

ラット肝上清中に共存せる細胞増殖抑制因子と促進因子の肝再生誘導による活性変換について

岡山大学医学部第一生理学教室（主任：西田勇教授）

藤 井 利 武

（昭和51年12月27日受稿）

緒 言

生体が組織に障害を受けると一部の臓器を除いて極めて強力な修復力で回復する。このとき障害部位では細胞分裂或は細胞の肥大により元の形態に復するが、正常な修復では元の大きさ以上にはならない。如何にして制御機構が働くのか？ 細胞分裂の制御機構の解明は、生体の発生・分化・生長・老化或は癌化の機構を知る上に極めて重要である。これを解明すべく哺乳類中最も再生力に優れているラットに部分肝切除を施行し、脱制御下におかれた再生肝と制御下にある正常肝について制御機構の差異を検討した。従来ラット肝再生の“引き金機構”においては体液性説が主流である。即ち、Christensen & Jacobsen¹⁾、Bucher²⁾、遠田ら³⁾の体液性因子、Cater⁴⁾、Paschkis⁵⁾らの生長ホルモン、Adibis⁶⁾、Fisher⁷⁾、本庄ら⁸⁾の門脈因子、Marosらの言う神経因子⁹⁾等である。これに対して細胞性因子についての報告は、Stich & Florian¹⁰⁾の肝ホモジネート、寺山 & 大塚¹¹⁾のアルギナーゼ、中原ら¹²⁾の肝抽出物、西田ら¹³⁾のコルニンなどがある。また肝以外からの細胞増殖に対する細胞性抑制或は促進因子としては、Bullock¹⁴⁾のChalone、Szent-Györgyi¹⁵⁾のPromine及びRetine、Gospodarowicz¹⁶⁾の線維芽細胞増殖因子(FGF)などが報告されている。これらのうちPromine及びRetine以外の物質はすべて単一臓器からは細胞増殖の抑制または促進作用の一方の活性を示す因子しか分離されておらず、或は他の支持物質例えば副腎皮質ホルモン、生長ホルモン、インスリン等の添加を必要とする。

著者は今回西田ら¹³⁾の方法を改良し、同一ラット肝上清中に培養細胞の増殖を抑制する因子と促進する因子の共存を確認し、さらに肝再生誘導によりこれらの因子が合目的に、活性を変化させるという知

見を得たので報告する。

材料及び実験方法

I. 細 胞

マウス由来線維芽細胞 L-929 株〔岡山大学医学部癌源研究施設病理学部門（佐藤二郎教授）より恵与された〕を GM〔増殖培養液：2% Tryptose-Phosphate-Broth (TPB, DIFCO), 10% 牛血清含有 Eagle's minimum essential medium (MEM, 大五)〕に継代培養したものを用いた。長期にわたり継代を繰返すと泡沫様細胞の出現をみるため、初期に凍結保存をしておき逐次溶解し泡沫様細胞の使用を可及的に回避した。¹⁷⁾ 鶏胚線維芽細胞 (CEF) は白色レグホン種の10日卵鶏胚を2% TPB, 5% 仔牛血清含有 MEM に初代培養し、¹⁸⁾ 継代2～3代までの CEF を使用した。活性検定は GM に増殖させた細胞を TEP〔0.05% Trypsin, 0.02% EDTA (ethylene-diamine-tetra acetate) 含有 PBS (一) (phosphate-buffered-saline)〕で集め SM (附着培養液：2% TPB, 0.5% 牛血清含有 MEM) にて植込む。植込み後24～36時間で各々の試料添加培養液に交換し、48～96時間培養後 TEP 処理し Coulter Counter (coulter electronics inc. USA) で細胞数を計数した。対照として抑制系は GM で、促進系は RM (静止培養液：2% TPB 含有 MEM) で同期間培養した。

II. 正常肝及び再生肝の調整

当教室で自家繁殖させたウイスター系ラット（生後約1ヶ月体重100～120g）を Higgins & Anderson の方法²⁰⁾によりエーテル麻酔下で肝の2/3にあたる中・左葉を結紮切除し、切除肝を正常肝として0°～4°Cの0.25 M Sucrose・10 mM Tris-cl pH7.4

・ 1 mM EDTA (STE) 溶液中へ集め、よく脱血洗浄後 -80°C へ凍結保存した。残存肝は正確に24時間或は72時間後にラットを断首し再生肝として採取し、STE 溶液で脱血洗浄後 -80°C へ凍結保存し使用した。尚部分肝切除は前夜よりラットを絶食・自由給水としておき、午前10時より午後1時の間に施行した。²¹⁾

III. 細胞増殖抑制及び促進因子の分画

-80°C に保存した肝を溶解し直ちに冷 STE 溶液中で細切し、充分血液の夾雑を除去した後 waring blender で破碎し、ガーゼ布続いてテロン布で濾過した。濾液をテフロンホモゲナイザーでホモゲナイズした後、5.0 M KOH で pH 7.4 に調整した。次に $10.000 \times \text{g}$ 10 分間遠沈して核及びミトコンドリア画分を除き、上清を $105.000 \times \text{g}$ 60 分間遠沈してミクロゾーム画分を除去した。²²⁾ この上清に 0.5 mM β -mercaptoethanol 存在下で攪拌し乍ら -15°C の精製エタノールを最終濃度 45% まで徐々に加え、60 分間静置後 $10.000 \times \text{g}$ 10 分間遠沈の沈渣を 45% 画分とした。さらにその上清に 0.5 mM β -mercaptoethanol 存在下で最終濃度 70% にまで精製エタノールを加え、同様の操作で得られる沈渣を 70% 画分とした (図 1)。

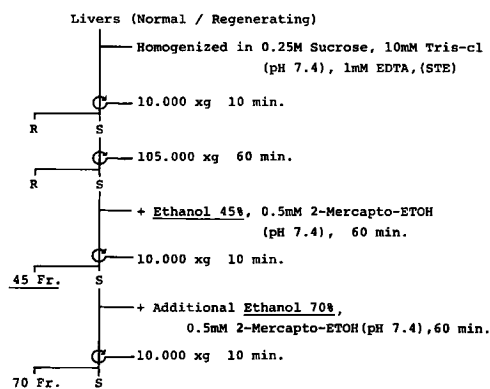


Fig. 1 Fractionation of Samples. All operations were conducted at $0 \sim 4^{\circ}\text{C}$.

以上の画分について正常肝からの標品を N45, N70, 再生肝からの標品を R45, R70, また術後72時間の肝からの標品を P45, P70 と称する。そしてこれらの沈渣を Visking tube で100倍量の 1 mM Tris-cl pH 7.4, 0.5 mM β -mercaptoethanol 液を外液として72時間以上透析し、polyethylenglycol (#20000) で濃縮した後凍結乾燥し 4°C のデシケーター中に保

存し実験に供した。以上の操作は総て $0^{\circ} \sim 4^{\circ}\text{C}$ で施行した。

IV. 各試料の使用法

凍結乾燥粉末の試料を PBS (-) に溶解し、ホモゲナイズ後 $10.000 \times \text{g}$ 10 分間の遠沈により不溶成分を除き、上清を millipore filter で濾過した。Lowry 法²³⁾ により濾液の蛋白量を測定し、抑制因子は GM に、促進因子は RM に適当量添加した。各試料の検定は 3 tubes の細胞を使用しその平均を出してある。抑制率或は促進率は次式による。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{GMの細胞数} - \text{実験群の細胞数}}{\text{GMの細胞数}} \times 100 (\%)$$

$$\text{促進率} = \frac{\text{実験群の細胞数} - \text{RMの細胞数}}{\text{RMの細胞数}} \times 100 (\%)$$

V. クロマトグラフィーによる分画

カラムは直径 2.5 cm 長さ 10 cm の DEAE-cellulose カラムを用いた。各試料を 10 mM Tris-cl pH 7.8, 0.5 mM β -mercaptoethanol (TM) 溶液に溶解し、ホモゲナイズ後 $10.000 \times \text{g}$ 10 分間遠沈で不溶成分を除去後、TM 溶液で平衡化したカラムにかけた。非結合画分は TM 溶液で溶出させ、次に 1.0 M NaCl 添加 TM 溶液で溶出、最後に 0.2 M 酢酸添加 NaCl・TM 溶液で溶出させた。それぞれを TM 画分、NaCl 画分、AA 画分と命名し充分量の 1 mM Tris-cl pH 7.8, 0.5 mM β -mercaptoethanol 溶液で72時間以上透析し、濃縮凍結乾燥して保存使用した。

VI. 核酸・蛋白合成の測定

6 cm 径のプラスチックシャーレに植込んだ細胞に、試料添加培養液と交換後16時間目に ^3H -Thymidine, ^3H -Uridine, ^{14}C -Leucine を加え4時間ラベルし、それぞれの放射活性を Scintillation Counter (Packard, Model 3320) で測定した。²⁴⁾ 尚1試料4 plates としその平均値を求めた。

VII. 熱処理による活性変化。

IV の濾液を 100°C で30秒及び60秒間煮沸し、凝固物を 3,000 rpm 5 分間遠沈で除去後蛋白量を測定し使用した。

VIII. Polyacrylamid gel 電気泳動

Davis²⁵⁾ の方法で調整したゲルに、各試料を $100 \mu\text{g}$ 負荷し1カラム当り 2 mA で泳動した。泳動後固定

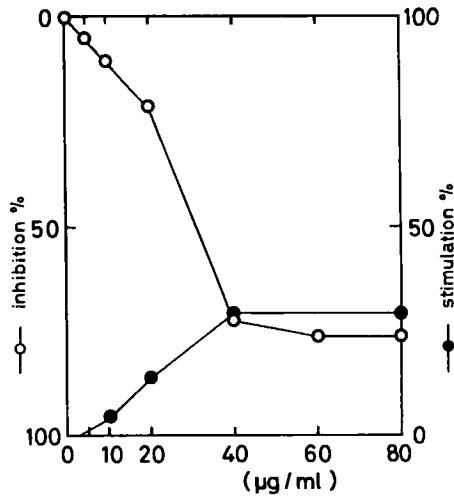


Fig. 2. Dose - dependent Inhibitory and Stimulatory Effects of N45 and N70 on L - 929 growth.
abscissa : amount of samples added in $\mu\text{g}/\text{ml}$. ordinate : left ; per cent control of inhibition induced by addition of N45.
right ; per cent control of stimulation induced by addition of N70.

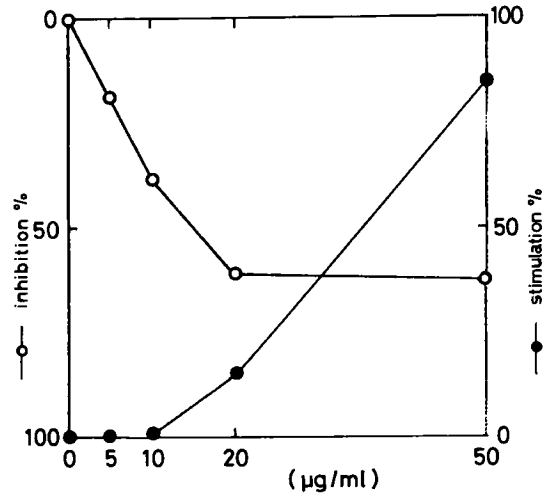


Fig. 3. Dose - dependent Inhibitory and Stimulatory Effects of N45 and N70 on CEF growth.
abscissa : amount of samples added in $\mu\text{g}/\text{ml}$. ordinate : left ; per cent control of inhibition induced by addition of N45.
right ; per cent control of stimulation induced by addition of N70.

染色しデンストメーターで比較した。

結 果

I. 細胞増殖抑制因子 (N45) と促進因子 (N70) の Dose response.

GMにN45, RMにN70を種々の濃度に添加培養し, その増殖抑制率及び促進率を検索した. L-細胞 (図2) に対してN45は40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で平均70%の抑制率を示し80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でも略々同程度の抑制効果を示す. またN70は同じく40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で平均30%の促進率を示し80 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でも同程度の促進効果を示す. 一方鶏胚線維芽細胞(CEF) (図3) に対してN45は20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で60%の抑制率を示し50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でも略々同程度の抑制効果を示す. またN70は20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上で促進効果を発現し, 濃度依存的にその作用を強める. N70のL-細胞とCEFに対する効果の違いは Strained cell と Primary cultured cell の相異によるものか, N70の種特異性を示唆するものか今後の検討が必要である. 以上の結果より試料濃度は一般に40~60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ とした.

II. N45とN70の CEF に対する拮抗作用

Table 1 Competitive Effects of N45 and N70 on CEF Growth

Samples	Cell No. ($\times 10^4$)	
RM	5.1	0%
RM + N70 (120 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	11.3	100%
RM + N70 (〃) + N45 (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$)	8.8	60%

RMにN70 (120 $\mu\text{g}/\text{ml}$) を添加し CEF に作用させ, 別系でさらにN45 (60 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 添加培養すると, 前者に比し後者は60%の増加にとどまる. つまりN45の抑制効果はN70の促進効果に対して拮抗的に作用することを示している. その結果を表1に示す.

III. 肝再生誘導の細胞増殖に及ぼす抑制因子 (N45 → R45) と促進因子 (N70 → R70) の活性変換.

L-細胞を一定 (24~36) 時間の休止状態での培養後, 各試料添加培養液に交換後96時間の抑制率, 促進率 (表2), 及び交換後24, 48, 72時間の各細胞数 (図4) を示す. 正常肝抑制画分 (N45) は強力な

Table 2 Effects of 45% and 70% Fractions on Cell Growth

Samples*	Cell No. ($\times 10^4$)	$\pm$ S. D. (%)	- Inhibition % + Stimulation %
GM	56.3	$\pm$ 1.3	- 0
GM + N 45	27.8	$\pm$ 9.8	-50.6
GM + R 45	55.3	$\pm$ 4.3	- 1.9
GM + P 45	54.2	$\pm$ 4.8	- 3.9
RM	12.2	$\pm$ 2.6	+ 0
RM + N 70	15.9	$\pm$ 2.7	+30.2
RM + R 70	15.7	$\pm$ 12.3	+28.3
RM + P 70	15.2	$\pm$ 4.1	+24.3

* Each sample was added $40 \mu\text{g}$ per ml in media.

細胞増殖抑制作用を示すが、再生肝の同一画分は殆ど失活するか或はかえって促進作用さえも示す。さらに部分肝切除後72時間の同一画分 P 45は R 45より僅かに抑制作用を回復したかに見えるものの、N 45には程遠い。この結果より肝の修復に従って抑制因子の活性化が再現されると推察される。また促進因子群の再生肝誘導による変換は、その活性に殆ど変

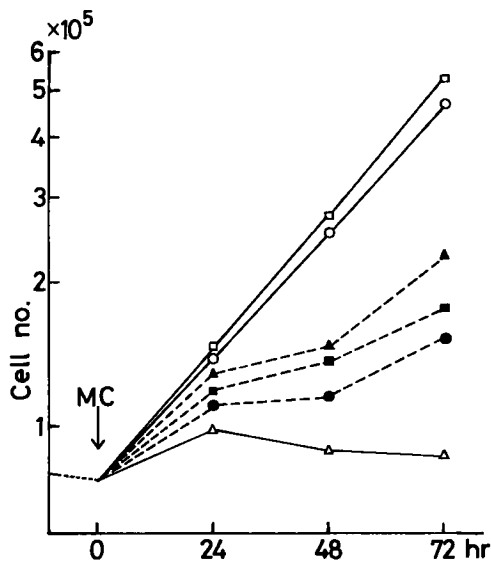


Fig. 4. Growth Curve of L-929.

The culture media were changed at 0 hour with fresh media with or without samples :

(○) Growing media (GM) system,
 (●) Resting media (RM) system,
 (△) N45 in GM, (▲) N70 in RM,
 (□) R45 in GM, (■) R70 in RM,
 respectively.

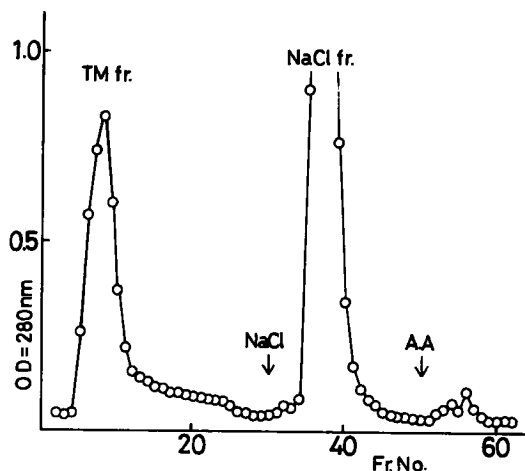


Fig. 5. Elution Pattern of N45 from DEAE-cellulose Column.

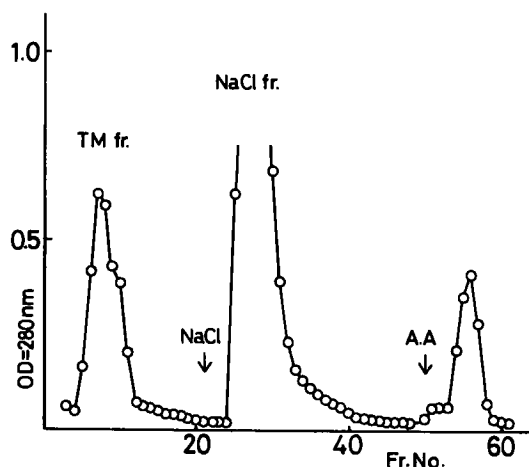


Fig. 6. Elution Pattern of R45 from DEAE-cellulose Column.

Table 3 Effects of DEAE-Cellulose Fractions on Cell Growth

Samples *	Cell No. ($\times 10^4$)	$\pm$ S. D. (%)	- Inhibition % + Stimulation %
GM	48.8	± 5.1	- 0
GM + N 45	6.2	± 13.8	-86.7
GM + N 45 : TM	6.1	± 24.6	-87.3
GM + N 45 : NaCl	44.6	± 5.1	- 8.6
GM + R 45	48.0	± 3.0	- 1.6
GM + R 45 : TM	9.4	± 12.2	-80.8
GM + R 45 : NaCl	44.6	± 3.4	- 8.6
RM	12.0	± 9.1	+ 0
RM + N 70 : TM	9.0	± 1.5	-25.4
RM + N 70 : NaCl	13.5	± 9.2	+12.8
RM + R 70 : TM	12.4	± 1.9	+ 3.0
RM + R 70 : NaCl	14.8	± 6.1	+23.4

* Each sample was added 50 μ g per ml in media.

Table 4 Effects of N45 and R45 on DNA, RNA and Protein Synthesis

Samples	DNA ^a	RNA ^b	Protein ^c
GM	100 (%)	100 (%)	100 (%)
GM + N 45 (100 μ g/ml)	32	41	55
GM + R 45 (")	100	95	86

a ; 100 % represented 5.92×10^4 cpm per mg protein.

b ; 100 % represented 10.7×10^4 cpm per mg protein.

c ; 100 % represented 1.12×10^3 cpm.

Table 5 Effects of DEAE-Cellulose Fractions of N45 and R45 on DNA synthesis

Samples	cpm/ μ g protein	- Inhibition % + Stimulation %
GM	66.6	- 0
GM + N 45 : TM (50 μ g/ml)	54.5	-17.4
GM + N 45 : NaCl (")	78.6	+19.2
GM + R 45 : TM (")	56.7	-14.1
GM + R 45 : NaCl (")	82.5	+25.1

Table 6 Loss of Activity by Heat-Treatment

Samples *	Cell No. ($\times 10^4$)	$\pm$ S. D. (%)	- Inhibition % + Stimulation %
GM	11.9	± 9.2	- 0
GM + N 45	3.9	± 8.8	-67.6
GM + N 45 (30")**	9.4	± 10.0	-20.9
GM + N 45 (60")	10.9	± 7.2	- 9.0
RM	8.4	± 10.0	+ 0
RM + N 70	10.0	± 0.9	+18.9
RM + N 70 (30")	8.7	± 9.9	+ 3.6
RM + N 70 (60")	8.5	± 9.6	+ 1.2

* Each sample was added 40 μ g per ml in media.

** 30" and 60" show that each sample was heated at 100°C for 30 and 60 seconds, respectively.

化を示さない。即ち、70%肝切除という刺激に対して残存肝の細胞側の応答機構の構成員として肝再生を惹起し継続させるのは、促進因子の活性化ではなく、抑制因子の活性低下が大きく関与していることを強く示唆する結果である。次にこれらの因子の精製と物性検索のため DEAE-cellulose カラムクロマトグラフィーの画各分（図 5, 6）の効果を検索した結果を表 3 に示す。抑制因子（N45）の活性の大部分が TM 画分に回収され、促進因子（N70, R70）の活性が NaCl 画分に回収される。ここで注目すべきは粗画分で全然抑制活性を発現しなかった R45 にも TM 画分に N45 と略々同程度の抑制活性が溶出回収されたことであり、この事実は正常肝抑制因子（N45）が R45 に変換し失活する機構を考察するうえで重要な知見である。

IV. 核酸・蛋白合成に及ぼす効果。

一定時間休止状態で培養後各試料添加培養液に交換し、前述の方法で放射活性前駆物質の各ポリマーへの取り込みに対する効果を検索し、DNA・RNA・蛋白合成に対する抑制及び促進効果を測定した結果を表 4 に示す。抑制率は GM の値を 100% として計算した。この結果より N45 は DNA 合成に対して最も強く抑制作用を示し、次で RNA、蛋白合成の順に抑制している。これに対して R45 は DNA 合成に全然抑制作用を示さず、N45 は DNA 合成抑制により抑制作用を発現すると考えられる。次に DEAE-cellulose クロマトグラフィーの画分の DNA 合成に対する効果の検索の結果を表 5 に示す。あまり顕著な差は見られないが N45・R45 共に TM 画分に抑制活性が存在するのは細胞数における各画分の結果と同様である。

V. 熱処理による活性変化。

N45 と N70 を熱処理した場合の活性変化を表 6 に示す。各々 100℃30秒で大部分失活しさらに60秒で殆ど完全に失活する。この結果より N45, N70 ともに蛋白性物質と推察し得る。

VI. Polyacrylamid gel 電気泳動

3種の粗抑制画分（N45, R45, P45）の Polyacrylamid gel 電気泳動による分析の結果を図 7, 8 に示す。N45 と R45 の比較で最も著明な変化は R45 において新たに PI が出現したことであり。PI は術後72時間の P45 にも僅か乍ら残存しており、細胞数

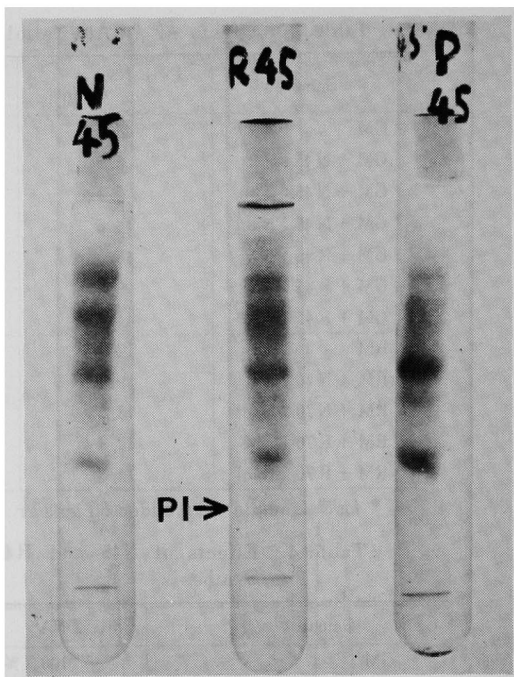


Fig. 7, Polyacrylamid gel Electrophoresis. left : N45, medium : R45, right : P45. PI shows the PI of Fig. 8.

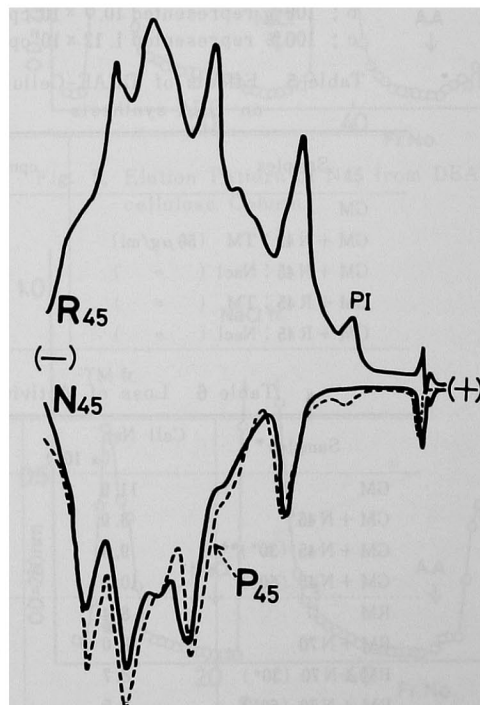


Fig. 8, Densitometry of Polyacrylamid gel Electrophoresis of N45, R45, and P45.

に対する抑制活性失活の持続と平行している。また DEAE-cellulose クロマトグラフィーで抑制活性が非結合 (TM) 画分に回収されることにより, PI が N→R 変換の本体である可能性も強い。

考 察

著者の報告した結果を考察するにあたり, この報告の意義を先づ文献学的に位置づけるところから始めたい。即ち“肝再生機構”の全体像を解析する場合, (i) 引き金機構における体液性因子と残存肝細胞の応答機構, (ii) 残存肝及び細胞中における増殖開始並びに維持に関する機構, (iii) 回復時の増殖停止機構等々の課題が解決されなければならないが, 著者はこの報告においては (ii) を中心として研究し増殖制御因子と考えられる物質 (抑制因子及び促進因子) の実在と, それらの応答変化を認めた結果を示したわけである。即ち, 肝細胞性因子として正常肝上清中に蛋白性の細胞増殖抑制因子と促進因子が共存し, 肝再生誘導により促進因子は殆ど不変であるが, 抑制因子は殆ど完全に失活するという極めて合目的な変換を認め, これを体液性情報入力 of 応答機構として肝細胞性の増殖制御機構の重要要素と推察しているわけである。

さて Higgins & Anderson²⁰⁾ によってラットの部分肝切除法が確立されて以来, 肝再生の機構について多数の報告がなされている。この肝再生の“引き金機構”について大別すると, (i) 部分肝切除により何か細胞増殖促進機構が駆動される, 或は促進因子が新生される。 (ii) 正常な成熟肝細胞中に肝細胞の増殖を抑制する物質或は機構が存在し, 肝が障害されると抑制作用が低下する。 (iii) 或は (i) と (ii) が同時に進行する, といったことが考えられる。

Stich & Florian¹⁰⁾ らは正常肝ホモジネート或は血清は再生肝の分裂指数を低下させるが, 再生肝ホモジネート或は血清は無効であると報告した。Cater & Hemingway⁶⁾ Paschkis⁵⁾ らは下垂体切除ラットを用いての研究から生長ホルモンの関与を推測したが, コントロール群に比し 24 時間近く遅延するものの確実に再生するのでこの推測は否定された。また副腎摘除によっても肝再生は阻害されない。これらは体液性因子として下垂体ホルモンや副腎のホルモンの関与が低いことを示している。

Christensen & Jacobsen¹⁾ Moolten & Bucher²⁷⁾ らの Parabiosis 或は交叉循環による研究で, 肝切除を受けたラットの血液が正常肝の分裂指数,

DNA 合成を上昇させること^{2, 28)} 肝切除された動物に移植された肝に細胞分裂, DNA 合成が認められること²⁹⁾ 肝切除された動物の血清は正常肝の分裂指数を上昇させ^{5, 6, 30)} さらに線維芽細胞の増殖を促進すること³¹⁾ 等々肝切除された動物の血液中に体液性因子として細胞増殖を促進する物質か, それとも抑制機構を解除する物質が存在する可能性が強く示唆された。しかし Fisher ら⁷⁾ により肝全摘を受けたラットとの Parabiosis でも正常肝の DNA 合成が上昇することが示され, 細胞増殖促進物質が肝臓由来のものに限定されないことも明らかとなった。彼は門脈血中に脾由来のミトコンドリア促進因子 (MSF) が存在することを推測し, また本庄ら⁸⁾ は門脈結紮による実験から MSF は脾由来の物質であり本体はインスリンであると報告している。また Paul³²⁾ は肝再生ラットの血清から培養細胞増殖因子を, Morley & Kingdon³³⁾ は肝細胞の DNA 合成促進物質を抽出し, それが分子量 26,000 の蛋白物質であると報告した。遠田ら³⁴⁾ は部分肝切除により血中 α_1 -グロブリンの変動を認め, α_1 -グロブリンの肝細胞増殖抑制因子は α_1 -酸性糖蛋白 (α_1 -AG) であり, 部分肝切除により肝細胞内の α_1 -AG が血中に放出され細胞内濃度が低下するため脱制御されて増殖促進がおけると推論している。また三浦ら^{35, 36)} も肝細胞増殖制御物質の報告をしている。Teir & Ravanti³⁷⁾ は成熟ラット肝よりも幼若ラット肝の浮遊液により強い増殖促進作用のあることを認め, Blomqvist³⁸⁾ は新生仔肝或は再生肝ホモジネートにはさらに強力な増殖促進効果を認めている。また Paschkis³⁹⁾ も再生肝から Growth promoting agents の遊離 (分泌) があるのではないかと推論している。さらに Marshake & Walker⁴⁰⁾ Kelly & Jones⁴¹⁾ らも肝抽出物に細胞増殖や DNA 合成促進効果のあることを報告している。また Stich ら^{10, 42)} は正常肝のミクロゾーム画分が再生肝の分裂指数を低下させるが, 再生肝のそれは無効と報告し, 大塚・寺山¹¹⁾ も腹水肝癌の DNA 合成を抑制する正常肝抽出物質が再生肝には存在しないことを報告し, 本体はアルギナーゼであろうと推察した。

次に再生肝における肝再生応答機構を解析する場合, 肝再生誘導による残存肝における核酸・蛋白合成系酵素群の活性化と分解酵素群の不活性化も合目的に行われているが⁴³⁻⁵⁰⁾ 各々の酵素群の変換は, “細胞性制御因子” そのものではなく, 制御因子により 2 次的に誘導された結果と考えるのが妥当である。

そこで著者の報告した蛋白性の“肝細胞性制御因子”は、体液性情報入力の変換にตอบสนองして環状ヌクレオチドや核蛋白磷酸化活性酵素などと相関し乍ら、核酸・蛋白合成系に直接・間接に効果を及ぼしている」と推察し得る。勿論この報告に述べている両因子の制御機構における真の機能を解析するには、精製をはじめ多くの実験が積み重ねられなければならないが、少なくともこの様な制御因子が上清中にも存在し部分肝切除という入力に対応した活性変換を示すという事実は、一般論としての“細胞増殖制御系”における細胞性因子の重要性を強く示唆するものである。

この論文において報告した結果は、同一肝上清中に線維芽細胞の増殖を抑制及び促進する物質が共存し、これらの両物質が肝再生誘導により合目的に活性変化を示すということである。エタノール分画法という比較的簡単な方法で分離される粗画分は、正常肝からの画分は線維芽細胞の増殖を強く抑制するが、再生誘導肝から同一方法で得られる再生肝画分ではその抑制活性が消失しており、さらに術後72時間のP45においても殆ど抑制活性は回復しておらず、残存肝が回復するには目的に合った変化である。しかし肝再生誘導による促進因子の活性化は認められず、肝再生は抑制因子の失活に大きく依存していることを強く示唆している。唯、ここには示さないが核酸・蛋白合成に対する促進因子の効果はN→R変換により著しく活性化される結果もあり、促進因子の関与も否定はできない。

次に抑制因子が如何なる機構により失活するかを考察すると、(i)量的な変化(抑制因子の減少)、(ii)質的な変化(因子そのものの物性変化或は抗抑制因子の活性化)、(iii)量的質的な変化が同時におこる場合が考えられる。(i)は肝湿重量に対する各画分の収量はN45=4.2%, N70=0.5%, R45=3.8%, R70=0.3%で粗分画であるため厳密には断定できないが量的な変化の可能性は低いと推察できる。(ii)の場合DEAE-celluloseクロマトグラフィーによる分画で、分画前の粗画分においてはまったく抑制活性を示さなかったR45から、N45と同程度の抑制活性画分が回収されたことは、肝再生誘導によりN45の抑制活性をマスクしていた“抗抑制因子”ともいふべきものが、DEAE-cellulose分画法により他の画分(例えばNaCl画分)に分離されたか、或は失活したことにより、マスクされていた抑制因子の効果が再び回収された可能性を示している。さらに Polyacry-

lamid gel電気泳動のパターンによりこの可能性はさらに強められた。即ち、N45では認められないpeakがR45でより低分子(陽極)側に出現したことである。またこのpeakは術後72時間のP45にも僅か乍ら残存しており、これらのことは一層質的な変化、即ち、抗抑制因子物質の新生或は活性化により、再生肝においては抑制因子が失活状態になり増殖が促されると考えられる。

これらの因子が細胞増殖を如何に制御しているかをみると、G₁~G₁後期に静止しているであろうL-細胞に各試料を作用させ増殖を開始させた後の放射活性前駆物質の取込み実験で、N45はS~G₂期の細胞のDNA合成を最も強力に抑制し、次でRNA・蛋白合成の順で抑制する。一方R45はDNA合成に対して全然抑制作用を示さず、N→R変換による抑制活性の失活はDNA合成抑制低下によるものと推察し得る。この様な抑制因子の作用機作についてはオートラジオグラフィーやキネティックな分析等今後さらに検討を加えなくてはならないが、少なくともDNA合成に対する抑制効果が最も著しいことなどから、細胞内に取込まれてから機能している可能性が強い。

結 語

ラットに部分肝切除を施行し、肝再生誘導時に惹起される残存肝細胞の応答機構を研究した。

1) ラット同一肝上清中に線維芽細胞増殖抑制因子と促進因子が共存し、エタノール分画法で分離された。

2) これら抑制因子と促進因子は熱処理により失活する蛋白性物質であり、お互に拮抗作用を有する。

3) 再生肝の同一画分では、促進画分は不変であるが、抑制同一画分は殆ど失活し、このことは肝再生にとって極めて合目的である。

4) 再生肝抑制同一画分のDEAE-cellulose分画で抑制活性が回収され、また同じくPolyacrylamid gel電気泳動で、正常肝抑制画分には存在しない新しいpeakが認められた。このことは肝再生誘導による新たな抗抑制因子の出現を示唆するものである。

本論の要旨は第47回日本生化学会大会及び第35回日本癌学会総会において発表した。

稿を終るに当り、御指導、御校閲下された恩師西田勇教授に深く感謝致しますと共に、終始御指導、御校閲下された畠瀬修講師に感謝致します。また種

々御協力いただいた第一生理学教室員各位に感謝致します。

文 献

- 1) Christensen, B. G. and Jacobsen, E.: Studies on liver regeneration. *Acta Med. Scand.* (Supple.), **234**, 103, 1949.
- 2) Bucher, N. R. L., Scott, J. F. and Aub, J. C.: Regeneration of the liver in parabiotic rats. *Cancer Res.*, **11**, 457, 1951.
- 3) Onda, H. and Yoshikawa, J.: Presence of hepatocyte-specific mitotic inhibition in normal rat plasma. *GANN*, **64**, 139, 1973.
- 4) Cater, D. B., Holmes, B. E. and Mee, L. K.: The effect of growth hormone upon cell division and nucleic acid synthesis in the regenerating liver of the rat. *Biochem. J.*, **66**, 482, 1957.
- 5) Paschkis, K. E.: Growth-promoting factors in tissues. *Cancer Res.*, **18**, 981, 1958.
- 6) Adibi, S., Paschkis, K. E. and Cantarow, A.: Stimulation of liver mitosis by blood serum from hepatectomized rats. *Exptl. cell Res.*, **18**, 396, 1959.
- 7) Fisher, B., Szuch, P., Levine, M. and Fisher, E. R.: A portal blood factor as the humoral agent in liver regeneration. *SCIENCE*, **171**, 575, 1971.
- 8) 小沢和恵, 山岡義生, 本庄一夫: 再生肝と門脈血内の因子. *医学の歩み*, **88**(7), 283, 1974.
- 9) Sakai, A.: Humoral factor triggering DNA synthesis after partial hepatectomy in the rat. *Nature*, **228**, 1186, 1970.
- 10) Stich, H. F. and Florian, M. L.: The presence of a mitosis inhibitor in the serum and liver of adult rats. *Canad. J. Biochem. Physiol.* **36**, 855, 1958.
- 11) Otsuka, H. and Terayama, H.: Inhibition of DNA synthesis in ascites hepatoma cells by normal liver extract. *Biochem. Biophys. Acta*, **123**, 274, 1966.
- 12) Nakahara, W. and Fukuoka, F.: Carcinostatic liver factor: I. Effect *in vitro* of homologous liver extract on viability of Ehrlich ascites carcinoma cells. *GANN*, **52**, 197, 1961.
- 13) Nisida, I. and Murakami, T. H.: Antimitotic action of cornin as a biologically active polypeptide. I. Biological properties of cornin. *Acta Med. Okayama*, **19**, 1, 1965.
- 14) Bullough, W. S. and Laurence, E. B.: Epidermal Chalone and mitotic control in the VX₂ epidermal tumor. *Nature*, **220**, 134, 1968.
- 15) Szent-Györgyi, A.: Studies on growth. *Current Therapeutic Res.* **7**(1), 85, 1965.
- 16) Gospodarowicz, D. and Moran, J.: Stimulation of division of sparse and confluent 3T3 cells population by a fibroblast growth factor, dexamethazone and insuline. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, **71**(2), 4584, 1974.
- 17) Beadle, D. J. and Harris, L. W.: Relationship between freezing rate, ultrastructure and recovery in a human diploid cell line. *J. Cell Sci.*, **15**, 419, 1974.
- 18) Rubin, H.: Chick embryo cells. In Kruse, P. F. and Patterson, M. K. ed. *Tissue culture*. **119**, Academic Press, 1973.
- 19) Wolf, L., Kohler, N., Roehm, C. and Lipton, A.: Initiation of DNA synthesis in mouse 3T3 fibroblast in response to a specific factor. *Exptl. Cell Res.*, **92**, 63, 1975.
- 20) Higgins, G. M. and Anderson, R. M.: Experimental pathology of the liver. *Archives of Pathology*, **12**, 186, 1931.
- 21) Grisham, J. W.: Morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver: Autoradiography with thymidine-³H. *Cancer Res.*, **22**, 842, 1962.
- 22) Hogeboom, G. H.: Fractionation of cell components of animal tissues. *Method in Enzymology*

- (Academic press), 1, 16, 1955.
- 23) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **93**, 265, 1951.
 - 24) Rudland, P.: Control of translation in cultured cells: Continued synthesis and accumulation of messenger RNA in non dividing cultures. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.* **71**, 750, 1974.
 - 25) Davis, B. J.: Disc electrophoresis II, Method and application to human serum proteins. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **121**, 404, 1964.
 - 26) Hemingway, J. T. and Cater, D. B.: Effect of pituitary hormones and cortisone upon liver regeneration in the hypophysectomized rat. *Nature*, **12**, 1065, 1958.
 - 27) Moolten, F. L. and Bucher, N. L. R.: Regeneration of rat liver: Transfer of humoral agent by cross circulation. *SCIENCE*, **158**, 272, 1963.
 - 28) Sakai, A. and Kountz, S. L.: Stimulation of hepatocytes and lymphocytes *in vitro* by liver degeneration. *Nature*, **257**, 53, 1975.
 - 29) Leong, G. F., Grisham, J. W., Hole, B. V. and Albright, M. L.: Effects of partial hepatectomy on DNA synthesis and mitosis in heterotopic autografts of rat liver. *Cancer Res*, **24**, 1496, 1964.
 - 30) Zimmerman, M. and Celozzi, E.: Stimulation of cell division in normal rat liver by a factor in serum from hepatectomized rats. *Fed. proc. (supple)*, **19**, 139, 1960.
 - 31) Grisham, J. W., Kaufman, D. G. and Alexander, R. W.: ³H-thymidine-labeling of rat liver cells cultured in plasma from sham- or partially hepatectomized rat. *Fed. proc.*, **26**, 624, 1967.
 - 32) Paul, D., Leffert, H., Sato, G. and Holly, R. W.: Stimulation of DNA and protein synthesis in fetalrat liver cells by serum from partially hepatectomized rats. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.*, **69**, 374, 1972.
 - 33) Morley, C. G. D. and Kingdon, H. S.: The regulation of cell growth, identification and partial characterization of DNA synthesis stimulating factor from the serum of partially hepatectomized rats. *Biochem. Biophys. Acta*, **308**, 260, 1973.
 - 34) 遠田裕政: 再生肝における細胞分裂の制御機構に関する研究(第6報). 第35回日本癌学会総会記事, 208, 1976.
 - 35) Fukui, N., Fujita, A., Otsuka, H. and Miura, Y.: Induction of thyrosinetransaminase and ornithine decarboxylase in isolated perfused regenerating rat liver. *J. Biochem.*, **75**, 867, 1974.
 - 36) 三浦義彰, 福井紀子: 肝細胞の再生の調節機構. 医学の歩み, **89**(11), 619, 1974.
 - 37) Teir, H. and Ravanti, K.: Mitotic activity and growth factors in the liver of the white rat. *Exptl. Cell Res.*, **5**, 500, 1953.
 - 38) Blomqvist, K.: Growth stimulation in the liver and tumour development following intraperitoneal injections of liver homogenate in the rat. *Acta Pathol. et Microbiol. Scand. (Supple.)*, **131**, 1957.
 - 39) Paschkis, K. E., Cantarow, A., Stasney, J. and Hobbs, J. H.: Tumor growth in partially hepatectomized rat. *Cancer Res.*, **15**, 579, 1955.
 - 40) Marshake, D. and Walker, A. C.: Effect of liver fractions on mitosis in regenerating liver. *Am. J. Physiol.*, **143**, 226, 1945.
 - 41) Kelly, L. S. and Jones, H. B.: Influence of homologous tissue factors on DNA turn over and radiation protection. *Am. J. Physiol.* **172**, 575, 1953.
 - 42) Stich, H. F.: Regulation of mitotic rate in mammalian organism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **90**, 603, 1960.
 - 43) Fujioka, M., Koga, M. and Lieberman, I.: Metabolism of ribonucleic acid after partial he-

- patectomy. J. Biol. Chem., **238**, 3401, 1963.
- 44) Church, R. B. and McCarthy, B. J.: Ribonucleic acid synthesis in regenerating and embryonic liver: I. The synthesis of new species of RNA during regeneration of mouse liver after partial hepatectomy. J. Mol. Biol. **23**, 459, 1967.
- 45) Tsukada, K. and Lieberman, I.: Synthesis of ribonucleic acid by liver nuclear and nucleolar preparations after partial hepatectomy. J. Biol. Chem, **239**, 2952, 1964.
- 46) Majumdar, C., Tsukada, K. and Lieberman, I.: Liver protein synthesis after partial hepatectomy. J. Biol. chem, **242**, 700, 1967.
- 47) 塚田欣司: 再生肝における DNA 合成の制御. 蛋白質・核酸・酵素, **18**(4), 249, 1973.
- 48) Perkarthy, J. M., Short, J., Lansing, A. and Lieberman, I.: Function and control of liver alkaline phosphatase. J. Biol. Chem, **247**, 1767, 1972.
- 49) McManus, J. P., Franks, D. J., Youdale, T. and Braceland, B. M.: Increase in rat liver cyclic-AMP concentrations prior to the initiation of DNA synthesis following partial hepatectomy or hormone infusion. B. B. R. C., **49**, 1201, 1972.
- 50) Tsukada, K.: Activity of serum ribonuclease after partial hepatectomy and acute stress in the rat. Biochem. Biophys. Acta, **186**, 21, 1969.

**Co-existence of inhibitory and stimulatory factors on cell proliferation
in a same rat liver supernatant and their regenerating changes**

by

Toshitake FUJII

The First Department of Physiology, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Isamu Nisida)

Responding mechanism of regenerating hepatocytes induced by partial hepatectomy was studied.

- 1) Fibroblast inhibitory and stimulatory factors on fibroblast proliferation co-exist in the same rat liver supernatant, and they were simply isolated each other by ethanol fractionation.
- 2) These factors have protein components and lose the biological activities by heat-treatment, and they show the competitive activity each other, respectively.
- 3) In regenerating liver, stimulatory factor(s) was not remarkably changed, but inhibitory one almost lost the inhibitory activity. These phenomena are very rational and suitable for hepatocyte regeneration.
- 4) The inhibitory activity was separatedly eluted by DEAE-cellulose chromatography of inactive regenerating liver fraction, and new peak that did not exist in normal inhibitory fraction was detected in polyacrylamid gel electrophoresis of regenerating liver same fraction.
- 5) These phenomena suggest that a possible new anti-inhibitory factor(s) would be formed by partial hepatectomy.