

**Fig. 3.** (A) Resistance to CsA of T1280V and D2292E mutants. While under G418 selection, established replicon cells were treated with CsA at the indicated doses. (B) Standard methods described in Section 2 were used to determine the colony-forming abilities of T1280V and D2292E mutants.

known to confer CsA resistance to some HCV genotypes [25–28], and as a single mutation, it conferred CsA resistance to three separate HCV strains in our hands. In contrast, T1280V in NS3 was not previously identified as a CsA-resistance mutant, and in our hands, it had no impact on CsA resistance as a single mutation (Figs. 2E and 3A).

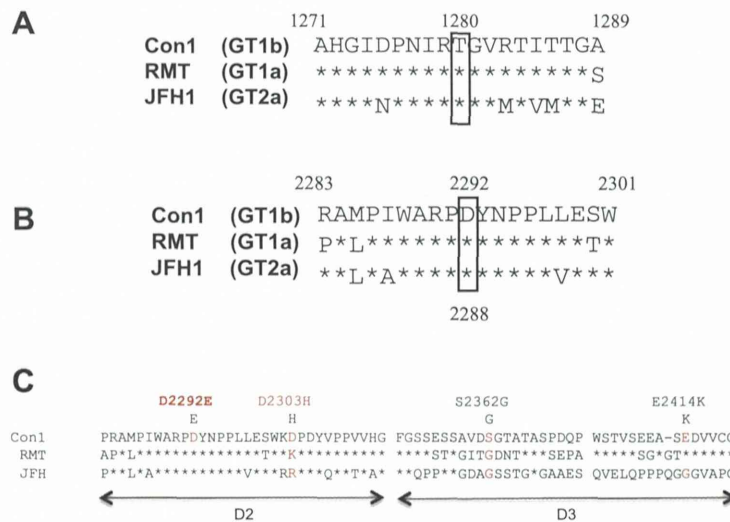
D2292E was the most significant resistance mutation in this study (Fig. 4C). This mutation is also significant in the regulation of HCV genome replication [29], and close to the CypA binding region [30] (Supplementary Fig. 1). With several genotypes (1a, 1b, 2a, 3, 4, and 6), D2292E is frequently observed after Debio-025 selection [28,31]. Other different mutations in NS5A and NS5B were identified in other studies of CsA resistance [7]; therefore, various mutations could influence HCV resistance to CsA.

In addition to the D2292E mutation, the T1280V mutation in NS3 was present in both clones #6 and #7. Despite its presence in both clones, it did not confer CsA resistance as a single mutant, nor did it enhance the effects of the NS5A CsA-resistant mutants (Fig. 2E). Instead, it partially rescued the colony-forming defect caused by D2292E (Fig. 3B). We used three assays—colony formation assay without CsA treatment (Fig. 3B), cell survival assay of established replicon cells with CsA and G418 dual-treatment (Fig. 3A), and HCV replication inhibition assay without G418 treatment (Fig. 2E and Table 2)—to evaluate the HCV replication competence of each of these two mutations (D2292E, T1280V). It is difficult to fully explain all of the results, and comparison of the two CsA-resistant clones (clone #6 and #7) leaves some questions unanswered. These clones were similar to each other when considering survival during CsA and G418 dual-treatment (Fig. 1B), but they show differences in their resistance in HCV sub-genome replication assay (Fig. 2B and E). Apparently, each mutation in clone #7, except for D2292E, had no effect on the results of the HCV sub-genome replication inhibition assay with CsA. These findings might suggest that these mutations were important to G418 resistance, but not to the resistance of HCV to CsA treatment. In contrast, each of three other mutations in NS5A (D2303H, S2362G, and E2414K) that were found in clone #6 were required for the maximum level of drug resistance conferred by a mutant NS5A in this study. To our knowledge, D2303H is a novel CsA-resistant mutation, and as a single mutation, it conferred CsA resistance comparable to D2292E. D2303H, like D2292E, was located in carboxy-terminal of domain II of NS5A, which is reportedly a CypA binding site [9]. S2362G and E2414K were mutations in domain III of NS5A, and these mutations may have influenced the peptidyl-prolyl isomerase enzymatic catalytic activity of CypA [22]. The V1681A mutation in NS4A identified in clone #6 greatly enhanced the CsA resistance of a HCV construct that had NS3 and NS5A replaced with Cs6#6 sequences (Fig. 2B–D). Though

**Table 1**  
The list of each mutated amino acid sequences in 16 clones throughout whole non-structural region.

A.A. No.	NS3								4A	4B	NS5A								5B		
	1062	1275	1280	1560	1609	1612	1681	1797	2109	2179	2197	2231	2269	2292	2303	2320	2362	2387	2414	2992	
p5.1	V	D	T	S	K	I	V	I	D	S	P	L	S	D	D	K	S	S	E	M	
Cs6#6	1	V	D	<b>V</b>	<b>G</b>	K	<b>T</b>	<b>A</b>	I	D	S	P	L	S	D	D	K	<b>G</b>	S	<b>K</b>	M
	2	V	D	<b>V</b>	<b>S</b>	<b>E</b>	I	V	I	<b>N</b>	S	P	L	S	D	D	K	S	S	E	M
	3	V	D	<b>V</b>	<b>G</b>	K	<b>T</b>	<b>A</b>	I	D	S	P	L	S	<b>E</b>	<b>H</b>	K	<b>G</b>	S	<b>K</b>	M
	4	V	D	<b>V</b>	<b>G</b>	K	<b>T</b>	<b>A</b>	I	D	S	P	L	S	<b>E</b>	<b>H</b>	K	<b>G</b>	S	<b>K</b>	M
	5	V	D	<b>V</b>	<b>G</b>	K	<b>T</b>	<b>A</b>	I	D	S	P	L	S	<b>E</b>	<b>H</b>	K	<b>G</b>	S	<b>K</b>	M
	6	V	D	<b>V</b>	<b>G</b>	K	<b>T</b>	<b>A</b>	I	<b>E</b>	S	P	L	S	<b>E</b>	<b>H</b>	K	<b>G</b>	S	<b>K</b>	M
	7	V	D	<b>V</b>	<b>G</b>	K	<b>T</b>	<b>A</b>	I	<b>E</b>	S	P	L	S	<b>E</b>	<b>H</b>	K	<b>G</b>	S	<b>K</b>	M
	8	V	D	<b>V</b>	<b>G</b>	K	<b>T</b>	<b>A</b>	I	D	S	P	L	S	<b>E</b>	<b>H</b>	K	<b>G</b>	S	<b>K</b>	M
Cs6#7	1	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	S	<b>E</b>	I	V	I	<b>N</b>	S	P	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	D	K	S	P	<b>G</b>	<b>T</b>
	2	V	D	<b>V</b>	S	<b>E</b>	I	V	I	<b>N</b>	S	P	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	D	K	S	P	<b>G</b>	<b>T</b>
	3	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	S	K	I	V	<b>V</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>L</b>	L	S	<b>E</b>	D	<b>T</b>	S	S	E	M
	4	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	S	K	I	V	<b>V</b>	<b>D</b>	<b>P</b>	<b>L</b>	L	S	<b>E</b>	D	<b>M</b>	S	S	E	M
	5	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	S	K	I	V	<b>V</b>	<b>D</b>	<b>P</b>	<b>L</b>	L	S	<b>E</b>	D	<b>T</b>	S	S	E	M
	6	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	S	K	I	V	<b>V</b>	<b>D</b>	<b>P</b>	<b>L</b>	L	S	<b>E</b>	D	<b>T</b>	S	S	E	<b>T</b>
	7	<b>I</b>	<b>G</b>	<b>V</b>	S	K	I	V	<b>V</b>	<b>D</b>	<b>P</b>	<b>L</b>	L	<b>P</b>	<b>E</b>	D	K	S	P	<b>G</b>	<b>T</b>
	8	V	D	<b>V</b>	S	<b>E</b>	I	V	I	<b>N</b>	S	P	<b>P</b>	<b>P</b>	<b>E</b>	D	K	S	P	<b>G</b>	<b>T</b>

The two gray-highlighted lines were selected as the representative sequences of CsA<sub>6</sub>μM\_#6 and #7 and used to generate the derivative constructs.



**Fig. 4.** Amino acid sequences of HCV-RMT-tri (GT1a) and HCV-JFH1 (GT2a) around (A) T1280V and (B) D2292E. (C) Location of the CsA resistant mutations in NS5A. Amino acid sequences around the positions of four CsA resistant mutations.

**Table 2**  
Evaluation of resistance to CsA of mutants that have single mutations or combinations of multiple mutations.

	Mutations		IC <sub>50</sub> (μm)	Fold change
	NS3	NS5A		
RMT-tri (RMT, GT1a)	–	–	0.79	1.0
	–	D2292E	2.1	2.7
	T1280I	–	0.96	1.2
	T1280I	D2292E	2.46	3.1
	T1280V	–	0.91	1.2
	T1280V	D2292E	2.54	3.2
JFH1 (JFH1, GT2a)	–	–	0.49	1.0
	–	D2292E	1.3	2.7
	T1280I	–	0.51	1.0
	T1280I	D2292E	1.38	2.8
	T1280V	–	0.69	1.4
	T1280V	D2292E	1.2	2.4

Threonine at site 1280 (RMT-tri or JFH1) were mutated to isoleucine (adaptive mutation of Con1 replicon) or valine (major mutation of CsA resistant clones). Aspartic acid at 2292 was mutated to glutamic acid.

**Table 3**  
Evaluation of amino acid mutations in NS5A that conferred CysA resistance.

	Mutations in NS5A				IC <sub>50</sub> (μm)	Fold change
	D2292E	D2303H	S2362G	E2414K		
Con1_5.1 (GT1b)	○				0.11	1.0
		○			0.88	7.9
			○		0.52	4.7
				○	0.12	1.0
				○	0.30	2.7
		○	○		1.0	9.4
		○			1.8	16.6
			○		0.95	8.5
				○	1.5	13.1
		○	○	○	2.80	25.7

we have not assessed V1681A as single mutant, analyzing its mechanism of CsA resistance and its cooperation with other mutations in NS3 and NS5A must be worthwhile because V1681A greatly enhanced the CsA resistance of some constructs.

In all, we evaluated three cyclophilin inhibitors—CsA, NIM811, and Debio-025. Among them, Debio-025 showed the strongest inhibition (IC<sub>50</sub> values to any mutants) and was tolerated by CsA-resistant mutations (IC<sub>50</sub> index change values, Fig. 2 and

**Table 4**  
Evaluation of amino acid mutations in NS5A that conferred NIM811 resistance.

	Mutations in NS5A				IC <sub>50</sub> (μm)	Fold change
	D2292E	D2303H	S2362G	E2414K		
Con1_5.1 (GT1b)	○				0.054	1.0
		○			0.324	6.0
			○		0.184	3.4
				○	0.056	1.0
		○	○		0.125	2.3
			○	○	0.455	8.4
		○	○		0.635	11.8
		○		○	0.403	7.5
		○		○	0.599	11.1
		○	○	○	0.923	17.1

**Table 5**  
Evaluation of amino acid mutations in NS5A that conferred Debio-025 resistance.

	Mutations in NS5A				IC <sub>50</sub> (μm)	Fold change
	D2292E	D2303H	S2362G	E2414K		
Con1_5.1 (GT1b)	○				0.024	1.0
		○			0.095	4.0
			○		0.074	3.1
				○	0.028	1.2
		○	○		0.024	1.8
			○	○	0.139	5.8
		○	○		0.198	8.3
				○	0.139	5.8
				○	0.185	7.8
		○	○	○	0.263	11.0

Table 3–5). It was interesting that the resistant mutants differed so greatly in their tolerance of these three inhibitors because all three inhibitors have the same mode of action. Garcia-Rivera et al. concluded that CsA resistance of HCV mutants were solely derived from dependence of the NS5A proteins on cyclophilins [28]. Our results might indicate that other factors are important to CsA resistance, in addition to residual cyclophilin activity.

Drugs that are intended to treat chronic HCV infection and that target important nonstructural HCV proteins—the serine protease NS3/4A, the large phosphoprotein NS5A, or the RNA-dependent RNA polymerase NS5B—have reached the clinical trial stage of drug development [32–34]. Two oral HCV protease inhibitors were approved by the FDA, and some of the drugs could achieve a sus-

tained virologic response (SVR) [35]. However, to develop treatments that eradicate individual chronic HCV infections, additional studies on the emergence of drug-resistant HCV mutants and on the molecular interactions at HCV replication complexes are necessary.

Our new findings provided insights into the way by which HCV acquires resistance to cyclophilin inhibitors, and these insights will facilitate the development of this type of anti-HCV drug for clinical use.

## Acknowledgments

The authors thank Debiopharm Corporation for providing Debio-025 and Novartis Pharmaceuticals for providing NIM811. We also thank Dr. Masahiro Shuda for his technical support and advice, and Mr. Seima Itami for fruitful discussions. This study was supported in part by grants from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science, and Technology of Japan; the Program for Promotion of Fundamental Studies in Health Sciences of the National Institute of Biomedical Innovation of Japan; and the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.04.053>.

## References

- M. Arai, Y. Tokunaga, A. Takagi, Y. Tobita, Y. Hirata, Y. Ishida, C. Tateno, M. Kohara, Isolation and characterization of highly replicable hepatitis C virus genotype 1a strain HCV-RMT, *PLoS ONE* 8 (2013) e82527.
- I. Saito, T. Miyamura, A. Ohbayashi, H. Harada, T. Katayama, S. Kikuchi, Y. Watanabe, S. Koi, M. Onji, Y. Ohta, et al., Hepatitis C virus infection is associated with the development of hepatocellular carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 6547–6549.
- L. Gravit, Introduction: a smouldering public-health crisis, *Nature* 474 (2011) S2–S4.
- M. Kohara, T. Tanaka, K. Tsukiyama-Kohara, S. Tanaka, M. Mizokami, J.Y. Lau, N. Hattori, Hepatitis C virus genotypes 1 and 2 respond to interferon- $\alpha$  with different virologic kinetics, *J. Infect. Dis.* 172 (1995) 934–938.
- P. Simmonds, J. Bukh, C. Combet, G. Deleage, N. Enomoto, S. Feinstone, P. Halfon, G. Inchauspe, C. Kuiken, G. Maertens, M. Mizokami, D.G. Murphy, H. Okamoto, J.M. Pawlotsky, F. Penin, E. Sablon, I.T. Shin, L.J. Stuyver, H.J. Thiel, S. Viazov, A.J. Weiner, A. Widell, Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes, *Hepatology* 42 (2005) 962–973.
- L.I. Backus, P.S. Belperio, T.A. Shahoumian, R. Cheung, L.A. Mole, Comparative effectiveness of the hepatitis C virus protease inhibitors boceprevir and telaprevir in a large U.S. cohort, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 39 (1) (2014) 93–103.
- F. Fernandes, D.S. Poole, S. Hoover, R. Middleton, A.C. Andrei, J. Gerstner, R. Striker, Sensitivity of hepatitis C virus to cyclosporine A depends on nonstructural proteins NS5A and NS5B, *Hepatology* 46 (2007) 1026–1033.
- F. Yang, J.M. Robotham, H.B. Nelson, A. Irsigler, R. Kenworthy, H. Tang, Cyclophilin A is an essential cofactor for hepatitis C virus infection and the principal mediator of cyclosporine resistance in vitro, *J. Virol.* 82 (2008) 5269–5278.
- T.L. Foster, P. Gallay, N.J. Stonehouse, M. Harris, Cyclophilin A interacts with domain II of hepatitis C virus NS5A and stimulates RNA binding in an isomerase-dependent manner, *J. Virol.* 85 (2011) 7460–7464.
- R. Flisiak, A. Horban, P. Gallay, M. Bobardt, S. Selvarajah, A. Wiercinska-Drapalo, E. Siwak, I. Cielniak, J. Higersberger, J. Kierkus, C. Aeschlimann, P. Grosgrain, V. Nicolas-Metral, J.M. Dumont, H. Porchet, R. Crabbe, P. Scalfaro, The cyclophilin inhibitor Debio-025 shows potent anti-hepatitis C effect in patients coinfecting with hepatitis C and human immunodeficiency virus, *Hepatology* 47 (2008) 817–826.
- S. Hopkins, B. DiMassimo, P. Rusnak, D. Heuman, J. Lalezari, A. Sluder, B. Scorneaux, S. Mosier, P. Kowalczyk, Y. Ribeill, J. Baugh, P. Gallay, The cyclophilin inhibitor SCY-635 suppresses viral replication and induces endogenous interferons in patients with chronic HCV genotype 1 infection, *J. Hepatol.* 57 (2012) 47–54.
- E. Lawitz, E. Godofsky, R. Rouzier, T. Marbury, T. Nguyen, J. Ke, M. Huang, J. Praestgaard, D. Serra, T.G. Evans, Safety, pharmacokinetics, and antiviral activity of the cyclophilin inhibitor NIM811 alone or in combination with pegylated interferon in HCV-infected patients receiving 14 days of therapy, *Antiviral Res.* 89 (2011) 238–245.
- N. Kato, M. Hijikata, Y. Ootsuyama, M. Nakagawa, S. Ohkoshi, T. Sugimura, K. Shimotohno, Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 9524–9528.
- D. Moradpour, F. Penin, C.M. Rice, Replication of hepatitis C virus, *Nat. Rev. Microbiol.* 5 (2007) 453–463.
- R.A. Love, O. Brodsky, M.J. Hickey, P.A. Wells, C.N. Cronin, Crystal structure of a novel dimeric form of NS5A domain I protein from hepatitis C virus, *J. Virol.* 83 (2009) 4395–4403.
- T.L. Tellinghuisen, J. Marcotrigiano, C.M. Rice, Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase, *Nature* 435 (2005) 374–379.
- S. Feuerstein, Z. Solyom, A. Aladag, A. Favier, M. Schwarten, S. Hoffmann, D. Willbold, B. Brutscher, Transient structure and SH3 interaction sites in an intrinsically disordered fragment of the hepatitis C virus protein NS5A, *J. Mol. Biol.* 420 (2012) 310–323.
- X. Hanouille, D. Verdegem, A. Badillo, J.M. Wieruszkeski, F. Penin, G. Lippens, Domain 3 of non-structural protein 5A from hepatitis C virus is natively unfolded, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 381 (2009) 634–638.
- Y. Liang, H. Ye, C.B. Kang, H.S. Yoon, Domain 2 of nonstructural protein 5A (NS5A) of hepatitis C virus is natively unfolded, *Biochemistry* 46 (2007) 11550–11558.
- Y. Shirota, H. Luo, W. Qin, S. Kaneko, T. Yamashita, K. Kobayashi, S. Murakami, Hepatitis C virus (HCV) NS5A binds RNA-dependent RNA polymerase (RdRP) NS5B and modulates RNA-dependent RNA polymerase activity, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 11149–11155.
- X. Hanouille, A. Badillo, J.M. Wieruszkeski, D. Verdegem, I. Landrieu, R. Bartenschlager, F. Penin, G. Lippens, Hepatitis C virus NS5A protein is a substrate for the peptidyl-prolyl cis/trans isomerase activity of cyclophilins A and B, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 13589–13601.
- D. Verdegem, A. Badillo, J.M. Wieruszkeski, I. Landrieu, A. Leroy, R. Bartenschlager, F. Penin, G. Lippens, X. Hanouille, Domain 3 of NS5A protein from the hepatitis C virus has intrinsic alpha-helical propensity and is a substrate of cyclophilin A, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 20441–20454.
- F. Yasui, M. Sudoh, M. Arai, M. Kohara, Synthetic lipophilic antioxidant BO-653 suppresses HCV replication, *J. Med. Virol.* 85 (2013) 241–249.
- T. Takeuchi, A. Katsume, T. Tanaka, A. Abe, K. Inoue, K. Tsukiyama-Kohara, R. Kawaguchi, S. Tanaka, M. Kohara, Real-time detection system for quantification of hepatitis C virus genome, *Gastroenterology* 116 (1999) 636–642.
- K. Goto, K. Watashi, D. Inoue, M. Hijikata, K. Shimotohno, Identification of cellular and viral factors related to anti-hepatitis C virus activity of cyclophilin inhibitor, *Cancer Sci.* 100 (2009) 1943–1950.
- X. Puyang, D.L. Poulin, J.E. Mathy, L.J. Anderson, S. Ma, Z. Fang, S. Zhu, K. Lin, R. Fujimoto, T. Compton, B. Wiedmann, Mechanism of resistance of hepatitis C virus replicons to structurally distinct cyclophilin inhibitors, *Antimicrob. Agents Chemother.* 54 (2010) 1981–1987.
- L. Coelmont, X. Hanouille, U. Chatterji, C. Berger, J. Snoeck, M. Bobardt, P. Lim, I. Vlieghe, J. Paeshuyse, G. Vuagniaux, A.M. Vandamme, R. Bartenschlager, P. Gallay, G. Lippens, J. Neyts, DEB025 (Alisporivir) inhibits hepatitis C virus replication by preventing a cyclophilin A induced cis-trans isomerisation in domain II of NS5A, *PLoS ONE* 5 (2010) e13687.
- J.A. Garcia-Rivera, M. Bobardt, U. Chatterji, S. Hopkins, M.A. Gregory, B. Wilkinson, K. Lin, P.A. Gallay, Multiple mutations in hepatitis C virus NS5A domain II are required to confer a significant level of resistance to alisporivir, *Antimicrob. Agents Chemother.* 56 (2012) 5113–5121.
- D. Ross-Thriepand, Y. Amako, M. Harris, The C terminus of NS5A domain II is a key determinant of hepatitis C virus genome replication, but is not required for virion assembly and release, *J. Gen. Virol.* 94 (2013) 1009–1018.
- H. Grise, S. Frausto, T. Logan, H. Tang, A conserved tandem cyclophilin-binding site in hepatitis C virus nonstructural protein 5A regulates Alisporivir susceptibility, *J. Virol.* 86 (2012) 4811–4822.
- I.U. Ansari, R. Striker, Subtype specific differences in NS5A domain II reveals involvement of proline at position 310 in cyclosporine susceptibility of hepatitis C virus, *Viruses* 4 (2012) 3303–3315.
- D.R. Bobeck, R.F. Schinazi, S.J. Coats, Advances in nucleoside monophosphate prodrugs as anti-HCV agents, *Antivir. Ther.* 15 (2010) 935–950.
- R. De Francesco, G. Migliaccio, Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C, *Nature* 436 (2005) 953–960.
- Z. Huang, M.G. Murray, J.A. Secrist 3rd, Recent development of therapeutics for chronic HCV infection, *Antiviral Res.* 71 (2006) 351–362.
- M. Radkowski, J.F. Gallegos-Orozco, J. Jablonska, T.V. Colby, B. Walewska-Zielecka, J. Kubicka, J. Wilkinson, D. Adair, J. Rakela, T. Laskus, Persistence of hepatitis C virus in patients successfully treated for chronic hepatitis C, *Hepatology* 41 (2005) 106–114.

## 特集 肝良性腫瘍および類似病変の病理・画像診断update

## 肝良性腫瘍の病理診断

原田憲一\*

肝の結節性病変は肝細胞癌、胆管癌以外にも多様な腫瘍性、過形成、過誤腫性病変があり、病理学的に鑑別が容易な病変ばかりではなく、血行動態を含めて臨床病理学的に診断する必要のある疾患も多い。また、近年、遺伝子変異に基づく肝細胞腺腫の分類および診断も採用され、従来の病理学的な疾患概念および診断基準とのすり合わせが今後必要である。

© Key Word

病理, 免疫染色, 遺伝子

## はじめに

肝にみられる結節性病変として、上皮性および間葉系腫瘍のほか、肝内血行動態の異常、リンパ球、線維化、脂肪細胞および脂肪化肝細胞の集簇などに起因する結節性病変など、多数の病態が存在する。特に肝は肝動脈と門脈との2重支配のため、他の臓器に比べて腫瘍に特徴的な血行動態および血流不均衡による実質の変化を来しやすい。本稿では、画像診断においてしばしば問題となる肝良性腫瘍を中心に概説する。

は門脈域や胆管を認めない。また、多数の異常筋性血管もみられ、多血性結節として描出される(図1-B, C)。元来、HCAは、血行動態を含めた臨床像および病理形態学的に特徴づけられてきたが、新WHO分類(2010年)では、遺伝子型を基に、

- 1) hepatocyte nuclear factor (HNF) 1 $\alpha$ 不活性化型,
- 2)  $\beta$ -catenin活性化型,
- 3) 炎症型,
- 4) 分類不能型,

に亜分類され、それぞれ変異遺伝子を反映した免疫組織化学的鑑別が容易となった<sup>1)</sup>。

1) HNF1 $\alpha$ 不活性化型

*HNF1A* 遺伝子変異によりHNF1 $\alpha$ 蛋白が不活性化し、HNF1 $\alpha$ で制御されるliver fatty acid-binding protein (L-FABP)の発現低下を免疫染色で評価することができる。組織学的には高度の脂肪化を呈するのが特徴であり、炎症所見や核異型は乏しい。

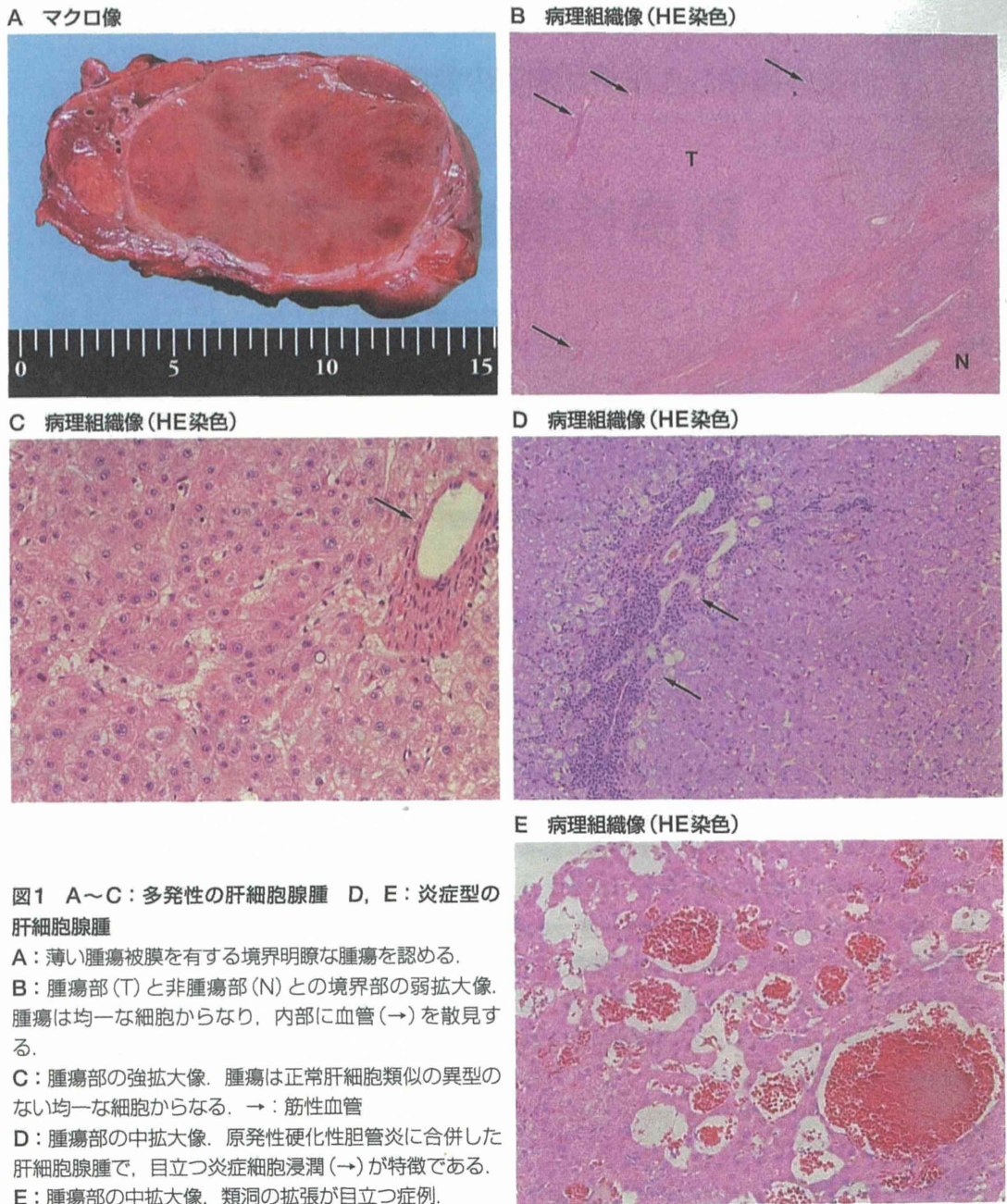
2)  $\beta$ -catenin活性化型

$\beta$ -catenin 遺伝子変異による恒常的な $\beta$ -catenin活性化を来し、免疫組織化学的に $\beta$ -cateninの核

## 1 肝細胞腺腫 (hepatocellular adenoma; HCA, liver cell adenoma)

肝細胞腺腫(HCA)は、経口避妊薬の服用歴のある若年女性に好発(85%)するが、わが国では蛋白同化ホルモン服用、I型糖原病などの代謝障害、肥満、アルコール多飲歴を有する症例が多い。通常、正常肝から発生する境界明瞭な単発性(稀に多発)の腫瘍で、腫瘍被膜を有する症例もある(図1-A)。組織学的に、正常肝細胞に類似した異型の乏しい細胞が索状配列を保ちつつ増生し、腫瘍結節内に

\* Harada K. 金沢大学医薬保健研究域医学系形態機能病理学



発現および glutamine synthetase のびまん性強陽性で評価することができる。糖原病や男性ホルモン投与との関連性が指摘されており、組織学的に脂肪化や炎症所見を伴うことはないが、細胞異型が目立ち高分化型肝細胞癌との鑑別が重要であることから、他の亜型よりも悪性転化のリスクが高いとされている。しかし、肝細胞癌自体が同様な遺伝子変異および免疫組織学的染色態度を示すた

め、早期または高分化型肝細胞癌との異同が指摘されている<sup>2)</sup>。

### 3) 炎症型

目立つ炎症細胞浸潤が特徴であるが、telangiectatic HCAとも呼称され、以前のtelangiectatic focal nodular hyperplasia (FNH)に相当する<sup>3) 4)</sup>。gp130遺伝子など変異によるIL-6/gp130/STAT系の恒常的な活性化により、免疫組織化学的

に炎症関連蛋白(SAAとCRP)の免疫染色にて評価できる。しかし、HCAにおけるこれらの炎症関連蛋白は、もともと正常肝細胞から産生されているため、これらの分子のびまん性かつ過剰発現が重要であり、かならず背景の正常肝細胞との発現比較が重要である。

臨床的には、肥満やアルコール摂取による脂肪肝との関連が示唆されている。組織学的には、炎症細胞浸潤を伴う線維性瘢痕とその周囲の細胆管反応、異常筋性血管、類洞の拡張が特徴であり、次項の限局性結節性過形成類似の組織所見を呈する(図1-D, E)。

#### 4) 分類不能型を含めた問題点

このような遺伝子異常に基づく分類および各亜型の臨床病理学的特徴が明らかとなりつつあるなかで、元来のHCAの特徴を有するが、いずれの遺伝子異常も見い出せない分類不能型がある。また、遺伝子異常を有する結節であるが、元来のHCAの特徴とは異なる症例の存在も報告されている。従来は正常肝から発生するのが特徴であったが、炎症型HCAが、原発性硬化性胆管炎などの慢性肝障害例からの発症例(図1-D)が報告され<sup>5)</sup>、炎症性の病態を基盤として発生する機序も考えられる。また、 $\beta$ -catenin変異型HCAと肝細胞癌との異同、さらに、複数の遺伝子変異パターンを示す症例の存在なども指摘されており、従来のHCAの概念および診断基準とのすり合わせが今後必要である。遺伝子変異に基づく免疫染色パターンによる鑑別は簡便かつ有用な方法であるが、染色結果を過信することなく、臨床像、組織像を加味し、個々の症例を診断する必要がある。

## 2 限局性結節性過形成 (focal nodular hyperplasia ; FNH) および限局性結節性過形成様病変 (FNH-like nodule)

### 1) 限局性結節性過形成 (FNH)

FNHは非硬変肝(通常正常肝)に発生し、境界明瞭な数mm~15cmの結節を呈する。約2/3の症

例は単発、約1/3は多発である。肝内血管系および血流異常が背景にあると考えられており、動脈灌流域における領域性の肝細胞過形成が基本的な病態である。

HCAと同様に、異型のない肝細胞の過形成からなるが、FNHでは、結節中心部に中心性瘢痕と放射状に伸びる線維性隔壁が特徴であり(図2-A)、中心性瘢痕部には大小の血管、硝子化した膠原線維、また隔壁内、実質内に異常筋性血管や隔壁に近接して細胆管増生、リンパ球浸潤、慢性胆汁うっ滞(肝細胞の淡明腫大、銅顆粒の沈着)を認める(図2-C, D)。病変内部には成熟門脈域を認めない(図2-E)。glutamine synthetaseの免疫染色にて地図様のパターンを示すのが特徴であり、 $\beta$ -catenin活性化型HCAとの鑑別に重要な所見である<sup>1)</sup>(図2-F)。

### 2) 限局性結節性過形成様病変 (FNH-like nodule)

一方、中心性瘢痕を伴わない、または不明瞭な限局性結節性過形成様病変(FNH-like nodule。図2-B)もしばしば経験され、HCAとの鑑別が重要である。報告によりまちまちであるが、FNHのうち0~51%が中心瘢痕の不明瞭なFNH-like noduleである<sup>6)~10)</sup>。また、FNHとFNH-like noduleとは血流異常に起因した一連の組織病態発生を反映しており、FNH-like noduleはFNHの前駆病変との考えもある<sup>11)</sup>。

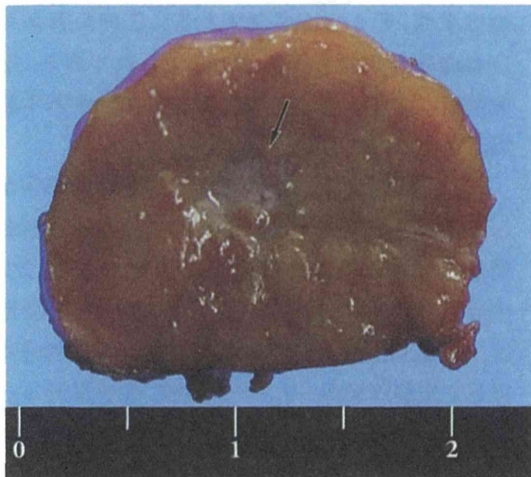
### 3) アルコール多飲者にみられる過形成結節

また、画像診断技術の向上により近年注目されている結節として、アルコール多飲者にみられる過形成結節がある<sup>12) 13)</sup>。多飲者のFNH-like noduleや多血性過形成結節(hypervascular hyperplastic nodule in heavy drinker)は、多飲者結節とも称される。肝硬変を背景に発生する多血性過形成結節のため、肝細胞癌との鑑別が問題となる。組織像はFNHやFNH-like noduleに類似し、結節内には脂肪変性、マロリデンク体などアルコールに起因する所見も同時に出現する。しばしば細胞異型、小型化、細胞密度増加を認め、組

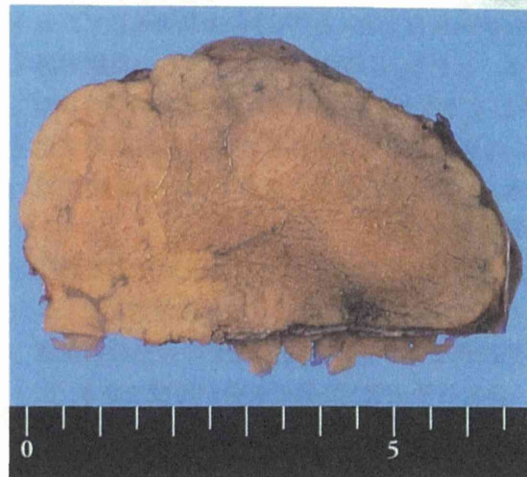
CRP : C-reactive protein  
gp130 : glycoprotein 130  
IL-6 : interleukin-6

SAA : serum amyloid A  
STAT : signal transducer and activator of transcription

A マクロ像(固定前)



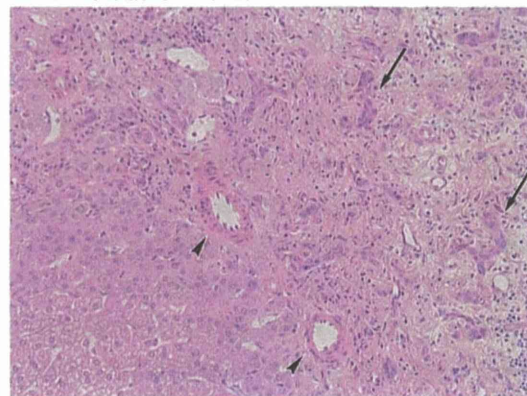
B マクロ像(固定後)



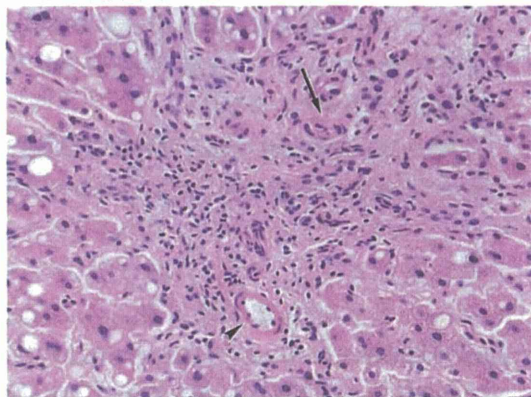
C 病理組織像(HE染色)



D 病理組織像(HE染色)



E 病理組織像(HE染色)



F 病理組織像

(左: HE染色, 右: glutamine synthetase免疫染色)

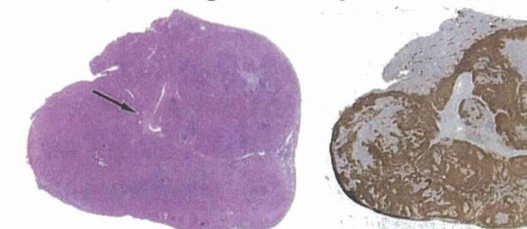


図2 A: 限局性結節性過形成 B: 限局性結節性過形成様病変  
C, D: 限局性結節性過形成 E: 限局性結節性過形成にみられた不完全な門脈域 F: 限局性結節性過形成

A: 結節中心部に星状の癆痕を認める(→).

B: 細い隔壁様の線維を認めるが, 明らかな中心性癆痕は認めない.

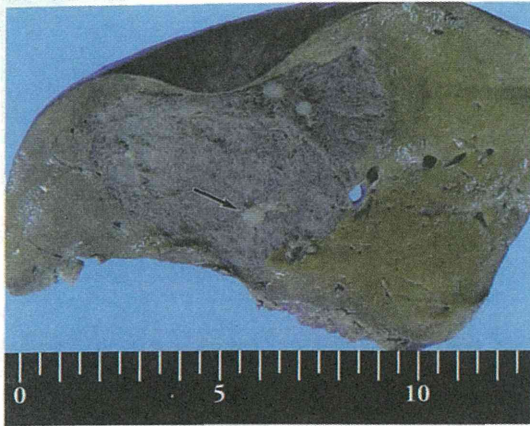
C: 弱拡大像. 結節中心の癆痕部には炎症細胞浸潤(\*), 筋性血管(⇨), 細胆管増生(→)を認める.

D: 強拡大像. 結節中心の癆痕部における筋性血管(⇨)と細胆管増生(→)を認める.

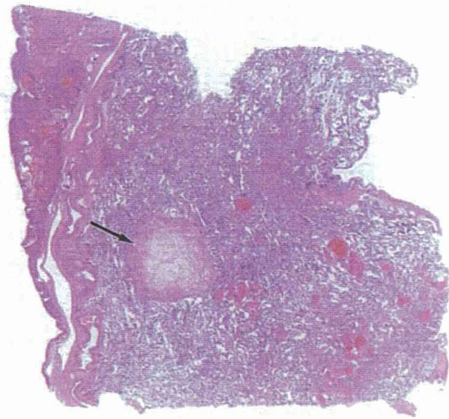
E: 強拡大像. 門脈域類似の組織成分を認めるが, 動脈(⇨)と不明瞭な胆管様構造物(細胆管, →)を認めるのみで, 門脈枝や動脈に伴走する胆管(小葉間胆管)は認めない.

F: セミマクロ像. HE染色で結節中心部に星状の癆痕を認める(左: →). glutamine synthetase免疫染色(右)で結節内の実質部に, 特徴的な地図様の陽性染色(茶色)を認める.

A マクロ像



B 病理組織像 (HE染色)



C 病理組織像 (HE染色)

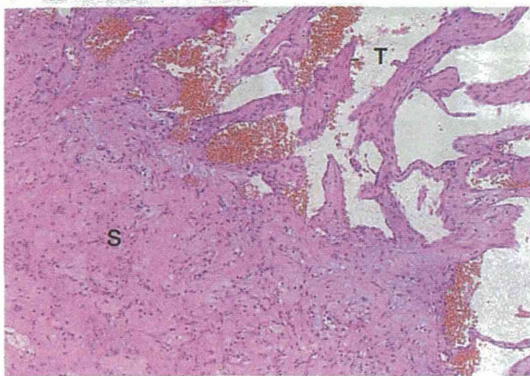


図3 肝血管腫

A: 黒赤色調の境界明瞭な腫瘍を認める。全体的に海綿状を呈しており、内部に白色調の癒痕を認める(→)。

B: セミマクロ像。海綿状の腫瘍成分内に癒痕を認める(→)。

C: 強拡大像。海綿状腫瘍成分(T)と癒痕部(S)の境界部の病理像で、海綿状部には血液を容れる拡張した血管の集簇を認める。癒痕部には血管構造は消失し、線維化と少数の細胞成分を認める。

織学的にも肝細胞癌との鑑別が重要である。また、炎症型HCA様のSAA陽性の結節も報告されているが、その意義は不明である。

### 3 肝血管腫 (hepatic hemangioma)

肝血管腫は、肝非上皮性腫瘍の中で最も頻度が高く、あらゆる年齢層の女性に好発する(男女比1:3)。肝にみられる血管腫は海綿状血管腫と毛細血管腫があるが、大部分は海綿状血管腫である。硬化性血管腫(sclerosing hemangioma)は海綿状血管腫が血栓形成、器質化、線維化および硝子化(癒痕化)などの2次的変化を伴い、病変の大部分が線維性結合織で置き換わった病態である。

肉眼的に肝血管腫は黒赤色調の境界明瞭な腫瘍で、断面は海綿状を呈し、線維性癒痕部では白色を呈する(図3-A)。組織学的に壁の薄い拡張性の血管が密に集簇しており、血管腔には血液が充満し、扁平な1層性の内皮細胞で裏打ちされている(図

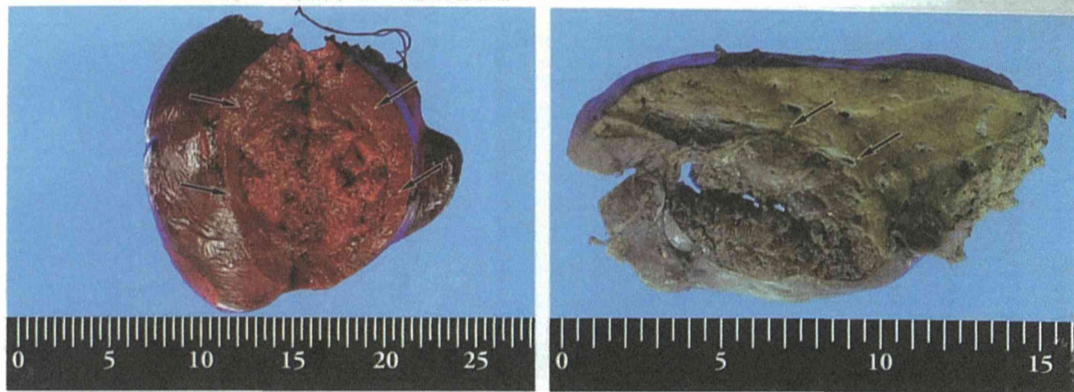
3-B, C)。隣接する血管とは線維性結合織で境されているが、肝細胞や門脈域など肝固有の組織成分は認めない。しばしば血栓の形成があり、線維化、硝子化、石灰化などの硬化性変化を伴うようになり(図3-B, C)、その程度が高度になると硬化性血管腫となる。硝子様癒痕が高度な硬化性血管腫の場合、血管構造がみられないため、血管腫の診断が困難となる。

### 4 血管筋脂肪腫 (angiomyolipoma; AML)

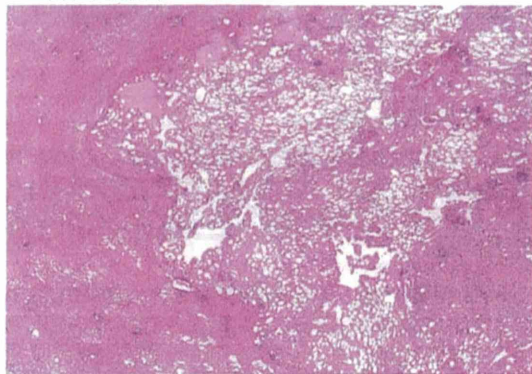
血管筋脂肪腫(AML)は、その名称のごとく、血管、平滑筋細胞、脂肪組織が混在した間葉系腫瘍であり、10~72歳とあらゆる年齢に発生し、明らかな性差はない。病理学的に被膜はないが、境界明瞭な腫瘍(図4-A)で、平均10cm大、1/3は5cm以下である。各構成成分の多寡により多彩な断面を呈し、脂肪が多いと黄色、血管が多いと赤褐色、



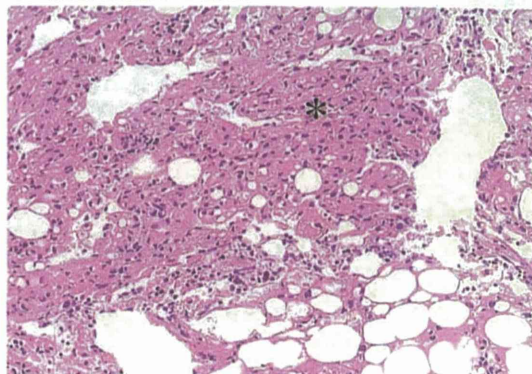
A マクロ像(左:固定前の入割部,右:固定後剖面)



B 病理組織像(HE染色)



C 病理組織像(HE染色)



D 病理組織像(左:HE染色,右:HMB45免疫染色)



図4 A~C:血管筋脂肪腫 D:脂肪成分を欠く血管筋脂肪腫

A:固定前の入割部写真では境界明瞭な脆い腫瘍を認める(左:→).固定後剖面像ではやや黒色調を呈する腫瘍を認める(右:→).

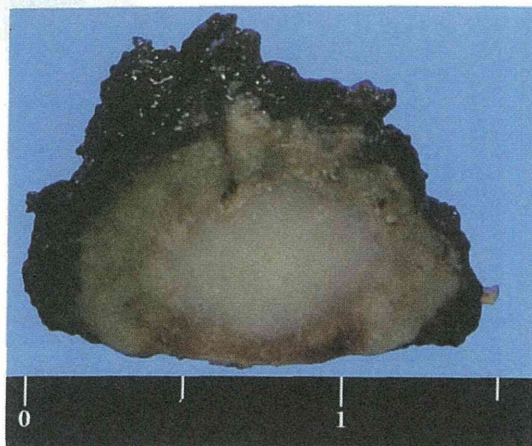
B:弱拡大像.脂肪細胞の豊富な腫瘍成分を示す.

C:強拡大像.脂肪細胞と平滑筋細胞(\*)の成分を示す.平滑筋細胞成分は類上皮様を呈し,肝細胞に類似した形態を示す.

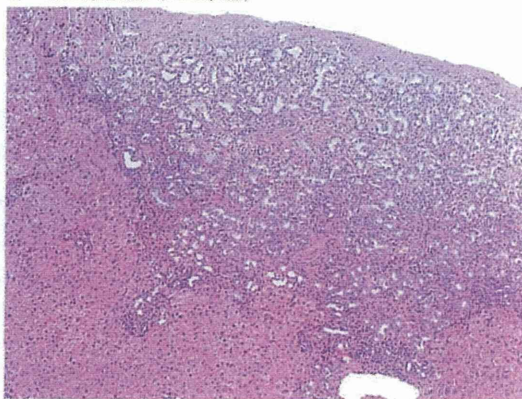
D:セミマクロ像.HE染色で2つの腫瘍を認める(左:→)が,脂肪成分を示唆する明るい成分は認めない.HMB45の免疫染色(右)では,いずれの結節も陽性所見を認める.

HMB:human melanin black

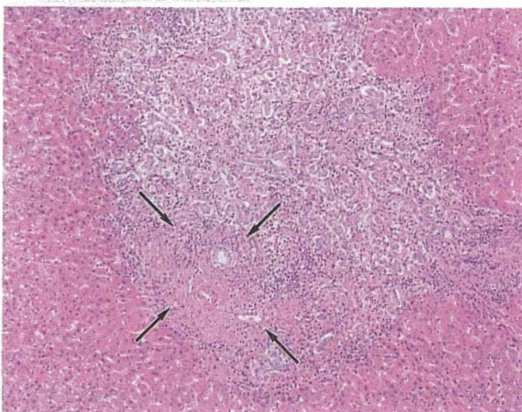
A マクロ像



B 病理組織像 (HE染色)



C 病理組織像 (HE染色)



### 図5 胆管細胞腺腫

A: 約5mm大の白色調の結節を認める。腫瘍被膜はなく、境界はやや不明瞭化している。

B: 肝被膜直下にみられた胆管細胞腺腫で、小型腺管が密に増生している。

C: 肝内深部にみられた胆管細胞腺腫で、腫瘍内に好中球の目立つ浸潤と門脈域(→)を認める。

平滑筋成分が多いと灰白色を呈する。組織学的に血管、平滑筋細胞、脂肪細胞が領域性に増生、または混在し(図4-B, C)、髄外造血もみられる。

血管が豊富なため画像上、脂肪化を伴う肝細胞癌との鑑別が重要であるが、病理像は全く異なる像を呈し、鑑別は通常容易である。しかし、好酸性の胞体を有する平滑筋細胞は類上皮細胞様で索状に増殖し、しばしば正常肝細胞や肝細胞癌に類似する(図4-C)。特に、脂肪細胞成分を欠く症例(図4-D)や平滑筋細胞のみからなる monotypic epithelioid angiomyolipoma (perivascular epithelioid cell tumor, PEComa)<sup>14)</sup>、また腫瘍の一部しか採取されない腫瘍針生検では、病理学的にも肝細胞癌との鑑別が困難である。しばしば病理診断の際に問題となるが、平滑筋マーカーとメラノーママーカー(HMB45, Melan A)の免疫染色が診断の決め手となる(図4-D)。

## 5 胆管細胞腺腫 (bile duct adenoma)

胆管細胞腺腫は肝被膜下に好発し、小型胆管の増生からなる0.5~2cm程度の結節性病変(図5-A)で、ほとんどは手術や剖検時に偶然発見されることが多い。腫瘍被膜はなく、やや境界不明瞭な灰白色の結節としてみられ、特に胃癌や肺癌の開腹手術時に肝表の転移巣疑いとして切除される症例をよく経験する。組織上、立方状~円柱状の胆管細胞が基底膜を伴いつつ比較的揃った小腺管を形成し、密に増生する(図5-B)。管腔は狭く不明瞭であり、胆管性過誤腫(von Meyenburg complex)にみられるような内腔の拡張はない。間質に種々の程度の線維化、リンパ球や好中球などの炎症細胞浸潤を伴うことが多く、結節内または隣接して門脈域を認める症例が多い(図5-C)。少量の粘液産生を認める症例もある。

末梢型の小型胆管からなる肝内胆管癌あるいは細胆管癌との鑑別が問題となる。現在のところ、