

物界は古細菌 (Archaea), 細菌 (Bacteria), 及び真核生物 (Eukaryota) の3界に分類されている。日本語では古細菌は細菌の一種と誤解され易いが (実際, 以前はそのように専門家の間でも誤解されていた), 細菌とは異なる独立した (対等の) 生物群である。この両者の違いを考慮に入れて, 細菌は, 英語での表現 (バクテリア) をしない場合, 真性細菌と呼ばれる。地球誕生後 10 億年頃, 無生物であった原始地球環境で何らかの化学反応が複合的に生じ生物の誕生につながったと考えられる。ダーウインの「種の起源」³⁾ に従えば, これらの反応産物の中に上記 3 つの生物群の共通先祖がいたと期待される。その先祖生物に LUCA [the Last Universal Common Ancestor, あるいは LUA (Last Universal Ancestor)] の名前が与えられている⁴⁾。LUCA の出現は 35 億年前の前カンブリア紀であると推定されている⁵⁾。

3. グロビン遺伝子の系統発生

現在までに多数のグロビンの存在が報告されているが, その名前は発見に関与した研究者の立ち位置を反映するものであり個々に命名されてきた。このため, この蛋白の機能を広く生物界全体を見渡して一般的に議論する時不便である。ここでは, この事を考慮して Vinogradov らが提案する命名法 (分類法) に従って, 現時点におけるグロビンの系統発生に関する理解を概観して⁶⁾, サイトグロビンの機能に関する理解の一助としたい。

グロビンは, globin fold だけからなる単一ドメイングロビン [Single Domain globin (SDgb)] と globin fold 以外に他のドメインをもつキメラグロビンに大別される。Hb を作っている α -globin と β -globin, Mb, Cygb, およびニューログロビン (Neuroglobin [Ngb]) などはいずれも前者に分類される。細菌にその存在が知られているフラボヘモグロビン (FHb) は酸化還元色素である FDA に対する結合ドメインをもつキメラグロビンである。換言すると FHb はフェロドキシ還元酵素様の FAD/NAD- 結合ドメインとグロビンドメインの融合蛋白で, 還元酵素活性と酸化酵素活性のいずれも持っている。真性細菌と古細菌にその存在が知られている酸素センサー機能を持つグロビン [Globin-Coupled Sensor (GCS)] もキメラグロビンである。GCS は酸素を感知するグロビンでありこれによってこれら生物は酸素を利用したり避けたりする事が出来る。分子の N 末端側は Mb 様ドメインでありそのヘムを介して酸素と結合出来る。C 末端

側は細菌の化学レセプター様のドメインであり酸素依存性の細胞内シグナリングに関与している⁷⁾。単一ドメイングロビンではあるがその一部を欠く “切断型ヘモグロビン (truncated hemoglobin)” がある。

通常のグロビンが 3/3 fold であるのに対して, 切断型は 2-over-2 α -helical fold (2/2 fold) である。26 種の古細菌, 245 種の真性細菌, 及び 49 種の真核生物のゲノムについて塩基配列解析を行いグロビン (あるいはグロビン様) 遺伝子配列の有無を調べた研究によれば, 古細菌と真性細菌のそれぞれおよそ 25% と 65% がグロビンを持っており, 真核生物になるとその割合は 90% 以上に上る⁸⁾。

現存生物の遺伝子情報から LUCA が持っていた遺伝子情報を推定するには, 古細菌と真性細菌のゲノムやプロテオームの詳細を調べ, 比較する研究が役に立つことは容易に考えられる。この二つの生物群のもつグロビンはどのような蛋白であるのかの質問も, LUCA との観点から考えれば興味が増す。Vinogradov らはそのような観点から研究を展開している⁹⁾。彼らはグロビンスーパーファミリーを M-, S-, 及び T-ファミリーの 3 つに区別してその系統を論じている。M-ファミリーはミオグロビン様のグロビンであり, S-ファミリーの名称はこのファミリーに上述の GCS が含まれているのでその sensor に由来している。これら二つは 3/3-globin 構造を持つ。T-ファミリーは上述の truncated globin で 2/2-globin 構造を持つ。M-ファミリーはさらに FHb と SDgb のサブファミリーに区分される。S-ファミリーは GCS, single domain Pgb (protoglobin), 及び SSDgb (Sensor Single Domain globin) の 3 つのサブファミリーを含んでいる。Protoglobin (プロトグロビン) は, 古細菌と真性細菌に存在し, 真核生物には含まれていないので, グロビンの先祖遺伝子ではないかと考えられて命名されたグロビンである。T-ファミリーは TrHb1s, TrHb2s, 及び TrHb3s の 3 つのサブファミリーに分かれている。真性細菌と比較すると古細菌はこれらのグロビンのうち, Pgb, GCS, 及び TrHb1s の 3 つだけを持っていることが特徴である。

真性細菌はこれらグロビン遺伝子に加えて, FHb グロビン遺伝子も持っており, つまり 3 種のグロビンファミリーの遺伝子を全て持っている唯一の生物集団であること, さらに 2/2-Hb と GCSHb は FHb に相同性を持つが, 2/2-Hb と GCSHb 間には無いことから, FHb 様の SDHb が現存グロビンの先祖ではないかとの考えが提唱されている⁹⁾。この先祖 Hb が切断されて 2/2-Hb と sensor-like

Hbを生じ、さらに、これらにC-末端ドメインが付加されてFHbとGCS-Hbが出現した可能性があるとの考えである。この可能性がさらに追求され、その系統発生の流れがどのようなかたちでLUCAと繋がるのか、今後の研究の発展が期待される。

4. グロビンと酸素

およそ46億年前の地球誕生後、最初の10億年の間、地球環境（大気および海洋）には酸素はほとんど無かったと考えられている。現在の現地球大気の酸素濃度は20.8%であるが、生命が誕生したと考えられるおよそ40億年前の大気の主成分は現在の様に窒素であるが、酸素の濃度は10%であったと推定されている¹⁰⁾。その他、少量の炭酸ガス、水蒸気のほか、極く僅かのその他の気体を含んでいたと思われる。生命誕生以前の地球での酸素の発生は、主として紫外線による水の分解によっていた。一方、生命は、上述した様に38億年前頃に既に出現していたと考えられている¹¹⁾。30億年から28億年前には、光エネルギーをその生存エネルギーとして利用する事ができる緑色硫黄細菌などが出現していた¹²⁾。しかし、これらの細菌は酸素を発生しない光合成細菌（anoxygenic photosynthetic bacteria）で光エネルギーを利用して得た高い還元力でNADHを合成し、光合成電子伝達系の最終的還元物質として水ではなく、例えば、硫化水素を利用するエネルギー代謝系を発達させていた。

およそ28億年前に大気環境に大きな変化が起こった。光合成電子伝達系の最終還元物質として水を利用する細菌の出現である。この細菌（シアノバクテリア）は光合成反応の一環として水を分解して酸素を発生する能力を獲得したのである。この出現は原始大気の有り様を劇的に変える事になった。ある種のanoxygenic photosynthetic bacteria、恐らく緑色非硫黄細菌、が水を分解して酸素、電子、及び陽子を生じる反応系を獲得し、酸素発生光合成細菌（oxygenic photosynthetic bacteria）であるシアノバクテリアの出現につながったと考えられている¹³⁾。シアノバクテリアは原始地球大気の“酸素化”に大きな貢献をしたと考えられる。酸素の出現はこれを利用してエネルギーを獲得する生物（好気呼吸生物）出現を促した。それまでの嫌気呼吸に比べて好気呼吸は呼吸基質（グルコースなどのヘキソース）当たりのATP生成率が18倍も高いことから、高度に複雑な機能を果たす事が出来る多細胞真核生物への進化を可能にした。

グロビンは酸素結合蛋白であるから、地球環境に酸素分子があつて初めてその機能を果たすことが出来ると考えられる。生命の誕生がおよそ40億年前、大気が多量の酸素を含む様に成ったのがおよそ30億年である。この10億年の間、生物は酸素がほとんど無い環境の中でグロビン蛋白を合成する能力を獲得し、酸素分子を利用して来たことになる。この酸素は紫外線の水分分解で生じた希少成分の酸素であったと考えられる。つまり、その発生に生物が関与していない希少酸素分子を利用することがエネルギー獲得手段として有利であったことを推定させる。大気に酸素がない環境化でも、グロビンが酸素に対して高い親和性をもっているため、当時の生物達は生息環境に存在する僅かの酸素を利用して生存できたと考えられる。このような考えは、極く僅かの酸素しか存在しなかった太古の地球環境でグロビン蛋白を持っていた古細菌あるいは細菌が私たち人類の先祖であったとの想像を掻き立てる。

5. サイトグロビンの発見

肝臓は体内に取り込んだ栄養素のみならず薬剤などの化学物質の処理器官であり、そのために必要な物質輸送活性、解糖系や脂肪代謝系などの代謝関連酵素活性が高い。また、取り込んだ薬剤の影響やウイルス感染などが慢性化すると肝細胞が障害を受け、それが引き金となり肝臓にコラーゲン線維が次第に増成沈着し（線維化と言われる）、ひいては肝硬変や肝細胞癌を発症する。この線維化や肝硬変の過程に星細胞が関与する。この細胞は正常状態ではビタミンA貯蔵細胞として、血中や肝細胞などにおけるビタミンAのホメオスタシスに中核的貢献をしている。この状態の星細胞は正常星細胞あるいは静止星細胞（非活性化星細胞）と呼ばれる。肝臓障害が慢性化するとこの星細胞が活性化し、コラーゲン合成などが高まり、肝臓は線維化の方向に進むことになる。この活性化星細胞はビタミンA貯蔵能を喪失し、形態が筋線維芽細胞様になる。また、増殖能も亢進する。この過程が星細胞の活性化でありその仕組みに関して多くの研究がなされて来た。例えば、四塩化炭素やチオアセトタミドは肝臓に障害を与える薬物である。これらをラットやマウスに与えることによって星細胞の活性化を実験的に誘導することが出来る。また、正常肝臓から静止星細胞を取り出してシャーレで培養すると、理由は良く分かっていないが、静止細胞は次第に活性化された状

態に変化することが知られており、活性化の仕組みを調べるためのモデルとしてよく使われている。

1995年頃、私たちは肝星細胞の活性化の仕組みを調べるための共同研究を開始した。当時、プロテオーム解析技術と呼ばれる新しいタンパク質研究方法が開発され研究者の間で利用され始めていた。私たちはこの新技術を使って星細胞の活性化現象をタンパク質発現の変化の面から調べることにした。上記した方法でラット体内及び培養環境下で星細胞を活性化させた。この細胞集団を実験群とし、それぞれの条件下(体内と培養環境)で得た静止星細胞を対照群として、これらの細胞が発現している蛋白を二次元電気泳動ゲルに網羅的に展開した。実際には、それぞれの蛋白スポットを可視化するため、専用の色素クマシーブリヤントブルー(CBB)で染色した。この方法では、サンプル中の蛋白の二つの固有値(分子量と等電点)が全ての蛋白について異なっておれば原理的には1つのCBB-スポットが1個の蛋白に対応していることになる。それぞれの実験条件で静止及び活性化細胞の個々の蛋白のゲル上でのCBB-スポットの分布パターン(プロフィール)を詳細に比較して活性化細胞で強く或は弱く発現している(CBBで強く或は薄く染まっている)スポットを選んだ。その選んだスポットの中から、二つの実験条件で共通しているスポットをさらに絞り込んで、このスポットを星細胞が活性化する時その発現が亢進又は低下する蛋白と見なして更なる分析の対象とした。これらスポットを質量分析器で解析してその蛋白を同定した。その分析の結果、27種の蛋白が同定された¹⁴⁾。

これら27種の蛋白は1個を除いて他の研究者によって同定されて名前が与えられていた。1個の未知蛋白は更なる研究対象とする価値があると判断してその蛋白を“星細胞活性化関連蛋白”(Stellate Cell Activation-Associated Protein [STAP])と名付けて、この蛋白質が実際に星細胞の活性化に関わっていることを示す実験を行なった。実験結果は、期待通り、STAPが肝星細胞活性化に深く関わっていることを示すものであった¹⁾。さらにこの蛋白は酸素結合能を有するヘム蛋白であること、過酸化水素を分解する酵素活性(パーオキシダーゼ活性)を示すことが新たに判明した。この研究成果によって、私達はグロビン蛋白質に強い関心を持つようになった。グロビン蛋白質が星細胞の活性化にどのようなかたちで関わっているのかという疑問が次なる研究課題として浮上した。

私達がこの成果を発表した翌年(2002)、二つの研究グ

ループが互いに独立して第4のグロビンを発見したと発表した。1つはドイツの研究グループであった¹⁵⁾。この研究グループの手法は、グロビン探索の正攻法であった。つまり、「ショウジョウバエのグロビン遺伝子配列に似た配列をもつヒトとマウスの遺伝子を公表されている遺伝子配列の中から発見できないか」との質問に答えるための研究成果であった。他の1つはアメリカのグループであったが、その手法も正攻法であり、既知の脊椎動物Hbのグロビンドメイン配列に似た配列を持つ遺伝子をヒトとマウスの遺伝子から探し出す研究であった¹⁶⁾。この新しいグロビンに対してドイツとアメリカの研究者はそれぞれサイトグロビン(Cygb)及びヒストグロビン(HGb)と命名した。同じ蛋白に対して三つの異なる名前が付いたことになるが、その後の研究でCygbがその新グロビン蛋白の性質を一番明確に正しく表現していることになり、Cygbの名前が共通呼称として定着した。

私達はグロビン研究からではなく、肝星細胞の活性化機構解明研究からCygbの発見に至った。この研究視点からグロビンの機能を改めて問い直すことによって原始生物以来、生物がその生存に必須の蛋白として持ち続けて来たグロビンの生物学と生理学上の役割に関して、さらには生物の慢性的ストレス反応として普遍的に見られる線維化過程における病理学的役割に関して、新しい考え方を提案できるのではないかと期待しながら研究を進展させている。

文 献

- 1) Kawada N, Kristensen DB, Asahina K, Nakatani K, Minamiyama Y, Seki S, Yoshizato K. *J Biol Chem.* 2001;276:25318-23.
- 2) Woese CR, Fox GE. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74:5088-90.
- 3) Darwin, C. *The origin of species by means of natural selection.* 1859; John Murray: p. 490
- 4) Theobald DL. *Nature.* 2010;465:219-22.
- 5) Männige RV, Brooks CL, Shakhnovich EI. *PLoS Comput Biol.* 2012;8:e1002839.
- 6) Vinogradov SN, Hoogewijs D, Vanfleteren JR, *et al.* *BMC Evol Biol.* 2006;6:31.
- 7) Hou S, Freitas T, Alam M, *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(16):9353-8.
- 8) Vinogradov SN, Tinajero-Trejo M, Hoogewijs D, *et al.* *Biochim Biophys Acta.* 2013;1834:1789-800.
- 9) Vinogradov SN, Hoogewijs D, Vanfleteren JR, *et al.* *Gene.* 2007 Aug 15;398(1-2):132-42.
- 10) Lane Nick. *Oxford University Press.* 2002
- 11) Mojzsis SJ, Arrhenius G, Friend CR, *et al.* *Nature.* 1996;384:55-9.
- 12) De Marais DJ. *Evolution. Science.* 2000. 8;289:1703-5.
- 13) Dismukes GC, Klimov VV, Tyrtyshkin A, *et al.* *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(5):2170-5.
- 14) Kristensen DB, Kawada N, Yoshizato K, *et al.* *Hepatology.* 2000;32:268-77.
- 15) Burmester T, Ebner B, Hankeln T, *et al.* *Mol Biol Evol.* 2002;19:416-21.
- 16) Trent JT 3rd, Hargrove MS. *J Biol Chem.* 2002;277:19538-45.

最新医学・別冊 新しい診断と治療のABC 44 (別刷)

肝硬変 改訂第2版
第2章 病理・病態生理

病 因

河 田 則 文

最 新 医 学 社

第2章 病理・病態生理

病 因

肝硬変は、B型やC型肝炎ウイルス感染（HBV、HCV）アルコール多飲、自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変など、すべての慢性肝疾患の終末像である。病理学的にはびまん性にコラーゲンで構成される線維性隔壁に囲まれた再生結節（偽小葉）が形成された状態で、臨床的には、代償性肝硬変と非代償性肝硬変の2つに大きく分けられる。また、肝硬変からは年率5～8%で肝がんが生じるため、肝がん発生源地として肝硬変を理解することが重要である。

病態のメカニズム

肝硬変は肝臓の小葉にI、III、IV型コラーゲンを主体とする細胞外マトリックス物質が蓄積しつつ、線維芽様細胞、血管内皮細胞や偽胆管で構成され、線維性隔壁で肝実質が置換されることが特徴である。肝内の毛細血管である類洞構造の変化に伴い肝細胞機能も減退し、タンパク合成や胆汁排泄が阻害され、最終的に肝不全に陥る。また、肝臓内における門脈終末枝の拘縮により門脈圧亢進症が惹起され、脾腫や消化管に静脈瘤が形成される。

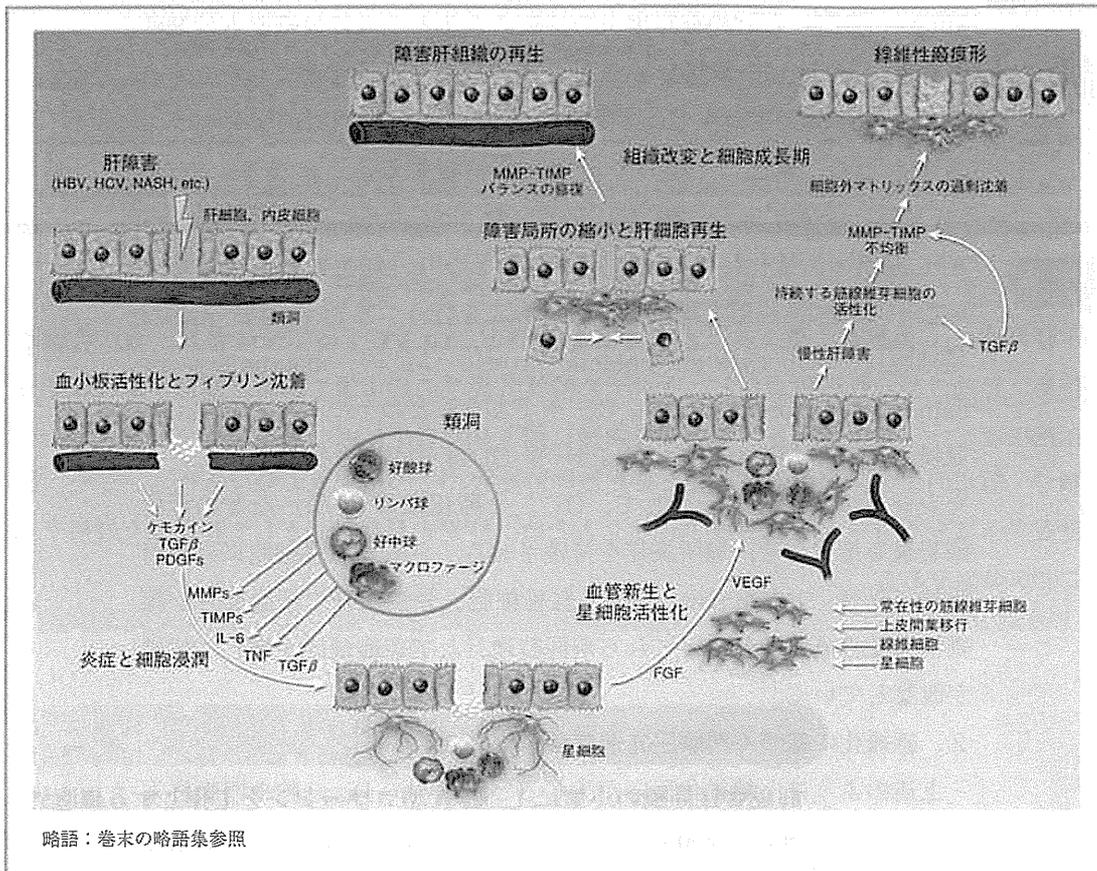
1. 肝線維化のメカニズム（図1）

肝炎ウイルスの感染やアルコール、脂肪沈着などで肝細胞が壊死して脱落すると、局所に微小な出血が生じ、血小板凝集とフィブリン形成で一時的に傷が塞がれる。傷害肝細胞、類洞内皮細胞や血小板からは、ケモカイン、トランスフォーミング増殖因子 β （TGF β ）、血小板由来増殖因子（PDGF）などのメディエーターが産生される。これらに呼応して、末梢血中の好酸球、好中球、リンパ球、マクロファージなどがインターロイキン-1（IL-1）、IL-6、IL-8、IL-10、IL-18、腫瘍壊死因子 α （TNF α ）やマトリックスメタロプロテアーゼ

● キーワード

星細胞
筋線維芽細胞
細胞外マトリックス
成長因子
肝硬度

図1 肝障害と治癒過程ならび線維化が生じるメカニズムを示す模式図



(MMP)などの生理活性物質を産生しつつ、炎症局所に集積する。さらに、肝類洞に存在する星細胞、類洞内皮細胞やKupffer細胞が活性化して、一過性の局所炎症を増幅させる¹⁾。

星細胞は生理的状況では3次的に類洞を包囲し、ビタミンAを貯蔵する肝組織特異的 pericyte (周皮細胞) と言えるが、炎症時には α -平滑筋アクチンに代表される分子マーカーを発現するようになり、筋線維芽細胞 (MFB) 様の細胞へと形質を変え、 $TGF\beta$ の産生と活性化を介したI型、IV型コラーゲン産生、血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) の産生、メタロプロテアーゼ組織インヒビター (TIMP) の分泌を行う。これにより、炎症局所に基底膜様構造を構築し、肝細胞再生の土台を作り、血管新生を伴いながら組織修復を行う。これが、急性肝炎のように炎症が一過性で終焉した場合のシナリオである²⁾。

しかしながら、肝炎ウイルス感染や脂肪性肝炎のように炎症が慢性

化してしまうと, activator protein 1 (AP-1) や c-Jun N-terminal kinase (JNK) などの転写因子の持続活性化とともに星細胞も持続活性化し, MFB 様の細胞として TGF β の産生・活性化とそれを介する TIMP-1 過剰産生が生じ, TIMP-1 と MMPs との相対的アンバランスが生じて, 組織に I 型コラーゲンが蓄積することになる. また, MFB は nuclear factor κ B (NF- κ B) や phosphoinositide 3-kinase-Akt 経路の活性化により細胞死抵抗性となり, 新生血管の構築を伴いながら線維性隔壁を構成して癥痕形成を行う. また, MFB 化した星細胞は, monocyte chemotactic protein (MCP), macrophage inflammatory protein (MIP), CC や CXC などのケモカイン産生, 抗原提示, Toll 様受容体 4 (TLR4) や CD14 の発現を伴ったエンドトキシンへの高反応性を介して, O $_2$ ⁻, 一酸化窒素 (NO) などの活性酸素種を産生させ, 局所炎症を持続させる. さらに, 星細胞以外の門脈域 MFB, 中皮由来の MFB, 線維細胞, 骨髄由来の細胞群らが線維性隔壁構成に加わる. これらが同時進行して組織硬度が増し, 組織が改築していく.

2. 線維化に基づく門脈圧亢進症のメカニズム

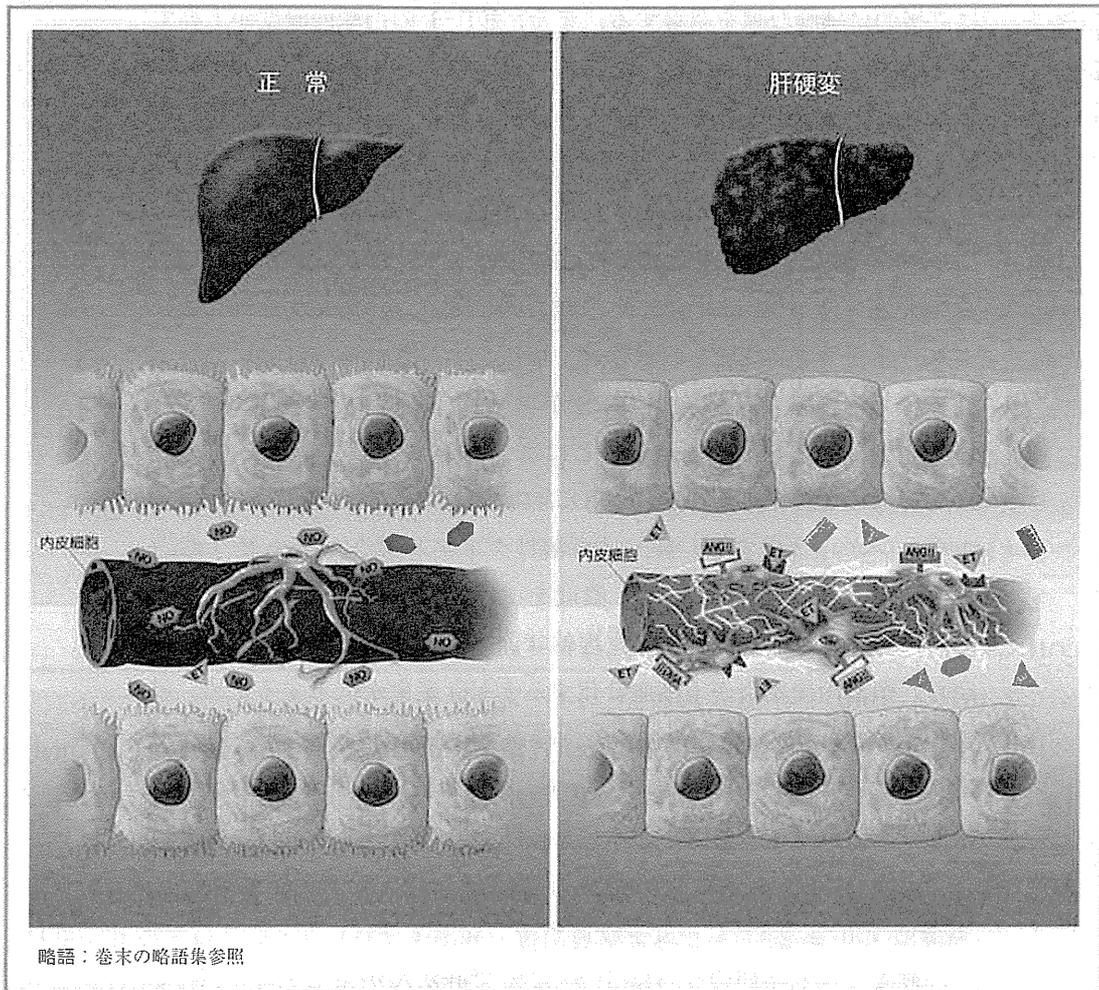
上述のように, 線維化反応が生じると, 類洞の Disse 腔や門脈終末枝 (terminal portal venule) に I 型コラーゲンを主体とする細胞外マトリックス物質が沈着する. MFB は α -平滑筋アクチンを発現させて, 収縮力を増しながら類洞や門脈終末枝周囲に集積する. また, 生理的状況下では, 類洞内皮細胞は“ふるい”である sieve plate を持っており, 100 nm 程度の物質を自由拡散で肝細胞側へと通過させるが, 線維化が生じると, この小窓は閉じて“毛細血管化”を起す. このような機構が総じて, 類洞や門脈終末枝は物理的に狭細化する⁹⁾. また, MFB は血管収縮性物質であるエンドセリン-1 (ET-1) とその受容体, アンジオテンシン II (ANGII) とその受容体を産生することが知られている. エンドセリンは 21 個のアミノ酸で構成され, 分子内に 2 個のジスルフィド結合を有する. 異なる遺伝子によってコードされる ET-1, ET-2, ET-3 という 3 種のペプチド異性体が存在する. エンドセリン受容体には, ET_A と ET_B の 2 種類が存在する. 活性化星細胞や MFB は主として ET-1 を産生し, ET_A 受容体を発現する. ET-1 は細胞内 Ca²⁺ 濃度を上昇させ, ミオシン軽鎖のリン酸

化を介し、アクチンを重合させて細胞を収縮させる。ET-1は星細胞に直接的に細胞収縮を誘導する。また、ET-1の門脈内濃度が上昇すると門脈圧亢進を惹起する。一方、腎臓の傍糸球体細胞から分泌されるレニンによって、肝臓から分泌されるアンジオテンシノーゲンからANGIが作られ、これがアンジオテンシン変換酵素（ACE）などによってANGIIに変換される（Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH）。ANGII受容体はAT1とAT2の2つがあり、ANGIIの大部分はAT1に結合して細胞質内にCa²⁺を流入させることにより、血管平滑筋細胞を収縮させ、血圧を上昇させる。肝臓においてはやはり、活性化星細胞やMFBがANGIIとAT1を発現しており、局所的に門脈系を収縮させることに寄与する⁵⁾。一方、類洞内皮細胞は血管弛緩物質であるNOをNO合成酵素（NOS1）を介してL-アルギニンから合成する。NOは可溶性グアニル酸シクラーゼ（sGC）を活性化させ、細胞内cGMP濃度を上げて細胞を弛緩させる。すなわち、NOにより星細胞は、生理的状态では弛緩している。しかしながら、類洞内皮細胞が毛細血管化するとNO産生が低下するため、星細胞やMFBの収縮性が増強する。ほかにも種々の分子が寄与するが、ET-1とANGIIの作用亢進の一方で、NO合成の低下が生じた結果、類洞や門脈終末枝が収縮することも、門脈圧亢進に寄与する⁶⁾（図2）。

肝硬変と発がん

肝硬変では5年間のうちに5～30%で肝がんが発生すると報告されているため、肝硬変の背景肝では、発がん指向性の分子メカニズムが進行している。例えば、C型肝炎ウイルス（HCV）感染に基づく肝発がんは線維化進行例や肝硬変例に見られ、国により頻度は異なるが、肝硬変からは年率1～8%で肝がんが発生する。したがって、HCVを排除すれば肝がん発生が予防できることは明確であり、危険性を57～75%低下させうると報告されている。しかしながら、残りの25～43%ではHCVを排除したにもかかわらず肝発がんするわけであり（いわゆる、持続的ウイルス陰性化：SVR、発がん）、HCVの排除だけでは発がんの危険性を皆無にすることはできない。疫学的研究によると、肝炎ウイルス感染症に加えて、性差、HBVとHCVの共感染、アルコール多飲、喫煙、メタボリックシンドロームの合併、

図2 正常ならびに肝硬変における類洞血流の調節機構を示す模式図

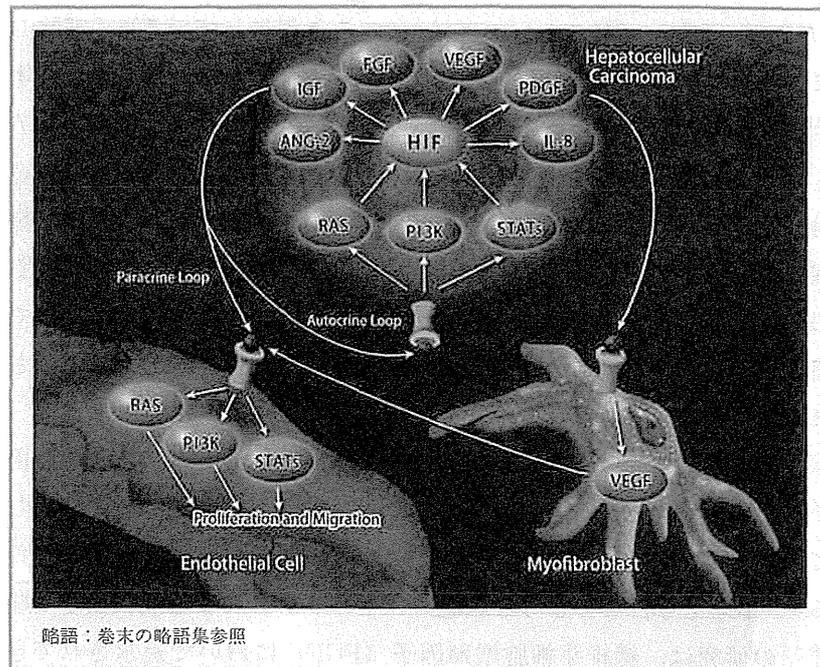


コーヒー飲量や遺伝学的要因が、肝発がんに寄与する⁷⁾。

近年、線維化肝という微小環境の肝発がんへの関与が着目されている。それらには細胞外マトリックスによるインテグリンシグナルの増強、活性化星細胞と肝細胞相互間のシグナル伝達、間質硬度の上昇、細胞外マトリックスに付着する成長因子の遊離、NK細胞による腫瘍監視機構の破綻、などが含まれる(図3)。

星細胞は hepatocyte growth factor, IL-6 や Wnt シグナルを産生し、肝細胞の増殖に至適な条件を提示する。MFB も同様に、PDGF や TGFβ 依存性メカニズムによってがん化した肝細胞の成長や遊走を支援する。また、活性化星細胞は、angiopoietin 1 を産生すること

図3 肝がんにおける、がんと間質との相互作用を示す模式図



で腫瘍増殖に必要な血管新生を誘導する。一方、腫瘍からの hedgehog シグナルは、MFB の活性化や線維化の維持に重要である。また、星細胞は（がん）幹細胞に対して“niche”として機能することが示唆されており、そのパラクリン分子の性質の解析が待たれるところである⁸⁾。ところで筆者らは、サイトグロビンというは乳類第4番目のグロビタンパクをラット星細胞から見いだした。このグロビタンパクは3次元立体構造やガス分子への解離定数などの性質は、ほぼミオグロビンと同等である。サイトグロビンは抗酸化機能としてペルオキシダーゼ活性や過酸化脂質の産生を抑制することができる。筆者らはその欠損マウスを用いた解析により、サイトグロビンが肝細胞の発がん過程に深く関与することを見いだした。すなわち、サイトグロビン欠損により、肝臓は易発がん性を呈するため、どのような分子機構が介在するのか、解析を進めているところである⁹⁾。

近年、非侵襲的に肝臓の硬度測定がなされるようになった¹⁰⁾¹¹⁾。その結果として、組織硬度が単に組織の線維化進行度や炎症反応を反映するばかりでなく、肝発がんとも相関することが報告されてきた。例えば、Masuzakiらは肝硬度測定（LSM）が10 kPa以下の群と LSM

25 kPa 以上の群で比較すると、肝発がんハザード比が 45.5 (95 %CI: 9.75 ~ 212.3, $P < 0.001$) になると報告している¹²⁾。実験的に、固いコラーゲンゲル上で培養された肝細胞は機能低下を来し、増殖する方向に形質を変えること、肝がん細胞株も固いポリアクリルアミドゲル上で培養されると増殖が加速し、それは Fak, Erk, Pkb / Akt, Stat3 経路が関与することが報告されている¹³⁾。また、星細胞や MFB の活性化も間質の硬度で制御されることから、間質細胞の活性化と間質硬度間には密接な関係がある。このように、肝硬変で組織が“硬く”なることが発がんを促進するというエビデンスが示されてきており、興味深い。

一方、肝硬変の際に組織に沈着する細胞外マトリックスは、成長因子をその受け手となる細胞から、言わば、隔離しており、状況に応じて成長因子を隔離から解き放してシグナル分子として機能させている¹⁴⁾。もともと、このような細胞外マトリックスによる成長因子“隔離”の研究は、線維芽細胞増殖因子 (FGF) において追求されてきたが、FGF も含めて TGF, 骨形成タンパク (BMP), Wnt やインターロイキン類も同様の挙動を示す。このプロセスの中で、MMPs は重要な役割を果たす。すなわち、MMP が成長因子を細胞外マトリックスから遊離させてリガンドとして働かせる一方で、MMP は成長因子受容体をそのプロテアーゼ活性により細胞表面から遊離させ、細胞を成長因子不応性にもさせてしまう。一方、 $TGF\beta$ は線維化促進因子として重要であるが、細胞外マトリックスに“隔離”されていた $TGF\beta$ の過剰遊離は腫瘍の増殖を抑制し、アポトーシスに陥らせる可能性もある。このように、細胞外マトリックスと成長因子間の相互作用は極めて複雑であり、状況に応じた制御がなされるため、実験で得られた事実の解釈は慎重に行うことが重要である¹⁵⁾。

河田 則文

文 献

- 1) Wynn T A, et al: Mechanisms of fibrosis: therapeutic translation for fibrotic disease., Ramalingam TR. *Nat Med* 18: 1028-1040, 2012.
- 2) Kawada N: Evolution of hepatic fibrosis research. *Hepatology Res* 41: 199-208, 2011.
- 3) Friedman SL: Evolving challenges in hepatic fibrosis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7: 425-436, 2010.
- 4) Garcia-Tsao G, et al: Now there are many (stages) where before there was one: In search of a pathophysiological classification of cirrhosis. *Hepatology* 51: 1445-1449, 2010.
- 5) Moreno M, et al: Reduction of advanced liver fibrosis by short-term targeted delivery of an angiotensin receptor blocker to hepatic stellate cells in rats. *Hepatology* 51: 942-952, 2010.
- 6) García-Pagán J C, et al: Functional aspects on the pathophysiology of portal hypertension in cirrhosis. *J Hepatol* 57: 458-461, 2012.
- 7) El-Serag H B: Epidemiology of viral hepatitis and hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 142: 1264-1273. e1, 2012.
- 8) Zhang D Y, et al: Fibrosis-dependent mechanisms of hepatocarcinogenesis. *Hepatology* 56: 769-775, 2012.
- 9) Thuy le T T, et al: Promotion of liver and lung tumorigenesis in DEN-treated cytoglobin-deficient mice. *Am J Pathol* 179: 1050-1060, 2011.
- 10) Pinzani M, et al: Technology Insight: noninvasive assessment of liver fibrosis by biochemical scores and elastography. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 5: 95-106, 2008.
- 11) Castera L: Noninvasive methods to assess liver disease in patients with hepatitis B or C. *Gastroenterology* 142: 1293-1302. e4, 2012.
- 12) Masuzaki R, et al: Prospective risk assessment for hepatocellular carcinoma development in patients with chronic hepatitis C by transient elastography. *Hepatology* 49: 1954-1961, 2009.
- 13) Schrader J, et al: Matrix stiffness modulates proliferation, chemotherapeutic response, and dormancy in hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology* 53: 1192-1205, 2011.
- 14) Whittaker S, et al: The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. *Oncogene* 29: 4989-5005, 2010.
- 15) Seki E, et al: A liver full of JNK: signaling in regulation of cell function and disease pathogenesis, and clinical approaches. *Gastroenterology* 143: 307-320, 2012.

Cytoglobin is expressed in hepatic stellate cells, but not in myofibroblasts, in normal and fibrotic human liver

Hiroyuki Motoyama¹, Tohru Komiya², Le Thi Thanh Thuy¹, Akihiro Tamori¹, Masaru Enomoto¹, Hiroyasu Morikawa¹, Shuji Iwai¹, Sawako Uchida-Kobayashi¹, Hideki Fujii¹, Atsushi Hagihara¹, Etsushi Kawamura¹, Yoshiki Murakami¹, Katsutoshi Yoshizato^{1,3} and Norifumi Kawada¹

Cytoglobin (CYGB) is ubiquitously expressed in the cytoplasm of fibroblastic cells in many organs, including hepatic stellate cells. As yet, there is no specific marker with which to distinguish stellate cells from myofibroblasts in the human liver. To investigate whether CYGB can be utilized to distinguish hepatic stellate cells from myofibroblasts in normal and fibrotic human liver, human liver tissues damaged by infection with hepatitis C virus (HCV) and at different stages of fibrosis were obtained by liver biopsy. Immunohistochemistry was performed on histological sections of liver tissues using antibodies against CYGB, cellular retinol-binding protein-1 (CRBP-1), α -smooth muscle actin (α -SMA), thymocyte differentiation antigen 1 (Thy-1), and fibulin-2 (FBLN2). CYGB- and CRBP-1-positive cells were counted around fibrotic portal tracts in histological sections of the samples. The expression of several of the proteins listed above was examined in cultured mouse stellate cells. Quiescent stellate cells, but not portal myofibroblasts, expressed both CYGB and CRBP-1 in normal livers. In fibrotic and cirrhotic livers, stellate cells expressed both CYGB and α -SMA, whereas myofibroblasts around the portal vein expressed α -SMA, Thy-1, and FBLN2, but not CYGB. Development of the fibrotic stage was positively correlated with increases in Sirius red-stained, α -SMA-positive, and Thy-1-positive areas, whereas the number of CYGB- and CRBP-1-positive cells decreased with fibrosis development. Primary cultured mouse stellate cells expressed cytoplasmic CYGB at day 1, whereas they began to express α -SMA at the cellular margins at day 4. Thy-1 was undetectable throughout the culture period. In human liver tissues, quiescent stellate cells are CYGB positive. When activated, they also become α -SMA positive; however, they are negative for Thy-1 and FBLN2. Thus, CYGB is a useful marker with which to distinguish stellate cells from portal myofibroblasts in the damaged human liver.

Laboratory Investigation (2014) 94, 192–207; doi:10.1038/labinvest.2013.135; published online 2 December 2013

KEYWORDS: α -smooth muscle actin; cellular retinol binding protein-1; chronic hepatitis; cytoglobin; fibulin-2; Thy-1

Stellate cell activation-associated protein was originally discovered by proteomic analysis (in 2001)¹ in cultured rat hepatic stellate cells that have vitamin A storage ability when quiescent and function as liver-specific pericytes. Histoglobin² and Cytoglobin (CYGB)³ were reported by Trent and Hargrove² and by Burmester *et al.*³ respectively, in 2002. These proteins, in addition to stellate cell activation-associated protein, were classified as human, mouse, and rat homologs of a hexacoordinate globin that differs from the traditional pentacoordinate globins, such as myoglobin and hemoglobin.⁴ CYGB consists of 190 amino acids with a calculated molecular mass of 21 kDa, and its amino acid

sequence is highly conserved among species.³ Human CYGB has ~25% amino acid identity with vertebrate myoglobin and hemoglobin and 16% identity with human neuroglobin, which is another type of globin that is present specifically in the nervous system. CYGB is thus recognized as the fourth globin of mammals.⁵ The CYGB gene is located on human chromosome 17q25.3 and mouse chromosome 11E2.

Although myoglobin, hemoglobin, and neuroglobin are tissue restricted to cardiomyocytes and skeletal myofibers, erythrocytes, and the nervous system, respectively, CYGB is ubiquitously expressed in the cytoplasm of mesenchymal fibroblastic cells of many organs,⁶ and CYGB was reported to

¹Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University, Osaka, Japan; ²Department of Biological Function, Faculty of Science, Osaka City University, Osaka, Japan and ³PhoenixBio, Higashihiroshima, Hiroshima, Japan
Correspondence: Dr N Kawada, MD, PhD, Department of Hepatology, Graduate School of Medicine, Osaka City University, 1-4-3 Asahimachi, Abeno, Osaka 545-8585, Japan.
E-mail: kawadanori@med.osaka-cu.ac.jp

Received 26 April 2013; revised 20 September 2013; accepted 4 October 2013

be present in the nucleus of human hepatocytes.⁷ In particular, CYGB is present in stellate cells in the liver and pancreas, reticulocytes in the spleen, mesenchymal cells in the submucosal layer of the gut, and mesangium cells and stromal cells in the rat kidney. Therefore, one interesting aspect of CYGB expression is its presence in visceral cells that have the ability to store vitamin A. CYGB has also been observed in some neuronal subpopulations of the central and peripheral nervous systems in humans.

Hepatic stellate cells have conventionally been recognized as hepatic fibroblastic cells (myofibroblasts are also categorized as this cell type) that preferentially localize to the portal region. Considering that quiescent stellate cells are transformed into activated stellate cells, the liver contains at least three types of fibroblastic cells: stellate cells, activated stellate cells, and portal myofibroblasts.^{8,9} Stellate cells are desmin positive in rodents¹⁰ and, when activated, they express α -smooth muscle actin (α -SMA). In addition, these cells express cellular retinol-binding protein-1 (CRBP-1) and participate in the metabolism of retinol and retinyl esters.¹¹ In contrast, thymocyte differentiation antigen 1 (Thy-1 or CD90)^{12–14} and fibulin-2 (FBLN2)^{15–17} have been utilized as markers of liver myofibroblasts. These cell type-specific markers of liver fibroblastic cells have been largely utilized in studies with rodents. However, a specific marker to distinguish stellate cells from myofibroblasts in the human liver has not yet been identified.

The aims of our present work were to investigate whether CYGB is a reliable marker of stellate cells in the normal human liver and to study the expression of CYGB, CRBP-1, Thy-1, FBLN2, and α -SMA in fibrotic and cirrhotic human liver.

MATERIALS AND METHODS

Human Liver Tissues

Human liver tissues damaged by hepatitis C virus (HCV) infection at various fibrosis stages (from F1 to F4, 10 samples each) and one tissue sample damaged by nonalcoholic steatohepatitis (NASH) at fibrosis stage F2 (58-year-old woman with serum alanine aminotransferase (ALT) 110 IU/l) were obtained by liver biopsy at Osaka City University Medical School Hospital (Osaka, Japan) from August 2006 to September 2011. Intact human liver tissues were obtained from patients who had metastatic liver tumors or cholangiocarcinoma treated by surgical resection. The procedures for this study were in accordance with the Helsinki Declaration of 1975 (2000 revision). Liver biopsy was performed after informed consent had been granted.

Clinical Data

The age, sex, and primary clinical data for each patient were obtained on consultation or admission to our university hospital. ALT levels, albumin levels, platelet counts, and anti-HCV antibody levels were measured at the Central Clinical

Table 1 Characteristics of the HCV-infected patients enrolled in this study

Stage	Age ^a (years)	ALT ^b (IU/l)	Albumin ^a (g/dl)	Platelet ^a ($\times 10^3/mm^3$)	Grade (A0/A1/A2/A3)
F1	55.5 \pm 13.7	63.5 (25.0–89.0)	4.1 \pm 0.3	17.9 \pm 5.4	3/7/0/0
F2	55.6 \pm 8.7	60.2 (40.5–74.0)	3.9 \pm 0.3	15.0 \pm 5.4	0/5/5/0
F3	63.8 \pm 8.1	75.1 (48.2–103.5)	3.8 \pm 0.3	12.6 \pm 3.2	0/2/5/3
F4	63.0 \pm 6.8	82.4 (44.7–115.2)	3.6 \pm 0.3	12.0 \pm 4.1	0/4/6/0

ALT, alanine aminotransferase.

The stage of liver fibrosis and grade of necroinflammation were assessed based on the new Inuyama classification.¹⁹

^aMean \pm s.d.

^bMedian (interquartile range).

Laboratory of Osaka City University Medical School Hospital (Table 1).

Histopathological Diagnosis

Liver biopsy was performed in all 41 patients using a 15-gauge Tru-Cut needle (Hakko, Tokyo, Japan) under ultrasound guidance. The tissue samples fulfilled the size requirements suggested by Janiec *et al*.¹⁸ Adequate liver biopsy samples were defined as having a length $>$ 1.0 cm and/or the presence of at least 10 portal tracts. The liver tissues were fixed in 10% formaldehyde, embedded in paraffin, and cut into 4- μ m-thick sections. Deparaffinized sections were stained with hematoxylin–eosin and Azan–Mallory, dehydrated in 100% ethanol, cleared by xylene, mounted with NEW M·X (Matsunami Glass Industries, Osaka, Japan), and then examined by microscopy. The degree of liver fibrosis was assessed based on the new Inuyama classification¹⁹ as follows: F0, no fibrosis; F1, expansion of the portal tracts without linkage; F2, portal expansion with portal-to-portal linkage; F3, extensive portal-to-portal and focal portal-to-central linkage; and F4, cirrhosis (Table 1).

The sections were also stained with 0.1% (w/v) Sirius red (Direct Red 80; Aldrich, Milwaukee, WI, USA) in a saturated aqueous picric acid solution for 1 h at room temperature to visualize collagen fibers. After staining, the sections were washed in two changes of 0.01 N HCl and mounted as described above.²⁰

Immunostaining of Human Liver Tissues

For immunohistochemistry, paraffin sections were dewaxed in xylene and rehydrated in decreasing concentrations of ethanol (xylene: 3 \times 3 min; 100% ethanol: 2 \times 3 min; 95% ethanol: 3 min; 70% ethanol: 3 min). Primary antibodies and immunohistochemistry conditions are listed in Table 2. In brief, the sections were deparaffinized and treated with a solution of 3% H₂O₂ in 100% methanol for 10 min at room temperature to block endogenous peroxidase activity.

Table 2 Primary antibodies used in this study

Antibody	Species	Source	Dilution
Anti-human cytoglobin	Rb poly	Our laboratory	1/100
Anti-human cytoglobin	Mo mono	Our laboratory	1/1000
Anti-rat cytoglobin	Rb poly	Our laboratory	1/100
Anti-human cellular retinol-binding protein-1	Rb poly	Santa Cruz	1/100
Anti-human α -smooth muscle actin	Mo mono	Dako	1/100
Anti-human thymocyte differentiation antigen 1 (Thy-1)	Rb poly	Abcam	1/100
Anti-mouse thymocyte differentiation antigen 1 (Thy-1)	Mo mono	Abcam	1/100
Anti-human fibulin-2 (FBLN2)	Rb poly	Sigma	1/200
Anti-human lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor-1 (LYVE-1)	Rb poly	Abcam	1/200

Mo mono, mouse monoclonal antibody; Rb poly, rabbit polyclonal antibody.

The sections were then preincubated with serum-free protein block (Dako, Glostrup, Denmark) for 10 min at room temperature and subsequently incubated with primary antibodies in a dilution of 1:100 for 1 h at room temperature. Negative controls with no primary antibody were used to assess nonspecific staining. The secondary antibodies used included horseradish peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:200; Dako), rabbit anti-goat IgG (1:200; Dako), and rabbit anti-mouse IgG (1:200; Dako). The chromogen used was 3,3'-diaminobenzidine (Dako). The resultant sections were stained and analyzed using a BZ-8000 microscope (Keyence, Osaka, Japan).

Subsequently, double immunofluorescence staining was performed. After the paraffin sections were dewaxed, the sections were incubated with a mixture of antibodies against CYGB and α -SMA as described previously.²¹ After rinsing in PBS, the sections were incubated with a mixture of fluorochrome-conjugated secondary antibodies: AlexaFluor 488 goat anti-rabbit IgG (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) and AlexaFluor 594 goat anti-mouse IgG (Molecular Probes). The sections were briefly washed and mounted with ProLong Gold Antifade Reagent (Molecular Probes). The resulting sections were stained and analyzed using a BZ-8000 microscope (Keyence).

Morphometry for Hepatic Fibrosis

For morphometric image analysis of hepatic fibrosis in immunostaining, the areas of the liver sections that were positive for Sirius red (red), α -SMA (brown), or Thy-1 (brown) were captured separately using a charge-coupled device (CCD) camera connected to a macro digital filing system (DP70 · BX-51; Olympus Corporation, Tokyo, Japan). Images representing the whole biopsy section were acquired at $\times 200$ magnification and digitalized. These separately captured and digitalized images were consolidated to create one large image using e-Tiling (Mitani Corporation, Tokyo, Japan). Collagen- or α -SMA-positive areas were measured

using Lumina Vision 2.4 (Mitani Corporation) and were calculated automatically. The hepatic fibrotic area (%) was calculated as the area stained with the selected color divided by the whole tissue area at $\times 100$ magnification.²⁰

In fibrotic livers, the number of CYGB- and CRBP-1-positive stellate cells in each field was counted around fibrotic portal tracts (F1 to F4 samples). The analysis was performed on each 10-sample group of F1–F4 tissues using an average of five fields per zone (1.4 mm²) (100 \times objective). We counted the cell bodies that stained positively and contained a nucleus.

Cell Lines

The human IISC line LX-2 was donated by Dr Scott L Friedman at the Mount Sinai School of Medicine (New York, NY, USA).²² LX-2 cells were cultured on plastic dishes or glass chamber slides in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. Huh7 cells (JCRB0403), which were obtained from the Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB) Cell Bank (Osaka, Japan), were maintained on plastic culture plates in DMEM supplemented with 10% FBS. In some experiments, LX-2 cells were transfected with the pEGFP-cytoglobin vector (Clontech, Mountain View, CA, USA) using FuGENE HD (Roche, Applied Science, Indianapolis, IN, USA). The cells were collected at 24 h after transfection.

Preparation of Primary Cultured Mouse Hepatic Stellate Cells

Primary mouse stellate cells were isolated from 12- to 16-week-old male C57BL/6N mice (Japan SLC, Shizuoka, Japan) by pronase-collagenase digestion and subsequent purification with a single-step Nycodenz gradient, as previously described.²³ All animals received humane care. The experimental protocol was approved by the Committee

of Laboratory Animals, Osaka City University Medical School, and was performed according to institutional guidelines. Isolated stellate cells were cultured on plastic dishes or glass chamber slides in DMEM (Sigma Chemical) supplemented with 10% FBS (Invitrogen), 100 U/ml penicillin, and 100 μ g/ml streptomycin. The purity of the cultures was determined based on observation of the characteristic stellate cell shape using phase-contrast microscopy.

Quantitative Real-Time PCR

Total RNA was extracted from stellate cells using the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). cDNA was synthesized as previously described.²⁴ Gene expression was measured by quantitative real-time PCR using cDNA, THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix Reagents (Toyobo, Osaka, Japan), and a set of gene-specific oligonucleotide primers. The reactions were performed in an Applied Biosystems Prism 7500 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The expression of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) was also measured as an internal control.

Immunoblotting

Protein samples (30 μ g) were subjected to 5–20% gradient SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (ATTO, Tokyo, Japan) and transferred to Immobilon P membranes (Millipore Corporation, Bedford, MA, USA). After blocking, the membranes were probed with a primary antibody against CYGB (1:1000; our laboratory), α -SMA (1:2000; Dako), Thy-1 (1:1000; Abcam, Cambridge, UK), or GAPDH (1:2000; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). The membranes were then labeled with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies. Immunoreactive bands were visualized using the ECL detection reagent (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and documented with an LAS 1000 device (Fuji Photo Film, Kanagawa, Japan).

Data Analysis

The data are presented as bar graphs representing the mean \pm s.d. in all experiments. Statistical analyses were performed using Student's *t*-test. *P* < 0.05 indicated statistical significance.

RESULTS

Specificity of the Anti-CYGB Antibody

We previously generated rabbit polyclonal anti-rat CYGB antibodies that stain stellate cells in intact and fibrotic rat liver and other visceral organs.^{1,25} In the present study, we newly generated rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies against human CYGB in our laboratory. Immunoblot analysis revealed that the rabbit polyclonal antibodies detected purified recombinant human CYGB,²⁶ which was provided by RIKEN (Harima, Hyogo, Japan), at 21 kDa and EGFP-binding recombinant human CYGB (generated in our laboratory) at 48 kDa; however, the

antibodies did not detect human albumin. LX-2 and Huh 7 cells expressed negligible levels of CYGB (Figure 1a). The monoclonal antibody produced almost identical results (data not shown).

Immunohistochemical Characterization of Intact Human Liver

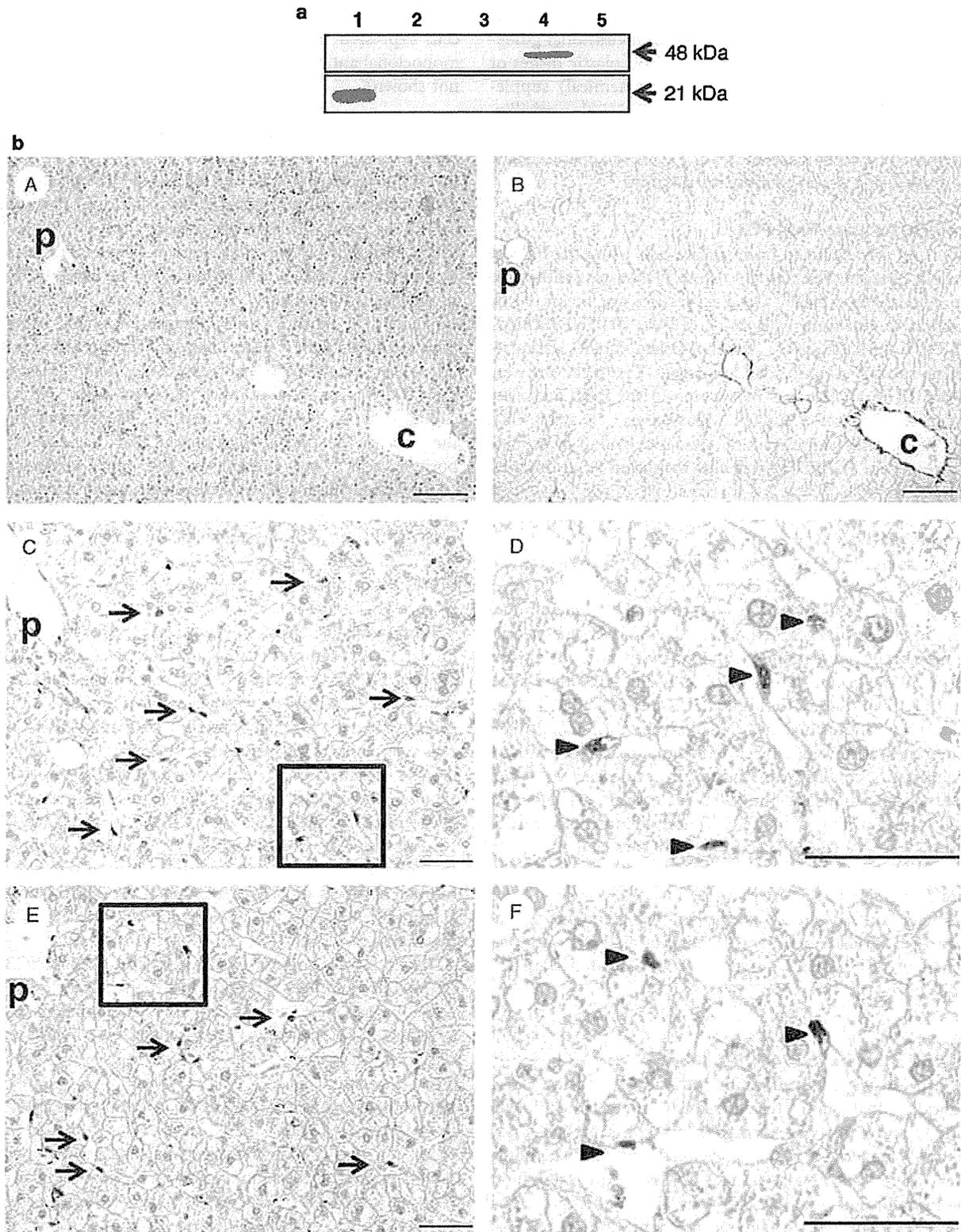
Intact human liver tissues were obtained by surgical resection from patients with metastatic liver tumors or cholangiocarcinoma, and the expression levels of CYGB, α -SMA, Thy-1, and FBLN2 were determined (Figure 1). As shown in Figure 1bA and B, the obtained tissue samples showed negligible inflammatory cell infiltration and negligible expansion of fibrotic areas. Immunostaining using the polyclonal antibodies against human CYGB revealed positive cells along the sinusoids throughout the lobule (Figure 1bC and D). Similar results were obtained with the monoclonal antibody (Figure 1bE and F). The hepatocytes and the cells in the portal areas were CYGB negative. CYGB-positive cells were present in the serial sections, and we identified these cells as stellate cells because an enlarged view revealed that they were located between the hepatocytes and the lumen of the sinusoids. In addition, these cells contained lipid droplets in their cytoplasm, and their cytoplasmic processes expanded along the sinusoids (Figure 1bD and F).

Immunohistochemistry was further performed on intact human liver samples using antibodies against CRBP-1, α -SMA, FBLN2, and Thy-1. In the liver parenchyma, strong expression of CRBP-1 was observed along the sinusoids (Figure 2a). An enlarged view showed that CRBP-1-positive cells contained lipid droplets, indicating that they were hepatic stellate cells. There were no CRBP-1-positive cells around the portal area. Instead, α -SMA-positive cells predominated; these cells also existed in the walls of the vessels, but not along the hepatic sinusoids (Figure 2b). In addition, the regions adjacent to the portal vein contained limited numbers of cells that stained for FBLN2 or Thy-1 (Figure 2c and d), which are also biomarkers of myofibroblasts.

Taken together, these findings indicate that CYGB and CRBP-1 are uniquely expressed in hepatic stellate cells in the intact human liver, whereas myofibroblast markers such as α -SMA, FBLN2, and Thy-1 are locally present in cells around the portal tract.

Immunohistochemistry of CD68, LYVE-1, and CRBP-1 in Relation to CYGB

CD68 is a glycoprotein that binds to low-density lipoprotein and is expressed by monocytes and macrophages. Kupffer cells are positive for CD68.²⁷ We found that spindle-shaped CD68-positive cells were present in the sinusoids in the intact human liver, indicating that these cells were Kupffer cells. These cells were predominantly located along the sinusoids (Figure 3a). Double immunofluorescence staining



showed that CD68 did not colocalize with CYGB (Figure 3b–d). LYVE-1, also known as extracellular link domain-containing 1 (XLKD1), acts as a receptor for both soluble

and immobilized hyaluronan. Sinusoidal endothelial cells are LYVE-1 positive.²⁸ We observed LYVE-1 positivity along the hepatic sinusoid in the sinusoidal walls, indicating that

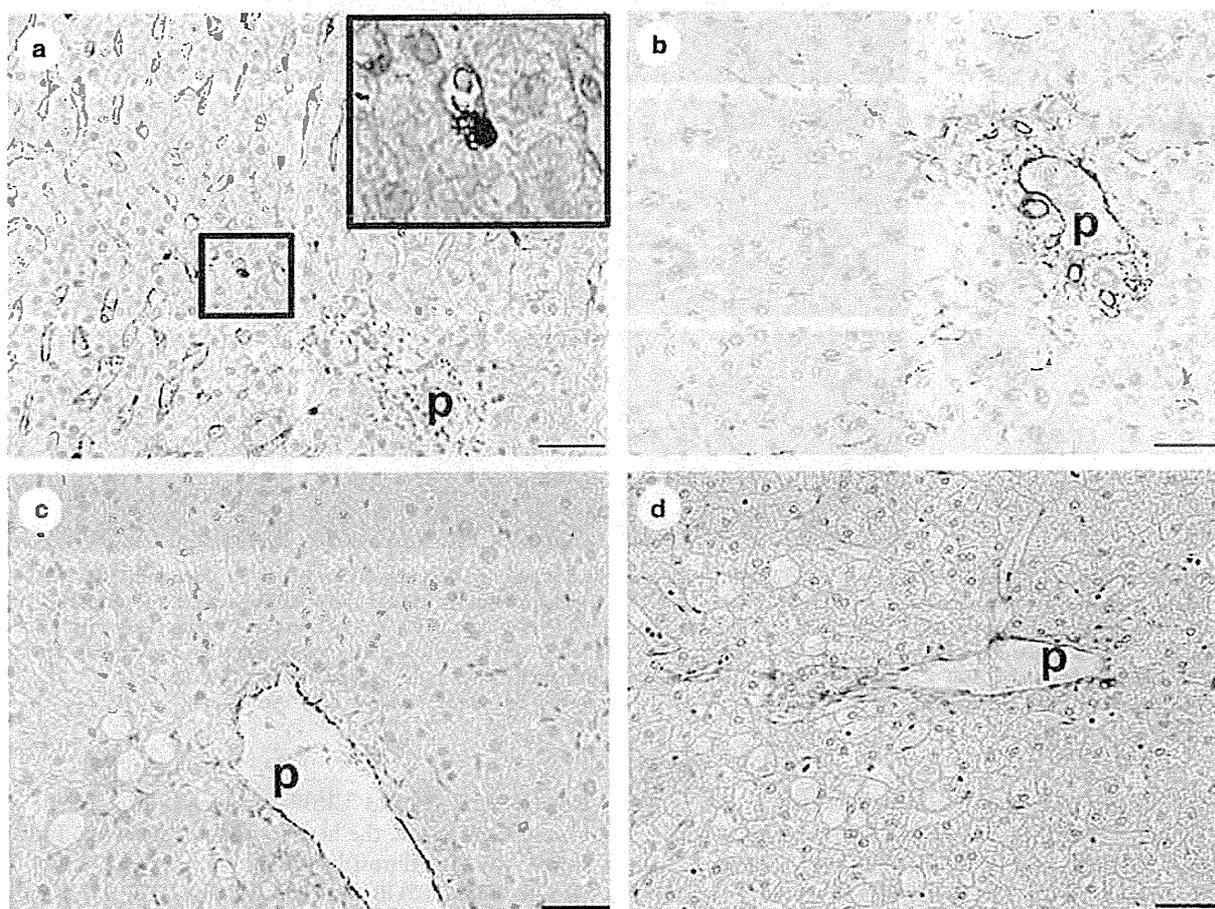


Figure 2 Immunohistochemistry for CRBP-1, α -SMA, FBLN2, and Thy-1 in intact human liver. (a) Immunohistochemistry for CRBP-1. In the liver parenchyma, strong expression of CRBP-1 was observed along the sinusoids (arrows). A magnified view of the enclosed area shows that a CRBP-1-positive cell contained lipid droplets, indicating that it was a hepatic stellate cell. CRBP-1 was not observed around the portal area. Bar, 100 μ m. p, portal vein. (b) Immunohistochemistry for α -SMA. α -SMA-positive cells were present predominantly in the portal area and in the walls of the vessels, but not along the hepatic sinusoids. Bar, 100 μ m. (c) Immunohistochemistry for FBLN2. FBLN2 was localized in the vessels of the portal spaces. Positive staining for FBLN2 was not visible along the sinusoids. Bar, 100 μ m. (d) Immunohistochemistry for Thy-1. Thy-1-positive cells were located within the portal tracts adjacent to the wall of the portal vein. Bar, 100 μ m.

Figure 1 Characterization of newly generated rabbit polyclonal antibodies against human CYGB. (a) Newly generated rabbit polyclonal antibodies against human CYGB detected purified recombinant human CYGB (21 kDa) (lane 1) and EGFP-labeled recombinant human Cygb (48 kDa) (lane 4) but not human albumin (lane 2). LX-2 cells and Huh 7 cells did not express CYGB (lanes 3 and 5, respectively). (1) Recombinant human CYGB (10 μ g); (2) human albumin (20 μ g); (3) lysate of LX-2 cells (20 μ g); (4) lysate of LX-2 cells overexpressing EGFP-CYGB (20 μ g); (5) lysate of Huh-7 cells (20 μ g). (b) Immunohistochemistry of normal human liver tissues. (A) Hematoxylin–eosin staining. No hepatocyte death or inflammation was observed. Bar, 100 μ m. c, central vein; p, portal vein. (B) Sirius red staining. Limited collagen deposition was observed around the portal and central vein areas. No fibrosis occurred in the liver parenchyma. Bar, 100 μ m. (C) Immunohistochemistry for CYGB using newly generated polyclonal antibodies. CYGB-positive cells were localized in the liver parenchyma along hepatic sinusoids (arrows). Bar, 100 μ m. (D) Magnified view of the enclosed area in (C). CYGB-positive cells were present in the perisinusoidal space and contained lipid droplets in the cytoplasm, suggesting that they were stellate cells (arrowheads). Bar, 20 μ m. (E) Immunohistochemistry for CYGB using the monoclonal antibody. CYGB-positive cells were localized in the liver parenchyma along the hepatic sinusoids (arrows). Bar, 100 μ m. (F) Magnified view of the enclosed area in (E). CYGB-positive cells were present in the perisinusoidal space and contained lipid droplets in the cytoplasm, suggesting that they were stellate cells (arrowheads). Bar, 20 μ m.

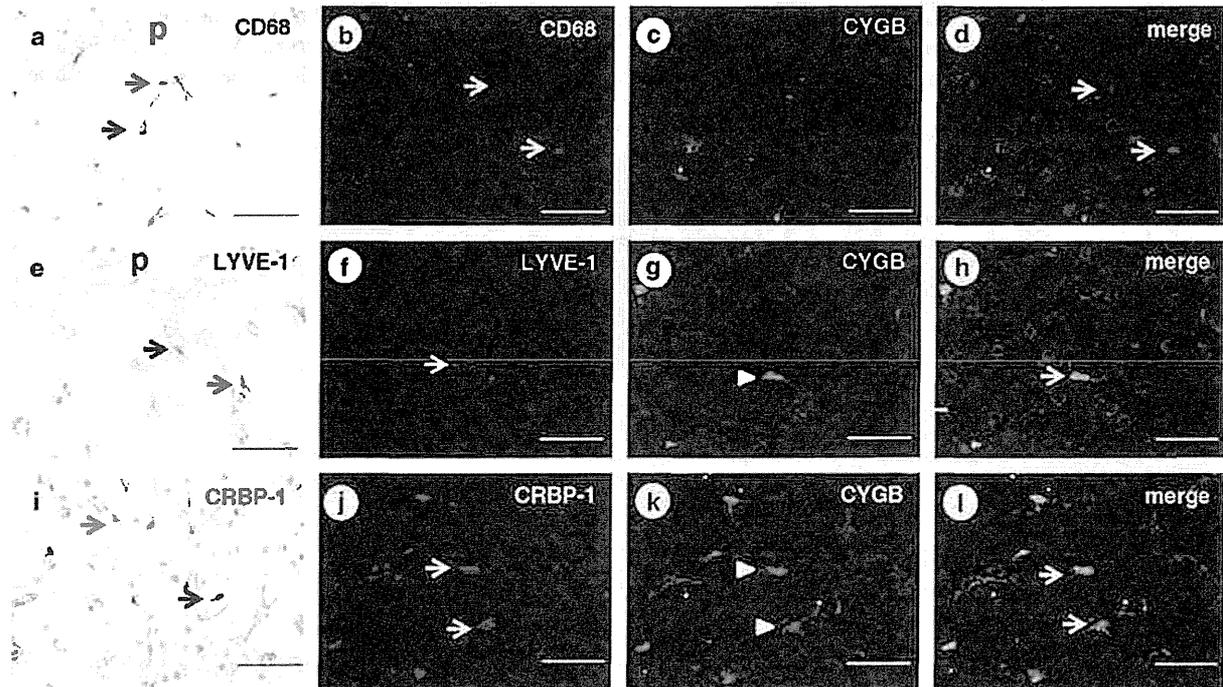


Figure 3 Immunohistochemistry for CD68, LYVE-1, and CRBP-1 in the intact human liver. (a–d) Immunohistochemistry for CD68 and CYGB. CD68-positive cells (arrows) were located inside the sinusoidal lumen (a). Double immunofluorescence showed that CYGB (b) and CD68 (c) did not colocalize as shown in panel d. p, portal vein. Bar, 100 μ m. (e–h) Immunohistochemistry for LYVE-1 and CYGB. LYVE-1-positive cells (arrows) were localized along the hepatic sinusoids (e). Double immunofluorescence showed that LYVE-1 (f) and CYGB (g, arrowhead) did not colocalize, as shown in (h). Bar, 100 μ m. (i–l) Immunohistochemistry for CRBP-1 and CYGB. CRBP-1-positive cells (arrows) were localized in the perisinusoidal space (i). Double immunofluorescence showed that CRBP-1 (j) and CYGB (k, arrowheads) were entirely colocalized, as shown in (l). Bar, 100 μ m.

LYVE-1-positive cells are sinusoidal endothelial cells in the intact human liver (Figure 3e). Double immunofluorescence staining showed that LYVE-1 did not colocalize with CYGB (Figure 3f–h). Therefore, CYGB was not expressed in hepatocytes, Kupffer cells, or sinusoidal endothelial cells. Double immunostaining for CRBP-1 (Figure 2a and Figure 3i) and CYGB (Figure 3j–l) supported the notion that normal liver tissues contain CYGB- and CRBP-1-double-positive quiescent stellate cells.

CYGB Expression in Fibrotic and Cirrhotic Human Livers

Liver tissues were isolated from patients at different HCV-induced fibrosis stages (from F1 to F4) and subjected to histochemical and immunohistological examination (Figure 4). The extent of collagen deposition at each fibrosis stage was estimated by Sirius red staining, which is shown in Figure 4aA (for F1), E (F2), I (F3), and M (F4). In the liver parenchyma, cells that were positive for CYGB (Figure 4 B, E, J, and N) or CRBP-1 (Figure 4C, G, K, and O) were present along the hepatic sinusoids, indicating that they were stellate cells. α -SMA was expressed in cells around the periportal area, and its expression extended along the expansion of collagen deposition, as shown by Sirius red staining, and along the hepatic sinusoids (Figure 4 D, H, L, and P).

Notably, CYGB- and CRBP-1-positive cells (stellate cells) were present inside the hepatic nodules; however, they were scarce in the fibrotic septum of cirrhotic (F4) livers (Figure 4N for CYGB and Figure 4O for CRBP-1), in contrast with the abundance of α -SMA-positive cells in the fibrotic septum (Figure 4P). We further studied the expression of CYGB, CRBP-1, and α -SMA in human NASH tissue (fibrosis stage F2). The results were similar to those obtained in HCV-induced fibrotic tissue: CYGB- and CRBP-1-positive cells were present along the hepatic sinusoids in the liver parenchyma, and α -SMA was expressed by cells around the portal area, with its expression extending along the deposited collagen (Figure 4Q, R, and S).

To quantify the immunohistochemistry results, we performed immunoblot analysis using rabbit polyclonal anti-human CYGB antibodies, which specifically react with human CYGB but not mouse CYGB, in human liver samples and fibrotic mouse livers. We detected a band at the position of purified recombinant human CYGB (21 kDa) in HCV-infected human fibrotic liver tissues at the F2 stage; however, this band was not detected in normal human liver samples. In addition, no CYGB band was observed in fibrotic liver tissues from mice treated with a choline-deficient amino acid-defined diet (for 32 weeks) or *N,N*-diethylnitrosamine

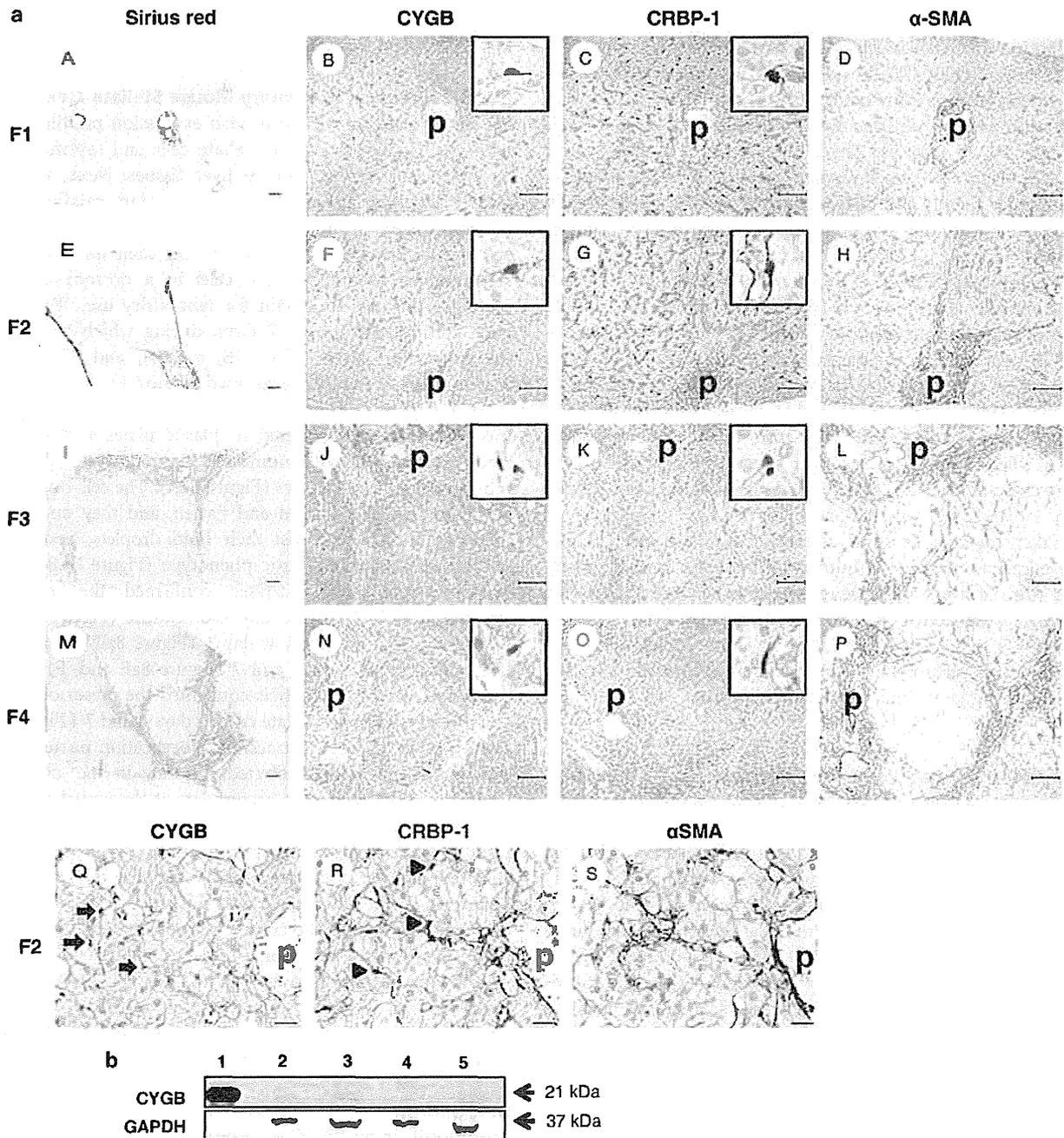


Figure 4 (a) Histological analyses of human liver fibrosis at different stages (F1 to F4) according to the new Inuyama classification. (A, E, I, M) Sirius red staining. Bar, 50 μ m. (B, F, J, N, Q) Immunohistochemistry for CYGB. Bar, 50 μ m. Inserts show high-magnification views of CYGB-positive cells in the liver parenchyma. (C, G, K, O, R) Immunohistochemistry for CRBP-1. Bar, 50 μ m. Inserts show high-magnification views of CRBP-1-positive cells in the liver parenchyma. (D, H, L, P, S) Immunohistochemistry for α -SMA. Bar, 50 μ m. p, portal vein. (b) Immunoblot analysis using rabbit polyclonal anti-human CYGB antibodies that specifically react with human CYGB but not mouse CYGB, with human liver samples and fibrotic mouse livers. (1) Recombinant human CYGB (10 μ g); (2) normal human liver (25 μ g); (3) hepatitis C virus-infected human liver (25 μ g); (4) fibrotic liver from a mouse treated with a choline-deficient amino acid-defined diet (25 μ g); and (5) fibrotic liver from a mouse treated with *N,N*-diethylnitrosamine (25 μ g). Note that this analysis also revealed the induction of CYGB in fibrotic human livers.