

Prostaglandin E₁ の肝細胞障害防御作用に関する実験的研究

—ラット初代培養肝細胞を用いた

D-galactosamine 惹起性肝細胞障害モデルによる検討—

奈良県立医科大学第3内科学教室

松本昌美

STUDY ON CYTOPROTECTIVE EFFECT OF PROSTAGLANDIN E₁
ON THE D-GALACTOSAMINE-INDUCED INJURY
OF RAT HEPATOCYTES IN PRIMARY CULTURE

MASAMI MATSUMOTO

The Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received September 29, 1994

Abstract: The cytoprotective effect of prostaglandin E₁ (PGE₁) on the D-galactosamine (GalN)-induced injury of rat hepatocytes in primary culture was investigated. The LDH release from the GalN (1 mg/ml)-treated hepatocytes was suppressed in the presence of PGE₁ (10⁻⁶ and 10⁻⁵ M). PGE₁ (10⁻⁷ and 10⁻⁶ M) had a tendency to inhibit the reduction of albumin secretion in the GalN-treated hepatocytes. The decreases of intracellular phospholipids and cholesterol in the GalN-treated hepatocytes were completely restored in the presence of PGE₁ (10⁻⁵ M). Though fatty acid composition in the GalN-treated hepatocytes showed an increase in linoleic acid level, and decreases in oleic acid and palmitoleic acid levels, these decreases were not affected by PGE₁ addition. PGE₁ (10⁻⁶ and 10⁻⁵ M) raised cyclic AMP (cAMP) release from the GalN-treated hepatocytes. Dibutyl cAMP also depressed LDH release from the GalN-treated hepatocytes. After a two-hour treatment with GalN (1 or 10 mg/ml), hepatocytes showed an enhanced specific binding to [³H]PGE₁. Scatchard plot analysis indicated that GalN treatment increased the number of the binding sites to [³H]PGE₁. It is confirmed in the present study that PGE₁ has cytoprotective effects on experimental hepatocellular injury. Also, it is suggested that these cytoprotective effects of PGE₁ could be at least in part associated with the cAMP-dependent mechanism enhanced probably by the increase of specific PGE₁ receptors in the early stage of hepatocellular injury.

Index Terms

prostaglandin E₁, primary culture of hepatocytes, D-galactosamine, cytoprotection, cyclic AMP

緒 言

prostaglandin (PG)は、アラキドン酸などの炭素数20個の高度不飽和脂肪酸からシクロオキシゲナーゼにより

合成される生理活性物質の総称で、その生物学的作用はきわめて多岐にわたるが、合成経路によりいくつかのグループに分類されている¹⁾。その中でも、prostaglandin E₂ (PGE₂)および prostaglandin I₂ (PGI₂)は、それぞれ

の合成酵素により prostaglandin H₂ から合成され、PGE₂ の誘導体である 16, 16-dimethyl prostaglandin E₂ (dmPGE₂) とともに、胃粘膜障害に対して細胞保護作用を示すことがまづ明らかにされた^{2,3)}。さらに、その細胞保護作用は他臓器においても発揮される可能性が近年注目されてきており、肝障害に対しても、四塩化炭素 (CCl₄)、D-galactosamine (GalN)、acetaminophen などを用いた in vivo または in vitro の実験的肝障害モデルにおいて、prostaglandin E₁ (PGE₁)^{4,5)}、PGE₂⁶⁾、dmPGE₂⁷⁻¹⁰⁾ および PGI₂¹¹⁾ などが、肝細胞壊死の抑制を中心とした防御的作用を示すことが報告されている。しかし、その防御作用の詳細や機序についてはいまだ未解明の点が多い。

著者らは先に、GalN 投与ウサギ急性肝不全モデルにおいて、PGE₁ が肝、腎および胃粘膜血流量を改善させ、肝不全に伴う脳浮腫、腎障害などの多臓器不全を予防することにより、延命効果をもたらすことを報告した¹²⁾。本研究では、PGE₁ の障害肝細胞に対する直接的な作用について、ラット初代培養肝細胞に GalN を添加して作成した in vitro の肝細胞障害モデルを用いて検討をおこなった。PGE₁ の障害防御作用については、遊離酵素、アルブミン合成能、脂質組成の変化などへの影響を中心に検討し、PGE₁ は障害肝細胞の viability および機能に対して保護作用を示すことが明らかとなった。さらに、その作用機序の解明のため、PGE₁ の細胞内 second messenger のひとつと考えられる cyclic AMP (cAMP) の関与ならびに肝細胞への特異的 PGE₁ 結合能の変化についても検討を加えたので報告する。

材料と方法

1. 試薬

PGE₁ は小野薬品株式会社より、dibutyl cAMP (DBcAMP) は第一製薬株式会社より供与された。collagenase Type I, insulin, dexamethasone および actinomycin D は Sigma 社より、Williams' E medium (WE), N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (HEPES) および fetal bovine serum (FBS) は Flow 社より、rabbit anti-rat albumin antiserum は Cooper 社より購入した。[5, 6-³H(N)]PGE₁ (60 Ci/mmol) は New England Nuclear 社より、GalN, cycloheximide, CCl₄, シンチレーション液およびその他の試薬はナカライテスク株式会社より購入した。

2. 肝細胞の初代培養

肝細胞は、体重約 200 g の Sprague-Dawley 系雄性ラット (日本 SLC 株式会社) から、コラゲナーゼ灌流法¹³⁾ お

よび低速遠心法により分離した。10% FBS, insulin (1 μM), dexamethasone (1 μM) および HEPES (10 mM) を含む WE に肝細胞を浮遊させ (5 × 10⁵ cells/ml), 10⁵ cells/cm² の密度で Corning plastic dish に播種し、37°C, 5% CO₂ および 95% 空気の条件下で単層培養を開始した。24 時間培養後、medium を FBS, insulin および dexamethasone を含まない WE に交換し、さらに 24 時間培養した後、以下の実験に供した。

3. GalN による肝細胞障害に対する PGE₁ の影響

1) LDH 活性

肝細胞を GalN (0 または 1 mg/ml) および PGE₁ (0, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ または 10⁻⁵ M) 含有 WE で 24 時間培養後、medium 中の LDH 活性を測定した。

2) アルブミン合成能

肝細胞を GalN (0 または 1 mg/ml) および PGE₁ (0, 10⁻⁷ または 10⁻⁶ M) 含有 WE で 24 時間培養後、medium を回収し、Minicon Concentrater (Grace 社) にて 100 倍に濃縮した後、肝細胞から分泌されたアルブミン量を single radial immunodiffusion 法にて測定した。

3) 肝細胞内リン脂質、コレステロールの定量および脂肪酸分析

肝細胞を GalN (0 または 1 mg/ml) および PGE₁ (0 または 10⁻⁵ M) 含有 WE で 12 時間培養し、次いで薬剤無添加 WE でさらに 12 時間培養した後、トリプシン処理により細胞を回収した。凍結融解と超音波により細胞を破砕した後、Folch 液 (クロロホルム: メタノール, 2:1) で脂質を抽出し、細胞内リン脂質およびコレステロール量を酵素法で測定するとともに、ガスクロマトグラフィーによる脂肪酸分析をおこなった。

4) cAMP 分泌量

肝細胞を GalN (0 または 1 mg/ml) および PGE₁ (0, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ または 10⁻⁵ M) 含有 WE で 24 時間培養後、medium 中の cAMP 量を RIA 法にて測定した。

4. GalN による肝細胞障害に対する DBcAMP の影響

肝細胞を GalN (0 または 1 mg/ml) および DBcAMP (0, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ または 10⁻³ M) 含有 WE で 24 時間培養後、medium 中の LDH 活性を測定した。

5. 肝細胞の特異的 PGE₁ 結合能

肝細胞を GalN (0, 1 または 10 mg/ml) 含有 WE で 2 時間または 4 時間処理後、[³H]PGE₁ (5 nM) を含む WE に交換し、37°C で 30 分間反応させた。1, 5, 10, 15, 20 および 30 分の各時点で、肝細胞を冷却した WE で 2 回洗浄後、1 N NaOH を 1 ml 添加して回収し、シンチレーション液を加え、肝細胞に結合した [³H]PGE₁ を液体シ

ンチレーションカウンターにて測定した。この際、総結合と非標識 PGE₁ (10⁻⁶ M) 添加により得た非特異的結合の差をもって特異的 [³H]PGE₁ 結合とした。

cycloheximide (5 μg/ml), actinomycin D (1 μg/ml) または CCl₄ (800 μg/ml) で 2 時間処理後の [³H]PGE₁ 結合能についても同様に測定した。

また、肝細胞を GalN (0 または 1 mg/ml) 含有 WE で 2 時間処理後、 [³H]PGE₁ (5 nM) を種々の濃度 (0~10⁻⁵ M) の非標識 PGE₁ とともに添加し、4 °C で 60 分間反応させ、肝細胞に結合した [³H]PGE₁ を測定して、特異的 [³H]PGE₁ 結合の competition curve を作製した。さらに、Scatchard plot analysis にて解離定数 (Kd) および最大結合能 (Bmax) を求めた。

6. 統計学的検定

平均の差の検定は Student の t 検定でおこない、危険率 5 % 未満を有意とした。

成 績

1. GalN 添加後の medium 中 LDH 活性と PGE₁ 併用による影響 (Fig. 1)

ラット初代培養肝細胞に GalN (1 mg/ml) を単独添加 24 時間後の medium 中 LDH 活性は、Control に比べ約 2 倍の値を示していたが、PGE₁ 10⁻⁶ および 10⁻⁵ M の同

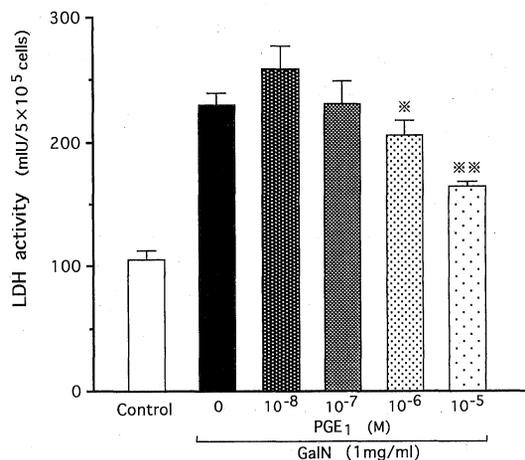


Fig. 1. Effect of PGE₁ on LDH release from the GalN-treated hepatocytes.

Data are means ± SD of triplicate determinations. * ; p < 0.05, ** ; p < 0.01, compared with the value in the absence of PGE₁. Hepatocytes were incubated in the medium containing GalN (0 or 1 mg/ml) and PGE₁ (0, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ or 10⁻⁵ M) for 24h. LDH activity was determined with collected medium.

時添加により、LDH 活性上昇は有意に抑制され、10⁻⁵ M では、GalN 添加による LDH 活性上昇は約半分まで抑制された。

2. GalN 添加時のアルブミン合成能と PGE₁ 併用による影響 (Table 1)

GalN 単独添加 24 時間後の medium 中に分泌されたアルブミン量は、Control の半分に減少していた。一方、GalN に PGE₁ 10⁻⁷ あるいは 10⁻⁶ M を同時添加すると、このアルブミン分泌量の低下は抑制された。

3. GalN 添加後の肝細胞内脂質組成と PGE₁ 併用による影響 (Table 2, 3)

GalN 添加後、回収した細胞中のリン脂質および総コレステロール量は、それぞれ Control の 38.9%, 35.7% に減少していた。GalN と PGE₁ の同時添加時には、リン脂質および総コレステロール量はそれぞれ Control の 108.3%, 92.9% のレベルを保持していた (Table 2)。

脂肪酸組成では、GalN 添加によりリノール酸 C 18 : 2 の比率の増加とオレイン酸 C 18 : 1 とパルミトレイン酸

Table 1. Effect of PGE₁ on the albumin secretion from the GalN-treated hepatocytes

	Albumin secretion (μg/ml/24 h)
Control	1.4
GalN (1 mg/ml)	0.7
GalN (1 mg/ml) + PGE ₁ (10 ⁻⁷ M)	2.0
GalN (1 mg/ml) + PGE ₁ (10 ⁻⁶ M)	1.2

Data are means of duplicate assay, in which each difference was below 10%. Hepatocytes were incubated in the medium containing GalN (0 or 1 mg/ml) and PGE₁ (0, 10⁻⁷ or 10⁻⁶ M) for 24 h. Twenty-four hour-cultured medium was concentrated 100-fold and used for the determination of albumin by single radial immunodiffusion.

Table 2. Effects of PGE₁ on intracellular contents of phospholipids and cholesterol in the GalN-treated hepatocytes

	Phospholipids (mg/7.5 x 10 ⁶ cells)	Cholesterol (mg/7.5 x 10 ⁶ cells)
Control	72	28
GalN (1 mg/ml)	28	10
GalN (1 mg/ml) + PGE ₁ (10 ⁻⁵ M)	78	26

Data are means of duplicate assay, in which each difference was below 10%. Hepatocytes were incubated in the medium containing GalN (0 or 1 mg/ml) and PGE₁ (0 or 10⁻⁵ M) for 12 h, and subsequently incubated in the medium without these agents for 12 h. The cells were collected by trypsinization, sonicated for disruption and used for extraction of lipids.

Table 3. Effect of PGE₁ on fatty acid composition in the GalN-treated hepatocytes

	Control	GalN (1 mg/ml)	GalN (1 mg/ml) +PGE ₁ (10 ⁻⁵ M)
C 16 : 0	31.5	28.0	34.0
C 16 : 1	3.2	1.3	0.7
C 18 : 0	17.4	18.1	18.4
C 18 : 1	23.1	13.6	13.8
C 18 : 2	4.5	16.1	16.0
C 18 : 3 (n-6)	0.2	0.2	0.0
C 18 : 3 (n-3)	0.2	0.2	0.2
C 20 : 3	0.8	0.6	0.5
C 20 : 4	11.9	14.8	10.7

Data are means of duplicate assay and represented as % of total fatty acid, in which each difference was below 10%. Hepatocytes were incubated in the medium containing GalN (0 or 1 mg/ml) and PGE₁ (0 or 10⁻⁵ M) for 12 h, and subsequently incubated in the medium without these agents for 12 h. The cells were collected by trypsinization, sonicated for disruption and used for extraction of lipids. Fatty acid composition was determined by gas chromatography.

C 16 : 1 の比率の低下が認められ、n-6 系の(C 20 : 3 + C 20 : 4)/C 18 : 2 比、すなわちリノール酸不飽和化指数の著明な低下が認められた。また、PGE₁ の併用は、GalN によるこれらの変化にはほとんど影響を与えなかった (Table 3)。

4. GalN 添加時の肝細胞 cAMP 分泌量と PGE₁ 併用による影響 (Fig. 2)

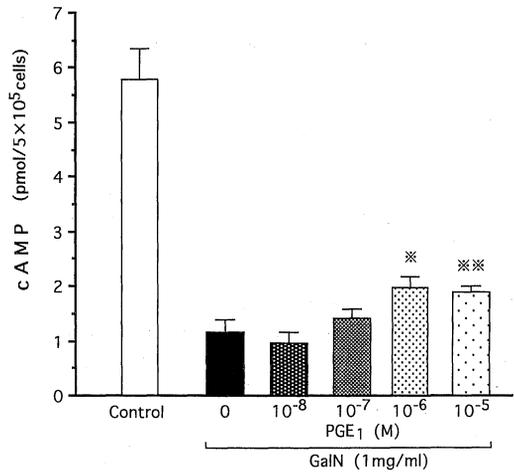
GalN 単独添加 24 時間後の medium 中への cAMP 分泌量は、Control に比して著明な低下を示していた。GalN と PGE₁ を同時添加した場合、10⁻⁶ および 10⁻⁵ M の PGE₁ 濃度において、cAMP 分泌量は GalN 単独添加時のそれぞれ 168.1%、162.4% を示し、この増加は有意であった。

5. GalN 添加時の遊離 LDH 活性に及ぼす DBcAMP 併用の影響 (Fig. 3)

GalN と同時に DBcAMP を培養液に添加し、24 時間後の medium 中 LDH 活性をみると、DBcAMP は 10⁻⁵、10⁻⁴ および 10⁻³ M の濃度において、GalN 単独添加時に増加していた LDH 活性を有意に抑制した。

6. PGE₁ の GalN 処理肝細胞への特異的結合能 (Fig. 4-7, Table 4)

肝細胞培養系に [³H]PGE₁ を添加し、肝細胞への特異的 [³H]PGE₁ 結合の時間的推移を検討すると、[³H]PGE₁ 添加後 30 分まで結合は増加し続けたが、肝細胞をあらかじめ GalN (1 または 10 mg/ml) で 2 時間処理し

Fig. 2. Effect of PGE₁ on cAMP release from the GalN-treated hepatocytes.

Data are means ± SD of triplicate determinations. * ; p < 0.05, ** ; p < 0.01, compared with the value in the absence of PGE₁. Hepatocytes were incubated in the medium containing GalN (0 or 1 mg/ml) and PGE₁ (0, 10⁻⁸, 10⁻⁷, 10⁻⁶ or 10⁻⁵ M) for 24h. cAMP was determined by RIA with collected medium.

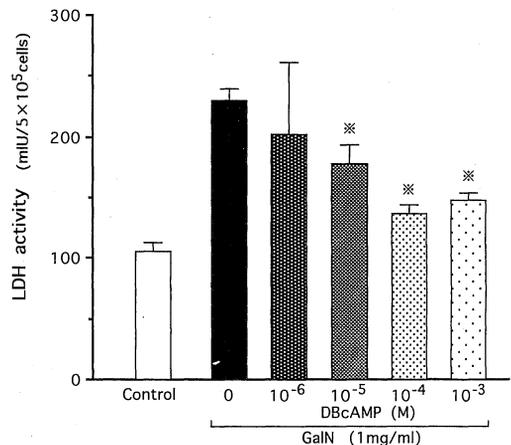


Fig. 3. Effect of DBcAMP on LDH release from the GalN-treated hepatocytes.

Data are means ± SD of triplicate determinations. * ; p < 0.01, compared with the value in the absence of DBcAMP. Hepatocytes were incubated in the medium containing GalN (0 or 1 mg/ml) and DBcAMP (0, 10⁻⁶, 10⁻⁵, 10⁻⁴ or 10⁻³ M) for 24h. LDH activity was determined with collected medium.

Table 4. Effects of various agents on specific binding of [³H]PGE₁ to hepaetocytes

	Binding rate (% of control)	
	15 min	30 min
Control	100.0±5.97	100.0±6.52
GalN(1 mg/ml)	142.5±9.24 **	127.6±7.89 *
GalN(10 mg/ml)	158.9±0.48 **	147.7±4.02 **
Cycloheximide(5 μg/ml)	141.5±13.07 **	107.0±11.85
Actinomycin D(1 μg/ml)	131.6±3.36 **	107.7±3.73
CCl ₄ (800 μg/ml)	116.8±3.81 *	121.5±8.71 *

Data are means±SD of triplicate determinations.
 *p<0.05, **p<0.01, compared with control value at the same time point. Hepatocytes were incubated for 2h in the medium containing each of various agents described in table. Subsequently, bindings were determined from the hepatocytes harvested 15 and 30 min after replacement of the medium by fresh medium containing the labeled PGE₁ (5 nM).

ておくと、この特異的[³H]PGE₁結合はGalN濃度依存性に亢進した(Fig. 4, Table 4). しかし、GalN処理時間を4時間とすると、もはやGalNによる[³H]PGE₁結合亢進は認められなかった(Fig. 5). なおこの際、medium中のLDH活性は、GalN(10 mg/ml)2時間処理(36.3±9.80 mIU/ml/5×10⁵ cells)ではControl(24.5±5.23 mIU/ml/5×10⁵ cells)に比して有意な増加はなく、GalN(10 mg/ml)4時間処理(88.7±15.50 mIU/ml/5×10⁵ cells)ではControl(45.3±2.08 mIU/ml/5×10⁵ cells)に比して有意に(p<0.01)増加していた。

cycloheximideあるいはactinomycin Dで2時間処理をおこなった場合も、[³H]PGE₁添加後15分の肝細胞のPGE₁結合能は、Controlに比して有意に増加した。また、CCl₄の2時間処理では、GalNと同様に[³H]PGE₁添加後15分および30分で肝細胞のPGE₁結合能は、Controlに比して有意に増加した(Table 4).

[³H]PGE₁(5 nM)と種々の濃度(0~10⁻⁵ M)の非標識PGE₁を添加しておこなった[³H]PGE₁結合のCompetition assayにおいても、GalN(1 mg/ml)2時間前処理により、肝細胞の特異的[³H]PGE₁結合は増加した(Fig. 6).

Scatchard plot analysisでは、肝細胞の[³H]PGE₁結合部位は2種類存在するか、あるいは負の協同性をもつことが示された。高親和性結合部位でのKdおよびBmaxは、Controlではそれぞれ11.2 nM, 290.4 fmol/10⁶ cellsで、GalN処理ではそれぞれ11.9 nM, 635.8 fmol/10⁶ cellsであり、Kd値に明らかな差はなく、GalN処理でBmax値の増加を認めた(Fig. 7).

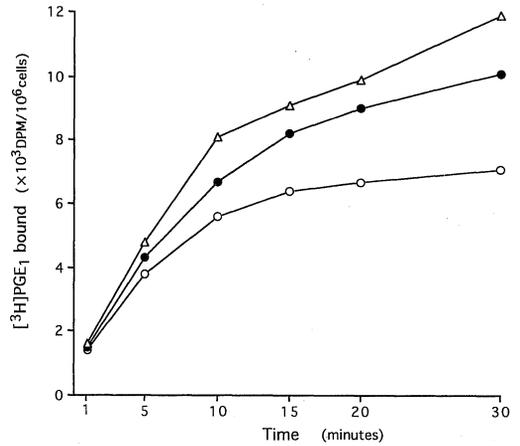


Fig. 4. Time course of specific [³H]PGE₁ binding to hepatocytes after 2h-treatment with GalN. ○; control, ●; GalN(1 mg/ml)-treated, △; GalN(10 mg/ml)-treated. Hepatocytes were incubated for 2h in the medium containing GalN (0, 1 or 10 mg/ml). Subsequently, bindings were determined from the hepatocytes harvested 1, 5, 10, 15, 20 and 30 min after replacement of the medium by fresh medium containing the labeled PGE₁ (5 nM).

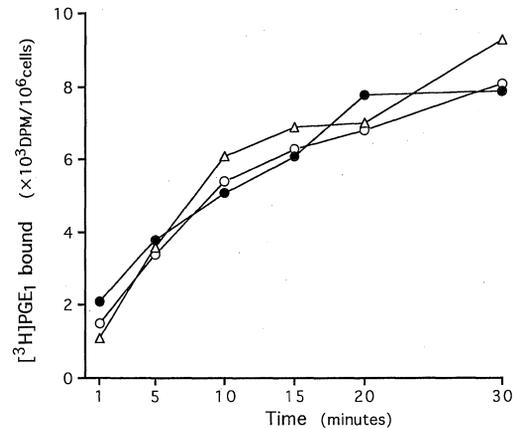


Fig. 5. Time course of specific [³H]PGE₁ binding to hepatocytes after 4h-treatment with GalN. ○; control, ●; GalN(1 mg/ml)-treated, △; GalN(10 mg/ml)-treated. Hepatocytes were incubated for 4h in the medium containing GalN (0, 1 or 10 mg/ml). Subsequently, bindings were determined from the hepatocytes harvested 1, 5, 10, 15, 20 and 30 min after replacement of the medium by fresh medium containing the labeled PGE₁ (5 nM).

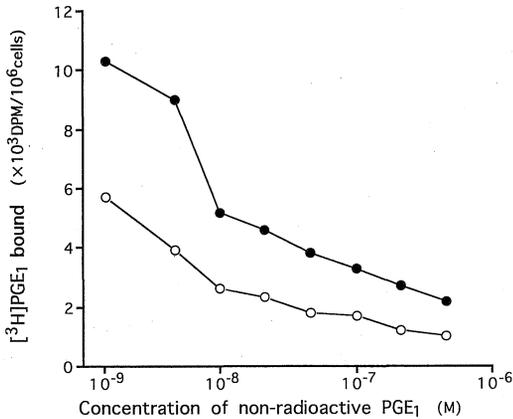


Fig. 6. Competition curve of specific [³H]PGE₁ binding to GalN-treated hepatocytes. ○; control, ●; GalN (1 mg/ml)-treated. Hepatocytes were incubated for 2h in the medium with and without GalN (1 mg/ml). [³H]PGE₁ binding was determined with the hepatocytes incubated in the medium containing the labeled PGE₁ (5 nM) and non-radioactive PGE₁ at various concentrations for one hour at 4°C.

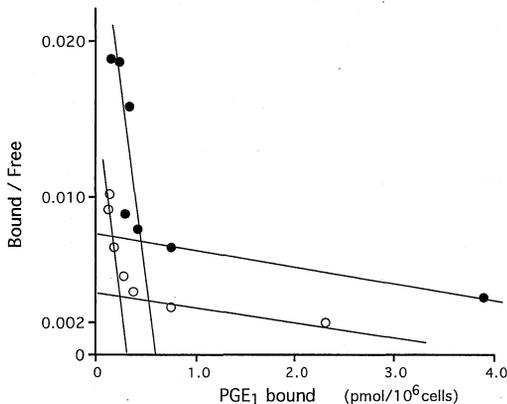


Fig. 7. Scatchard plot analysis of specific [³H]PGE₁ binding to GalN-treated hepatocytes. ○; control, ●; GalN (1 mg/ml)-treated. Hepatocytes were incubated for 2h in the medium with and without GalN (1 mg/ml). [³H]PGE₁ binding was determined with the hepatocytes incubated in the medium containing the labeled PGE₁ (5 nM) and non-radioactive PGE₁ at various concentration for one hour at 4°C.

考 察

GalN は実験動物においてヒトのウイルス肝炎類似の病理組織学的変化を引き起こす薬剤であり、その投与量を増すと肝細胞の広範な壊死のために、劇症肝炎様の病態を招来することが知られている¹⁴⁾。この機序については、GalN による直接的な肝細胞膜障害に加えて、エンドトキシン、補体、種々のサイトカインなどが複雑に関与することが示唆されている¹⁵⁾。

GalN による直接的な肝細胞障害は、GalN の galactose 代謝経路への侵入により、UDP-hexose および uridine phosphate の欠乏をきたし、これが RNA および蛋白合成障害を導く機構が考えられている^{16,17)}。この早期の可逆性の障害にひき続いて、細胞内 Ca²⁺ の増加¹⁸⁾、そして phospholipase の活性化がおこり、その結果、細胞膜の構造および機能に様々な障害が出現し、最終的な細胞壊死につながっていくものとされている¹⁷⁾。

本研究では、GalN による細胞壊死の指標である medium 中での LDH 活性の増加は、10⁻⁶ および 10⁻⁵ M の PGE₁ の添加によって有意に抑制され、PGE₁ による肝細胞壊死の防御作用が認められた。さらに、PGE₁ は GalN による肝細胞のアルブミン合成能の低下をも抑制したことから、PGE₁ は細胞壊死を防御するだけでなく、肝細胞機能を保持する作用を有していることが示唆された。肝細胞の脂質組成については、肝細胞内リン脂質およびコレステロール量は、GalN 処理により約 40% 減少したが、PGE₁ を添加するとそれらは Control とほぼ同レベルに保持され、この面でも、PGE₁ は著明な防御作用を示すことが明らかとなった。脂質成分の大きな変化は膜構造の変化と深い関係を有していることは確実であり、このことから、細胞膜構造の保持が PGE₁ の重要な作用点であることがうかがわれる。

ところで、PG の細胞障害防御作用の機序は、いまだ不明であるが、Ruwart¹⁹⁾らや Rush²⁰⁾らは、CCl₄ 肝障害において、dmPGE₂ は CCl₄ 由来の肝毒性物質 trichloromethyl free radical の産生を阻害することによって肝障害を抑制すると報告している。また、Sikujara²¹⁾らは、GalN または CCl₄ 肝障害における dmPGE₂ の細胞障害防御作用は、肝細胞膜およびライソゾーム膜の安定化によるものと報告している。石井⁹⁾は、ケノデオキシコール酸惹起性肝細胞障害に対する PGE₁ の防御作用について検討した結果、細胞障害と修復における PG の意義を以下のように要約している。すなわち、細胞に化学的あるいは物理的刺激が加わると phospholipase A₂ が活性化され、細胞膜のリン脂質からアラキドン酸が遊離して

cyclooxygenase の作用で PG となり、細胞外に遊離される。その結果、細胞膜のアラキドン酸が減少し、細胞膜の流動性が低下する。ここに外因性の PGE₁ を投与すると細胞膜のアラキドン酸量の減少を抑制し、細胞膜の流動性を維持することになり、細胞内代謝および細胞機能が保持されるとしている。

今回の成績で、脂肪酸組成に及ぼす GalN の影響については、GalN により C 18 : 2(n-6)比率の増加と C 18 : 1, C 16 : 1 比率の低下が認められた。C 18 : 1 および C 16 : 1 は、 Δ^9 -不飽和化酵素によりそれぞれ C 18 : 0 および C 16 : 0 から合成され、また、C 18 : 2(n-6)は、 Δ^6 -不飽和化酵素により C 18 : 3(n-6)へと代謝されることが知られているが、GalN による肝細胞脂肪酸組成の変化には、これら不飽和化酵素の活性低下が関与しているものと考えられた。このような脂肪酸組成の変化は、膜構成脂肪酸の変化に反映され、膜を不安定化させる要因のひとつになっていることが示唆されるが、PGE₁ はこれらの組成変化そのものには全く影響を与えておらず、PGE₁ の膜安定化作用の機序については、異なった作用点を考えねばならない。すなわち、PGE₁ は細胞膜に結合し、膜の分解離散の防御に関わるような構造的位置を占めるのではないかという推測も成り立つ。

一方、Ignaro²²⁾らは、PG の膜安定化作用は cAMP を介している可能性を示唆している。また、Kurebayashi²³⁾らは、in vivo の肝障害モデルにおいて、dmPGE₂ 投与により細胞内 cAMP が増加すること、また cAMP 誘導体のひとつである DBcAMP は、ラット肝特異的膜抗原に対するモノクローナル IgM 抗体投与時の遊離酵素の上昇を抑制することから、PG の細胞障害防御作用に cAMP が関与する可能性を指摘している。GalN 障害肝細胞を用いた本研究においても、 10^{-6} および 10^{-5} M の PGE₁ 添加時には、medium 中の LDH 活性上昇のみならず cAMP 量減少も抑制されたこと、さらに、DBcAMP の添加も GalN による LDH 活性の増加を抑制したことなどから、cAMP を介する代謝的改善作用が in vitro における PGE₁ の肝細胞障害防御作用の一端をになっている可能性が考えられた。

PG は通常、細胞に対して特異的なレセプターを介して作用すると考えられており²⁴⁾、また、その細胞内 mediator のひとつが cAMP であることから、in vitro における PGE₁ の細胞障害防御作用についてもレセプターを介した経路が重要と考えられる。そこで、肝細胞の特異的 PGE₁ 結合について検討したところ、遊離 LDH 活性が Control に比して上昇していない GalN 2 時間処理後の肝細胞では、特異的 PGE₁ 結合は GalN の濃度

依存性に増加していた。一方、遊離 LDH 活性が Control に比して有意に上昇している GalN 4 時間処理後の肝細胞では、特異的 PGE₁ 結合は GalN 処理で増加を示さなかった。すなわち、壊死のない肝細胞障害早期においては、特異的 PGE₁ 結合が増加しており、その後の細胞壊死が出現してくる時期には、特異的 PGE₁ 結合の増加現象は消失するものと考えられた。このことから、障害早期におこる細胞内での何らかの代謝的变化が、特異的 PGE₁ 結合の増加を導く可能性が示唆された。

PGE₁ は、甲状腺²⁵⁾、副腎髄質²⁶⁾および肝細胞膜^{27,28)}において、通常 2 種類の結合部位を有することがこれまで報告されている。ラット肝細胞膜においては、高親和性結合部位での Kd 値は 1.3 nM ²⁷⁾ または 17.6 nM ²⁸⁾ という報告があるが、本研究では、正常肝細胞の Kd 値は 11.2 nM 、GalN 障害肝細胞の Kd 値は 11.9 nM であり、両者の Kd 値はほぼ同レベルであった。一方、GalN 障害肝細胞の Bmax 値は $635.8 \text{ fmol}/10^6 \text{ cells}$ であり、正常肝細胞の Bmax 値 ($290.4 \text{ fmol}/10^6 \text{ cells}$) の 2 倍以上に高値であった。したがって、GalN 障害肝細胞における特異的 PGE₁ 結合の増加は、親和性の増強によるものではなく、PGE₁ 結合部位の増加によるものと考えられた。

特異的 PGE₁ 結合の増加は、蛋白合成阻害剤である cycloheximide、RNA 合成阻害剤である actinomycin D および代表的な肝毒性物質のひとつである CCl₄ の処理によっても認められたことから、このような PGE₁ 結合部位の up-regulation は、細胞構造を維持するためのある種の細胞ストレス反応として、一般的な反応である可能性が強いものと考えられた。また、肝障害早期には通常細胞表面に表出していない PGE₁ 結合部位の細胞表面への移行がおこっている可能性も考えられる。

in vivo の実験的肝障害モデルにおいて、PG は本研究のごとく障害誘発物質と同時に、それ以前に投与された時、あるいは障害誘発後ごく早期に投与された時のみ、細胞障害防御作用を示すことが知られており^{4,11)}、本研究でみられた細胞壊死にいたる以前の障害早期肝細胞における特異的 PGE₁ 結合の増加は、PGE₁ による細胞障害防御作用発現のために重要な役割をはたしている可能性が考えられた。

結 語

ラット初代培養肝細胞の GalN による in vitro 肝障害モデルを用いた検討により、PGE₁ の肝細胞障害防御作用に関して、以下の成績を得た。

1) PGE₁ (10^{-6} および 10^{-5} M) は、GalN (1 mg/ml) 添加時の肝細胞からの遊離 LDH 活性の増加を有意に抑制

した。

2) 肝細胞のアルブミン分泌量は, GalN(1 mg/ml) 添加により Control の半分に減少したが, PGE₁(10⁻⁷ および 10⁻⁶ M) の同時添加によりこの減少は抑制される傾向にあった。

3) PGE₁(10⁻⁸ M) は, GalN(1 mg/ml) による肝細胞でのリン脂質および総コレステロール量の減少をほぼ完全に抑制した。

4) GalN(1 mg/ml) により, 肝細胞内脂肪酸組成でのリノール酸比率の増加とオレイン酸, パルミトレイン酸比率の低下が認められ, リノール酸不飽和化指数の著明な低下が認められたが, PGE₁(10⁻⁸ M) はこれらの変化にはほとんど影響を与えなかった。

5) PGE₁(10⁻⁶ および 10⁻⁵ M) は, GalN(1 mg/ml) により著減した肝細胞 cAMP 分泌量を有意に増加させた。

6) DBcAMP(10⁻⁵, 10⁻⁴ および 10⁻³ M) も PGE₁ と同様に, GalN による遊離 LDH 活性の増加を有意に抑制した。

7) GalN 2 時間処理後の肝細胞への特異的 [³H]PGE₁ 結合能は, GalN の濃度依存性に充進していた。しかし, GalN 4 時間処理後の肝細胞では, [³H]PGE₁ 結合は増加を示さなかった。

8) [³H]PGE₁ 結合の Scatchard plot analysis において, GalN 処理肝細胞の高親和性結合部位での Kd 値は Control と変わらず, Bmax 値は Control より高値を示した。

以上より, PGE₁ は障害肝細胞の viability および機能に対して保護作用を示すことが示唆され, また, その mediator として cAMP の関与が推測された。さらに, 障害早期肝細胞における特異的 PGE₁ 結合の増加は, 細胞障害防御作用発現のために重要な役割をはたしている可能性が示唆された。

(本論文の要旨は, 第 26 回日本肝臓学会西部会主題示説ならびに第 28 回日本肝臓学会総会において発表した。稿を終えるに臨み, 終始御懇篤なる御指導, 御校閲を賜った恩師辻井 正教授に深甚の謝意を捧げるとともに, 御助言, 御校閲を賜った生化学教室の神谷知彌教授ならびに第 1 外科学教室の中野博重教授に深謝いたします。

また, 本研究の遂行にあたり常に御指導, 御助言をいただいた福井 博助教授, 病態検査学岡本康幸助教授ならびに御助力いただいた教室の諸兄に感謝の意を表します。)

文 献

- 1) 室田誠逸編: プロスタグランジンと病態. 化学同人, 東京, 1984.
- 2) Robert, A., Nezamis, J. E., Lancaster, C. and Hanchar, A. J.: *Gastroenterology* 77: 433, 1979.
- 3) Terano, A., Ota, S., Mach, T., Hiraishi, H., Stachura, J., Tarnawski, A. and Ivey, K. J.: *Gastroenterology* 92: 669, 1987.
- 4) Koyama, T., Uno, H., Ishii, S., Bannai, K., Hasato, A. and Makita, T.: *J. Pharm. Pharmacol.* 42: 362, 1990.
- 5) 石井良和: 日消誌. 82: 108, 1985.
- 6) Koyama, T., Imoto, M., Tanaka, M., Fukuda, Y., Satake, T. and Ozawa, T.: *Biochem. Intern.* 19: 421, 1989.
- 7) Ruwart, M. J., Rush, B. D., Friedle, N. M., Piper, R. C. and Kolaja, G. J.: *Prostaglandins* 21: 97, 1981.
- 8) Stachura, J., Tarnawski, A., Ivey, K. J., Mach, T., Bogdal, J., Szczudrawa, J. and Klimczyk, B.: *Gastroenterology* 81: 211, 1981.
- 9) Guarner, F., Fremont-Smith, M., Corzo, J., Quiroga, J., Rodriguez, J. L. and Prieto, J.: *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leuko-triene Res.* 12: 75, 1983.
- 10) Stachura, J., Tarnawski, A. and Szczudrawa, J.: *Folia-Histochem. Cytochem.* 18: 311, 1980.
- 11) Guarner, F., Fremont-Smith, M. and Prieto, J.: *Liver* 5: 35, 1985.
- 12) Kikuchi, E., Fukui, H., Matsumoto, M., Tsujita, S., Matsumoto, M., Matsumura, M., Uemura, M. and Tsujii, T.: *J. Hepatol.* 20: 478, 1994.
- 13) Seglen, P. O.: *Methods Cell Biol.* 13: 29, 1976.
- 14) Keppler, D., Lesch, R., Reutter, W. and Decker, K.: *Exp. Mol. Pathol.* 9: 279, 1968.
- 15) 野口和典, 松隈則人, 吉武正男, 谷川久一: 肝胆膵 19: 243, 1989.
- 16) Keppler, D., Rudigier, J. F. M., Bischoff, E. and Decker, K.: *Eur. J. Biochem.* 17: 246, 1970.
- 17) El-Mofty, S. K., Scrutton, M. C., Serroni, A., Nicolini, C. and Farber, J. L.: *Am. J. Pathol.* 79: 579, 1975.
- 18) Farber, J. L. and El-Mofty, S. K.: *Am. J. Pathol.* 81: 237, 1975.

- 19) **Ruwart, M. J., Nichols, N. M., Hedeem, K., Rush, B. D. and Stachura, J.** : In Vitro Cell Dev. Biol. 8 : 450, 1985.
- 20) **Rush, B. D., Merritt, M. V., Kaluxny, M., Van Schoick, T., Brunden, M. N. and Ruwart, M.** : Prostaglandins 32 : 439, 1986.
- 21) **Sikujara, O., Monden, M., Toyoshima, K., Okamura, J. and Kosaki, G.** : Transplantation 36 : 238, 1983.
- 22) **Ignarro, L. J. and Colombo, C.** : Science 180 : 1181, 1975.
- 23) **Kurebayashi, Y. and Honda, Y.** : Hepatology 14 : 545, 1991.
- 24) **Robertson, R. P.** : Prostaglandins 31 : 395, 1986.
- 25) **Moore, W. V. and Wolff, J.** : J. Biol. Chem. 248 : 5705, 1973.
- 26) **Karaplis, A. C. and Powell, W. S.** : J. Biol. Chem. 256 : 2414, 1981.
- 27) **Smigel, M. and Fleischer, S.** : Biochim. Biophys. Acta 332 : 358, 1974.
- 28) **Okamura, N. and Terayama, H.** : Biochim. Biophys. Acta 465 : 54, 1977.