◆特集：肝と凝固線溶系 総説◆

肝再生と線溶系

岡田 清孝*, 松尾 理*

Liver regeneration and fibrinolytic system

Kiyotaka OKADA*, Osamu MATSUO*

Key words: fibrinolytic factor, liver regeneration, cellular fibrinolysis, ECM degradation, growth factor activation

はじめに

肝臓は、様々な代謝や蛋白合成など複数の機能を持つ臓器である。もちろん、凝固・線溶系の多数の因子も、肝細胞によって合成・分泌される。線溶系因子では plasminogen (Plg) と α_2 -antiplasmin (α_2 -AP, または α_2 -plasmin inhibitor; α_2 -PI) が肝細胞で産生される¹⁾。線溶系は Plg が Plg activator (PA) [tissue-type PA (t-PA) または urokinase-type PA (u-PA)] によって活性化され plasmin に変換される。また, PAs と plasmin にはそれぞれに対する阻害因子である PA inhibitor (PAI) と α_2 -AP が存在し, それぞれの酵素活性を制御している²⁾。最近, これらの線溶系因子の受容体や結合部位が種々の細胞表面に存在することが証明され, 細胞周囲での蛋白分解活性の発現や, 細胞内の情報伝達に関与していることが報告されている³⁾⁴⁾。これらの細胞周囲における線溶系因子の機能は「細胞性線溶」と呼ばれ, 従来の血管におけるフィブリンの分解に関わる機能としての「血液線溶」と区別されるようになった⁵⁾ (図 1)。細胞性線

溶は, 様々な生理学および病態生理学的な現象 (例えば細胞の浸潤, 転移, 組織修復や血管新生など) に関与することが報告されている⁶⁾。この細胞性線溶の研究は, 各遺伝子の欠損 (knockout; KO) マウスを用いた動物実験モデルの解析により飛躍的に前進した⁷⁾。

一方, 肝臓は再生能力の優れた組織であり, この再生過程には様々なサイトカインや増殖因子が関与している。また, 障害された細胞やその周囲の組織は再生過程で再構築される。その際, 細胞外基質 (extracellular matrix; ECM) の分解は活性型の matrix metalloproteinases (MMPs) によって起こる。この MMPs の活性化には plasmin が関与していることが報告されている。また, ECM には肝再生に関わるサイトカインや増殖因子がプロテオグリカンを通して存在している。このような点から肝再生過程において線溶系因子は蛋白分解活性の発現に関与していることが考えられる⁸⁾ (図 2)。

そこで, 肝臓における線溶系因子の関わりについて, 特に肝再生機構を中心に総説する。

*近畿大学医学部第二生理学 [〒 589-8511 大阪府大阪狭山市大野東 377-2]

Department of Physiology, Kinki University School of Medicine [377-2 Ohono-higashi, Osakasayama, Osaka 589-8511, Japan]

Tel: 072-366-0221 Fax: 072-366-2853 e-mail: kiyokada@med.kindai.ac.jp

図1 血液線溶系と細胞性線溶. 血液線溶系において plasminogen (Plg) は tissue-type Plg activator (t-PA) または urokinase-type activator (u-PA) によって plasmin に活性化される. PAs と plasmin はそれぞれ PA inhibitor (PAI-1) と α_2 -antiplasmin (α_2 -AP, または α_2 -plasmin inhibitor; α_2 -PI) によって阻害される. Plasmin は fibrin を分解することで血栓溶解を誘導する. 一方, 細胞性線溶は細胞表面の線溶系因子によって引き起こされる. 線溶系因子に対する受容体または結合部位は種々の細胞上に存在する. 細胞膜上に結合した線溶系酵素はその周囲での蛋白分解活性を発現する. また, 線溶系因子の受容体への結合は細胞内情報伝達系を誘導し, 細胞機能を発現する.

図2 肝障害後の肝再生過程における線溶系因子の役割. 肝障害後 plasmin は matrix metalloproteinase (MMP) を活性化させ, 間接的または直接的に細胞外基質 (extracellular matrix; ECM) を分解する. また, u-PA/u-PAR 系は肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor; HGF) を活性化. さらに, plasmin はトランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor- β ; TGF- β) を活性化させて再生を制御する.

線溶系因子による成長因子の活性化

肝再生過程では数多くのサイトカインや増殖因子がオートクラインまたはパラクライン的に役目をはたす。それらの因子の中には前駆体として分泌され、限定分解を受けて活性化体として作用する物がある。線溶系因子はこれら活性化に関与して、肝再生を誘導する。また、増殖因子はECM中に存在し、その分解により放出されて作用する場合もある。このECMの分解にも線溶系因子の関与が考えられる。線溶系因子のKOマウスの実験モデルの結果では心⁹⁾・血管系¹⁰⁾や皮膚¹¹⁾¹²⁾での障害時に plasmin/ α_2 -AP系が増殖因子の誘導に関与することを認めている。

1. 肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor ; HGF)

HGFは肝細胞の増殖因子¹³⁾としての機能だけでなく、上皮細胞の細胞分散 (scattering) を引き起こすことから scatter factor (SF) とも呼ばれる¹⁴⁾。また、HGFの機能は形態形成誘導、抗アポトーシス作用や血管新生作用なども持ち合わせている。HGFは分子量約10万の前駆体一本鎖糖蛋白質として分泌され、蛋白分解酵素の限定分解により、一個のジスルフィド結合で結合した二本鎖型に変換される。HGFの構造はPlgと約40%の相同性を示し、4個のクリングル構造のA鎖と、セリン酵素様構造 (酵素活性は持たない) のB鎖で構成されている¹⁵⁾。その受容体c-Metとの反応はA鎖が結合に直接的に、B鎖がその結合の安定化にそれぞれ関与する。HGFが結合したc-Metは細胞内領域のチロシンリン酸化を引き起こし、細胞内情報伝達系を介してHGFの機能発現を誘導する¹⁶⁾。HGFとc-MetはそれぞれのKOマウスの結果から肝臓形成にとって不可欠であることが示されている¹⁷⁾¹⁸⁾。

HGFの活性化は、特異的な蛋白分解酵素 (例えば HGF activator²⁰⁾、凝固因子 XIIa¹⁹⁾、線溶系酵素^{20)~22)}) によって行われる。また、HGF

は肝臓、脾臓および腎臓などのECM内のプロテオグリカンに結合している²³⁾。ラットの70%部分肝切除 (partial hepatectomy ; PH) での血漿HGFレベルはECMからの動員により2時間以内に増加する²⁴⁾。また、70% PH後のu-PA活性はu-PA受容体 (u-PAR) 発現の誘導と共に、1分以内に急速に増加する²⁴⁾。このu-PA活性の増加は、Plg活性化を引き起こしECM蛋白質の分解を誘導すると共に²⁵⁾、HGF活性化を起こさせることから、肝再生過程において重要な因子である²⁶⁾。

最近、DateらはHGFのアンタゴニストとして、4個のクリングル構造を含むA鎖 (NK4) をHGFのエラスターゼ処理により作成することに成功した²⁷⁾。このNK4はc-Metに対してHGFの競合阻害を示し、血管新生抑制作用を発現することで抗腫瘍・転移抑制の面から臨床応用が期待されている。また、PlgのA鎖は5個のクリングル構造を持ち、そのフラグメントが血管新生抑制作用を示すことから angiostatin と呼ばれている²⁸⁾。両者の血管新生抑制作用は異なる作用機序によるものと考えられる。

2. トランスフォーミング増殖因子 (transforming growth factor ; TGF- β)

TGF- β は分子量25kDの活性型に75kDのLAP (latency associated peptide) とLTBP (latent TGF- β binding protein) が結合した潜在型TGF- β 大複合体 (large latent TGF- β complex ; LLC) を形成し存在している²⁹⁾。TGF- β の活性化は複雑で臓器、状況などにより異なり、トロンプスポンジン¹³⁰⁾、インテグリン $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ ³¹⁾ や蛋白分解酵素 (plasmin³²⁾、血漿カリクレイン³³⁾) などで引き起こされる。活性型TGF- β の受容体は数種類報告され、細胞内情報伝達系を介して様々な機能を発現する。TGF- β の機能は肝細胞を含む上皮細胞、血管内皮細胞、血球細胞などほとんど全ての細胞に対して強い増殖抑制作用を示す。また、TGF- β は種々の細胞での蛋白質合成や分泌を制御して、血管新生、動脈硬化、組織線維化など様々な生理的・

病態生理的現象に深く関与している²⁹⁾。

TGF- β は通常肝臓において類洞内皮細胞やクッパー細胞から少量産生されている。ラットの PH モデルでの TGF- β は肝切除後、残余肝全体で分泌亢進し、その後主に肝細胞と肝星細胞から産生される。また、肝臓の炎症や線維化時には HSC が大量の TGF- β を産生する。肝臓では plasmin が ECM から潜在的な TGF- β の放出を誘導し、肝星細胞膜上で潜在型 TGF- β 分子から LAP を隔離することによって活性化する³²⁾。

線溶系因子による ECM の分解

ECM はフィブロネクチン、コラーゲン、ラミニン、ビトロネクチンやプロテオグリカンなど含む様々な巨大分子から構成されている。その機能は細胞間であって全体構造を維持し、さらに細胞分化、遊走、成長やアポトーシスなどに関与している³⁴⁾。肝臓の ECM 構造は他の組織とは異なり、循環する血液と肝細胞の間で物質の交換を容易にする特徴を有している。肝臓の特異的な ECM 構造は肝再生時に重要な役割をはたす³⁵⁾。肝障害時に線溶系因子は MMPs とともに ECM を分解促進して、肝再生誘導に関与すると考えられる。

ラットの PH モデルでは、plasmin が MMPs 活性化²⁵⁾を介して間接的または直接的にフィブロネクチン、ラミニンやエンタクチンなどを含む ECM 構成成分の分解を誘導する³⁶⁾。また、肝細胞はその膜上に u-PA 受容体 (u-PAR) と Plg 結合部位を持ち、効率良い Plg 活性化を引き起こす。よって、マウス肝細胞膜上での PA/Plg 系は肝再生過程における ECM のクリアランスにおいて重要な役割を果たすと考えられる。

肝障害モデルによる解析

肝臓の障害・再生過程の研究にはラットやマウスなどによる実験動物モデルが数多く使用さ

れている。障害モデルは異なる機序の障害を誘導する薬物投与や肝臓の一部を切除する部分肝切除などが用いられている。また、肝臓から分離した初代肝細胞や樹立化された肝細胞を用いた細胞培養系による解析も行われている。

1. 肝細胞による線溶系因子の発現

肝細胞は Plg と α_2 -AP の主要な産生・分泌細胞として知られている。両蛋白質の発現は、サイトカイン³⁷⁾やホルモン³⁸⁾などの影響を受ける。ヒトやマウスの Plg 遺伝子のプロモータ領域には IL-6 エレメントが存在している³⁹⁾⁴⁰⁾。また、Plg mRNA の発現はマウス肝細胞の培養系において細胞密度に依存する⁴¹⁾。マウス α_2 -AP 遺伝子のプロモータ領域には特異的な (TGG)_n の繰り返し配列が存在している⁴²⁾。これらに対して PAs や PAI-1 は通常の肝細胞でほとんど発現していない。しかし、*in vivo* 系において LPS などの刺激により PAs や PAI-1 はそれぞれ特異的な発現を示す⁴³⁾。また、肝細胞の初代培養⁴⁴⁾や肝癌細胞株の培養⁴¹⁾では両者とも発現が認められる。これらの PAs や PAI-1 の発現誘導の結果は肝細胞が静止状態から増殖プロセスにスイッチングされたことを示唆している。

一方、PAs や PAI-1 は肝臓障害後の肝再生過程において産生が誘導される²⁴⁾⁴⁶⁾。

線溶系因子の発現と肝再生過程との間の関係については、動物モデルや細胞培養系で解析されている⁴⁷⁾⁴⁸⁾。

2. 四塩化炭素肝障害モデル

マウスにおける四塩化炭素 (CCl₄) の腹腔内投与は肝星細胞の活性化を誘導する。活性化肝星細胞は ECM 蛋白質 (フィブロネクチンやコラーゲンなど) の過剰産生を誘導し、肝の線維化を引き起こす⁴⁹⁾。四塩化炭素の小量単回投与では、P450 依存性の中毒性代謝産物により中心静脈周囲の肝細胞が障害される。マウスでは、投与後 2 日目をピークに ECM 蛋白質の増加を伴う障害を引き起こし、その後壊死部が徐々に除去されて 7~14 日で再生・回復する。

図3 四塩化炭素肝障害モデルにおけるPlgWTとPlgKOマウスの肝臓。PlgWTマウスの肝障害は四塩化炭素投与2日後をピークに出現し、その後回復過程をたどり7日で再生される。これに対し、PlgKOマウスは2日後同程度の障害を示したが、その後回復せず肝再生不全を示した。

著者らはこのモデルにおける線溶系因子の肝再生への関与について線溶系因子のKOマウスを用いて検討した⁵⁰⁾。四塩化炭素投与後の肝再生能はWTマウスに比べPlgKOとPlg/ α_2 -APダブルKOマウスで遅延し、 α_2 -APKOで促進した(図3)。肝臓中のフィブロネクチン量はWTマウスで2日目をピークに増加し、その後7-14日で回復した。これに対し α_2 -APKOマウスのフィブロネクチン量は増加後急速に減少し、5-7日で回復したが、PlgKOとPlg/ α_2 -APダブルKOマウスでは増加後回復が認められなかった。また、血漿および肝臓組織中のPAs活性は四塩化炭素投与後2-5日目にu-PA活性が2-14日目にt-PA活性が増加していた(図4)。さらに、肝臓組織中のplasmin活性は四塩化炭素投与後2日目以降増加したが、WTマウスに比べ α_2 -APKOマウスの方が高かった。また、肝臓から分離した肝細胞は膜上にPlgとu-PAを結合し、PAsによる活性化の亢進と α_2 -APによる阻害からの保護を示した⁵¹⁾。これらの結果は、plasmin/ α_2 -AP系が肝再生過程においてECMの分解・再構築に重要な役割を果たすことを示唆した。

また、Bezerra JAらは、同モデルにおいてPlgKO⁵²⁾とt-PA/u-PAダブルKO⁵³⁾マウスが肝

再生遅延を示し、その損傷部位周囲にフィブリン沈着が認められたことを報告した。また、Plg/fibrinogen (Fbg) ダブルKOマウスではPlgKOマウスと同様に肝再生遅延が認められた⁵⁴⁾。これらの結果から、四塩化炭素投与モデルの肝再生過程においてplasminの基質はフィブリンのみではないことを示唆している。これに反し、PlgKOマウスの皮膚創傷治癒モデルでのフィブリン沈着を伴う治癒遅延はFbgKOとの組み合わせ(Plg/FbgダブルKOマウス)で認められなくなった⁵⁵⁾。また、Ngらは、同モデルにおけるPlgKOマウスの肝再生遅延は活性化肝星細胞の長期存在が関係していることを示唆した。

一方、PAsのKOマウスではu-PAKOとu-PA/t-PAダブルKOマウスで肝再生遅延を示したが⁵³⁾、u-PARKOまたはt-PAR/u-PARKOマウス⁵⁶⁾ではWTマウスと同等であった。これらの結果から、四塩化炭素投与モデルの肝再生はu-PA依存性Plg活性化がECM蛋白質分解を促進することと、u-PARはこの過程に必須でないことが示唆した。

また、四塩化炭素投与モデルの肝再生過程においてPlg/plasmin系は肝細胞内のERK1/2シグナル伝達経路を介したプロアポトーシス蛋白質BimEKの発現を減少させ、抗アポトーシス作用を示すことを示唆した⁵³⁾。

3. Fas抗体モデル

抗Fas抗体の腹腔内投与モデルは肝細胞のアポトーシスを誘発し、ヒトの劇症肝炎の病因を反映する⁵⁷⁾。Fas(APO-1/CD95; 神経成長因子レセプター/TNF族に属するI型膜蛋白質)は、外部因子刺激でアポトーシスを誘導する細胞膜分子で、肝臓、胸腺、心臓、肺と卵巣を含む種々の組織に遍在性に存在する。

そこで、我々は抗Fas抗体投与モデルでの肝再生能におけるu-PA/PAI-1系の役割についてKOマウスを用いて検討した²⁶⁾。u-PAKOマウスはHGF活性化遅延に基づく肝再生不全を示した。一方、PAI-1KOマウスはHGF活性化亢

図4 四塩化炭素肝障害モデルにおける PlgWT マウスの血漿および肝組織中の線溶活性. 四塩化炭素投与後の PlgWT マウスでは, 血漿および肝組織中で2-5日にu-PA活性が, 2-14日にt-PA活性の発現増加を示した. また, 血漿では3日目以降線溶系亢進による plasmin- α_2 -antiplasmin 複合体が認められた.

進に基づく肝再生促進を示した. これらの結果は, u-PA/PAI-1系が抗 Fas 抗体投与モデルでの HGF 活性化による肝再生誘導において重要な役割を果たすことを示唆した.

4. 部分肝切除モデル

マウスまたはラットの部分肝切除 (partial hepatectomy; PH) モデルは肝臓の特異的な葉を取り出すことで約30%, 70%あるいは90%を切除し, 残りの葉を損傷なく残存させてその後の肝再生能を評価できる. 70% PH モデルの残存葉は取り出された葉の体積・重量を補うために徐々に増大し, 7~14日で元の重量まで回復する. このモデルは肝毒素 (例えば CCl_4 または抗 Fas 抗体) を使用する他の方法と比較して組織損傷や炎症が関係していないことが特徴である.

そこで, PlgKO マウスを用いて, 70% PH モデルでの肝再生過程における Plg の役割を検討した⁵⁹⁾. 70% PH 後の PlgWT マウスの肝重量は経時的に増加し, 10~14日で元の重量に回復した. しかし, PlgKO マウスの肝重量は7日まで WT マウス同様増加したが, その後増加が止まり 10~14日で有意に低値を示した. また, 70% PH 後10日目の PlgKO マウスの肝臓はフィブリン沈着で囲まれた細胞壊死領域が

認められた. この結果, Plg の欠如は 70% PH 後通常に肝再生が開始するが, その後フィブリン沈着の出現により局所的虚血状態が起こり, その後の回復が正常に進行しないことが示された. 従って, 70% PH モデルにおける Plg の役割は肝再生の後期において重要であることが示唆された.

また, Roselli らは, 70% PH モデルで肝再生における u-PA/u-PAR 系について検討した. その結果, u-PAKO マウスにおける再生過程の肝細胞は u-PAWT マウスより DNA 合成能が低かった⁶⁰⁾. さらに, u-PAKO マウスの肝臓組織はフィブリン沈着を含む細胞損失領域が検出された. しかしながら, 肝重量の回復率は, u-PAKO と u-PAWT マウスの間で有意差を示さなかった. また, 同モデルでの u-PARKO マウスの肝再生過程は WT マウスと同等であった. これらの結果は, 70% PH モデルでの肝再生過程において u-PA が u-PAR との相互作用から独立して役割を果たすことを示唆している.

一方, Drixler らは, 70% PH モデルにおける肝再生過程での脈管形成と u-PA/Plg 系との関係について検討した⁶¹⁾. その結果, 肝重量の回復は, WT マウスに比較して PlgKO と

図5 肝再生過程における肝細胞上での線溶系因子の役割. 肝細胞はPlgとu-PAを結合させ、局所的に効率良いPlg活性化を引き起こす. 生じたplasminは細胞周囲のECM蛋白質分解を誘導する. また、u-PA/u-PAR系はHGFの活性化を引き起こし、細胞増殖を誘導する.

u-PAKO マウスで有意に低下していた. しかし、肝切除後の肝臓の微小血管密度の増加はWTおよびu-PAKO マウスで顕著であったが、PlgKO マウスでは見られなかった. これらの結果は、Plgが70% PHモデルにおける肝再生過程での脈管形成に関与することを示唆している.

5. アルコール肝障害モデル

エタノール暴露の動物モデルは、ヒトのアルコール性肝臓疾患 (ALD) と類似した病理学的変化を示すと考えられている⁶²⁾. Bergheimらは、急性および慢性アルコール肝障害モデルを用いて肝損傷におけるPAI-1の役割について検討した⁶³⁾. アルコール暴露は、PAI-1WTマウスの肝臓でTNF- α -誘発性のPAI-1発現を誘導した⁶³⁾. また、PAI-1WTマウスの肝臓はアルコール暴露により肝細胞の脂肪蓄積、脂肪変性および壊死が見られた. しかし、PAI-1の欠如はアルコールによって誘発された肝損傷に対して保護を示した. これらの結果はアルコールによって誘発された肝臓の脂肪変性と損傷はTNF- α -依存性PAI-1発現の誘導が関与することを示唆している.

6. 総胆管結紮 (BDL) モデル

肝外性胆汁うっ滞は、マウスやラットでの外

科的総胆管結紮 (BDL) でモデル化されている. このモデルは、肝細胞性壊死、好中球浸入、胆管細胞と肝細胞の増殖、肝星細胞活性化および進行性線維化を含む組織病理学的な変化を誘発する⁶⁴⁾. Wangらは、BDL後の肝臓損傷とt-PA/PAI-1系の関係について検討した⁶⁵⁾⁶⁶⁾. BDLの後、t-PAKOマウスは、WTマウスに比べ胆汁梗塞、アポトーシス細胞および好中球浸入などの増加と肝細胞増殖の減少を示した⁶⁶⁾. さらに、PAI-1KOマウスではBDLで誘導される症状を軽減したが、合成t-PA阻害剤投与でその効果は消失した. また、t-PA遺伝子の損失は、BDL後の肝臓でのHGF活性化とc-Metリン酸化を低下させた. 以上の結果から、マウスBDLモデルではその誘発症状にt-PA/PAI-1系が関与することが示唆されている.

おわりに

肝障害後の再生過程における線溶系因子の機能は図5に示す. 線溶系因子は肝細胞周囲での蛋白分解活性を制御することで、2方向から肝再生過程に関与する. u-PAはHGF/c-Met系の活性化を誘導し、肝細胞の増殖を促進す

る。一方, plasmin は ECM 蛋白質の分解を誘導し, 肝再生のための微小環境を整える。また, 最近, 肝硬変に対する u-PA の遺伝子治療がラットを用いたモデルで試みられている⁶⁷⁾。さらに, u-PA 遺伝子組換え SCID マウスはヒト肝細胞の増殖・継代に利用されている⁶⁸⁾。

今後, 細胞周囲での線溶系因子を中心とした蛋白分解活性の調節は肝再生の新たな医療への応用に期待される。

文 献

- Okada K, Yuasa H, Hagiya Y, Takaishi T, Fukao H, Ueshima S, Matsuo O : Fibrinolytic activity in liver tissues of stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **22** : 275-276, 1995.
- Collen D, Lijnen HR : Basic and clinical aspects of fibrinolysis and thrombolysis. *Blood* **78** : 3114-3124, 1991.
- Haijar KA : Cellular receptors in the regulation of plasmin generation. *Thromb Haemost* **74** : 294-301, 1995.
- Bhat GJ, Gunaje JJ, Idell S : Urokinase-type plasminogen activator induces tyrosine phosphorylation of a 78-kDa protein in H-157 cells. *Am J Physiol* **277** : 301-309, 1999.
- Fukao H, Ueshima S, Okada K, Matsuo O : The role of the pericellular fibrinolytic system in angiogenesis. *Jpn J Physiol* **47** : 161-171, 1997.
- Pepper MS : Extracellular proteolysis and angiogenesis. *Thromb Haemost* **86** : 346-355, 2001.
- 岡田清孝, 松尾 理 : 線溶系因子ノックアウトマウスと細胞性線溶, 坂田洋一, 小澤敬也, 編集, 医学のあゆみ, 別冊 血液疾患-state of arts. Ver.3 東京, 医歯薬出版, 2005, 343-348.
- Michalopoulos GK, DeFrances MC : Liver regeneration. *Science* **276** : 60-66, 1997.
- Matsuno H, Kozawa O, Yoshimi N, Akamatsu S, Hara A, Mori H, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Uematsu T : Lack of α_2 -antiplasmin promotes pulmonary heart failure via overrelease of VEGF after acute myocardial infarction. *Blood* **100** : 2487-2493, 2002.
- Matsuno H, Ishisaki A, Nakajima K, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Kozawa O : Lack of α_2 -antiplasmin promotes re-endothelialization via overrelease of VEGF after vascular injury in mice. *Blood* **102** : 3621-3628, 2003.
- Kanno Y, Hirade K, Ishisaki A, Nakajima K, Suga H, Into T, Matsusita K, Okada K, Matsuo O, Matsuno H : Lack of α_2 -antiplasmin improves cutaneous wound healing via over-release of endothelial growth factor-induced angiogenesis in wound lesions. *J Thromb Haemost* **4** : 1602-1610, 2006.
- Kanno Y, Kuroki A, Okada K, Tomogane K, Ueshima S, Matsuo O, Matsuno H : α_2 -antiplasmin is involved in the production of transforming growth factor fibrosis. *J Thromb Haemost* **5** : 2266-2273, 2007.
- Nakamura T, Nawa K, Ichihara A : Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rat. *Biochem Biophys Res Commun* **122** : 1450-1459, 1984.
- Gherardi E, Stoker M : Hepatocytes and scatter factor. *Nature* **346** : 228, 1990.
- Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S : Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* **342** : 440-443, 1989.
- Naldini L, Vigna E, Narsimhan RP, Gaudino G, Zarnegar R, Michalopoulos GK, Comoglio PM : Hepatocyte growth factor (HGF) stimulates the tyrosine kinase activity of the receptor encoded by the proto-oncogene c-Met. *Oncogene* **6** : 501-504, 1991.
- Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C : Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* **373** : 699-702, 1995.
- Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, Kitamura N : Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* **373** : 702-705, 1995.
- Shimomura T, Miyazawa K, Komiyama Y, Hiraoka H, Naka D, Morimoto Y, Kitamura N : Activation of hepatocyte growth factor by two homologous proteases, blood-coagulation factor XIIa and hepatocyte growth factor activator. *Eur J Biochem* **229** : 257-261, 1995.
- Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK : Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol* **143** : 949-958, 1993.
- Naldini L, Vignat E, Bardelli A, Follenzi A, Galimi F, Comoglio PM : Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *J Biol Chem* **270** : 603-611, 1995.
- Matsuoka H, Sisson TH, Nishiuma T, Simon RH : Plasminogen-mediated activation and release of hepatocyte growth factor from extracellular matrix. *Am J Respir Cell Biol* **35** : 705-713, 2006.
- Yanagita K, Nagaie M, Ishibashi H, Niho Y, Matsumoto K, Nakamura T : Lung may have an endocrine function producing hepatocyte growth factor in response to injury of distal organs. *Biochem Biophys Res Commun* **182** : 802-809, 1992.
- Mars WM, Liu M-L, Kitson RP, Goldfarb RH, Gabauer MK, Michalopoulos GK : Immediate early detection of urokinase receptor after partial hepatectomy and its implications for initiation of liver regeneration. *Hepatology* **21** : 1695-1701, 1995.
- Olle EW, Ren X, McClintock SD, Warner RL, Deogracias MP, Johnson KJ, Colletti LM : Matrix metalloproteinase-9 is an important factor in hepatic regeneration after partial hepatectomy in mice. *Hepatology* **44** : 540-549, 2006.
- Shimizu M, Hara A, Okuno M, Matsuno H, Okada K, Ueshima S, Matsuo O, Niwa M, Akita K, Yamada Y, Yoshimi N, Uematsu T, Kojima S, Friedman SL, Moriwaki H, Mori H : Mechanism of retarded liver regeneration in plasminogen activator-deficient mice : impaired activation of hepatocyte growth factor after Fas-mediated massive hepatic apoptosis. *Hepatology* **33** : 569-576, 2001.
- Date K, Matsumoto K, Shimura H, Tanaka M, Nakamura T : HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic action of hepatocyte growth factor. *FEBS Letters* **420** : 1-6, 1997.
- O'Reilly MS, Holmgren L, Shing Y : Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell* **79** : 315-328, 1994.
- 近藤和嘉子, 奥野正隆, 小嶋聡一 : TGF- β 活性化機構とその制御. *血栓止血誌* **14** : 210-219, 2003.
- Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribeiro

- SM, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bock N : Thrombospondin-1 is a major activator of TGF- β in vivo. *Cell* **93** : 1159-1170, 1998.
- 31) Munger JS, Huang X, Kawakatsu H, Griffiths MJ, Dalton SL, Wu J, Pitter JF, Kaminski N, Garat C, Matthay MA, Rifkin DB, Sheppard D : The integrin $\alpha v \beta 6$ bind and activates latent TGF- β : a mechanism for regulating pulmonary inflammation and fibrosis. *Cell* **96** : 319-328, 1999.
 - 32) Okuno M, Akita K, Moriwaki H, Kawada N, Ikeda K, Kaneda K, Suzuki Y, Kojima S : Prevention of rat hepatic fibrosis by the protease inhibitor, camostat mesilate, via reduced generation of active TGF- β . *Gastroenterol* **120** : 1784-1800, 2001.
 - 33) Akita K, Okuno M, Enya M, Imai S, Moriyaki H, Kawada N, Suzuki Y, Kojima S : Impaired liver regeneration in mice by lipopolysaccharide via TNF- α /kallikrein-mediated activation of latent TGF- β . *Gastroenterol* **123** : 352-364, 2002.
 - 34) Ashkenas J, Muschler J, Bissler MJ : The extracellular matrix in epithelial biology : shared molecules and common themes in distant phyla. *Dev Biol* **180** : 433-444, 1996.
 - 35) Martinez-Hernandez A, Amenta PS : The extracellular matrix in hepatic regeneration. *FASEB J* **9** : 1401-1410, 1995.
 - 36) Kim T-H, Mars WM, Stolz DB, Petersen BE, Michalopoulos GK : Extracellular matrix remodeling at the early stages of liver regeneration in the rat. *Hepatology* **26** : 896-904, 1997.
 - 37) Jenkins GR, Seiffert D, Parmer RJ, Miles LA : Regulation of plasminogen gene expression by interleukin-6. *Blood* **89** : 2394-2403, 1997.
 - 38) Menoud P-A, Sappino N, Boudal-Khoshbeen M, Vassalli JD, Sappino AP : The kidney is a major site of α_2 -antiplasmin production. *J Clin Invest* **97** : 2478-2484, 1996.
 - 39) Petersen TE, Martzen MR, Ichinose AG, Davie EW : Characterization of the gene for human plasminogen, a key proenzyme in the fibrinolytic system. *J Biol Chem* **265** : 6104-6111, 1990.
 - 40) Bannach FG, Gutierrez A, Fowler BJ, Bugge TH, Degen JL, Parmer RJ, Miles LA : Localization of regulatory elements mediating constitutive and cytokine-stimulated plasminogen gene expression. *J Biol Chem* **277** : 38579-38589, 2002.
 - 41) Akao M, Ueshima S, Okada K, Fukao H, Seki T, Ariga T, Matsuo O : Cellular density regulation of plasminogen gene expression in mouse hepatocytes. *Life Sci* **72** : 1695-1704, 2003.
 - 42) Okada K, Lijnen HR, Dewerchin M, Belayew A, Matsuo O, Collen D : Characterization and targeting of the murine α_2 -antiplasmin gene. *Thromb Haemost* **78** : 1104-1110, 1997.
 - 43) Yamamoto K, Loskutoff DJ : Fibrin deposition in tissues from endotoxin-treated mice correlates with decreases in the expression of urokinase-type but not tissue-type plasminogen activator. *J Clin Invest* **97** : 2440-2455, 1996.
 - 44) Ouax PHA, van den Hoogen CM, Verheijen JH, Padro T, Zeheb R, Gelehrter TD, van Berkel TJ, Kuiper J, Emeis JJ : Endotoxin induction of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor type 1 mRNA in rat tissues in vivo. *J Biol Chem* **265** : 15560-15563, 1990.
 - 45) Imagawa S, Fujii S, Dong J, Furumoto T, Kaneko T, Zaman T, Satoh Y, Tsutsui H, Sobel BE : Hepatocyte growth factor regulates E box-dependent plasminogen activator inhibitor type 1 gene expression in HepG2 liver cell. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26** : 2407-2413, 2006.
 - 46) Mueller L, Broering DC, Meyer J, Vashist Y, Goettsche J, Wilms C, Rogiers X : The induction of the immediate-early gene Egr-1, PAI-1 and PRL-1 during liver regeneration in surgical models is related to increased portal flow. *J Hepatol* **37** : 606-612, 2002.
 - 47) Seki T, Healy AM, Fletcher DS, Noguchi T, Gelehrter TD : IL-1b mediates induction of hepatic type 1 plasminogen activator inhibitor in response to local tissue injury. *Am J Physiol* **277** : G801-G809, 1999.
 - 48) Thornton AJ, Buruzdzinski CJ, Raper SE, Gelehrter TD : Plasminogen activator inhibitor-1 is an immediate early response gene in regenerating rat liver. *Cancer Res* **54** : 1337-1343, 1994.
 - 49) Yazigi NA, Carrick TL, Bucuvalas JC, Schmidt CS, Balistreri WF, Bezerra JA : Expansion of transplanted hepatocytes during liver regeneration. *Transplantation* **64** : 816-820, 1997.
 - 50) Okada K, Ueshima S, Imano M, Kataoka K, Matsuo OS : The regulation of liver regeneration by the plasmin/ α_2 -antiplasmin system. *J Hepatol* **40** : 110-116, 2004.
 - 51) Okada K, Ueshima S, Matsuo O : Role of fibrinolysis in hepatic regeneration. Tanaka K, Davie EW (eds) : *Recent Advances in Thrombosis and Hemostasis* Tokyo, Springer Japan, in press.
 - 52) Bezerra JA, Bugge TH, Melin-Aldana H, Sabla G, Kombrinck KW, Witte DP, Degen JL : Plasminogen deficiency leads to impaired remodeling after a toxic injury to the liver. *Proc Natl Acad Sci USA* **96** : 15143-15148, 1999.
 - 53) Bezerra JA, Currier AR, Melin-Aldana H, Sabla G, Bugge TH, Kombrinck KW, Degen JL : Plasminogen activators direct reorganization of the liver lobule after acute injury. *Am J Pathol* **158** : 921-929, 2001.
 - 54) Pohl JF, Melin-Aldana H, Sabla G : Plasminogen deficiency leads to impaired lobular reorganization and matrix accumulation after chronic liver injury. *Am J Pathol* **159** : 2179-2186, 2001.
 - 55) Bugge TH, Kombrinck KW, Flick MJ, Daugherty CC, Danton MJ, Degen JL : Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency. *Cell* **87** : 709-719, 1996.
 - 56) Shanmukhappa K, Sabla GE, Degen JL, Bezerra JA : Urokinase-type plasminogen activator supports liver repair independent of its cellular receptor. *BMC Gastroenterology* **6** : 1-9, 2006.
 - 57) Kawao N, Okada K, Kawata S, Okamoto C, Tsuritani M, Ueshima S, Matsuo O : Plasmin decreases the BM3-only protein Bim_{EL} via the ERK1/2 signaling pathway in hepatocytes. *Biochim Biophys Acta* **1773** : 718-727, 2007.
 - 58) Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S : Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature* **364** : 806-809, 1993.
 - 59) Tanaka M, Okada K, Ueshima S, Imano M, Ohyanagi H, Carmeliet P, Matsuo O : Impaired liver regeneration after partial hepatectomy in plasminogen deficient mice. *Fibrinolysis & Proteolysis* **15** : 2-8, 2001.
 - 60) Roselli HT, Su M, Washington K, Kerins DM, Vaughan DE, Russell WE : Liver regeneration is transiently impaired in urokinase-deficient mice. *Am J Physiol* **275** : G1472-G1479, 1998.
 - 61) Drixler TA, Vogten JM, Gebbink MFBG, Carmeliet P, Voest EE, Rinkes IHMB : Plasminogen mediates liver regeneration and angiogenesis after experimental partial hepatectomy. *Brit J Surgery* **90** : 1384-1390, 2003.
 - 62) Harrison SA, Diehl AM : Fat and the liver-a molecular overview. *Semin Gastrointest Dis* **13** : 3-16, 2002.

-
- 63) Bergheim I, Guo L, Davis MA, Lambert JC, Beier JI, Duveau I, Luyendyk JP, Roth RA, Arteel GE : Metformin prevents alcohol-induced liver injury in the mouse: critical role of plasminogen activator inhibitor-1. *Gastroenterol* **130** : 2099-2112, 2006.
- 64) Miyoshi H, Rust C, Roberts PJ, Burgart LJ, Gores GJ : Hepatocyte apoptosis after bile duct ligation in the mouse involves Fas. *Gastroenterol* **117** : 669-677, 1999.
- 65) Wang H, Vohra BPS, Zhang Y, Heuckeroth RO : Transcriptional profiling after bile duct ligation identifies PAI-1 as a contributor to cholestatic injury in mice. *Hepatology* **42** : 1099-1108, 2005.
- 66) Wang H, Zhang Y, Heuckeroth RO : Tissue-type plasminogen activator deficiency exacerbates cholestatic liver injury in mice. *Hepatology* **45** : 1527-1537, 2007.
- 67) Bueno M, Salgado S, Beas-Zarate C, Armendariz-Borunda J : Urokinase-type plasminogen activator gene therapy in liver cirrhosis is mediated by collagens gene expression down-regulation and up-regulation of MMPs, HGF and VEGF. *J Gene Med* **8** : 1291-1299, 2006.
- 68) Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, Kataoka M, Utoh R, Yamasaki C, Tachibana A, Soeno Y, Asahina K, Hino H, Asahara T, Yokoi T, Furukawa T, Yoshizato K : Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* **165** : 901-912, 2004.