

慢性肝疾患における血清 TGF- β_1 測定の有用性

高取 敬子, 山本晋一郎, 大海 庸世, 大元 謙治, 井手口清治, 山本 亮輔,
三井 康裕, 島原 将精, 日野 一成, 平野 寛

各種肝疾患患者92例について血清 TGF- β_1 値を測定し, 検討を行った. 正常人コントロールの血清 TGF- β_1 値は 0.90 ± 0.31 ng/ml に対し急性肝炎 1.92 ± 0.66 ng/ml, 慢性肝炎 1.57 ± 0.65 ng/ml, 肝硬変 1.98 ± 1.76 ng/ml, 肝癌 2.19 ± 1.01 ng/ml と, いずれも有意に高値を示した. 慢性肝炎について肝組織像別の検討を行った結果, $CAH_{2A} > CAH_{2B} > CPH$ の順に高値であった. 肝硬変では, 非代償期の方が代償期よりやや高値を示した. 肝癌では, 2 ng/ml を越えるものが 41.2% を占めていた. 以上の結果から, 血清 TGF- β_1 値の測定は慢性肝疾患における肝硬変への進展や肝癌発生の指標となりうる可能性が示唆された.

(平成5年10月22日採用)

The Usefulness of Serum Transforming Growth Factor β_1 Measurement in Chronic Liver Diseases

Keiko Takatori, Shinichiro Yamamoto, Tsuneyo Ohumi, Kenji Ohmoto, Seiji Ideguchi, Ryosuke Yamamoto, Yasuhiro Mitsui, Masakiyo Shimabara, Kazunari Hino and Yutaka Hirano

We examined the usefulness of serum Transforming Growth Factor- β_1 (TGF- β_1) measurement as a marker of hepatic fibrosis and carcinogenesis in chronic liver diseases. The mean value of serum TGF- β_1 in the control group was 0.90 ± 0.31 ng/ml. In contrast, the mean values of TGF- β_1 in patients with acute hepatitis (AH), chronic hepatitis (CH), liver cirrhosis (LC) and hepatocellular carcinoma (HCC) were 1.92 ± 0.66 ng/ml, 1.57 ± 0.65 ng/ml, 1.98 ± 1.76 ng/ml and 2.19 ± 1.01 ng/ml respectively. In CH, serum TGF- β_1 showed high values in the order of $CAH_{2A} > CAH_{2B} > CPH$. In LC, it was higher in the decompensated state than in compensated state. In HCC, the serum TGF- β_1 level exceeded 2 ng/ml in 41.2%. From the above findings, it is suggested that measurement of serum TGF- β_1 could be a good marker for chronicity of liver disease and also for carcinogenesis in liver cirrhosis. (Accepted on October 22, 1993) *Kawasaki Igakkaishi* 19(4): 293-298, 1993

Key Words ① Serum TGF- β_1 ② Chronic liver diseases

はじめに

TGF- β_1 は、細胞外マトリックス増加作用、肝細胞増殖調節作用を持つサイトカインであり、肝の線維化や肝細胞の形質転換における重要な因子と考えられている。今回、我々は、慢性肝疾患における血清中 TGF- β_1 値を測定し、若干の知見を得たので報告する。

対象と方法

各種肝疾患患者92例（アルコール性肝障害5例，急性肝炎5例，慢性肝炎41例，肝硬変24例，肝癌17例）と正常人7例を検討対象とした。

1. 血清 TGF- β_1 測定方法 (Table 1)

Table 1 の手順に従い、血清をトリフルオロ酢酸 (TFA) 溶液で処理後、カラムにて40%アセトニトリルを溶媒として溶出し、その分画を酸処理し測定試料とした。処理した血清は TGF- β_1 測定キット (アマシャム・ジャパン社) を使用し ELISA 法にて測定した。

2. 免疫組織化学的検索法

肝組織内の TGF- β_1 の発現を知るために、剖検材料からパラフィン切片を作成し、TGF- β_1 抗体 (ダコ・ジャパン社) を第一次抗体とし、二次抗体としてビオチン標識抗ウサギ IgG (ダコ・PAP キット, ダコ・ジャパン社), 三次抗体に Avidine - Biotin - Perox-

idase complex (ABC キット, オンコジーンサイエンス社) を使用し, 0.03% 過酸化水素加3, 3-diammობenzidine (DAB) を加えて発色させた。また, 1%メチルグリーンにより核染色を行った。

3. 統計学的処理方法

Table 1. Method of serum TGF- β_1 measurement.

◆ 試料の調製	1 血清 1.0 μ l に TFA 溶液 10 ml 加える (最終 TFA 濃度 1 ~ 2%)
	2 4°C 10分 放置後, 蒸留水で10倍希釈
◆ カラム処理	1 Amprep TM C18カラムをメタノール 50 ml で洗浄
	2 0.1% TFA 溶液 20 ml でカラムを平衡化
	3 12000 rpm 30分 4°C で遠心した試料の上清をカラムにアプライ
	4 0.1% TFA 溶液 10ml でカラムを洗浄
	5 40% アセトニトリル, 0.1% TFA 溶液 10 ml で溶出
	6 溶出分画を遠心濃縮 又は, 凍結乾燥機で完全乾固
	7 この分画を PBS で希釈し酸処理後アッセイ
◆ 測定 (TGF- β_1 ELISA システムキットを使用)	1 第1抗体 (抗ヒト TGF- β_1 鶏卵抗体) 固相化マイクロプレートにサンプルを 100 μ l ずつ加え, 室温で一晩放置
	2 サンプルを除去し洗浄
	3 第2抗体溶液 (抗ヒト TGF- β_1 ウサギ抗体) を加え, 室温で4時間放置
	4 第2抗体溶液を除去し洗浄
	5 第3抗体溶液 (ビオチン標識 抗ウサギ IgG ヤギ抗体) を加え室温で1.5時間放置
	6 第3抗体溶液を除去し洗浄
	7 ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (PCS) 溶液を加え室温で1時間放置
	8 PCS 溶液を除去し洗浄
	9 O-フェニレンジアミンを溶解した基質溶液 (0.02% 過酸化水素溶液) を加え遮光下にて30分反応
	10 反応停止後 492 nm の吸光度を測定

Table 2. The mean values of serum TGF- β_1 in various liver diseases.

	n	Mean \pm S.D. (ng/ml)	P
Normal control	7	0.90 \pm 0.31	
Acute hepatitis (AH)	5	1.92 \pm 0.66	< 0.05
Chronic hepatitis (CH)	41	1.57 \pm 0.65	< 0.01
Liver cirrhosis (LC)	24	1.98 \pm 1.76	< 0.01
Hepatocellular carcinoma (HCC)	17	2.19 \pm 1.01	< 0.01
Alcoholic liver damage	5	2.19 \pm 2.21	n. s.

有意差の検定は、Student *t*-test を用いた。

結 果

1. 血清 TGF-β₁ 平均値 (Table 2)

正常コントロールでは 0.90±0.31 ng/ml と 1.00 ng/ml 以下であった。これに対し、急性肝炎 1.92±0.66 ng/ml, 慢性肝炎 1.57±0.65 ng/ml, 肝硬変 1.98±1.76 ng/ml, 肝癌 2.19±1.01 ng/ml といずれも有意に高値であった。一方、アルコール性肝障害群では 2.19±

2.21 ng/ml と高値を示したが、数値にばらつきが多く、正常コントロール群との間に有意差を認めなかった。

2. 血清 TGF-β₁ の分布 (Fig. 1)

慢性肝炎、肝硬変、肝癌へと病勢の進行と共に TGF-β₁ は増加する傾向が認められた。肝硬変で 8.80 ng/ml, アルコール性肝障害で 6.08 ng/ml と極めて高値を示した症例を認めたが、他の症例に比して、背景因子に特別な差は認めなかった。

3. 組織学的及び臨床的進行度と血清 TGF-β₁ 値 (Table 3)

慢性肝炎のうち、肝生検にて組織学的診断がなされた25例につき、組織学的進行度と TGF-β₁ 値を比較検討した。CPH では 0.97±0.24 ng/ml, CAH_{2A} では 1.72±0.55 ng/ml, CAH_{2B} では 1.08±0.31 ng/ml で、CAH_{2A} は CAH_{2B} より有意に高値であった。

次に肝硬変24例について、腹水、黄疸、肝性脳症の有無等にて臨床的に代償期と非代償期に分類し TGF-β₁ 値を比較検討した。代償期では 1.67±1.03 ng/ml, 非代償期では 2.40±2.45 ng/ml であった。非代償期の方が代償期に比較して高値の傾向を示したが有意差は認めなかった。

4. 肝癌症例における血清 AFP 値と TGF-β₁ 値 (Fig. 2)

Figure 2 は肝癌患者17例の血清 AFP 値と TGF-β₁ 値を示したものである。両者の間に有意な相関関係は認められなかったが、TGF-β₁ 値が2 μg/ml を越える例が 41.2%

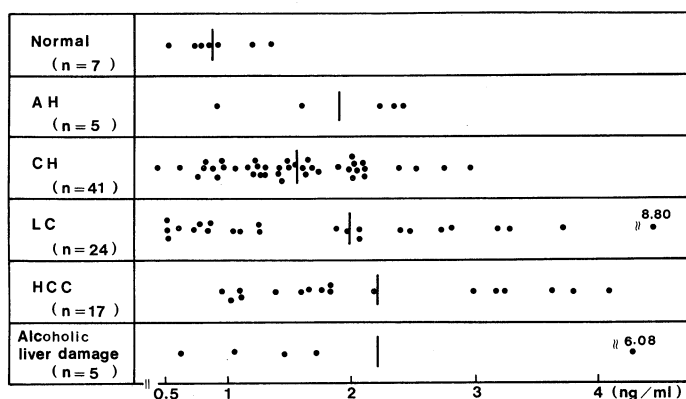


Fig. 1. Distribution of serum levels of TGF-β₁.

Table 3. The mean values of serum TGF-β₁ in CH and LC. CAH_{2A} cases showed the highest value in CH, which was significantly higher than CAH_{2B} or CPH. In LC, it was higher in the decompensated state than in the compensated state.

	n	mean±S.D. (ng/ml)	
CH			
CPH	8	0.97±0.24	} n. s.
CAH _{2A}	12	1.72±0.55	
CAH _{2B}	5	1.08±0.31	
LC			
compe.	14	1.67±1.03	} n. s.
decompe.	10	2.40±2.45	

CPH : Chronic persistent hepatitis
 CAH : Chronic active hepatitis
 compe. : compensation
 decompe. : decompensation

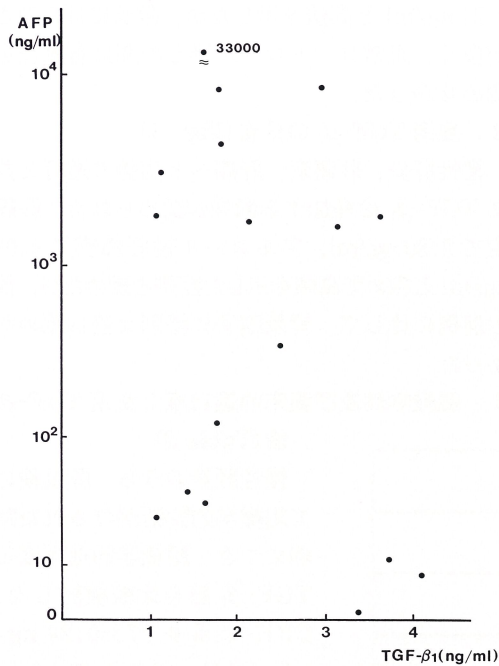


Fig. 2. Correlation between serum AFP and TGF- β_1 values in HCC patients.

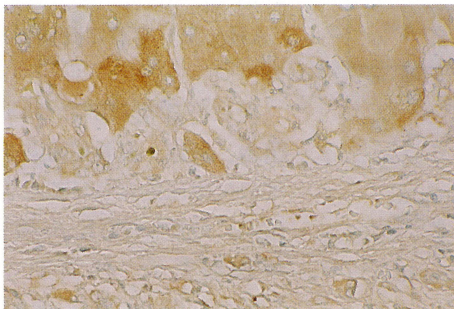


Fig. 3. Immunohistochemical staining of TGF- β_1 in the liver tissue of a LC patient by the ABC method, $\times 75$.

(7例)であった。

5. TGF- β_1 の免疫組織化学的検討 (Fig. 3)

肝硬変患者の剖検材料を使用し、TGF- β_1 の局在を調べるためにABC法にて免疫組織化学染色を施行した。Figure 3に示す如く、線維化した間質周辺にTGF- β_1 陽性の肝細胞が認められた。

考 察

Transforming growth factor (TGF) は

Todaro らにより Molony 肉腫ウイルスで形質転換されたマウス 3T3 細胞の無血清培地中に見い出され¹⁾、精製が進められ TGF- α と TGF- β に分類され、それぞれは異なったポリペプチドであることが明らかになっている^{2),3)}。TGF- α は分子量約6000の単一ポリペプチドで、Epithelial growth factor (EGF) と類似した構造をもち⁴⁾、細胞の EGF レセプターと高い親和性を有し、各種の腫瘍細胞により産生され、その autocrine 機構による自律的増殖への関与が推定されている⁵⁾。一方、TGF- β は腫瘍化した細胞より産生分泌されるが、腫瘍細胞以外にも胎児組織や各種の正常組織からも抽出され、分子量 25,000 Da のホモダイマーである⁶⁾。TGF- β には β_1 と β_2 の 2 種類があり、 β_1 と β_2 はその作用において明らかな違いが認められていないが、それぞれ別個のレセプターをもつことがわかっている⁷⁾。

TGF- β の *in vitro* での作用は多岐にわたっているが、現段階では、1) 細胞増殖を促進する作用、逆に、2) 増殖を抑制する作用、および、3) 細胞増殖に直接関連しない細胞外マトリックス形成促進などの作用の大きく 3 つのカテゴリーに分けられている⁸⁾。その中で、TGF- β は線維芽細胞をはじめとする多くの間葉系細胞の増殖を促進する^{8),9)}。慢性肝炎では肝の TGF- β_1 mRNA の発現が増加し、コラーゲン産生の程度と比例していることが報告されている¹⁰⁾。今回の検討でも慢性肝炎患者では、血清中 TGF- β_1 値は、正常コントロール群に比べ有意に高値であった。また、慢性肝炎では、CHA_{2A} 群は CHA_{2B} 群よりも有意に高値を示しており、このことは、TGF- β_1 が線維化の進行期のみでなく early acute phase substance として線維化の初期にも大きく関与しているためかと思われた。

肝硬変では、Figure 1 の如く、非代償期群で 1 例 8.80 ng/ml と高値を示したため見かけ上非代償期が代償期に比較し高値をとったと考えられ、代償期、非代償期間で血清 TGF- β_1 値の差はないものと思われる。肝癌症例において血清 AFP 値と TGF- β_1 値との相関を検討した結果、Figure 3 に示す通り有意な相関関係を認めな

ったが、TGF- β_1 平均値は 2.19 ng/ml とコントロール群に比べ有意に高く、今後肝癌の tumor marker として利用できる可能性がある。

TGF- β は全身の諸臓器に広く分布しているが、ヒト正常肝細胞は TGF- β_1 mRNA を発現していないとされている¹¹⁾。しかし、ヒト肝細胞癌より樹立された細胞株 (HuH-7) 培養上清中の TGF- β 様因子の存在^{12),13)} やヒト肝細胞癌組織での TGF- β_1 mRNA の発現が報告され¹⁴⁾、TGF- β_1 が細胞の癌化に伴って発現してくることが示唆されている。我々も、Figure 3 に示す如く、免疫組織化学染色法にて硬変肝細胞内に TGF- β_1 の発現を認めており、硬変肝における発癌に TGF- β_1 が関与している可能性が考えられた。

TGF- β_1 は胎児組織や細胞増殖の盛んな組織において発現が強いことが知られており、細胞の分化と密接な関係にあると考えられているが¹⁵⁾、TGF- β の発現メカニズムについてはほとんど解

明されておらず今後の研究が待たれるところである。

ま と め

各種肝疾患92例につき血清 TGF- β_1 値の測定を行い、次の結果を得た。

1. 正常人コントロールの平均値は 0.90 ± 0.31 ng/ml に対し、AH, CH, LC, HCC はいずれも有意に高値を示した。

2. CH (n=41) の平均値は 1.57 ± 0.65 ng/ml であったが、組織学的には CAH_{2A}, CAH_{2B}, CPH の順に高値を示した。

3. LC (n=24) の平均値は 1.98 ± 1.76 ng/ml であったが、代償期より非代償期の方がやや高値を示した。

4. HCC (n=17) の平均値は 2.19 ± 1.01 ng/ml と高値を示し、2 ng/ml を越えるものが7例 (41.2%) を占めていた。

文 献

- 1) DeLarco JE, Todaro G : Growth factors from murine sarcoma virus transformed cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75 : 4001-4005, 1978
- 2) Assoian RK, Komoriya A, Meyers CA, Miller DM, Sporn MB : Transforming growth factor- β in human platelets. J. Biol. Chem. 258 : 7155-7160, 1983
- 3) Derynck RJ, Jarrett JA, Chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV : Human transforming growth factor- β cDNA sequence and expression in tumor cell line. Nature 316 : 701-705, 1985
- 4) Lee DC, Rose TM, Webb NR, Todaro G : Cloning and sequence analysis of a cDNA for rat transforming growth factor- α . Nature 313 : 489-491, 1985
- 5) Rosenthal A, Lindquist PB, Bringman, TS, Goeddel DV, Derynck R : Expression in rat fibroblasts of a human transforming growth factor- α cDNA results in transformation. Cell 46 : 301-309, 1986
- 6) Sporn MB, Roberts AB, Wakefield LM, de Crombrughe B : Some recent advances in the chemistry and biology of transforming growth factor- β . J. Cell Biol. 105 : 1039-1045, 1987
- 7) Cheifetz S, Weatherbee JA, Tsang NL-S, Anderson JK, Mole JE, Lucas R, Massague J : The transforming growth factor- β system. a complex pattern of cross-reactive ligand and receptor. Cell 48 : 409-415, 1987
- 8) Assoian RK : Biphasic effects of type β transforming growth factor on epidermal growth factor receptors in NRK fibroblasts. J. Biol. Chem. 260 : 9613-9617, 1985
- 9) Robey PG, Yonug MF, Flanders KC, Roche NS, Kondaiah P, Reddi AH, Termine JD, Sporn MB, Roberts AB : Osteoblasts synthesise and respond to TGF- β in vitro. J. Cell Biol. 105 : 457-463, 1987

- 10) Castilla A, Prieto J, Fausto N : Transforming growth factors β_1 and α in chronic liver disease effects of interferon α therapy. N. Engl. J. Med. 324 : 933-940, 1991
- 11) Derynck R, Jarre * JA, chen EY, Eaton DH, Bell JR, Assoian RK, Roberts AB, Sporn MB, Goeddel DV : Human transforming growth factor- β complementary DNA sequence and expression in normal and transformed cells. Nature 316 : 701-705, 1985
- 12) Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J : Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. Cancer Res. 42 : 3858-3863, 1982
- 13) 上木 昇, 中里 勝, 安室芳樹, 波田寿一, 東野一彌, 佐藤二郎 : ヒト肝癌細胞株 (HuH-7) による TGF- β 様因子の産生. 肝臓 29 : 1660, 1988
- 14) 伊藤信之, 河田純男, 田村信司, 高石健司, 白井康博, 藪内以和夫, 松田康雄, 西岡 稔, 垂井清一郎 : ヒト肝細胞癌組織における transforming growth factor- β_1 mRNA の発現. 肝臓 31 : 824-825, 1990
- 15) Hein UI, Munoz EF, Flangers KC, Ellingsworth LR, Thompson NL, Roberts AB, Sporn MB : Role of transforming growth factor- β in the development of the mouse embryo. J. Cell Biol. 105 : 2861-2867, 1987