

[総説]

# 肝再生のきっかけ

三浦 義彰\* 福井 紀子\*\*

(昭和56年4月1日受付)

## 要 旨

肝葉の 2/3 切除後にみられる肝組織の増殖(肝の再生)のきっかけとなる物質については従来インスリン、グルカゴン、ビリベルジンなどがそれに当たるとされてきた。著者等はこの物質がトロンボキサンであることをダイコクネズミ肝の灌流実験その他から推定した。この物質の肝内合成は正常肝に於ては抑制因子により抑止されているが、肝葉を切除するとこの因子の活性が減じ、肝内でトロンボキサンがアラキドン酸から合成される。これによって肝の部分切除後の DNA 合成反応開始のきっかけとなる。それではどのような機作が働いて、肝臓に損傷を与えるとトロンボキサン合成抑制物質が激減するのはまだ不明である。また肝の再生にはトロンボキサンのほか、血小板由来の増殖因子の存在が必須であるが、この因子のみでは再生しない。

**Key words:** 肝再生, フォスホオリパーゼ A<sub>2</sub>, PG, TX, PDGF

**略語一覧:** PG (プロスタグランジン), TX (トロンボキサン), PDGF (血小板由来増殖因子), Tdr-kinase (チミジンキナーゼ), ORD (オルニチンデカルボキシラーゼ), TAT (チロジンアミノトランスフェラーゼ)

## I. はしがき

ネズミの肝臓はその 2/3 を切除すると約 2~3 週間以内にもとの重量にまで回復する。この現象は俗に肝の再生といわれ、既に 1894 年に Valerian von Meister<sup>1)</sup> によって定量的な実験がなされている。しかし今に至るまで、なぜ再生現象は肝臓にはみられるが、四肢の切断などの後にはみられないのかわかっていない。近年肝癌の外科的療法が成功をおさめるようになったので、臨床的にも肝の再生の問題は重視されるようになった。しかし肝葉の切除を行なうとなぜ肝の再生がはじまるのか、どのような物質がそのきっかけをつくるのかは明らかにされていなかった。

肝の再生をおこすきっかけとなる物質については従来臨床経験および動物実験の成績から門脈血に含まれるホルモンたとえばインスリンやグルカゴンなどが考えられてきた<sup>2-5)</sup>。そのほか胆汁色素にもこの作用があるとい

う報告がある<sup>6)</sup>。また別の考え方として正常動物には細胞増殖を抑制するカロンという物質があるが、これが肝葉切除とともに活性が減少するとする説もある<sup>7)</sup>。

私達はネズミの肝臓を体外にとり出し、血清をふくむ灌流液で灌流中に肝葉の 2/3 を切除すると、12 時間後に DNA 合成がみられることを認めた<sup>8)</sup>。このことは肝の再生には肝外の物質の寄与は主なものではなく、主役は残存肝でつくられる物質であることを示唆する。この物質は肝の損傷によってつくられる物質であるから、外傷や炎症の時にみられるアラキドン酸カスケードによる産物である可能性は強い。私達は以下述べるような実験成績からトロンボキサン (TX) が再生のきっかけ物質であろうと推定したのである。

## II. 肝細胞の Pleiotypic responses

細胞の増殖が始まる前にみられる一連の生化学的現象を pleiotypic response という。たとえば細胞内への

\* 千葉大学名誉教授

\*\* 元千葉大学医学部生化学第 1 教室講師 現千葉県立衛生短期大学教授

Yoshiaki MIURA, Noriko FUKUI: Triggers for Liver Regeneration.

Department of Biochemistry, School of Medicine, Chiba University, Chiba 280.

Received for publication, April 1, 1981.

養分のとりいれの増加とか、RNA代謝の高進などが知られている。私達は肝細胞の pleiotypic responses として細胞内の C-GMP 濃度の高まり<sup>9)</sup>, オルニチンデカルボキシラーゼ (ODC) やチロジンアミノトランスフェラーゼ (TAT) の誘導<sup>10)</sup>, チミジンキナーゼ (tdr-kinase) の活性増加<sup>11)</sup>, DNA の合成<sup>12)</sup>などに注目した。そしてこれらの現象が肝の部分切除後15分前後にまず C-GMP 濃度の上昇, 3~4時間後に ORD 並びに TAT の誘導, 22時間後に DNA 合成というように時間を迫ってみられる。これは肝の部分切除以外の場合でも肝細胞の増殖を伴う場合にはみられることである。たとえば静脈内にトリヨードサイロニン (T), グルカゴン (G), ヘパリン (H) の混合液 (TGH 溶液) を注射した後も同様な pleiotypic responses がみられるのである<sup>12)</sup>。

さらに私達は灌流肝を用いて実験し、灌流液に C-AMP をいれても ORD も TAT も誘導されないが、C-GMP を灌流液に加えると肝に ORD も TAT も誘導されることをみた<sup>13)</sup>。

ORD や TAT の誘導現象は G<sub>1</sub> 期の pleiotypic responses としては鋭敏で RNA 代謝の上昇率などより遙かに顕著なので、pleiotypic responses の強さを比較するには適している。たとえば70%の肝切除よりも85%の肝切除の時の方が ORD や TAT の誘導は強い。このことは pleiotypic と response は肝の損傷度と比例すること<sup>10)</sup>を示唆し、pleiotypic response をひきおこす物質は肝組織の損傷によって生じるのではないかという考えを抱くに至った。

一方、肝葉の切除は代謝能力の損失、血流の変化もひきおこすために、これによって pleiotypic response が生じるのではないかと考える人も多い。この説の真疑を知るために、私達は血流の変化も代謝能力の喪失も伴わない肝組織の損傷方法としてホチキスで肝に針金を通す方法、あるいは肝臓に糸を通す方法などを試みた (図1)。このいずれの方法にせよ、30本以上の針金を通せ



図1. 肝組織に糸を通し損傷を与える方法

ば肝臓には ODC の誘導と40時間後には DNA の合成がみられた。そして最も興味あることはこの方法によって針金を通さなかった肝葉にも ORD の誘導と DNA 合成がみられることである<sup>14)</sup>。この事実は pleiotypic response をおこす物質が肝組織の損傷のある場所から体液によって、無傷の場所にも運搬されることを物語っている。それではこの物質は何であろうかという問題が提起されてくる。

### III. Pleiotypic response をおこす物質

Pleiotypic response のうち最初に現れてくるのは肝葉切除後あるいは TGH 溶液注射後15分後にみられる C-GMP 濃度の上昇である。C-GMP を上昇させる物質で創傷局所で合成可能な既知の物質をしらべてみるとプロスタグランジン (PG) F<sub>2α</sub> が登場してくる。灌流肝に肝葉切除前にアスピリンやインドメサシンをあらかじめ灌流液に加えると DNA 合成がみられないことから、PG 類の関与は十分に考えられることである。そこで灌流肝に PGF<sub>2α</sub> を加えてみたところ ORD は誘導さ

表1. 灌流肝での DNA 合成

灌流条件*	DNA 合成**
肝葉切除ナシ	3494 ± 329
65% 肝葉切除	6985 ± 1626
アスピリン添加 + 肝切除	2328 ± 166
インドメサシン添加 + 肝切除	450 ± 125
イミダゾール添加 + 肝切除	789 ± 300
PGF <sub>2α</sub> 添加 (肝切除ナシ)	4312 ± 405

\*灌流は肝葉切除後12時間

\*\*灌流肝をスライスし、放射性チミジスとガラス器内で2時間保温、酸不溶性分画の放射能と Dische のジフェルアミン吸光度との比

れるが、DNA 合成はみられなかった。そこで PGF<sub>2α</sub> 以外のアラキドン酸から脂肪酸シクロオキシゲナーゼによって生じてくる物質をしらべてみるとトロンボキサン (TX) とプロスタサイクリンがある。灌流液に TX 生成阻害剤であるイミダゾールを加えてから肝葉切除をしてみると DNA 合成は著しく抑制されることを発見した (表1)。すなわち TX が pleiotypic response をおこす可能性が強く示唆されたのである<sup>15)</sup>。しかし活性のある TXA<sub>2</sub> は不安定で灌流液に直接これを加えて実験を試みることは不可能であるから、TXA<sub>2</sub> の代謝物である TXB<sub>2</sub> の存在を肝組織に見出すことをまず第一の目標とした。

そこで私達はあらかじめ開腹しておいたダイコクネズ

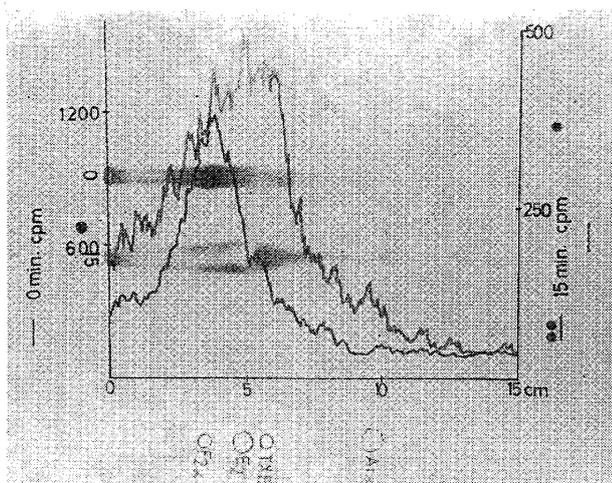


図2. In vivo に於ける肝のアラキドン酸代謝 (ラジオシンチグラムとラジオオートグラフィ)

正常肝標品 左側の目盛 曲線は放射能の高い方、主な放能は PGE<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub> にある

再生15分の標品 右側の目盛 曲線は放射能の低い方、主な放射能は TXB<sub>2</sub> にある

ミの血管内へ <sup>14</sup>C-アラキドン酸を注入し、その直後に肝葉の 2/3 を切除し、この標品を正常肝の標品とし、さらに15分後の残存肝を再生肝の標品と考えると、それぞれの標品中の TXB<sub>2</sub> の有無を検索した。この実験成績は大変興味あるものである。すなわち正常肝では PGE<sub>2</sub> と PGF<sub>2α</sub> が主として放射能を示したが、再生肝は主として TXB<sub>2</sub> に放射能が存在した<sup>16)</sup> (図2)。

この事実は再生肝は何等かの事情によってアラキドン酸代謝の系路が変わり、主として TX の合成が肝臓で行なわれていることを示すものである。

#### IV. 肝組織におけるアラキドン酸代謝

PG や TX は臓器によって生成されたり、されなかったりする。これは果してある臓器には PG や TX 産生系を欠いているのであろうか、肝組織だけについていえば一般に PG はつくっても TX は生産しないとされていた。しかし私達の研究によれば、これは TX 産生系を欠くからではなく、細胞上清部分に TX 産生を抑制する物質が存在するからである。

前述のように生体でアラキドン酸を血管内に与えると PGE<sub>2</sub> と PGF<sub>2α</sub> が肝臓では生じてくる。次に肝臓をヒアルロニダーゼその他の酵素で処理して肝細胞をバラバラにして、この遊離肝細胞に <sup>14</sup>C-アラキドン酸を加えて保温すると、アラキドン酸の大部分は磷脂質にとりこまれ、ほとんど PG は生じない。しかし肝細胞膜に損傷があるような遊離肝細胞では PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub> のほか

TXB<sub>2</sub> が生じてくる。(この TXB<sub>2</sub> が間違なく TXB<sub>2</sub> であることは直接にはマススペクトログラフィーで、また間接には TX 合成の特異阻害剤であるイミダゾールおよび OKY-1555 の使用によって確認されている)。

また同じく遊離細胞でも腹水肝癌細胞は細胞膜が丈夫なのでアラキドン酸はほとんど磷脂質にとりこまれ、PG の産生はみられない<sup>17)</sup>。

ところがいったん細胞膜をこわしてホモジェネートをして <sup>14</sup>C-アラキドン酸と保温してみると正常肝では PGE<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub> が放射能を帯び、再生肝では PGE<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub> のほか再生15分までは TXB<sub>2</sub> の生成が増加する。その上、肝癌では PGE<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub>, I<sub>2</sub>, TXB<sub>2</sub> が生じてくる。さらにミクロソーム分画をホモジェネートから精製すると正常肝では PGE<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub> のほか TXB<sub>2</sub> も生成される。これはミクロソームを除いた後の上清に TX の合成を阻害する因子があることを示すものである (表2)。この因子は耐熱

表2. 正常肝と肝癌細胞の細胞内分画での PG, TX の生合成\*

細胞内分画	正 常 肝				肝 癌			
	P	P	P	T	P	P	P	T
	G	G	G	X	G	G	G	X
	E <sub>2</sub>	F <sub>2α</sub>	I <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>	F <sub>2α</sub>	I <sub>2</sub>	B <sub>2</sub>
ホモジェネート	+	+	-	-	+	+	+	+
ミクロソーム	+	+	-	+	+	+	+	+
上 清	-	-	-	-	+	+	+	+

\* 各細胞内分画を <sup>14</sup>C-アラキドン酸と30分保温後、酸性脂質を抽出し薄層クロマトグラフィのスポット中の放射能の有(+)無(-)をあらわす。

性は強くなくトリプシン処理で活性が失われる<sup>18)</sup>。

すなわち正常細胞ではこの阻害因子がミクロソームでつくられる TX の量を制限しており、肝癌細胞にはこの阻害因子が失われているために PGE<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub>, TX のほか PGI<sub>2</sub> までもホモジェネートで合成され得るものと考えられる。

#### V. 再生肝での TX 合成

前述のように肝のホモジェネートでみると、肝葉切除から15分まで PGE<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub> および TXB<sub>2</sub> の合成が増し、以後は正常値にもどる。その増加率をみると PGE<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub> については軽度であるが、TX の合成増加率はずっと大きい (図3)。PG と TX の生合成増加率が異なることから少くともこれらに共通の合成酵素の脂肪酸シクロオキシゲナーゼ活性が肝葉切除によって増すのではなく、別個の原因によるものと考えられる。実際にミク

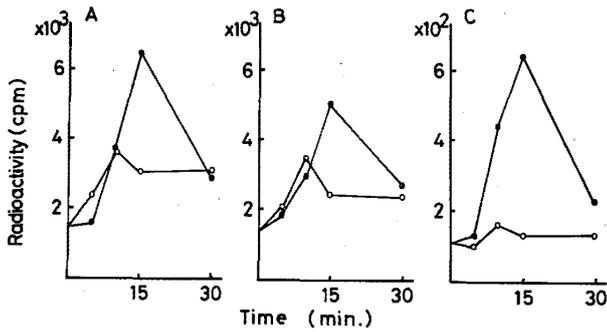


図3. 再生肝初期に於ける PG, TX 合成率の増加  
 A: PGE<sub>2</sub> B: PGF<sub>2α</sub>  
 C: TXB<sub>2</sub>

ロソーム分画だけの PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, TXB<sub>2</sub> の合成率を正常肝と再生肝とでくらべてみると相互の間に大差はない。

そこで上清分画の阻害因子の活性が再生時に減少するか否かをしらべてみた。すなわち正常肝ミクロソーム分画に正常肝上清あるいは再生15分後の上清を加えて阻害因子の活性度をくらべてみると、正常肝上清は TX 合成の阻害が著しいが、再生肝上清にはこの作用がほとんどない。

すなわち阻害因子の活性は肝の部分切除後の15分ほどの間に一時的に著しく低くなるのが明らかになった。このことが再生肝での TX 合成を可能にしているのである。

VI. 肝再生に PDGF の協同作用

それでは TX だけが再生のきっかけとなるのであろうか。これについては私達は灌流肝の実験から血小板由来の増殖因子(Platelet-derived growth factor, PDGF)が TX と共存してはじめて DNA 合成がおこることを証明した。すなわち私達は灌流実験の最初の頃はコウシ血清80%フルオロカーボン(酸素供与体)20%の組成をもつ灌流液を使用していたが、千葉血清の特定ロット以外のコウシ血清は DNA 合成をおこさないことに気付いた。そこで DNA 合成をひきおこす血清中の有効成分を探索するうちに PDGF にたどりついたのである<sup>18)</sup>。

PDGF は細胞周期の G<sub>0</sub> 期にある 静止細胞が G<sub>1</sub> 期に移行する際に必要な因子である。また最近では PDGF は細胞膜の磷脂質を分解するフォスホリパーゼ A<sub>2</sub> の活性化因子である<sup>19)</sup>ともいわれている。フォスホリパーゼ A<sub>2</sub> はふだんは不活性であるが、トロンビン、キニンおよび PDGF に富む血清(血液凝固をおこした後の

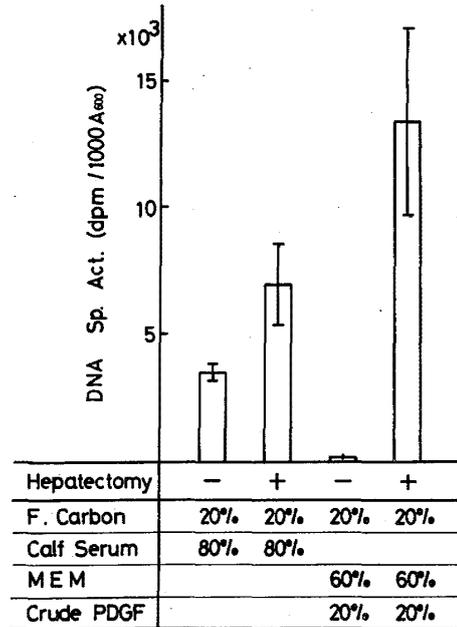


図4. 灌流再生肝の DNA 合成に対する PDGF の効果  
 F. Carbon はフルオロカーボン(ミドリ十字)懸濁液

血清)が細胞膜に接触すると急に活性化して磷脂質を分解し、アラキドン酸を遊離する。このアラキドン酸は脂肪酸シクロオキシゲナーゼの基質となって、PG, TX 等の生産がみられることになるのである。

私達は PDGF をヒトの血漿からなかば精製し、これを20%、MEMを60%、フルオロカーボン20%の灌流液を用いた。この PDGF を含んだ灌流液を用いても、肝切除をしないと DNA 合成はほとんどみられなかった(図4)。このことは PDGF がフォスホリパーゼ A<sub>2</sub> を活性化しアラキドン酸を遊離してもそのままでは肝上清の TX 合成阻害因子があるため TX の生合成にはつながらない。しかしながら肝葉切除によって TX 合成阻害因子が減少してはじめて TX が合成されると解釈される。したがって PDGF の役割がアラキドン酸の遊離にあり、PG, TX の前駆体の供給がよくなってもそれだけでは TX は合成されないで、DNA 合成はおこらない。やはり肝葉切除があつてはじめて TX 合成阻害がなくなり DNA 合成をひきおこすのである。

VII. 結 論

私達は以前、肝葉切除の影響はフォスホリパーゼ A<sub>2</sub> の活性化にあると考えた。ところがフォスホリパーゼ A<sub>2</sub> の活性化は PDGF によるものとするれば、肝葉切除による刺激は TX 合成阻害因子の活性低下と考えざるを得ない。しかもこの活性低下は肝葉切除直後のわ

ずかに15分間におきてくるので gene expression によるものとは考えにくい。リゾソーム中の特異な蛋白分解酵素の活性化が考えやすいがまだ実証されていない。ともかく肝細胞の損傷によって TX の合成が増してくるという現象しか現在のところとらえられていないのである。

TX 合成阻害因子の本態は現在のところまだ充分明らかにされていないが、易熱性で透析バッグ中に残りトリプシン処理で活性を失なう点から蛋白質であると考えられる。この蛋白質が肝細胞の損傷に伴って一時的に活性を失うと TX が生じ、これが、肝再生のキッカケとなると考えられる。肝以外の組織もこの因子が存在するのかどうかはまだしらべられていない。これがわかるとなぜ肝では再生がみられ、切断後の四肢など他の組織ではみられないかを説明することができよう。

### SUMMARY

Many authors postulated that humoral factors such as insulin, glucagon and biliverdin etc. are triggers for liver regeneration after partial hepatectomy. The authors, however, found that extrahepatic substances were not always necessary for liver regeneration using isolated perfused liver system except platelet-derived growth factor in the perfusion liquid. Normal liver microsomes were able to synthesize prostaglandin (PG)E<sub>2</sub>, F<sub>2α</sub> and thromboxane (TX)B<sub>2</sub> from arachidonic acid. As the cytosol fraction contained an inhibitor of TX biosynthesis, apparently, normal liver produced only PGE<sub>2</sub> and F<sub>2α</sub>. However, during the initial 15 min after partial hepatectomy, the inhibitory activity of TX synthesis temporarily disappeared and regenerating liver was able to synthesize TX. An addition of imidazole, specific inhibitor of TX biosynthesis, into the perfusion liquid, suppressed DNA synthesis after partial hepatectomy. Thus, TX seems to be a trigger substance for liver regeneration.

### 文 献

- 1) von Meister, V.: *Rekreation des Lebergewebes nach abtragung ganzer leberlappen. Beiträge zur Pathologischen Anatomie und zur Allgemeinen Pathologie*, Ziegler, E (Ed.) Gustav Fischer, Stuttgart 1894.
- 2) Bucher, N. L. R. and Swaffield, M. N.: Regulation of hepatic regeneration in rats by synergistic action of insulin and glucagon. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **72**, 1157-1160, 1975.
- 3) Bucher, N. L. R. and Swaffield, M. N.: Synergistic action of glucagon and insulin in regulation of hepatic regeneration. *Adv. Enz. Regul.* **13**, 281-293, 1975.
- 4) Fisher, B., Szuch, P., Levine, M. and Fisher, E. R.: A portal blood factor as the humoral agent in liver regeneration. *Science* **171**, 575-577, 1971.
- 5) 菅原克彦, 三谷進: 肝再生時の肝臓相関に関する基礎的研究, *日外会誌*, **78**, 989-993, 1977.
- 6) Okazaki, K., Nishimura, H., Arizono, H., Nishimura, N. and Suzuki, Y.: Biliverdin initiates the liver regeneration in the rat. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **81**, 512-520, 1978.
- 7) Onda, H.: α<sub>1</sub>-acid glycoprotein and α<sub>1</sub>-antitrypsin as mitotic inhibitors in regenerating rat liver. *GANN.* **68**, 301-306, 1977.
- 8) Miura, Y., Fukui, N., Kanzaki, Y. and Mahmud, I.: Induction of ornithine decarboxylase and DNA synthesis in isolated perfused liver after partial hepatectomy. *Advances in Enzyme Regulation* **16**, 195-203 Weber, G. (Ed.) Pergamon Press, Oxford 1978.
- 9) Miura, Y., Iwai, H., Sakata, R., Ohtsuka, H., Ezura, E., Kubota, K. and Fukui, N.: Involvement of cyclic GMP in the initial stage of hepatocytes proliferation. *J. Biochem.* **80**, 291-297, 1976.
- 10) Fukui, N., Fujita, A., Ohtsuka, H. and Miura, Y.: Induction of tyrosine aminotransferase and ornithine decarboxylase in isolated perfused regenerating rat liver, *J. Biochem.* **75**, 867-873, 1974.
- 11) Fukui, N.: Factors regulating thymidine kinase in regenerating liver. *J. Biochem.* **69**, 1075-1082, 1971.
- 12) Ebina, Y., Iwai, H., Fukui, N., Ohtsuka,

- H. and Miura, Y.: Prereplicative enzymatic changes in regenerating rat liver. *J. Biochem.* **77**, 641-645, 1975.
- 13) Miura, Y. and Fukui, N.: Prostaglandins as possible trigger for liver regeneration after partial hepatectomy. *Cellular & Molecular Biol.* **75**, 179-184, 1979.
- 14) Karimi-Tari, F., Mahmud, I., Fukui, N. and Miura, Y.: Induction of ornithine decarboxylase and DNA synthesis after liver injury. *Cellular & Molecular Biol.* **26**, 647-652, 1980.
- 15) Mahmud, I., Fukui, N. and Miura, Y.: Arachidonic acid metabolism in normal and regenerating liver and hepatoma. *Adv. Enz. Regul.* **18**, 27-37, 1980.
- 16) Kanzaki, Y., Mahmud, I., Asanagi, M., Fukui, N. and Miura, Y.: Thromboxane as possible trigger for liver regeneration after partial hepatectomy. *Cellular & Molecular Biol.* **25**, 147-152, 1979.
- 17) Miura, Y., Mahmud, I., Karimi-Tari, F., Hiyama, Y. and Fukui, N.: Regulation of the arachidonic acid cascade in normal liver and hepatoma cells. *Adv. Enz. Reg.* 1981. (in press)
- 18) Hiyama, Y., Mahmud, I., Karimi-Tari, F., Fujita, S., Fukui, N. and Miura, Y.: Platelet-derived growth factor and thromboxane are necessary for liver regeneration. *Cell. Mol. Biol.* (in press)
- 19) Shier, W. T.: Serum stimulation of phospholipase A<sub>2</sub> and prostaglandin release in 3T3 cells is associated with platelet-derived growth-promoting activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**, 137-141, 1980.