

---

---

肝再生時に働く生体内トリプレットシステム  
(神経-内分泌-免疫系三者相関)の解明

---

---

課題番号 : 07407030

平成7~9年度 文部省科学研究費補助金  
(基盤研究(A)(2)) 研究成果報告書



平成10年3月

研究代表者 葛西 眞一

(旭川医科大学医学部教授)

## 目次

序	3
研究組織・経費	5
研究発表	6
研究背景（肝再生研究の歴史）	9
分担研究報告	19
1. 中枢神経系と肝再生現象	20
2. HGFと肝再生現象	25
3. HSSと肝再生現象	28
4. NOと肝再生象	31
5. 肝細胞移植からみた肝再生象	34

## 序

肝再生機転に関して、19世紀末に始まり21世紀間近の今日まで約一世紀におよんで、さまざまな研究がおこなわれてきたが、肝再生現象の一部しか解明がなされたにすぎず、その全貌は未だ不明である。その原因のひとつとして、一つの因子は一つの機能だけを持つのではなく、多角的な機能、相互的な機能を有し、さらには各因子が連環し有機的に関連していることが明らかとなってきた事があげられる。例を挙げれば、免疫系の細胞間信号伝達物質として登場したサイトカインが、神経系および内分泌系の細胞にも信号を送り、脳でも産生され、様々の神経-内分泌反応を誘起することが知られるようになり、神経-内分泌-免疫系の情報伝達相関機構が、生体の物質代謝の恒常性を維持するためのより高度な機構として認識されるようになってきた。肝再生現象について神経、内分泌、そして免疫系の個々の分野で、特に肝再生のプロモーターとして内分泌系の方向から盛んに研究されている。しかし、生体の物質代謝の恒常性が肝再生時にも維持されていることを考えると、肝再生に関して神経-内分泌-免疫系の情報伝達相関機構上で解明する研究こそ今、第1に求められている。われわれは、従来、等閑視されてきた神経系の役割を解析検討してきた結果、神経活動が肝再生機構の初期認識、始動に重要な役割を演じていることを推察してきたが、長期の時間経過を必要とする肝再生現象を神経系だけで説明することは不可能と考え、内分泌系と神経系の接点である中枢神経系の働きに注目した。中枢神経系は、様々なホメオスタシス反応の作用部位であり、また、神経ペプチドによる多様な影響も明らかとなった現在、神経系と免疫系の接点を明らかにすることは重要と考えられる。さらにわれわれは、新しい細胞間言語として注目されている一酸化窒素(NO)による肝再生現象にたいする影響、神経ペプチドによる影響などをふまえて、肝再生現象を明らかにできれば、生体の物質代謝の恒常性を維持するための重要な生体システムとして考えられる生体内トリブ

レットシステム（神経-内分泌-免疫系三者相関）の総合的な解明を可能ならしめるものと考え基礎的研究を行った。

## 研究組織

研究代表者： 葛西眞一（旭川医科大学医学部教授）  
研究分担者： 加藤一哉（旭川医科大学医学部講師）  
研究分担者： 河野 透（旭川医科大学医学部助手）  
研究分担者： 紀野修一（旭川医科大学医学部助手）  
研究協力者： 岩元 純（旭川医科大学医学部助教授）  
米田政志（旭川医科大学医学部助手）  
澤 雅之（旭川医科大学医学部助手）  
坂田博美（旭川医科大学大学部助手）

## 研究経費

平成7年度	16、630千円
平成8年度	7、200千円
平成9年度	2、200千円
計	26、030千円

## 研究発表

平成10年

1. Kono T., Miyata M., Yamamoto Y., Kakisaka A., Yachiku S., Kasai S., Pelvic nerve grafts restore bladder function in denervated rats. *Surgery* 1998(in press)
2. Ayabe T., Kono T., Kasai S., Iwamoto J., Kohgo Y., Evaluation of disease activity of ulcerative colitis by urinary nitrite. *Gastroenterology* 1998(in press)
3. Tamori K, Yoneda M, Makino I: Central administration of thyrotropin-releasing hormone analog increases hepatic blood flow in rats. *American Journal of Physiology* 1998(in press).
4. Kono T., S. Kino, J. Iwamoto, Yoneda M, S. Kasai, Hepatic production of inducible nitric oxide synthase in patients with various liver diseases.  
*Liver* 1998 (in press)

平成9年

5. Yoneda M, Yokohama S, et al.: Neuropeptide Y in the dorsal vagal complex stimulates bicarbonate-dependent bile secretion in rats. *Gastroenterology* 112: 1673-1680, 1997.
6. Yoneda M., Kono T., et al.: Central thyrotropin-releasing hormone stimulates hepatic DNA synthesis in rats. *Hepatology*, 26, 1203-1208, 1997
7. Yanagiya N., Yoshida A., Kono T., Iwamoto J.: Transient corneal edema induced by Nitric Oxide Synthase Inhibition, *Nitric Oxide: Biology and Chemistry*, 1(4), 301-307, 1997
8. Kato K., S. Kasai., K. Onodera, M. Sawa, M. Imai, T. Kawahara, M. Mito .  
Effect of hepatocyte growth factor (hHGF) on the proliferation of transplanted hepatocytes in the spleen. *Transplantation Proceedings* 29: 2029-2031, 1997
9. 葛西眞一、加藤一哉、水戸廸郎：肝臓および  
肝細胞移植と肝再生 *実験医学* 15, 2159-2164, 1997

平成8年

10. Kono, T., Iwamoto, J., Y. Yamamoto, Kakisaka, A., Kasai, S., and M. Mito. Nitric Oxide (NO) is released from liver into the abdominal cavity in the acute liver failure animal model.: FASEB J., 10, 705, 1996

11. Kono, T., Iwamoto, J., Yamamoto, Y., Kakisaka, A., Kasai, S. and Mito, M. Intraabdominal Nitric Oxide (NO) production in rats: Measurements in expelled air.: Gastroenterology, 110, 1996

12. Kasai, S., Kono, T., Mito, M. and Iwamoto, J., Inducible nitric oxide synthase (iNOS) like immuno-reactivity in the hepatocytes from various liver diseases.

The Biology of Nitric Oxide Part 5 (Portland), Edited by S. Moncada, 279, 1996

13. Kato K., K. Onodera, M. Sawa, M. Imai, T. Kawahara, S. Kasai, M. Mito

Effect of hepatocyte growth factor on proliferation of intrasplenically transplanted hepatocytes in rats.

Biochemical and Biophysical Research Communications 222: 101-106, 1996

平成7年

14. Yoneda M and Tach Y: Serotonin enhances gastric response to TRH analog in the dorsal vagal complex through 5HT2 receptor in rats. American Journal of Physiology 269: R1-R6, 1995.

15. Yoneda M and Tach Y: Somatostatin analog in the hypothalamus inhibits and in the medulla stimulates gastric acid secretion. British Journal of Pharmacology 116: 2303-2309, 1995.

16. Yoneda M, Tamasawa N, Takebe K, et al.: Central neuropeptide Y enhances biles secretion through vagal and muscarinic but nitric oxide pathways in rats. Peptides 16: 727-732, 1995.

17. Kono, T., Mito, M., Saha, S. K. and Iwamoto, J. : Hepatocytes produce inducible nitric oxide synthase(iNOS) and NADPH diaphorase (NADPH-d) in patients with various liver disease.:

FASEBJ, 9, 679, 1995

18. Kasai, S., Kono, T., Mito, M., and Iwamoto, J. 1995 Inducible nitric oxide synthase (iNOS) like immuno-reactivity in the hepatocytes from various liver diseases.: Endothelium, 3, 1995

19. 肝細胞再生機転研究のあゆみ

水戸 迪郎、河野 透

肝胆膵 30(1), 141-157, 1995

## 研究背景

## 肝再生研究の歴史

正常肝において肝細胞は数万個に一個程度の頻度で核分裂像を示すにすぎないが、外科的切除あるいは薬物、ウイルスなどで傷害されると一転して激しい勢いで分裂を始める。この現象を肝再生とよんでいるが、実際は代償性に増殖するものであり、正確な再生現象ではない。そして、この再生における強い増殖は肝が元の大きさに達すると止まるという点で腫瘍の増殖とは大きく異なる。再生がどうしておこり、どのような仕組みでコントロールされているかについて過去無数の研究が行われてきたが、現在においてもまだ十分な解答を得られてはいない。本章では、その肝細胞再生機転研究の歴史について鳥瞰してみたい。

人類が肝再生現象を認識しそれを最初に記録した事象は、ギリシャ神話のなかで肝臓を鳥に食されながら生き長らえたプロメテウスの神話に始まる。この神秘的な肝再生現象を科学的に観察し解析したのは1894年のvon Meisterが肝部分切除後に肝組織の修復増殖が生ずることを定量的に観察し報告したことに始まるが、定量的でしかも反復し再現性のある肝再生現象が研究できるまでに、それから40年近い1931年のHiggins and Andersonのラットの肝部分切除の実験報告まで待つことになる。その後、肝再生現象の研究は飛躍的な発展を遂げることになる。

### I 血流因子から体液性因子解析の歴史

#### 1) 血流因子

二十世紀初頭における肝再生現象研究の主眼は、肝臓に動脈系と門脈系の血流が流入し、個々の肝細胞が生存と機能を営む肝臓の二重血行支配の特殊性に着目し門脈血流そのものにおかれていた。1920年、Rousらは、一側の門脈を結紮すると当該領域の肝葉は萎縮し、非結紮側は代償性に肥大することによって、実験犬は肝不全症状が起らないとした。この実験結果は、門脈血流の欠損が肝萎縮を惹起すると、homeostaticな現象で肝再生をとらえた点で注目される。さらに、1931年にMannらは、門脈血が直接肝に流入しない門脈下大静脈吻合したEck瘻犬に肝部分切除を行うと、残存肝重量がほとんど増加しないことから、肝再生には、血流量の維持が決定因子であること、また門脈血そのものが重要であることを示唆した。

その後、1953年、Childらは門脈血と肝再生の関係を検索するために門脈下大静脈交叉吻合モデルを導入し、門脈に元来の門脈血とほぼ同量の下大静脈血を流入させて量的因子を一定にし肝部分切除を行った。その結果、急速に肝再生が起ることを認め、肝再

生における流量因子説を決定づけた。さらに翌年、Fisherらは、門脈血に換えて動脈血を流入させ、肝流入血流量を維持するならば肝部分切除後の肝再生が旺盛に起こることを示した。これらの実験結果により1960年後半までは、肝再生因子としての肝血流量の重要性 (vascular theory) は支配的であった。

## 2) 体液性因子—門脈因子の同定

現在ではやや古典的概念とされる血流因子説に挑戦し、体液性因子説の導入に道を開いたのは、1955年のWeinbrenの実験である。彼らは残存肝におけるmitosisを初めて肝再生の指標として検討した結果、ラットの肝部分切除後、残存肝に門脈血流が欠如しても、再生現象が正常肝部分切除と同様に起こることと、門脈動脈化は肝のmitosisには何ら影響を及ぼすものではないことを報告した。さらに1968年、Clarkeらによって肝流入血流量の増加によって細胞分裂の増加が起こらないことが指摘された。ただし、Clarkeらのモデルでは、正常肝に対する血流の増加による細胞増殖の影響がないことを前提としていた。1964年にBucher、67年にMooltenらによって肝部分切除を受けたラットと正常ラットの間で交叉循環を行うと、交叉を受けた正常ラットの肝臓において肝細胞の増殖が認められることが報告され、1964年にLeong、Visolainenらによって異所性に自家移植された肝臓において肝細胞の増殖が起こることなど、次々と肝切除後の血中に肝再生を促進させる物質の存在を強く示唆する実験結果が報告され、いわゆる体液性因子説が肝再生機序究明の主流となった。これを契機にして肝血流は細胞分裂を促進させる物質の運搬に参与するにすぎないとされ、血流因子は肝再生現象解明の主役の座から降板させられる結果となった。

1973年Starzlらによって門脈血中のhepatotrophic substanceの存在が大きくクローズアップされた。すでに、Marchioroらは移植肝を異所性に移植する実験から門脈血中のhepatotrophic substanceの存在を指摘していたが、移植による拒絶反応が起こることが問題であった。Starzl、Lee、Fisherらは問題点解決のため同系ラットの異所性肝移植実験を行い、またPrice、Bucherらは主に門脈域臓器切除モデルで門脈血中のhepatotrophic substanceを究明しようとした。これら多彩な実験方法を駆使した動物実験の結果、特に膵ホルモンの重要性が認識されるに至った。

Starzlらはさらに部分的門脈下大静脈交叉吻合モデルを導入し、同一動物の肝葉の左右の変化を対比することにより流入血の質的因子を検討し、門脈血中に膵起源とするhepatotrophic factorの存在を、さらにはsplanchnic diversionモデルによってインシュリンが肝細胞の増殖と大きさを制御する主なhepatotrophic factorであることを示唆し、同時にそ

の実験結果から脾因子以外の因子として小腸因子の存在も強く示唆した。このモデルで論理的かつ明解にhepatotrophic factorを提示した感があったが、左右両葉が独立した代謝の場を持つことを前提としているため、一個体のhomeostasis下にある肝両葉の競合現象を無視した点が、かれらの実験結果の解釈で大きな問題点であった。

### 3) 体液性因子—HGF解明

われわれが1976年に開発した脾臓内肝細胞移植モデルでの検討で、脾臓内に直接注入された遊離肝細胞は増殖し組織の再構築を営むことより、肝細胞の増殖には門脈血の直接的な流入を必要条件としないことを明示し、インシュリン以外の因子が存在することを示唆した。また、肝細胞を遊離しての細胞培養実験がBissellらによって確立されてから数多くの肝細胞再生効果因子（ホルモンやgrowth factor）が効率よく同定され、登場してきた。現在まで少なくとも22種類の肝細胞再生効果因子が同定あるいは確認されている。しかもそのうち半分は1980年以降に加えられたものである。ホルモンでは前述にあるようにインシュリンの肝細胞増殖作用は明らかであるが、グルカゴンに関しては肝細胞の代謝状態によってその効果も大きく変化することが知られている。両ホルモンが協調して働くことによってラット肝部分切除後の肝細胞増殖が進むことはBucher、deDiego、Takatukiらによって報告されているが、正常ラットの肝細胞のDNA合成を誘発する事はないことも報告されている。しかし、EGFを併用すると条件によっては核酸代謝を誘発したり抑制したりすることが明示された。このようにそれ自身では肝細胞の核酸代謝を促進できないhepatotrophic factorsはCo-mitogenとよばれ、その他ではNorepinephrine、Vasopressin、Angiotensin IIなどがその仲間である。

1980年代後半になって劇症肝炎患者やラット肝再生時血清に血小板から未知の肝再生因子を発見することが精力的に行われ、1986年、88年ついにNakamura、Gohda、TubouchiらによってヒトHGFが初めて単離精製され、その後89年にMiyazawaらによってc-DNAのクローニングが成された。HGFの存在の可能性はすでに1960年代から指摘されていたがその全一次構造解明までには20年近くの年月を要した。HGFは肝細胞を無血清培地下で増殖させる作用を有するcomplete-mitogenで、ラットにおいて肝部分切除後1時間以内にHGFは15倍に上昇することから、MichalopoulosらはHGFが肝再生における引き金因子としての可能性、さらに同時に上昇するNorepinephrineがHGFのCo-mitogenである可能性を指摘した。FujiwaraらもHGF投与により正常肝での細胞増殖が誘発されることより引き金因子としての可能性を示唆した。

最近、Shiotaらは、HGF遺伝子を組み込んだtransgenic mouseに肝部分切除を行ったとこ

ろ、肝DNA量の回復に要する時間が短縮することを観察し、HGFが調節因子として肝再生を促進する可能性を示唆した。肝再生におけるHGFの作用機構について、肝傷害の種類によって肝再生がパラクリン機構つまり非実質細胞から周辺の再生肝細胞へ供給される機構に依存する場合と、エンドクリン機構つまり肝部分切除後にみられる血中HGFが肺や脾臓などの遠隔臓器から分泌され、再生肝細胞へ供給される機構に依存する場合の二つの異なった機構を有していることが指摘され、サイトカインの作用機構の複雑性が示唆された。

その他のcomplete-mitogenではEGF、TGF- $\alpha$ などがあり増殖抑制因子としてはTGF- $\beta$ やActivin Aなどがあげられる。EGFはインスリンと同じように肝細胞増殖因子として注目されていたが、肝再生時に体内で増加しないことが判明し、その重要性が疑問視された。それに比べてEGFと同じ受容体を持つTGF- $\alpha$ は肝再生時にDNA合成時期に一致して体内で増加することより、肝再生にとってより重要な因子である可能性が1989年、Faustoらによって示唆された。

一方、1985年、NakamuraらによってTGF- $\beta$ が培養肝細胞のDNA合成を抑制することが報告されて以来、肝細胞増殖抑制因子として注目されている、しかし、肝切後のTGF- $\beta$ 産生は肝再生初期にすでに発現しており、未だに肝再生の停止因子として多くの解決すべき問題点を抱えている。さらにTGF- $\beta$ の仲間であるActivin Aもオートクリン増殖抑制因子である可能性がTGF- $\beta$ 同様検討されているが、そのm-RNAの発現時期が増殖期に一致していることは、肝再生の停止因子として解決すべき問題点である。最近、Oberhammer、SchwallらによってTGF- $\beta$ 、Activin A両者による肝細胞のapoptosisが報告され肝再生の停止因子として注目されている。

## II. 神経性因子解析の歴史

肝再生現象を考える上で神経因子の重要性は疑いのないところである。しかし、従来肝血流調節因子としての役割つまり交感神経系ばかり重要視され、迷走神経を中心とした副交感神経系の役割については他の体液性因子の研究に比べて大きく立ち後れていた。

1960年代から70年代にかけて神経細胞、神経線維、神経伝達物質および神経終末の同定手段が格段に進歩し、肝臓内の神経支配の研究は大きく前進し、特に交感神経系が肝血管壁に密に分布し、肝血流調節を行っていることが明らかとなった。1968年、Makinoらは、肝動脈周囲神経切除によって肝血流量は増加するが、肝再生への影響は極めて軽微であると報告した。

一方、肝再生現象における副交感神経系の関与についての最初の報告は1963年、沖

中らによる、腹部迷走神経切除によって肝部分切除後の肝再生率が低下したというものである。このことは、肝実質に分布する副交感神経系が肝再生機構に重要な役割を担っている可能性を示唆した。1968年にBiliottiも同様に、迷走神経切除によって肝切後3日目の再生肝重量が低下したと報告した。DNA合成に関してもLamar、Shimazuらによって迷走神経切除によって、残存肝細胞のDNA合成亢進の開始の遅延とピーク値の抑制が起こることが報告され、生理的な場における肝再生には体液性因子に劣らず神経性因子、特に迷走神経が重要な調節作用を営んでおり、その解析の必要性を説いた。しかし、これらの迷走神経切断実験のほとんどが横隔膜直下での迷走神経本幹切断実験であり、肝臓だけでなく膵臓など重要な体液性因子を分泌する腹部臓器にたいする迷走神経支配も同時に遮断されることになり、肝再生現象における神経性因子の役割が直接的なのか、間接的なのかを論ずるには中枢を含めたより緻密な実験が必要であると考えられた。

1987年、Tanakaらは、迷走神経肝臓枝を選択的に切断し肝部分切除を行った。その結果、残存肝におけるDNA合成は抑制されず、その時間経過において遅れるのみであり、肝重量の回復も抑制されないと報告した。われわれは、flow cytometry法を用いて同様の実験を行ったところ、肝切後のDNA合成の時間経過が迷走神経肝臓枝を切断すると、初期の段階から約3時間遅れるがピーク値の抑制は起こらないことを明らかにした。さらに、肝実質細胞の染色体構造が迷走神経により維持されていることも示唆した。これらの結果から、迷走神経が直接的に肝実質細胞に働き、その増殖過程が協調的に進行するように制御する役割をもつことが推定された。しかし、培養肝細胞の増殖、臨床での部分肝移植時の再生など、神経系非存在下でも肝再生が起こることは、神経系の肝再生機構における役割が一義的でないことを考えさせる。

次に、肝再生時における中枢神経系の反応動態に着目し、迷走神経肝臓枝の起始細胞が存在する延髄迷走神経背側核内の神経活動を電気生理学的に解析を試みた結果、肝部分切除量に応じて神経活動が肝切直後から急激に活発化し、DNA合成が開始される前に終了することを観察した。この神経活動が迷走神経肝臓枝切断ラットでは認められなかったことから、肝切直後の求心性情報、つまり肝再生現象の初期認識やDNA合成開始指令に関与することを推定した。さらに、視床下部におけるmicrodialysis法による肝切除後の神経伝達物質の変動を測定した結果、視床下部外側野でのセロトニン遊離が亢進し、迷走神経肝臓枝切断ラットでは亢進が認められなかった。これらの一連の実験結果から、視床下部一下垂体系という内分泌系の中核と、迷走神経肝臓枝—延髄—視床下部という肝再生現象における神経性因子の両者の視床下部における接点を見いだす結果となった。しかし、後述する各種肝再生因子（免疫系因子、細胞膜性因子、細胞外マトリックス、そしてサイ

トカイン関連因子等)との連環については、その研究の膨大さからか遅々として進んでいないのが現状である。

### III.免疫性因子解析の歴史

肝再生現象における免疫系の関与に関する研究はそれほど多くない。1931年、Higgins、58年、Perez-Tamayoらによって肝部分切除時に同時に脾臓摘出をおこなったラットでは肝再生が促進することを観察した。脾臓を移植するとその差が認められなくなり、しかも異所性に移植しても同様の結果であったことから、かれらは脾臓そのものに肝再生に影響を及ぼす因子が存在することを推定した。さらに、1964年、Craddockらがリンパ系臓器である脾臓、胸腺、リンパ節などの細胞におけるチミジンの取り込み量が肝部分切除後、増加することから免疫系が肝再生時に特異的に活性化されることを報告した。1975年、Sakaiらによってこのような肝部分切除後に起こる免疫系賦活が、肝切除後8時間経過した血清中の何らかの物質によって起こることを報告したが、1980年、DesserWiestらは、肝切除後18時間から4日までの血清中には胸腺細胞のDNA合成抑制物質が存在するという結果を報告した。しかし、肝切除後の免疫系に変化を及ぼす非特異的活性因子がどこで産生されるのか全く明らかになっていない。

1979年、Sakaiらは再生肝細胞が細胞培養実験上、同系ラットのリンパ節細胞に免疫応答を惹起させることを示唆し、続いて、1983年、Miyaharaらによって肝切除後に起こる肝再生過程におけるリンパ細胞の活性化が記憶と特異性をもつ免疫応答であり、その抑制活性はB細胞ではなくT細胞とマクロファージの2種類の細胞群によって担われることを示した。

一方、局所における免疫系の担い手である肝内のリンパ球、常在性マクロファージであるクッパー細胞の動向に着目した研究が進められ、1983年、Kanedaらによって肝類洞に存在するpit細胞が末梢血中のlarge granular lymphocyteと同一の細胞で、natural killer

(NK)細胞であることを報告し、1990年、Shinyaらによってラット肝部分切除後2週間後にpit細胞数がピークに達することが報告された。マウスにおいても88年、Itohらによって肝切除後、3週間以降にpit細胞数がピークに達することが報告された。また、同時に再生肝細胞に対して傷害活性を有する細胞はNK細胞であることを示した。これらの実験結果から肝再生の停止機構が働いていると考えられる時期に一致して増加するNK細胞、つまりpit細胞が肝再生の停止機構に関与している可能性が提示された。

pit細胞以外のリンパ球として胸腺外分化T細胞があるが、1992年、Aboらによって肝類洞が胸腺外分化T細胞発現の重要な場であることが報告され、彼らの最近の研究でマ

ウス肝部分切除後、胸腺内単核球の減少と同時に胸腺外分化T細胞の増加を認めたことから、胸腺外分化T細胞が再生肝細胞を認識し肝再生の停止機構に関与していることが示唆された。1993年、Ohnishi、Mutohらは広汎性肝壊死モデルにより肝壊死後の肝再生において脾臓内NK細胞による再生肝細胞に対する傷害活性を報告し、さらに劇症肝炎臨床例での検討結果からNK細胞ならびに胸腺外分化T細胞が肝再生を抑制している可能性を臨床的検討から示唆し、免疫性因子が肝再生現象の中で終止に特異的に関連している可能性を指摘した。

クッパー細胞については、Shinyaらによって肝再生過程において特異的にNK細胞とクッパー細胞の膠着率が増大することが報告され、活性化されたクッパー細胞により種々のサイトカインによりNK細胞は活性化され、再生肝細胞におけるHLAclassI抗原量の低下を認識し、再生肝細胞に抑制をかける可能性が指摘された。しかし、どのような仕組みで肝細胞自身が十分再生したと判断しHLAclassI抗原量を低下させ、再生を抑制させるのか、さらに、非実質細胞であるクッパー細胞がどのように、対象となる再生肝細胞が十分再生したと認識するのか全く分かっていない。これらの点に関する解明が今後早急に進むことが望まれる。

#### IV.肝細胞膜因子解析の歴史

肝細胞増殖に関与する因子は直接的であれ間接的であれ、前述のように多数の因子が複雑に絡み合っているが、肝細胞膜自身、または肝細胞間の変化に着目した研究が進められている。肝再生過程における細胞間接着装置の変化についての最初の研究は、1979年のYancey、Metzらによるgap junction (GJ) が肝再生直後から急激に減少するとする報告である。その後、MoriらによってGJに対する抗体が開発され、さらにtight junction (TJ) に対する抗体が開発され、GJ、TJが肝細胞再生時に特異的に変化することが報告されたが、その現象の生理的な意義については十分証明されていない。

その他、細胞間関連因子として細胞膜に存在するタンパクである細胞接着分子があげられるが、再生肝における細胞接着分子の変動について、E cadherinのmRNAが著明に減少する報告などがあるが、肝再生に関する研究は少なく、不明な点が多い。いずれにしても再生開始時に肝細胞の細胞接着が変化することは確かであるが、各種増殖因子に対する応答を獲得するためなのか、または、応答した結果なのか全く不明である。

また、肝細胞周囲に存在する細胞外マトリックスと肝細胞増殖との関連では1984年、Enatらが肝部分切除後の残存再生肝から抽出したbiomatrixが肝細胞の増殖促進効果を報告したのが最初である。その成分の検討では、フィブロネクチンが最も増殖促進効果が

強かったことがTomomuraらによって培養系実験で報告された。しかし、ラットでの生体系実験では、肝再生24時間後での細胞外マトリックスのなかで特異的に増加しているのはフィブロネクチンではなく、ラミニンであったということは今後の解決すべき問題点である。

肝細胞自身、特に肝細胞膜そのものについて1990年にHirataらによって、正常肝細胞膜自身に肝細胞増殖因子に対する反応性を高める過程を抑制する働きがあることが報告された。さらにHirataらは、これとは反対の作用を有するcomitogenタンパクが再生肝細胞膜に発現されていることを報告し、肝細胞膜そのものによる肝再生調節機構の存在を示唆し、今後の研究、特にhomeostasisの維持という観点から、どのように肝細胞膜自身が、神経、内分泌系などに関連していくのかその解明が期待される。

## V.肝細胞内遺伝子発現因子解析の歴史

1980年代に入り癌遺伝子が次々と発見され、それに従い肝再生時においても各種特異的な遺伝子が発現していることが報告され、肝再生現象における役割について盛んに研究が進められている。核内癌遺伝子であるc-fos、c-mycが肝切直後から急激に増大することを1984年、Makino、86年、Thompson、Kruijerらによってラットとマウスで報告されたのを機会にその他の核内癌遺伝子であるjunについても1990年、Mohn、Alcornらによって肝切直後から急激に増大することが報告されたが、その意義については解明されていない。

受容体型の仲間ではEGFだけでなくTGF- $\alpha$ 受容体であるEGF受容体をコードしているc-erbBが、肝再生時に重要な働きをしている可能性が指摘され、その解析から、最近EGF/TGF- $\alpha$ 系がG0/G1期だけでなくG1/S期にも重要な系であることが判明した。

また、HGFの受容体であることが判明したc-metの肝切後の変動を解析した実験結果が相次いで報告された。その結果、HGF受容体とEGF受容体ではシグナル伝達系が同一でないことが推定された。

癌遺伝子を中心にして肝再生直後から経時的にまた複雑に変化していることが各種実験で明らかとなってきたが、EGF、TGF- $\alpha$ 、HGFなどの肝再生増殖因子との関連そして相互の連環について今後の解明が期待される。そこで、現在までに明らかとなっている肝細胞増殖因子の細胞内伝達機構を考えると、複数のCo-mitogenとComplete-mitogenが協調し時間的、空間的に複数の作用点に働いていることが分かる。しかし、前述の免疫系を加えた三者連環機構とがどのように結びついていくのかは今後の大きな課題であると考えられる。

## 分 担 研 究 報 告

# 1. 中枢神経系と肝再生現象

## 1) 自律神経系における複数臓器同時支配神経細胞の存在

### 【目的】

肝内における血糖値センサーの存在、肝再生促進因子として働くといわれる膵ホルモン（インスリン、グルカゴン）等、肝膵が互いに生理機能的に極めて密接に関連していると考えられているが、肝再生時における肝膵相関の調節因子のひとつとしての自律神経系の役割を神経解剖学的、電気生理学的に解明を試みることで、病態生理学的な観点からの肝再生時における合目的な複数臓器相関機構解明を意図した。

### 【方法】

実験モデルとして、正常ラット（Wistar）、自然発症型糖尿病ラット（BBWistar）を使用。各ラットの迷走神経肝臓枝と膵臓枝に神経細胞標識物質であるTrue blue(TB)とDiamidino yellow(DY)を別々に取り込ませ、延髄迷走神経背側核、疑核及び頸神経節内におけるTB、DY染色神経細胞の分布を蛍光顕微鏡下に比較検討した。同時に、二重免疫組織化学染色法を利用してTB、DY二重染色神経細胞つまり肝膵同時支配神経細胞の神経伝達物質及び神経ペプチドを同定した。肝膵同時支配神経細胞を電気生理学的に同定し、その神経活動を経時的に導出記録し、各種肝、膵疾患モデルや肝再生モデルにおいて正常ラットと比較検討した。

### 【成績】

正常ラットの迷走神経肝臓枝と膵臓枝に二種類の神経細胞標識物質TB、DYを別々に取り込ませた場合、延髄の二つの迷走神経運動核（背側核と疑核）および頸神経節（感覚系）において多数のTB、DY二重染色神経細胞が観察された。とくに疑核においては約50%が二重染色神経細胞であった。糖尿病ラットでは、背側核内の二重染色神経細胞の数の変化はなかったが、疑核においては10%以下に減少していた。また、感覚系である頸神経節でも約40%近くあった二重染色神経細胞が10%以下に激減していた。同時に行った二重免疫組織化学によって、これらTB、DY二重染色神経細胞は、substance P, neuropeptide Y, calcitonin gene related peptideなど多数の神経ペプチドを含有していた。しかも、肝内に同じ神経ペプチド含有繊維が多数認められた。

### 【結論】

ラットの迷走神経肝臓枝と膵臓枝に二種類の神経細胞標識物質を別々に取り込ませたところ、延髄の二つの迷走神経運動核および頸神経節（感覚系）において多数の二重染色神経細胞が観察され、他の中枢神経系と同様に、自律神経系においても、Axon collateral（肝膵同時支配神経細胞）が存在し、肝膵臓器相関の担い手となる可能性が強く示唆された。

さらに、臓器相関を理解するうえで、自律神経系の役割が重要視されながらも解明が遅れていた。今回発見した肝膵同時支配神経細胞は、各種肝、膵疾患モデルにおいて変化することが明かとなり、臨床的に極めて重要な肝再生機序が複数臓器相関から成り立っている現象であるという新しい視点の妥当性を示した。

## 2) 自律神経系による複数臓器同時支配の肝再生機構への関与の検討

### 【目的】

われわれは、正常ラットにおける神経解剖学的実験結果から、副交感神経系による肝膵臓器同時支配神経系が存在すること、また自然発症型糖尿病ラットにおいては、その肝膵臓器同時支配神経系の破格つまり、門脈における感覚神経系（脈圧、血糖値センサーの存在等）と膵臓に分布する運動神経系（肝再生促進因子であるインスリン分泌等）が特異的に減少していることを報告した。今回、肝再生時における調節因子のひとつとしての自律神経系の肝膵およびそれ以外の複数臓器同時支配神経系の解明を進めることで、肝再生時における合目的な複数臓器相関機構解明を意図した。

### 【方法】

実験モデルとして、正常ラット（Wistar）、自然発症型糖尿病ラット（BBWistar）を使用。各ラットの迷走神経肝臓枝と小腸枝、大腸枝、膵臓枝または腎臓枝に神経細胞標識物質であるTrue blue(TB)とDiamidino yellow(DY)を別々に取り込ませ、延髄迷走神経背側核、疑核及び節神経節内におけるTB、DY染色神経細胞の分布を蛍光顕微鏡下に比較検討した。同時に、二重免疫組織化学染色法を利用してTB、DY二重染色神経細胞の神経伝達物質及び神経ペプチドを同定した。70%肝切肝再生モデルにおいて肝再生状況をBrdU摂取率で正常ラットと自然発症型糖尿病ラットの間で比較検討した。

### 【成績】

正常ラットの迷走神経肝臓枝と小腸枝、大腸枝、脾臓枝または腎臓枝に二種類の神経細胞標識物質TB、DYを別々に取り込ませた場合、延髄の二つの迷走神経運動核（背側核と疑核）および節神経節（感覚系）において多数のTB、DY二重染色神経細胞が観察された。糖尿病ラットでは二重染色神経細胞数が減少していた。また、感覚系である節神経節でも二重染色神経細胞が減少していた。同時に行った二重免疫組織化学によって、これらTB、DY二重染色神経細胞は、substance P, neuropeptide Y、calcitonin gene related peptide など多数の神経ペプチドを含有していた。70%肝切モデルにおける肝切 24 時間後のBrdU摂取率は正常ラットの半分以下であった。

### 【結論】

ラットの自律神経系において肝臓と他臓器との間に同時支配神経系が存在し、肝再生時における複数臓器相関の担い手となる可能性が示唆された。また、同時支配神経系の解剖学的破格がある自然発症型糖尿病ラットにおいて肝再生が抑制されたことは、肝再生機構における自律神経系による複数臓器同時支配神経系の役割を解明するという新しい視点への研究方向の妥当性を示した。

## 3) 中枢性Thyrotropine-Releasing Hormone (TRH) の肝増殖に及ぼす影響についての検討

### 【目的】

古典的神経伝達物質であるアセチルコリンやアドレナリンに加え、近年、新しい神経伝達物質あるいは神経修飾物質として、神経ペプチドが注目されている。種々の神経ペプチドが、脳内において神経伝達物質として作用し、自律神経系経由で呼吸・循環系および消化管における生理機能の調節や病態に重要な役割を果たしていることが、明らかにされている。なかでも、内分泌ホルモンとして視床下部で同定されたThyrotropine-Releasing Hormone (TRH)は、延髄の迷走神経運動核にて神経伝達物質として働き、胃生理機能に対して促進的に作用することが知られている。一方、肝臓も自律神経が密に分布しており、更に肝再生において自律神経系が不可欠であることが明らかにされているが、神経ペプチドによる肝生理機能の中枢性作用については、何も明らかにされていない。そこで今回、我々は中枢性TRHの肝増殖に対する作用について検討した。

### 【方法】

肝増殖は、<sup>3</sup>H-thymidine肝DNAへの取り込みによって検討した。ウイスター系雄性ラット(200 - 220 g)をエーテル麻酔下で定位脳手術装置に固定の上、TRH安定型アナログのRX77368 (1 - 100 ng) およびコントロールとして生理食塩水を脳槽内に投与し、6 - 72時間後に<sup>3</sup>H-thymidin(20 uCi/100 g)を腹腔内投与して、更に2時間後に屠殺して肝臓を取り出した。肝をホモジュネートした後、<sup>3</sup>H-thymidine肝DNAへの取り込みはSchneiderの方法に従って検討した。コリン作働性神経遮断剤であるアトロピン (0.15 mg/kg, ip, 15分前)、プロスタグランジン合成阻害剤であるインドメサシン (5 mg/kg, ip, 30分前) およびNitric Oxide合成阻害剤であるNG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10 mg/kg, iv, 15分前) の前投与あるいは迷走神経肝臓枝切断術を施し、中枢性TRHの肝増殖に対する効果への作用機序の検討も行った。

### 【成績】

TRH(10 ng)の脳槽内投与により、24時間にピークを持つ<sup>3</sup>H-thymidineの肝DNAへの取り込みが認められた(Mean +/- SEM; cpm/mg DNA: 0時間 92 +/- 6; 6時間 131 +/- 11; 12時間 195 +/- 42; 24時間 693 +/- 78; 72時間 120 +/- 27 ; n=5-8)。中枢性TRHの肝増殖作用は、1 - 10 ngで容量依存性であった。(Mean +/- SE: cpm/mg DNA: 生理食塩水 95 +/- 6; 1 ng 114 +/- 14; 5 ng 318 +/- 57; 10 ng 693 +/- 78; 100 ng 710 +/- 135; n=5-7)。中枢性TRHの肝増殖作用は、アトロピン、インドメサシンおよび迷走神経切断術により消失したが、L-NAMEは影響を及ぼさなかった。TRHの静脈内投与は<sup>3</sup>H-thymidineの肝DNAへの取り込みを増加させなかった。

### 【結論】

TRHは、中枢神経系に作用し、迷走神経ムスカリンレセプターおよびプロスタグランジン合成を介して肝増殖を刺激した。本所見は、中枢性神経ペプチドによる肝増殖調節を示唆するものである。

## 4) 中枢性制御における延髄迷走神経運動核内Y1およびY2レセプターの関与

### 【目的】

近年、神経伝達物質として中枢性神経ペプチドが注目されており、生体内の様々な生理作

用を中枢性にコントロールしていることが知られている。我々は、Neuropeptide Y (NPY)の脳槽内および左側延髄迷走神経運動核(Dorsal Motor Nucleus: DMN)への投与が自律神経系を介して胆汁分泌を刺激することを見出した。更に最近の薬理的・分子生物学的検討により、NPYレセプターは数種のサブタイプに分類され、脳内にもY1およびY2レセプターが分布していることが明らかとなった。そこで特異的NPYレセプター・アゴニストをDMNにmicroinjectionして胆汁分泌に及ぼす効果を検討した。

#### 【方法】

ラットをウレタン麻酔下で開腹、総胆管にポリエチレンカテーテルを挿入して外胆汁瘻とし、タウロコール酸(30  $\mu\text{mol/kg/h}$ )を十二指腸に持続注入した。基礎分泌測定の後、ラットを定位脳手術装置に固定の上、特異的Y1およびY2アゴニストである[Leu31,Pro34]NPYおよびNPY3-36 (0.1-15 pmol)をDMNに微量注入し、胆汁分泌の反応を観察した。

#### 【成績】

Y1アゴニストである[Leu31,Pro34]NPYの左側DMNへの投与によって、用量依存性(1-8 pmol)に胆汁分泌量の増加が観察された( $\mu\text{ml}/20\text{min}/100\text{g}$ : 生食 4  $\pm$  2; 0.1 pmol -5  $\pm$  3; 0.3 pmol 7  $\pm$  6; 1 pmol 68  $\pm$  16; 4 pmol 148  $\pm$  24; 8 pmol 268  $\pm$  45)。それに反して、Y2アゴニストであるNPY3-36の左側DMNへの投与では、用量依存性 (1-8 pmol) に胆汁分泌量の減少が認められた(生食 4  $\pm$  2; 0.1 pmol 4  $\pm$  3; 0.3 pmol 3  $\pm$  6; 1 pmol -33  $\pm$  16; 4 pmol -48  $\pm$  26; 8 pmol -62  $\pm$  18)。どちらのアゴニストも右側DMNへの投与では効果を示さなかった。それぞれの特異的NPYアゴニストによる胆汁分泌調節作用は迷走神経肝臓枝の切断により消失した。

#### 【結論】

NPYは左側延髄迷走神経運動核内の異なったレセプターを介して、胆汁分泌に対しparadoxicalな作用を有することが確認された。

## 2. HGFと肝再生現象

### 1) ラット脾内移植肝細胞の再生に及ぼすHepatocyte growth factor (HGF) の効果

#### 【目的】

我々は、脾内肝細胞移植が先天性肝酵素欠損症や急性肝不全モデルに対し有効であるあることを報告してきた。しかしながら本療法が臨床応用されるためには、その安全性とともに移植肝細胞の生着効率の向上および迅速な再生を誘導することが必要である。そこで、hepatocyte growth factor (HGF)を用いて脾臓内に移植された肝細胞に対しその生着率および再生に及ぼす効果について検討を加えた。

#### 【方法】

10-12週齢のwistar ratを用いて肝細胞分離、脾内肝細胞移植をおこなった。脾内肝細胞移植は肝細胞浮遊液0.2ml( $1 \times 10^7$  cells) を脾臓に直接注入した。脾臓内の肝細胞生着率および再生率は、それぞれ画像解析装置による単位面積あたりの肝細胞数およびBromodexy-uridine labeling index (BrdU LI)にて評価した。

#### 【成績】

実験群は1) コントロール群：脾内肝細胞移植(HTx)のみを施行した群、  
2) HGF群：human recombinant HGF (hHGF) 360  $\mu$ g/kg BWをone shotにて静脈内投与した群、3) HGF-CIV群：hHGF 1000  $\mu$ g/kg BWを持続静脈内投与した群を作成した。肝細胞移植5日目における生着率はコントロール群では $14.9 \pm 7.7$ 個、HGF群では $45.5 \pm 12.9$ 個、HGF-CIV群では $61.6 \pm 3.8$ 個で、有意( $p < 0.05$ )に各群ともコントロールに比し高かった。BrdU LIはコントロール群では $1.8 \pm 0.7$ 、HGF群では $2.9 \pm 1.0$ 、HGF-CIV群では $5.8 \pm 0.9$ であり、有意( $p < 0.05$ )に各群ともコントロールに比し高かった。

#### 【結論】

脾臓内に移植された肝細胞に対しその生着率および再生に及ぼす効果について検討を加えたところ、HGFは有意に脾内移植肝細胞の再生を促進した。

## 2) HGF/SFトランスジェニックマウスを用いた肝再生の解析

### 【目的】

われわれはマウスメタロチオネインプロモーターの制御下に、全身の上皮系組織でHGF/SFを過剰発現するトランスジェニックマウスを作成して、HGF/SFの肝再生に対する作用を検討した。

### 【方法】

ヒトHGF/SF cDNAをプローブとして、NIH3T3線維芽細胞由来cDNAライブラリーをスクリーニングしてマウスHGF/SF cDNAを単離した。このcDNAを新しく開発されたメタロチオネインプロモーターに挿入し、このDNA断片をマイクロインジェクション法によりFVB/N由来マウス受精卵に導入してトランスジェニックマウスを得た。

### 【成績】

このHGF/SFマウスにおいては肝臓は著明に腫大し、肝重量は対照マウスの2倍以上に達した。組織学的に肝細胞は著明な多形性を示した。肝小葉内では、中心静脈周囲に大型の肝細胞が、その周りを小型の肝細胞が取り囲むという分布を示した。肝細胞の増殖能に関しては、BrdUを用いた肝細胞のLabeling Indexはトランスジェニックマウスで著明に増加しており、対照に比べて4.7週令で11倍、12.3週令で4.7倍の取り込みの増加が見られた。肝臓にHGFの過剰発現したトランスジェニックマウスでは、70%部分肝切除後の肝再生が約3倍の速度で進行し、切除後5日目には切除前の肝重量に回復した。

### 【結論】

すでにin vivoでのHGF/SFの肝細胞増殖促進ならびに肝再生促進作用に関して、アルブミンプロモーターを用いたトランスジェニックマウスでの解析の報告がある。しかし、我々のトランスジェニックマウスにおいては、より高濃度のHGF/SFがパラクリン、オートクリンに存在するため、HGF/SFの究極の作用をさらに検討することが可能になった。その結果、肝重量の増加や、肝細胞増殖能の著明な亢進が認められた。しかし、70%部分肝切除後の肝再生実験ではアルブミンプロモーターを用いたトランスジェニックマウスと比較しても、著明な違いは認めなかった。このことは、HGF/SFの肝再生刺激は、ある一定の閾値に達すれば、もうそれ以上細胞内に細胞増殖のシグナルを伝達しなくなることを示唆している。したがって、今後はHGF/SFの受容体metを介する細胞内情報伝達機構の解明が、肝再生機構を解明する上で重要であると考えられた。以上の結果は、HGF/SFがin

vivo においても肝細胞のきわめて強力なmitogenであることを示し、肝臓の再生に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

### 3. HSSと肝再生現象

#### 1) 肝細胞増殖刺激因子(HSS)の脾内移植肝細胞に対する増殖促進効果

##### 【目的】

近年、欧米における臓器移植の成績向上はめざましく、一年生存率は90%まで達している。しかし、この成績向上は一方で深刻なドナー臓器不足をもたらしている。また、我が国のような一部の国では、脳死者からの臓器摘出がいまだに認められず、脳死臓器移植のめどすら立っていない。1970年代前半より、肝臓を細胞単位に分離するコゲナーゼ消化法が開発され、急性・慢性肝機能不全および先天性肝酵素欠損症に対する新しい治療法として、肝細胞移植の可能性が検討されている。しかし、肝細胞移植による肝機能補助には、充分な量の肝細胞が長期に生着することが必要であり、移植肝細胞の確実な生着・早期分裂増殖法を確立することが臨床応用上の大きな課題である。

胎児肝、乳児肝、および再生肝から抽出されるHepatic Stimulatory Substance (HSS)は、熱・酸・アルカリに安定な分子量10-30kDのペプチドであり、部分肝切除後の残存肝再生ならびに培養肝細胞の増殖を促進し、D-ガラクトサミンもしくは四塩化炭素誘導急性肝不全動物の治療にも有効であると報告されている。また、その効果は肝特異的かつ種非特異的である。本研究では、レピントラットに門脈下大静脈吻合を造設して慢性肝機能不全を誘導し、その脾内に移植した同系肝細胞に対するHSSの増殖促進効果を検討した。

##### 【方法】

HSSは、LaBrecqueらの方法にしたがって豚再生肝より抽出した。体重約20kgの雄性豚に40%部分肝切除を行い、その48時間後に再生肝を摘出しホモジナイズした。肝ホモジネートを65℃に加熱した後、2回遠心分離して得られた上清がHSSであり、使用まで-70℃で保存した。肝細胞は、Wistar系雄性ラットの肝臓よりコゲナーゼ消化法にて分離し、 $1 \times 10^7$ 個の肝細胞を含む0.5mlの浮遊液を22G注射針を用いて体重約200gの同系ラットの脾内に直接注入し、以下の各群に分けて移植肝細胞に対するHSSの増殖促進効果を検討した。Group1: sham手術+脾内移植(n=5)、Group2: sham手術+脾内移植+HSS(n=5)、Group3: 門脈下大静脈吻合+脾内移植(n=5)、Group4: 門脈下大静脈吻合+脾内移植+HSS (n=5)。

門脈下大静脈吻合は、移植1週間後にエーテル麻酔下に再開腹し、7-0 Silk (Ethicon, USA)を用いて端側連続縫合にて行った。HSSは、門脈下大静脈吻合およびsham手術後週2回静注(3ml)にて投与し、投与開始後2,4週目に犠牲死させて脾臓を摘出した。

脾内肝細胞の組織学的検索および増殖能を検討するために、摘出した脾臓を縦軸に

沿って中心で薄切し、HEおよびPAS染色を行った。HSSによる脾内移植肝細胞の増殖促進効果は、画像解析装置（Nachet, France）に接続された光学顕微鏡下にPAS染色標本を観察し、脾臓縦断面における肝細胞の占有面積を測定して比率(%)で表して評価した。測定値はmean±SDで表し、有意差検定は Student's t-testで行い、危険率5%以下を有意差有りとした。

### 【成績】

投与開始2週間後における正常ラット脾臓の組織学的観察では、HSS投与群・非投与群ともにPAS染色陽性顆粒を細胞質内に有する十数個の肝細胞が小さな集団を形成して生着しているのが観察された。画像解析装置による肝細胞占有率の検討では、両群ともに1%程度であった。投与開始4週間後になると、生着細胞数はさらに減少し、両群の肝細胞占有率はともに0.5%以下にまで低下した。

投与開始2週間後のHSS投与群の組織学的検索では、数十個の肝細胞が大きな集団を形成して赤脾髄に瀰漫性に生着していることが観察され、肝細胞占有率は約6%と非投与群の3%に比して有意に（ $p < 0.05$ ）高い値を示した。投与開始4週間後の投与群の組織学的観察では、肝細胞以外に胆管様構造が多くみられるようになり、占有率は3%にまで低下した。非投与群では胆管様構造は少ないが、肝細胞占有率は1%にまで低下していた。

### 【結論】

近年、慢性肝不全や先天性肝酵素欠損症の新しい治療法として、肝細胞移植による障害肝の代謝機能補助の可能性が報告されている。しかしながら、移植肝細胞による代謝補助能は以下に示す如くいまだ不十分である。ビリルビン抱合酵素欠損である Gunnラットの場合、移植肝細胞によるビリルビン抱合能は、移植後一年以上経過しても正常の約30%程度と低く、無アルブミンラットにおいても、正常ラットのわずか1%程度のアルブミン産生能を示すに過ぎない。これらの結果は、異所性に移植された肝細胞の絶対数が不足していることを示している。移植部位によって異なるが、一度に移植可能な細胞数には限界があり、何らかの方法で移植された肝細胞の増殖を促進する方法の確立が必要である。

従来より、異所性移植肝細胞の分裂増殖に及ぼす宿主肝部分切除の影響が多くの研究者によって検討されている。部分肝切除により移植肝細胞の一時的なDNA合成上昇が認められるものの、生着肝細胞数の増加は報告されていない。我々は、レシピエントに肝毒性物質である acetoaminofluoren(AAF)を前投与した後に、70%肝切除と肝細胞脾内移植を同時に行うと移植肝細胞の著明な増殖がみられることを報告している。これは、AAFの前投与

により70%肝切除後の残存肝再生が阻害され、利用されなかった肝再生促進物質が脾臓内の肝細胞に作用したためと考えられる。また、我々は、アスコルビン酸(AsA)を投与しないかぎり壊血病類似症状によって死亡するAsA生合成酵素欠損ラットを用いて、肝細胞移植による救命の可能性を検討した。この場合、肝細胞移植のみでの救命は得られず、移植肝細胞の分裂増殖促進するためにレビメントへの肝毒性物質(AAF)の投与と70%部分肝切除を行うことにより初めて救命率の向上が得られた。しかし、このAAF投与と70%肝切除による死亡率は10-15%であり、肝機能障害を有する患者に施行することは非現実的と考えられる。したがって、肝細胞移植の臨床応用を考慮した場合、臨床応用可能な方法で移植肝細胞の増殖を促進しなければならない。

宿主肝が正常である場合、HSSによる脾内肝細胞の増殖促進効果は極めて微弱であり、投与開始4週間後には占有率が0.5%以下にまで低下し、非投与群との間に有意差は認められなかった。一方、門脈下大静脈吻合により慢性肝不全を誘導された群では、HSSの投与により著明な肝細胞増殖促進効果が認められた。これらの結果により、以下に示す二つの可能性が示唆された。i)門脈下大静脈吻合により誘導された肝不全は不可逆的であるため、肝臓が慢性肝不全により産生された何らかの内因性肝再生因子を利用できないため、HSSと内因性肝再生因子が相乗効果を発揮した。ii)慢性肝不全により肝再生抑制因子が減少し、HSSの増殖促進効果がより著明に発揮された。

脾内移植肝細胞の経過をみた場合、移植後徐々に移植肝細胞の壊死脱落がみられ、4-8週間後に生着細胞数が最低値に達し以降漸増する傾向にある。本研究においても、投与開始後2週間目と比較した場合、4週間目ではHSS投与群においても肝細胞占有面積率の低下が認められた。これは上述の機序によるものと考えられるが、HSSの投与は少なくとも生着細胞数の減少を抑制したと考えられた。

今回用いたHSSは異種である豚再生肝由来であるが、アレルギー反応などの副作用も認められず、門脈下大静脈吻合ラットの脾内に移植された肝細胞の増殖を著明に促進した。本研究の結果は、異所性に移植した肝細胞の分裂増殖を誘導することが可能であることを示し、今後の肝細胞移植の研究に寄与するものと考えられる。

## 4. NOと肝再生現象

### 1) 再生肝組織における誘導型一酸化窒素合成酵素 (inducible Nitric Oxide Synthase, iNOS) 発現の意義

#### 【目的】

生体内において一酸化窒素（以下NO）は様々な細胞から発生し、循環系・神経系・免疫系などにおける多機能性の生理活性物質として働いていることが報告されつつある。しかし、過剰に産生されるとNO自体が強い細胞毒性を示し、炎症反応や自己免疫機序で起こる組織破壊において、細胞障害因子として関与している可能性やNOによる直接的、またはその発癌性の高い代謝産物やニトロソ化合物によって間接的に発癌因子となる可能性が指摘されている。肝細胞培養系において種々のサイトカインによってiNOSが誘導されることが知られているが、その意義は明らかでない。今回我々は、70%肝切モデルから採取した残存再生肝組織におけるiNOSの産生とNADPH-diaphorase活性について比較検討し、肝再生時におけるNO発生の意義について検討を加えた。

#### 【方法】

70%、40%肝切モデルを作製し、経時間的に残存再生肝組織を採取。iNOSの発現は、抗iNOS抗体を用いた免疫組織化学的手法（iNOS-Like Immunoreactivity, 以下iNOS-LIR）とNADPH-diaphorase活性組織化学の両者で検討した。

#### 【成績・結論】

正常肝組織においてiNOS-LIR、NADPH-diaphorase活性の両者は検出できなかった。肝切モデルから採取した肝組織においては、iNOS-LIR、NADPH-diaphorase活性の両者が陽性であり、しかも両者の分布はほとんど一致しており、染色程度も両者は極めて一致していた。肝切後6時間をピークとして門脈領域の肝細胞においてiNOS-LIR、NADPH-diaphorase活性の両者が陽性であった。が、その意義については現在検討中である。可能性としては、NOによる類洞、門脈などの血流増加（NOは強力な血管拡張因子）が考えられるが不明である。今後、NOブロッカーによる、肝再生実験によって明らかにしていきたい。

## 2) 急性肝炎モデルにおける iNOS発現と腹腔内NOガス測定

### 【目的】

生体内において一酸化窒素（以下NO）は様々な細胞から発生し、循環系・神経系・免疫系などにおける多機能性の生理活性物質として働いていることが報告されつつある。しかし、過剰に産生されるとNO自体が強い細胞毒性を示し、炎症反応や自己免疫機序で起こる組織破壊において、細胞障害因子として関与している可能性やNOによる直接的、またはその発癌性の高い代謝産物やニトロソ化合物によって間接的に発癌因子となる可能性が指摘されている。細胞培養系において種々のサイトカインによってiNOSが誘導されることが知られているが、その意義は明らかでない。今回我々は、ガラクトサミン+エンドトキシン投与急性肝不全モデルによる肝組織におけるiNOSの産生とNADPH-diaphorase活性および経時間的に腹腔内より採取したNOgasについて比較検討し、炎症の増悪におけるNOの病因論的意義について検討を加えた。

### 【方法】

ガラクトサミン+エンドトキシン投与急性肝不全モデルを作製。iNOSの発現は、抗iNOS抗体を用いた免疫組織化学的手法（iNOS-Like Immunoreactivity, 以下iNOS-LIR）とNADPH-diaphorase活性組織化学の両者で検討した。NOgasについては、経時間的に腹腔内より採取、NOgas分析機にて測定。

### 【結果・結論】

ガラクトサミン+エンドトキシン投与前においてiNOS-LIR、NADPH-diaphorase活性の両者およびNOgasは検出できなかった。投与2時間で、ガラクトサミン+エンドトキシン投与急性肝不全モデルから採取した生検組織において、iNOS-LIR、NADPH-diaphorase活性の両者が陽性であり、しかもNOgasも産生されはじめた。6時間後NOgas産生が、ピークとなり、炎症程度とも相関していた。12時間後では減少しはじめ、24時間後では、ほとんど検出出来なかった。しかも、炎症の程度に比例してNOgas産生が増強する傾向が認められたことより急性肝不全の増悪に、誘導型NOSで生成されたNOが関与している可能性が示唆された。また、炎症の程度、治療効果判定、治療に役立つ可能性も示唆された。今後、NO産生を抑制した状態での急性肝不全発生が抑制されるかどうか検討したい。TNF, IL-1はNOを産生する合成酵素であるiNOSを誘導することが培養肝細胞ですでに知られている。したがってサイトカインによって誘導されたiNOSによって過剰に産生された

NOが肝細胞傷害を誘発している可能性が高い。したがって、過剰なNO産生を促すNO合成酵素を抑制すれば肝障害発生が軽減される可能性がでてきた。

## 5. 肝細胞移植と肝再生現象

### 1) 先天性アルブミン合成欠損無アルブミンラットに対する脾内肝細胞移植

#### 【目的】

肝硬変などによる肝不全、肝臓の先天性代謝疾患に対し、現在肝臓移植が有効な手段として海外では行われているが、供給されるドナーの絶対的、相対的不足が深刻化している。また日本では脳死判定の社会的合意が得られていないなどの問題で臨床応用がなされておらず、一部で生体部分肝移植が行われているにすぎない。一方、肝機能補助の目的では、肝臓移植をする必要はなく、失われた一部の機能を補う選択的移植の考えが唱えられている。その一つの試みとしての分離肝細胞移植法は、ガラクトサミン急柱肝不全モデルや虚血性肝障害モデルにこ対する延命効果が示され、またBilirubin UDP - glucuronyl transferase (BUDP-GT) 活性の欠損したGunnラットに対するビリルビン代謝能の維持などの成績が報告され注目されている。しかしながら、これらの多くは、移植肝細胞の特異的機能発現は移植初期の短い期間に限られて検討されており、生体内での長期間にわたる移植肝細胞の機能維持は困難とされている。一方、ラット分離肝細胞の脾内移植法では、脾臓内で移植肝細胞が持続的に増殖し、約1年後には脾臓断面の約40%を占め、アンモニア代謝・ビリルビン代謝能力が維持されていることがMitoらにより報告されている。今回、我々はアルブミン合成能を欠如している先天性代謝疾患の一つである無アルブミンラット(Nagase's analbuminemic rat)の脾臓内に同系正常ラットのアルブミン産生肝細胞の移植を行い、移植肝細胞が脾臓内で増殖し正常肝とほぼ同様の組織を再構築するとともにアルブミン合成能を維持し、無アルブミンラットの血中アルブミン値を上昇させ、その上昇値が脾臓内肝組織量に対応することを観察した。

#### 【方法】

1) 実験動物： 実験動物は、12週令の雄性F344 Fischerラット（以下F344ラット）（RT11）（日本クレア、東京）をドナーと正常コントロールとして、佐々木研究所（東京）より供与され明海大学実験動物センターで継代したF344とコンジェニック系統の12週令雄性の無アルブミンラット（Nagase's analbuminemic rat）（以下NARと略）（RT11）をレシピエントと未処置コントロールとして用いた。これらのラットを、I群：正常F344ラット群（n=5）、II群：未処置NAR群（n=9）、HI群：F344ラットより分離した肝細胞をNAR脾臓内に移植した群（n=10）（以下HCTxと略）の3群にわけた。各群を同条件のもとオリエンタル固形食飼料、水道水にて飼育した。

2) 脾臓内肝細胞移植： 肝細胞分離は、Seglenらの方法に準じて行った。エーテル麻酔下にF344ラットを開腹し、Ca<sup>2+</sup> freeのHanks' balanced salt solution (HBSS) で前灌流後、0.05% collagenase (type 1, Sigma) solutionにて灌流し細胞を分離した。低速遠心(50x g, 1 min)を3回繰り返して分離肝細胞を回収し、トリパンブルー染色にてviabilityを判定した。1X10<sup>7</sup>個の肝細胞を0.2 mlのHBSSに懸濁し、25ゲージ針を用いてレシピエントの脾臓下極より直接注入し移植した。注入時、脾門部を一時的にクランプし、注入部は漏出を防ぐため7-0針つき絹糸で縫合閉鎖した。

3) 血中アルブミン値の測定： 各群について、移植前と後1カ月ごとに採血、18カ月間観察した。なお、I、II群には同週齢のラットを選んだ。血液サンプルは、採血前日より絶食させた各群ラットから移植前・後1カ月毎にエーテル麻酔下に頸静脈より採血し、3,000x gで遠心後、測定まで-600Cで凍結保存した。血中アルブミンは、抗ラットアルブミン抗体を用いたradioimmunoassay法にて測定した。移植16カ月のラット1000倍希釈血清を用いて抗ラットアルブミン抗体(Cappel, USA)によるWestern blotにより、血清中ラットアルブミンの存在を確認した。なお、数値はmean±S.D.で表した。

4) 脾内肝細胞組織の形態学的検索： 肝細胞移植後16ヶ月に、血中アルブミン値にばらつきのある3匹のNARを犠牲死させ、腔内肝組織を形態学的に検索した。脾臓は、門脈内に留置したカテーテルより経脾静脈的に0.1% glutaraldehydeを含むperiodatelysine paraformaldehyde solutionにて灌流固定し、固定後脾臓を長軸方向に3 mmにスライスしてパラフィン包埋しH. E染色PAS染色、渡銀染色、アルブミン抗体免疫染色を行った。なお、ラットアルブミンの免疫染色では、一次抗体にrabbit anti-rat albumin serumを用い、DABにて発色させた。また電顕用に脾臓の一部を細切して1%オスミウム酸にて固定しEpon 821に包埋した後、酢酸ウラニール、鉛にて二重染色し、電顕にて観察した。脾内肝組織占拠率は、画像解析装置CB - Tasper System (Kontron)を用いて、脾臓長軸断面積中のアルブミン陽性肝細胞の占める割合で示した。

## 【成績】

### 1) 移植後、血中アルブミンの推移

HCTx後のNARの体重は12カ月間漸次増加し、それ以降は減少した。生存率は12カ月で100%であったが、16カ月、18カ月の時点で感染症により各1匹が死亡した。NARの血中アルブミン値は、1.8 ±0.3mg/dl、と正常F344ラットの2,680 ±179.0 mg/dlに比べ著しく低値を示した。移植後1カ月：6.9 ±1.1mg/dl、6カ月：30.8 ±6.1mg/dl、12カ月：37.2 ±8.7 mg/dlと経時的に増加し、14カ月：53.9 ±9.2 mg/dlと増加した。なお移植16カ月後に犠牲死

させた3匹のうち血中アルブミンの最大値は88.3mg/dlであり、正常F344ラットの約4%に相当した。また、これら3匹の移植ラット血清中には、抗ラットアルブミン抗体によるWestern blotにて、分子量67,000のラットアルブミンの存在が確認された。

## 2) 形態学的検索

移植後16カ月目の灌流固定の脾臓断面では、異所性肝組織は脾臓の下部1/2を占め、同部の脾臓には腫大は見られず逆に萎縮している。HE染色では、脾内肝細胞は白脾髄を取り巻くように、不規則な肝細胞索構造をもつ肝組織を再構築していたが、肝小葉構造はみられず、胆道系組織や悪性像もみられなかった。PAS染色では、正常肝組織と同様にほぼすべての移植肝細胞に陽性で、グリコーゲンの存在が確認された。渡銀染色では、形成された肝細胞索はreticulin fiberによる繊細な骨組みに囲まれていた。抗ラットアルブミン抗体による免疫染色では、ほとんどの脾内肝細胞に陽性像がみられた。また、移植群NARの肝臓にはアルブミン陽性肝細胞が散見されるが、コロニーを形成しているアルブミン陽性肝細胞群はみられず、移植をしていないNAR肝臓にもほぼ同じ程度にアルブミン陽性肝細胞が散見された。電顕像では、脾臓内の肝細胞によく発達したミトコンドリアや豊富な粗面小胞体、グリコーゲン顆粒がみられ、活性の高い細胞像が確認された。内皮細胞は、肝細胞のperivascular spaceを覆うように存在し、肝臓同様のsinusoidの形成がみられ、fenestrationもみられた。Disses' spaceにはfat-storage cellが散見された。肝細胞どうしが接する面には、bile canaliculiの形成がみられた。

## 3) 脾内肝細胞の占有率

移植後16カ月目に犠牲死させたNARの3匹の脾内肝細胞の占有面積はそれぞれ16.5 mm<sup>2</sup>, 29.7 mm<sup>2</sup>, 32.7 mm<sup>2</sup>で、脾臓長軸断面積はそれぞれの27.1%, 36.1%, 40.9%であった。従って、算出される異所性肝組織重量は、それぞれ120 mg, 350 mg, 420mgとなり正常肝臓重量の0.8%, 2.4%, 2.9%に相当した。また、この推定脾内肝組織重量は血中アルブミン上昇値とほぼ対応した。

### 【考察・結論】

無アルブミンラットは、1979年長瀬らにより発見された常染色体劣性遺伝によるミュータントで、肝細胞質におけるアルブミン合成mRNAのスプライシング異常により、正常アルブミン合成能を有しない先天性代謝病モデルである。本研究に用いたNARは、Sprague Dawley無アルブミンラットのアルブミン合成スプライシング異常mRNA遺伝子を、近交系F344-Fischerラットに導入し作出したものである。したがって、これらラット間の移植は同系移植であることから拒絶反応を来すことなく、免疫抑制をする必要がない。NARの

血中アルブミン値は0.8~1.8 mg/dlであり、この値は正常ラットの約0.05%に相当し、極めて低値である。しかも血中ラットアルブミンをradioimmunoassay法により微量測定することが可能で、動物を犠牲死させることなく、移植肝細胞の機能を経時的に鋭敏に知りえることができるなど、移植後の機能を評価するに有用なモデルである。我々はすでにこのNARに対しアルブミンを産出する正常肝臓を同所性に移植することにより、レシピエントのNARの血中アルブミン値 $1.30 \pm 0.21$  mg/dlが移植後1週で $1,490 \pm 72$  mg/dlと上昇し、4カ月で $2063 \pm 133$  mg/dl、と正常ラットのアルブミン値まで回復することを報告した。さらに短期間の検討ではあるが、肝細胞、胎児肝移植でも有意に上昇することを報告し、代用肝としての可能性を示唆した。今回、脾内肝細胞移植の長期効果を機能的、形態学的に判定するために、NAR脾臓内にアルブミン産生肝細胞を移植し、血中ラットアルブミンの推移を検討した。その結果、移植後血中ラットアルブミン値は経時的に上昇し、移植後16カ月では正常F344ラット血中アルブミン値の2.1%（最高4.0%）まで上昇した。この血中アルブミンは抗ラットアルブミン抗体によるimmunotransblotによりラットアルブミンであることが確認された。他方、形態学的にみると、Mitoらと同様、この時期では白脾髄をとりまくように肝細胞の増殖が認められ、不規則な肝細胞索構造を持つ肝組織を再構築しており、脾臓の下部約2分の1の面積を占めるようになるなど、生化学的な成績を裏づける成果が得られた。肝細胞移植後の血中アルブミンの上昇が、腔内で生着した肝細胞由来であるかないかを確認するため、移植14カ月目に脾臓を摘出し、上昇したNAR血中アルブミン値の推移をみたところ、脾摘出前の血中アルブミン値 $37.2 \pm 8.7$  mg/dlから脾摘2カ月後： $8.8 \pm 0.2$  mg/dl、4カ月後： $7.6 \pm 1.0$  mg/dlと経時的にNAR血中アルブミン値は減少したか、未処置NAR血中アルブミン値： $1.8 \pm 0.3$  mg/dlまでは至らなかった。これは、脾臓内に移植した肝細胞が脾臓に生着するとともに、細胞注入時に脾静脈を介して一部が肝臓にも流出し生着した可能性を示唆している。Guputaらは、HBsAgを産生分泌するG7HBV形質転換マウスの分離肝細胞をC57BL16Jマウスの脾臓内に移植し、血中HBsAgを測定することにより、移植肝細胞の機能判定が可能であることを報告し、Ogawaらも、アルブミン産生肝細胞をNARの門脈内に移植して、移植肝細胞が肝臓内に生着した肝細胞量を反映していることを報告している。今回、我々は、肝臓に移植肝細胞が生着しているのか否かを同定するために、肝細胞移植16カ月目にNAR肝臓内アルブミン陽性肝細胞の存在をimmunostainingにて試みたところ、移植をしなかったコントロールNARの肝臓にも加令にともなうアルブミン陽性肝細胞を多数認め、移植したNARの肝臓との間に差を認めなかった。これらの結果より、今回の経時的な血中アルブミン値の上昇は主に、脾臓内に生着した肝細胞由来であると考えられた。移植肝細胞は、長期にわたり、肝の特異的機能で

あるアルブミン産生能を維持し、血中アルブミン値を上昇させるが、これらのアルブミン値と移植肝細胞の脾内占拠率の関係について検討した。肝細胞移植脾臓を酵素抗体免疫染色によりアルブミン陽性細胞を染色し、これを画像解析によって脾内占有率を定量化したところ、脾内肝細胞の占有面積は27%-41%で、推定肝組織重量は約120 mg/dl、420 mg/dl、正常肝重量の0.8-2.9%に相当した。この値は脾内肝組織重量とNARアルブミン上昇値との間に対応関係がみられた。このように、この血中アルブミン値は、生着している移植肝細胞量により決定されるものと考えられる。他方、NARに対する脾内移植胎児肝においても、同方法で占有面積から肝組織重量を測定した結果でも、移植18カ月後の血清アルブミンは $30.8 \pm 2.0$  mg/dlと正常ラットの1.5%、脾内移植肝細胞のグラフト含有率は $33.5 \pm 2.8\%$ で、このさい推定肝重量は1.5%に達し、血清アルブミンと腔内移植肝細胞のグラフト重量との間に比例関係を示す成績が得られている。また、国土らのGunnラット腔内肝細胞移植12カ月後の肝細胞に、特異的に存在するアシアロ糖蛋白受容体に結合する $^{99m}\text{Tc}$ -GSA ( $^{99m}\text{Tc}$ -diethylenetriamine pentaacetic acid-galactosyl-human serum albumin) に用いた定量的評価では $^{99m}\text{Tc}$ -GSAの脾臓への取り込みの肝臓への取り込みに対する比率は0.06-1.33% ( $0.06 \pm 0.13$ ) で、これから推定された腔内肝細胞重量は5.1-147.5 ( $60.2 \pm 13.3$ ) mg、腔内肝細胞占有率は1.3-16.8 ( $10.2 \pm 1.5$ ) が、Gunnラットにおいて、黄疸を正常化するに必要な肝重量は生肝の約12%と報告している点からみると、Gunnラットに対する我々の肝細胞移植量では代償しきれなかったといえる。同様に先天性肝アスコルビン酸合成酵素欠損ラットに対する肝細胞移植においては、生命を維持する閾値に達していないとされている先天性アルブミン合成能欠損無アルブミンラット (NAR) の腔内に正常ラットのアルブミン産生肝細胞を同系移植し、長期的効果をアルブミン合成能の面から、機能的、形態学的に検討した。肝細胞移植後、ラットは12カ月以上生存し体重の増加がみられた。NARの血中アルブミン ( $1.8 \pm 0.3$  mg/dl) は、肝細胞移植後、経時的に増加し、14カ月 ( $53.9 \pm 9.2$  mg/dl) に頂値に達した。16カ月後のラットの血中アルブミンの最大値 ( $88.3$  mg/dl) は正常ラット血中濃度 ( $2,680 \pm 179$  mg/dl) の約4%に相当した。肝細胞移植脾摘出後、経時的に血中アルブミンが減少したことから、腔内肝細胞が長期にわたりアルブミン産生能を維持していたことが裏づけられた。しかも血中アルブミンは抗ラットアルブミン抗体によるWestern blotで、分子量67,000のラットアルブミンの存在が明らかにされた。顕微鏡によると移植肝細胞が腔内で増殖し、正常肝とほぼ同様の組織を再構築した。電顕においてもミトコンドリア等の発達も良く活性の高い細胞であった。アルブミン免疫染色では腔内肝細胞にアルブミン陽性像が認められた。画像解析による移植後16カ月目の脾臓内肝細胞の占有面積率は27-41%、推定組織重量は120-420 mgで正常肝重量の

0.8 - 2.9%に相当した。脾内肝細胞移植により無アルブミンラットの血中アルブミン値を上昇させ、その上昇値が、生着している脾内肝組織量によることから、血中アルブミン値をモニタすることにより、移植肝細胞の機能を経時的に定量化することか可能となりえた。