮能の制御は肝線維症や門脈圧亢進症の治療に直結すると考えられ、種々の薬物や生理活性物質に対する拮抗剤が検討されてきた。

筆者らは星細胞活性化の分子機構を網羅的に調べる過程で、cytoglobin (Cygb)/stellate cell activation associated protein (STAP)を発見した。Cygbは星細胞に特異的に発現するガス^{*}1結合タンパク質であることから星細胞の収縮性に関与する可能性がある。これら、星細胞の活性化に関与する分子群とその微小循環動態への関与について最近の知見を報告する。



肝血管系の解剖

門脈は主として上下腸間膜静脈と脾静脈が合流して肝小葉内の類洞へ流れ込む血管系である。したがって、門脈圧を規定する因子は門脈への流入血液量と血管抵抗であるが、門脈系のなかで抵抗血管として作用しうるのは門脈終末枝 (terminal portal venule) と類洞であると考えられている。

星細胞は肝臓のDisse腔^{*}2に存在し、類洞内皮細胞を驚掴みするように3次元配置する(図1)^(1,3)。星細胞はアクチンやミオシンなどの収縮タンパク質、アスミンやピメンチンなどの中間径フィラメントを豊富に所有し、エンドセリン (endothelin: ET) や一酸化窒素 (NO) 刺激に応じて収縮弛緩する⁽⁴⁾。B, C型肝炎ウイルス、アルコールや薬剤などで肝臓に炎症反応が惹起され肝細胞壊死・脱落が生じると、星細胞は血小板由来増殖因子 (platelet-derived growth factor: PDGF), TGF-βなどの成長因子やフリーラジカルなどによって“活性化”されて筋線維芽細胞 (myofibroblast: MFB) へと変化し収縮力を増す(図2)。また、活性化星細胞は

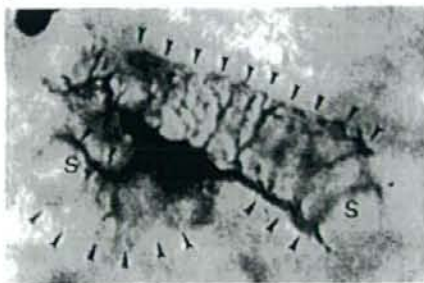


図1

ゴルジ鍍金法で染色されたラット星細胞

Disse腔に存在する星細胞の細胞体から突起が伸び、類洞 (S: 円筒状の類洞血管両端の断面) を包囲するように配置することがわかる。突起の外側に肝細胞が、内側に類洞内皮細胞が存在する。矢印で示されている範囲が一つの星細胞でカバーされている類洞部分をなす。染色されている物質はビタミンAであると考えられる。

*1
CO, NO, O₂

*2
肝類洞の内皮細胞と肝細胞の間に存在する間隙。

ビタミンA	Nakane(1963)
デスミン	Yokoi(1984)
CRBP	Blomhoff(1985)
平滑筋型 α -アクチン	Ramadani(1990)
HSP47	Masud(1994)
SPARC	Frizell(1995)
N-CAM	Nakatani(1996)
GFAP	Niki(1996)
C-Myb	Kirada(1996)
Cygb/STAP	Kawada(2001)



	ヒト星細胞		ラット星細胞		線維芽細胞	血管平滑筋細胞	MFB
	静止期	活性化	静止期	活性化			
デスミン	-	-	+	++	-	+	+
GFAP	?	+	+	+/-	-	-	-
平滑筋型 α -アクチン	(-)	+	-	+++	-	+++	+++
Cygb/STAP	+	-	+	+++	-	+	+++

図2

星細胞を同定する分子

免疫染色などで肝臓内の星細胞を他の構成細胞と区別する際に汎用される分子群を記す。デスミンは順天堂大学のグループが報告した有用なマーカーである。その発現は障害肝で増強することが観察される(組織図)。平滑筋型 α -アクチンは活性化星細胞のマーカーとしてげっ歯類だけでなくヒト組織でも利用される。それぞれの分子発現様式は静止期と活性化状態で異なる。

細胞外マトリックスの産生を介して炎症後の肝組織修復と癒痕形成に重要な役割をになっている。とくに、肝小葉門脈域への過剰な細胞外マトリックス沈着は門脈終末枝を狭小化させ血管抵抗を増加させる⁽⁵⁾。

肝微小循環の調節機構(図3)

プロスタグランジン (prostaglandin: PG) 類として肝臓ではトロンボキサン A_2 (TXA₂) が血小板から、プロスタサイクリン (prostaglandin: PGI₂) が内皮細胞から、PGE₂ がクッパー (Kupfer) 細胞から主として合成される⁽⁶⁾。TXA₂ は星細胞表面の TXA₂ 受容体に結合するとイノシトールリン酸代謝を活性化し、細胞内 Ca²⁺ 濃度を上昇させて収縮応答を惹起する。また、*ex vivo* 肝灌流実験でも TXA₂ 投与後門脈圧上昇が観察される。一方、PGE₂ や PGI₂ が受容体に結合するとアデニレートシクラーゼが活性化され細胞内 cAMP 濃度が上昇し、アクチンフィラメントが解離して細胞は弛緩する⁽⁴⁾。

肝臓では類洞内皮細胞と星細胞が ET-1 を産生する⁽⁷⁾。また、星細胞に ETA 受容体が、また、内皮細胞とクッパー細胞に ETB 受容体が発現しており、放射標識した ET-1 は、類洞と門脈終末枝に集積する。ラット灌流肝に ET-1 を投与すると、灌流圧は著明に上昇し、持続投与すると不可逆的収縮をきたす^(8, 9)。ラットの腸間

膜静脈や肝静脈は ET に応答しないが、門脈から得たリング標本は持続的に収縮する⁽⁵⁾。一方、星細胞が筋線維芽細胞へと形質をかえると ET の産生量が増加し、ETA 受容体も発現増強するので、慢性障害肝では、ET がオートクラインに星細胞収縮を増強し、細胞外マトリックスとともに類洞を締め付けて微小循環を阻害する可能性が提唱されている。

肝微小循環動態への NO の関与は肝灌流実験により検討されている。前述した ET による肝灌流圧の上昇は、ニトロプルシドナトリウムや sin-1 などの NO 供与体で抑制され、NO 合成阻害剤で増強される^(8, 10)。培養星細胞の収縮能は NO によって減弱し、アクチンフィラメントの解離現象がみられる。したがって、NO は星細胞の収縮抑制を介して類洞内血流を一定に保つ役割を果たすものと推測される。また、星細胞自体もエンドトキシンやインターフェロン (IFN)- γ 刺激に応じて NO を産生する⁽¹¹⁾。

さらに最近、アンジオテンシン II の関与が注目を集めている。生理的状態の肝臓ではアンジオテンシノーゲンがクッパー細胞でアンジオテンシン II に変換されることが知られていた。最近の報告では活性化星細胞自体がアンジオテンシン II を産生し、また、アンジオテンシン II 受容体 (AT1) が過剰発現することから、アンジオテンシン II 依存性星細胞収縮がオートクラインに肝局所で作動することが明らかにされてきた^(12, 13)。

星細胞の収縮力と平滑筋型 α -アクチン

平滑筋型 α -アクチンは星細胞活性化のマーカーとして汎用される。正常ラットから正常の星細胞を分離培養すると、培養開始 2 日目から平滑筋型 α -アクチンが発現する。この時期には PDGF や TGF- β 受容体も発現するので、星細胞が静止期 (quiescent phenotype) から活性化への移行期であることがわかる。アクチンには α , β , γ の 3 種類があり、 β は一定であるが、 α と γ が活性化星細胞で誘導される。コ

ラーゲングル法を用いて星細胞の収縮力を観察する実験では、静止期の星細胞に収縮性は観察できず、活性化に依存した収縮力増強を観察できる⁽¹⁴⁾。平滑筋型 α -アクチン発現の転写制御は十分に解明されていないが、転写調節領域に存在するE-box^{*3}が重要であること、また、酸化ストレスがE-box結合転写因子の調節に関与することが報告されている⁽¹⁵⁾。

星細胞収縮力の制御と門脈圧亢進症の治療

前述したように、星細胞の収縮力制御は慢性肝障害にともなう門脈圧亢進症の治療と直結するので旺盛な研究が現在進行形である。方法論としては、(1)星細胞の活性化自体を制御する、(2)星細胞の収縮力を制御する、の2通りが考えられる。前者の代表的薬剤はIFNである。とくに、IFN- γ は*in vitro*および*in vivo*で星細胞活性化を抑制し⁽¹⁶⁾、平滑筋型 α -アクチン発現と細胞収縮を抑制する。すでに広く臨床使用されているIFN- α や β にも弱いながら星細胞活性化抑制効果がある。

前述したようにETが星細胞を強く収縮させるので、ETの受容体拮抗剤を用いればその収縮力を制御できる。事実、ETA/B受容体拮抗剤であるボセンタンを用いればラットに誘導した門脈圧亢進症を軽減することができ、さらに、平滑筋型 α -アクチンと細胞外マトリックスの発現を抑制できることが報告されている⁽¹⁷⁻¹⁹⁾。興味深いことに、障害肝自体のET産生は亢進しており、肝内で生じたETが活性化星細胞に作用する可能性が高いので、ET受容体拮抗剤を肝臓にうまくターゲットしてやれば、副作用のない門脈圧亢進改善剤が開発される可能性がある。

NOは平滑筋型 α -アクチン発現を抑制し、星細胞収縮を抑制するので、NOを星細胞のみに作用させる手法を開発できれば門脈圧亢進症を改善できる可能性がある。現在、内皮型NO合成酵素(eNOS)や神経型NO合成酵素



(nNOS)をアデノウイルスベクターに組み込んで投与し、肝細胞に強制発現させて門脈圧亢進症を改善させる試みが動物モデルでなされている^(20, 21)。また、NCX-1000というNOを遊離するウルソデオキシコール酸由来の薬剤が開発されている⁽²²⁾。

最近、Rhoシグナルの阻害は平滑筋収縮を抑制することが示され、Rhoの下流に位置するRhoキナーゼ(ROCK)を阻害する薬剤としてY-27632が発見された⁽²³⁻²⁵⁾。活性化星細胞にY-27632を添加すると形態が樹状突起をもつ静止期の形態へと変化する。一方、*ex vivo*肝灌流実験でET-1により門脈圧を上昇させる際、Y-27632を同時投与するとET-1による圧上昇が誘導されないことが判明した⁽²⁶⁾。以上の結果から、門脈-類洞系の圧調節機構へのRho/ROCKシステムの関与は明らかであり、これをターゲットとした門脈圧亢進治療剤の開発も可能であると考えられる。

臨床に直結する話題としてアンジオテンシンIIの阻害が注目に値する。すでに高血圧の治療薬として、アンジオテンシン変換酵素阻害剤やAT1受容体拮抗剤は多数存在する。これらを用いることで星細胞の活性化制御、ならびに、門脈圧の制御が可能と考えられ、各種の臨床試験がおこなわれている^(12, 13)。

肝類洞に発現する新しいガス結合タンパク質cytoglobin

筆者らは星細胞に発現するタンパク質をブ

図3

星細胞の収縮・弛緩を調節する因子と細胞内伝達物質

*3

「5'-CANNTG-3'という塩基配列(Nは任意の塩基)。

ロテオーム解析し⁽²⁷⁾、その過程でCygbを見いだした⁽²⁸⁾。Cygbはヘムタンパク質であり、哺乳類ではヘモグロビン、ミオグロビン、ニューログロビンにつぐ第4番目のグロビンである。Cygbは酸素だけでなく一酸化炭素(CO)やNO結合能を有する⁽²⁹⁾。Cygbのような内臓系線維芽細胞に発現するガス結合性グロビンの機能解析は始まったばかりであり、他のグロビン同様に酸素運搬タンパク質として機能するのか、あるいは、なんらかの酵素活性を有して酸化還元反応に関与するのか、その解析が待たれる。

おわりに

門脈圧亢進症は胃食道静脈瘤を合併することから悪性ではないにしても、致死的要素を併わせもつ疾患であり適当な治療法が必要である。現在では内視鏡的に食道静脈瘤結紮術や硬化療法治療がおこなわれているが、これらは根治術ではなく、患者サイドにたつと内服できる薬剤で門脈圧をコントロールできればベストである。残念ながら現存する薬剤ではこれは不可能に近い。門脈圧亢進症の分子機構を解明しそれに対応する治療法を開発していく研究がようやく端緒についたばかりである。

Profile

かわだ・のりふみ

1986年 大阪市立大学医学部卒。大学院時代から肝臓洞細胞の研究に着手。学位は「肝炎における局所プロスタグランジン産生」に関する研究で取得(1991年)。ドイツ・フライブルグ大学留学時(1991～2年)に星細胞と出会い、その後一貫して肝線維化の分子機構を研究。2001年には星細胞に発現する新しいグロビンを発見。肝臓病を主体とした臨床と基礎研究の両者をおこなう。2007年より肝臓病内科学教授。

参考文献

[1] 河田則文, 井上直康:「肝代謝—その細胞社会的背景」Mebio 11 (1994) 20-28
 [2] Mucuskey RS: "The hepatic microvascular system" In The Liver: Biology and Pathology (Arias IM, Boyer J L, Fausto N, Jakob W B, Schachter D & Shafritz D eds) Laven Press (New York) (1994) 1089-1106
 [3] Wake K: "Perisinusoidal stellate cells (fat-storing cells, interstitial cells, lipocytes), their related structure in and around the liver sinusoids, and vitamin A-storing cells in extrahepatic organs" Int Rev Cytol 66 (1980) 303-353
 [4] Kawada N, Tran-Thi TA & Decker K: "The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances—possible involvement of endothelin-1 and nitric oxide in the regulation of sinusoidal tone" Eur J Biochem 213 (1993) 815-823

[5] Friedman S L, Roll F J, Boyles J & Bissell M: "Hepatic Lipocytes: The principle collagen-producing cells of normal rat liver" Proc Natl Acad Sci USA 82 (1985) 8881-8885
 [6] Decker K: "Biologically active products of stimulated liver macrophages (Kupffer cells)" Eur J Biochem 192 (1990) 245-261
 [7] Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S et al: "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells" Nature 332 (1988) 411-415
 [8] Tran-Thi TA, Kawada N & Decker K: "Regulation of endothelin-1 action on the perfused rat liver" FEBS Lett 318 (1993) 353-357
 [9] Kaneda K, Ekatakin W, Sogawa M, Matsumura A, Cho A & Kawada N: "Endothelin-1-induced vasoconstriction causes significant increase in portal pressure of rat liver: localized constrictive effect on the distal segment of preterminal portal venules as revealed by light and electron microscopy and serial reconstruction" Hepatology 27 (1998) 735-747
 [10] Moy JA, Bates JH & Fisher RA: "Effect of nitric oxide on platelet activating factor and α -adrenergic-stimulated vasoconstriction and glycogenolysis in the perfused rat liver" J Biol Chem 266 (1991) 8092-8096
 [11] Rockey DC & Chung JJ: "Inducible nitric oxide synthase in rat hepatic lipocytes and the effect of nitric oxide on lipocyte contractility" J Clin Invest 95 (1995) 1199-1205
 [12] Satalier R, Gines P, Nicolas JM, Gorbig MN, Garcia-Ramallo E, Gassil X, Bosch J, Arroyo V & Rodes J: "Angiotensin II induces contraction and proliferation of human hepatic stellate cells" Gastroenterology 118 (2000) 1148-1158
 [13] Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Nakatani T, Tsuchida H & Fukui H: "Angiotensin-II type 1 receptor interaction is a major regulator for liver fibrosis development in rats" Hepatology 34 (2001) 745-750
 [14] Rockey DC, Houset CN & Friedman SL: "Activation-dependent contractility of rat hepatic lipocytes in culture and in vivo" J Clin Invest 92 (1993) 1795-1804
 [15] Lee KS, Buck M, Hugglum K & Chojkier M: "Activation of hepatic stellate cells by TGF α and collagen type I is mediated by oxidative stress through c-myc expression" J Clin Invest 96 (1995) 2461-2468
 [16] Rockey DC, Maher JJ, Jarnagin WR, Gabbiani G & Friedman SL: "Inhibition of rat hepatic lipocyte activation in culture by interferon- γ " Hepatology 18 (1992) 776-784
 [17] Rockey DC & Chung JJ: "Endothelin antagonism in experimental hepatic fibrosis. Implications for endothelin in the pathogenesis of wound healing" J Clin Invest 98 (1996) 1381-1388
 [18] Rockey DC & Welsiger RA: "Endothelin induced contractility of stellate cells from normal and cirrhotic rat liver: Implications for regulation of portal pressure and resistance" Hepatology 24 (1996) 233-240
 [19] Pinzani M, Milani S, De Franco R, Grappone C, Caligiuri A, Gentilini A, Tosti-Guerra C, Maggi M, Falli P, Ruocco C & Gentilini P: "Endothelin 1 is overexpressed in human cirrhotic liver and exerts multiple effects on activated hepatic stellate cells" Gastroenterology 110 (1996) 534-548
 [20] Yu Q, Shao R, Quang H, George SE & Rockey DC: "Adenovirus mediated gene transfer of neuronal nitric oxide synthase in cirrhotic liver ameliorates portal hypertension" Hepatology (Abstract) 30 (1999) 318A
 [21] Yu Q, Shao R, George SE & Rockey DC: "Gene transfer of neuronal nitric oxide synthase in cultured liver cells and its effect on hepatic stellate cell contractility" Hepatology (Abstract) 30 (1999) 313A
 [22] Fiorucci S, Antonelli E, Morelli O, Mencarelli A, Casini A, Mello T, Palazzetti B, Tallet D & del Soldato P: "Morelli A, NCX-1000, a NO-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, selectively delivers NO to the liver and protects against development of portal hypertension" Proc Natl Acad Sci USA 98 (2001) 8897-8902
 [23] Noda M, Yasuda-Fukazawa C, Morishiki K, Kato T, Okuda T, Kurokawa K & Takuwa Y: "Involvement of rho in GTP gamma S-induced enhancement of phosphorylation of 20 kDa myosin light chain in vascular smooth muscle cells: inhibition of phosphatase activity" FEBS Lett 367 (1995) 246-250
 [24] Uehata M, Ishizaki T, Satoh H, Ono T, Kawahara T, Morishita T, Tamakawa H, Yamagami K, Inui J, Masakawa M & Narumiya S: "Calcium sensitization of smooth muscle mediated by a Rho-associated protein kinase in hypertension" Nature 389 (1997) 990-994
 [25] Itoh K, Yoshitaka K, Akado H, Uehata M, Ishizaki T & Narumiya S: "An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells" Nat Med 5 (1999) 221-225
 [26] Kawada N, Seki S, Kuroki T & Kaneda K: "ROCK Inhibitor Y-27532 Attenuates Stellate Cell Contraction and Portal Pressure Increase Induced by Endothelin-1" Biochem Biophys Res Commun 266 (1999) 296-300
 [27] Kristensen DB, Kawada N, Inamura K, Miyamoto Y, Tateno C, Seki S, Kuroki T & Yoshizato K: "Proteome analysis of rat hepatic stellate cells" Hepatology 32 (2000) 268-277
 [28] Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, Nakatani K, Minamiyama Y, Seki S & Yoshizato K: "Characterization of a stellate cell activation-associated protein (STAP) with peroxidase activity found in rat hepatic stellate cells" J Biol Chem 276 (2001) 25318-25323
 [29] Nakatani K, Okuyama H, Shimahara Y, Saeki S, Kim DH, Hatajima Y, Seki S, Kawada N & Yoshizato K: "Cygb/STAP, its unique localization in splanchic fibroblast-like cells and function in organ fibrogenesis" Lab Invest 84 (2004) 91-101

CASE REPORT

Hiroji Shinkawa · Takuya Nakai · Akihiro Tamori
Hiromu Tanaka · Shigekazu Takemura · Kazuki Ohba
Takahiro Uenishi · Masao Ogawa · Satoshi Yamamoto
Seikan Hai · Tsuyoshi Ichikawa · Shintaro Kodai
Kazuhiro Hirohashi · Kenichi Wakasa · Shoji Kubo

Hepatocellular carcinoma (HCC) recurring 10 years after clearance of hepatitis B surface antigen and 20 years after resection of hepatitis B virus-related HCC

Received: January 7, 2008 / Accepted: March 24, 2008

Abstract A 62-year-old man had been followed up for chronic hepatitis B (HB) since 1973. Hepatocellular carcinoma (HCC) was detected in 1985, at the age of 42 years. Serum HB surface antigen and anti-HB envelope antibody were positive at that time. A right hepatic lobectomy was performed. In 1995, serum HB surface antigen had cleared spontaneously and liver function had normalized. In March 2005, at the age of 62 years, a 1.5-cm diameter hepatic mass was detected in the left lateral segment. At that time, he was seropositive only for anti-HB core antibody. A diagnosis of recurrent HCC was made, and partial hepatectomy was performed. Covalently closed circular HBV DNA was detected in both cancerous and noncancerous tissues by nested polymerase chain reaction (PCR). Cassette-ligation-mediated PCR showed that HBV DNA was integrated into the telomerase reverse transcriptase gene located on chromosome 5p15.

Key words Hepatocellular carcinoma · Hepatitis B virus · Human telomerase reverse transcriptase (hTERT) · Liver resection

Introduction

It is well known that hepatitis B virus (HBV) can cause hepatocellular carcinoma (HCC). Persistent active hepatitis can result in progression to cirrhosis and the development of HCC. During the natural history of chronic hepatitis B (HB), seroconversion from HB surface antigen (HBsAg) to anti-HB surface antibody (anti-HBs) is associated with remission of active hepatitis and improvement of liver function and pathologic features.¹ Although it is thought that clearance of HBsAg from the serum indicates clinical cure and a decreased risk of carcinogenesis, HCC is sometimes detected after this seroconversion.^{2–6} It has also been reported that occult HBV infection is important in the development of HCC.^{4,7–10} In this report, we describe a case of HCC which recurred in 2005, 10 years after the clearance of HBsAg in 1995, and 20 years after resection of the first HCC while the patient was seropositive for HBsAg in 1985.

Case report

A 62-year-old man had been followed up for chronic HB since 1973. In 1985 (at age 42 years), a hepatic tumor was detected in the anterior superior segment (S8) by ultrasonography (US) and computed tomography (CT). Serum HBsAg was positive, serum anti-HBs was negative, HB envelope antigen (HBeAg) was negative, and anti-HB envelope antibody (anti-HBe) was positive (Table 1). Liver function tests indicated active hepatitis. Transcatheter arterial embolization and percutaneous transhepatic portal vein embolization were performed, followed by right lobectomy. He was transfused with 1500 ml whole blood and 880 ml fresh frozen plasma during the operation. The tumor measured 1.8 × 1.5 cm (Fig. 1A), and was classified as T1N0M0 according to the TNM system.¹¹ Pathologic examination revealed a moderately differentiated HCC and no microvascular invasion (Fig. 1B). Examination of the

H. Shinkawa (✉) · H. Tanaka · S. Takemura · K. Ohba · T. Uenishi · M. Ogawa · S. Yamamoto · S. Hai · T. Ichikawa · S. Kodai · S. Kubo
Department of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery, Osaka City University Graduate School of Medicine, 1-4-3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka 545-8585, Japan
Tel. +81-6-6645-3841; Fax +81-6-6646-6057
e-mail: m1297198@msic.med.osaka-cu.ac.jp

T. Nakai
Department of Surgery, Kinki University, Osakasayama, Japan

A. Tamori
Department of Hepatology, Osaka City University Graduate School of Medicine, Osaka, Japan

K. Hirohashi
Department of General Practice, Osaka City University Hospital, Osaka, Japan

K. Wakasa
Department of Pathology, Osaka City University Hospital, Osaka, Japan

Table 1. Results of laboratory tests at the times of the first and second operations

Test	First operation (Oct. 1985)	Second operation (March 2005)
Albumin (g/dl)	4.0	4.2
Total bilirubin (mg/dl)	0.6	0.6
Aspartate aminotransferase (IU/l)	50	24
Alanine aminotransferase (IU/l)	115	27
ICGR15 (%)	13.5	19.6
Prothrombin test (%)	105	113
HBeAg	-	-
Anti-HBe	+	+
HBsAg	+	-
Anti-HBs	-	-
Anti-HBc	+	+
HBV DNA	ND	-
Anti-HCV (titer)	ND	2.2
HCV RNA	ND	-
α -Fetoprotein (AFP; ng/ml)	57	4
AFP-L3 (%)	ND	0
PIVKA-II (AU/ml)	ND	21

ICGR15, indocyanine green retention rate at 15 min; HBeAg, hepatitis B envelope antigen; anti-HBe, anti-hepatitis B envelope antibody; HBsAg, hepatitis B surface antigen; anti-HBs, anti-hepatitis B surface antibody; anti-HBc, anti-hepatitis B core antibody; HBV DNA, hepatitis B virus DNA; anti-HCV, anti-hepatitis C virus antibody; HCV RNA, hepatitis C virus RNA; PIVKA II, protein induced by vitamin K absence or antagonist II; ND, not determined; INH, inhibition

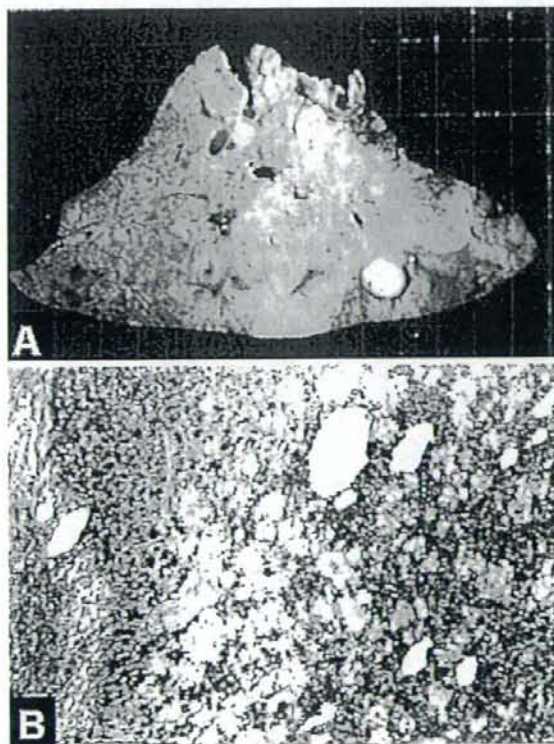


Fig. 1. A Resected specimen from the first operation. The tumor measured 1.8 cm \times 1.5 cm and was mostly necrotic. B Pathologic examination showing that the tumor is a moderately differentiated hepatocellular carcinoma. H&E, \times 20

nontumorous hepatic tissue showed minimal hepatitis activity (grade 1) and portal-portal septa without architectural distortion (stage 2) according to the histologic activity index score.¹² In 1995 (at age 52 years), serum HBsAg had cleared. In 1996, serum HBV DNA was negative by the polymerase chain reaction (PCR) method. Serum anti-hepatitis C virus antibody (anti-HCV; Ortho Diagnostic Systems, Tokyo, Japan) was positive, but serum hepatitis C virus RNA (Quantiplex HCV-RNA; Chiron, Emeryville, CA, USA) was negative. The anti-HCV titer was consistently low. The serum levels of aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) had normalized in 1995. In March 2005 (at age 62 years), a hepatic mass measuring 1.5 cm in diameter was detected in the left lateral segment by CT and US. At that time, serum HBsAg, anti-HBs, and HBV DNA were all negative (Table 1). Anti-HB core antibody was positive. The anti-HCV titer was very low. Although the indocyanine green retention rate at 15 min was 19.6%, the results of other liver function tests were within the reference ranges. Renal function tests were abnormal because of renal failure following coronary artery bypass grafting and graft replacement of the ascending aorta at the age of 59 years. The levels of the tumor markers α -fetoprotein (AFP), AFP-L3 fraction, and protein induced by vitamin K absence or antagonist II were all within the reference ranges. In May 2005, partial hepatectomy was performed with a preoperative diagnosis of recurrent HCC. The tumor measured 2.5 \times 2.0 cm (Fig. 2A), and was classified as T2N0M0. Pathologic examination showed a moderately differentiated HCC and no microvascular invasion (Fig. 2B), with nonactive hepatitis (grade 0) and portal fibrous expansion (stage 1) in the noncancerous tissue. The HB surface (HBs) gene and covalently closed circular (ccc)

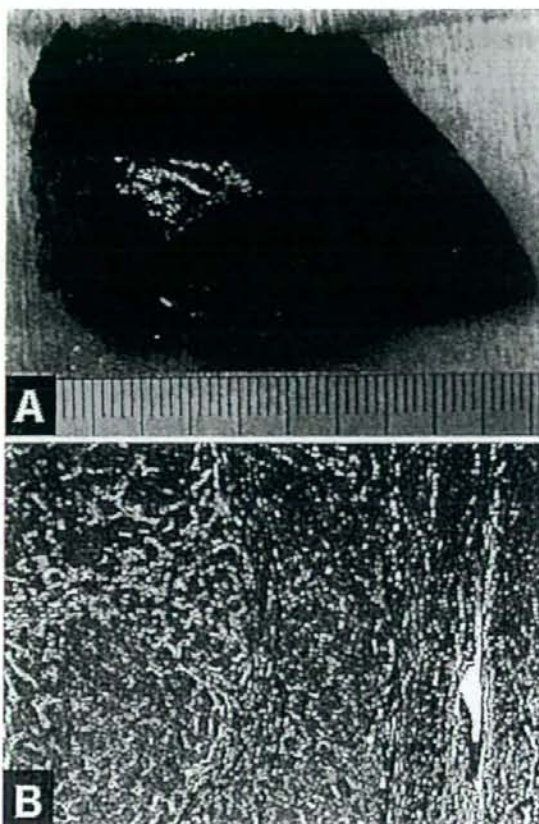


Fig. 2. A Resected specimen from the second operation. The tumor measured 2.5 cm \times 2.0 cm. B Pathologic examination showing that the tumor is a moderately differentiated hepatocellular carcinoma. H&E, \times 20

HBV DNA were detected in the tumor by PCR. The *HBs* gene, hepatitis B core (*HBc*) gene, and ccc HBV DNA were detected in the nontumorous tissue by PCR. The *HBx* gene was not detected in either tumor or nontumorous tissues by PCR (Fig. 3). Cassette-ligation-mediated PCR^{10,13} showed that HBV DNA was integrated into the telomerase reverse transcriptase gene (*hTERT* gene) located on chromosome 5p15 in the tumor (Fig. 4). The patient is in good health without recurrent tumor 18 months after the second operation.

Discussion

In this report, we describe a case of recurrent HCC 10 years after the clearance of HBsAg and 20 years after resection of the first HBV-related HCC. The duration between the first HCC and the recurrent HCC is the longest reported in the literature to date. The duration between the clearance of HBsAg and the detection of the recurrent tumor is the longest except for one case reported by Yoshino et al.⁶

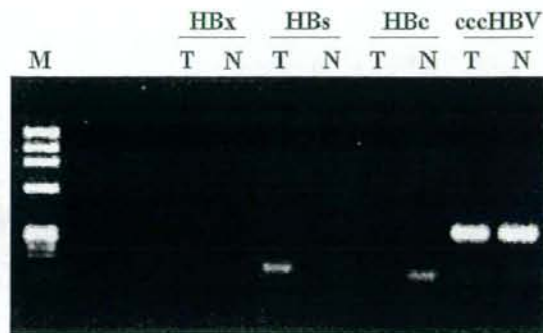


Fig. 3. Hepatitis B virus (HBV) DNA analysis of the resected sample. Detection of the *HBx* gene, *HBs* gene, *HBc* gene, and ccc HBV DNA was performed using specific primers in the tumor (T) and nontumorous (N) tissues. M, Marker (pBR322/AluI).

The mechanism of carcinogenesis in HCC associated with HBV includes mutagenesis and changes in proliferation and differentiation caused by the integration of HBV DNA.¹⁴⁻¹⁷ HBx protein binds with p53 protein and inhibits p53-mediated prevention of neoplastic transformation,^{18,19} and also activates cellular transcription factors.^{20,21} Chronic inflammation and oxidative stress due to HBV infection induce DNA damage in hepatocytes.²² Although we could not investigate the integration of HBV DNA at the time of the first operation in this patient, the first HCC is thought to have been caused by chronic HB, because he was seropositive for HBsAg and had active hepatitis at that time. At the time of the second operation, serum HBsAg and HBV DNA had cleared and liver histology had improved. Research on HBV DNA has shown that the *HBs* gene and ccc HBV DNA are detectable in HCC and nontumorous hepatic tissue, and that the *HBc* gene is detectable in non-carcinomatous hepatic tissue; the *HBx* gene was not detected in either tumor or nontumorous tissues in our patient. Integration of HBV DNA into the *hTERT* gene has also been detected. Previous reports showed that HBV DNA was integrated into the *hTERT* gene, and that it also could play an important role in hepatic carcinogenesis.^{23,24} These findings indicate that the patients have either occult HBV infection or integration of HBV DNA in their liver. Other possible mechanisms of hepatic carcinogenesis include inactivation of p53 by mutations and regional allelic deletions, although changes in the *p53* gene and p53 protein were not investigated in our patient.²⁵

Hepatitis B antigens have been detected in the hepatic tissues of some patients after the clearance of serum HBsAg associated with the remission of active hepatitis, especially in those with a high anti-hepatitis B core antibody (anti-HBc) titer.^{26,27} HBV DNA is often integrated into the host's chromosomes and plays an important role in hepatic carcinogenesis.²⁸ Thus, we speculate that, in our patient, the HCCs developed from multicentric origins, and that the integrated HBV DNA participated in the development of the recurrent HCC. In patients with chronic HB, screening for HCC is necessary even after clearance of serum HBsAg