

Transforming growth factor- β の免疫調節作用

—特に免疫グロブリン産生に及ぼす影響—

奈良県立医科大学第3内科学教室

松 為 裕 二

Received April 17, 1998

抄録： Transforming growth factor- β (TGF- β)は、間葉系細胞の増殖を促進するが、免疫担当細胞の機能には一般に抑制的に働くことが知られている。ところで肝硬変、肺線維症など臓器線維化を組織学的特徴とする疾患では、高免疫グロブリン(Ig)血症が共通した特徴であり、また標的臓器において TGF- β の発現亢進が明らかになってきている。そこで線維化臓器の TGF- β 産生亢進が高 Ig 血症の成立に関与している可能性を想定した。まず TGF- β を添加してマウス脾細胞を培養すると、リンパ球増殖能、Ig 産生能は短期培養では抑制的に働くが、長期培養ではむしろ促進的に働いた。次に浸透圧ミニポンプを用いて TGF- β を持続的にマウス肝内に注入すると、脾細胞の非特異的および特異的 Ig 産生の亢進を認めた。これらの成績は、肝での長期におよぶ TGF- β 産生亢進が高 Ig 血症の成立に関与する可能性を示すと考えられた。(奈医誌. J. Nara Med. Ass. 49, 215~225, 1998)

Key words : Transforming growth factor- β , 免疫グロブリン産生, 臓器線維化, サイトカイン

緒 言

Transforming growth factor- β (TGF- β)は、1978 年に、軟寒天培地内で正常線維芽細胞の増殖を促進する因子として腫瘍細胞の培地上清中より分離されたが¹⁾、現在では、種々の正常細胞も産生することが知られている。発見の契機は線維芽細胞増殖活性であったが、その後上皮細胞やリンパ系細胞の増殖にはむしろ抑制的に作用すること、さらに、細胞増殖のみならず、細胞や組織の分化、創傷の治癒・線維化、免疫応答の調節などきわめて多岐にわたる生物活性を有することが明らかになってきた^{2,3)}。

TGF- β の免疫系に及ぼす作用については、T 細胞、B 細胞、マクロファージおよび NK 細胞に対し抑制的に働くことが知られ、主に T 細胞の産生するインターロイキン 2 (IL-2)、IFN- γ などのサイトカイン分泌を、また、B 細胞の免疫グロブリン(Ig)分泌をともに抑制し、マクロファージの貪食能、さらに、NK 活性に対しても抑制的に作用することが数々報告されている⁴⁻¹³⁾。このように、従来は、TGF- β はリンパ球機能に対して、常に抑制的に作用すると考えられてきた。ところが、著者は、TGF- β

を添加してマウス末梢単核球を長期培養すると、リンパ球増殖能はむしろ保持され、さらに Ig 産生も TGF- β 非添加時に比べ亢進するという新事実を発見した。

次に、著者は、以前より、肝硬変をはじめ膠原病、肺線維症など臓器線維化を組織学的特徴とする疾患群においては、高 Ig 血症がひとつの共通の血清学的特徴であることに関心を寄せていた。近年、これらの疾病では線維化をきたす肝臓・皮膚・肺などの標的臓器において TGF- β の発現がみられることがしだいに明らかにされてきた¹⁴⁻²¹⁾。

そこで、著者は本研究で、まず、TGF- β の in vitro におけるリンパ球機能調節作用について、一定の結論を得るために、様々な実験条件下で検討した。次に著者は、臓器線維化を特徴とする疾病群において TGF- β 産生亢進が高 Ig 血症の成立に関与している可能性を想定し、TGF- β 肝内持続投与の Ig 産生に及ぼす影響について検討を加えた。

実験材料と方法

1 実験動物

日本 SLC(浜松)より購入した近交系マウス種 C3H/

HeN, C 57 BL/6, A/J, AKR/N, BALB/c, DBA/2 を用いた。すべて雌性, 6—8 週齢である。

2 TGF- β

TGF- β はヒト血小板由来の hTGF- β_1 (タカラ酒造) を用いた。hTGF- β_1 1 μ g に, ウシ血清アルブミン (2 mg/ml) を含む 5 mM 塩酸 100 μ l を加えたものを原液とし, 使用時に, ウシ血清アルブミン (2 mg/ml) を含む PBS (phosphate buffered saline) にて必要濃度に希釈した。

3 脾細胞培養

マウス脾臓を左側腹部小切開にて摘出の後, ピンセットおよびビベットによる物理的処置にて脾細胞が single cell として浮遊する状態とした。これらの細胞を 5% ウシ胎児血清 (FCS) および抗生物質 (kanamycin 60 μ g/ml, ampicillin 100 μ g/ml) を含む RPMI 1640 培養液にて 5×10^6 個/ml に調整した。なお, ノドマウスを用いた一部の実験では, マクロファージを除去すべく以下の処置も施行した。すなわち, コラーゲンにてコーティングしたプラスチックシャーレに脾細胞培養液を注ぎ, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 環境下で 3 時間静置の後, シャーレ附着性細胞を除去した。この処置による非附着性細胞分画に占めるラテックス粒子貪食能を有する細胞の割合は 0.1% 以下であった。

4 リンパ球幼若化反応

脾細胞を RPMI 1640 培養液にて, 1×10^6 個/ml に調整し, 96 穴平底培養プレート (0.2 ml/穴) にて培養した。リンパ球幼若化惹起物質として *Escherichia coli* 055 : B 5 由来 LPS (Difco, Detroit, USA) および Con A (Pharmacia, Uppsala, Sweden) を用い, それぞれ最終濃度 20 μ g/ml, 2 μ g/ml となるように添加した。培養終了 4 時間前に ³H-Thymidine 1 μ Ci/1 μ l (1 Ci = 37 GBq) を添加し, Titertek cell harvester にて細胞をガラス線維フィルター上に回収, その放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

5 NK 活性

YAC-1 標的細胞 10⁶ 個を 200 μ l の Na₂⁵¹CrO₄ (1 mCi/1 ml) および 200 μ l の FCS に混合, 37 $^{\circ}$ C にて 60 分間静置後, PBS にて 3 回洗浄し, Cr 標識 YAC-1 標的細胞とした。Effector 細胞としては脾細胞を用いた。96 穴丸底培養プレートを用い, 1 穴あたり effector 脾細胞 3×10^5 /100 μ l と Cr 標識 YAC-1 標的細胞 1×10^4 /100 μ l, すなわち E : T 比 30 : 1 にて 4 時間共培養した。培養液中に遊離した放射活性を測定し, 次式により NK 活性を算出した。

$$\text{NK 活性 (\%)} = (a - b) / (c - b) \times 100$$

a : 実験遊離放射活性

b : 自然遊離放射活性

c : 最大遊離放射活性

なお, 自然遊離群には Cr 標識細胞浮遊液 100 μ l に培養液 100 μ l を, また最大遊離放射活性は Cr 標識細胞浮遊液 100 μ l に 1% Triton-X 100 μ l を加えて放射活性とした。

6 Ig 産生細胞数の測定

非特異的 Ig 産生細胞は, ラビット抗マウス IgG, IgM, IgA 抗体 (ICN immunobiologicals, Lisle, IL, USA) を用いたプロテイン A ブラーク法²²⁾により, それぞれ IgG, IgM, IgA 各 Ig クラスのブラーク形成細胞数 (Plaque Forming Cell : PFC 数) を測定した。羊赤血球 (SRBC) に対する抗原特異的 Ig 産生細胞数の測定は Jerne の方法²³⁾に従い, SRBC 特異的 IgM 産生細胞を直接法にて測定した。

7 肝内および腹腔内 TGF- β 微量持続注入法

TGF- β 微量持続注入には, 7 日間持続注入可能な浸透圧ミニポンプ²⁴⁾ (Alza 社製 alzet^R, model 2001) および 14 日間持続注入可能な model 2002 を用いた。本ポンプに, 塩酸処理にて活性型とした TGF- β 25-100 ng/0.2 ml PBS あるいは PBS 0.2 ml を充填し微量持続注入を行った。肝内への注入に際しては, ポンプ長軸に対して約 45 度の傾斜角で 3 mm 本体より突出させた付属金属管 (外径 0.8 mm) にシリコンチューブ (外径 1.0 mm, 長さ 5 mm) を装着し, 本チューブをマウス肝内に約 2 mm 刺入させ固定した。なお, 処置後 7 日目あるいは 14 日目においてもチューブ先端が肝内に固定されていることは確認している。一方, 腹腔内投与時には付属金属管をポンプ本体に収納して腹腔内に留置した。

8 培養細胞株の IL-6 産生に及ぼす TGF- β 添加の影響

IL-6 産生株として 2 種の細胞株を用いた。すなわち, ヒト肝細胞株 Chang liver 細胞株²⁵⁾ および胆管細胞癌患者の腹水より樹立された HuCC-T1 細胞株²⁶⁾ である。これらの細胞は, それぞれ, 5% FCS および抗生物質 (kanamycin 60 μ g/ml, ampicillin 100 μ g/ml) を含む RPMI 1640 培養液にて培養し, TGF- β 添加による培養上清中の IL-6 濃度を ELISA 法にて測定した。

9 統計学的処理

測定値は平均値 (mean) \pm 標準偏差 (S. D.) で示し, 有意差検定は Student t test を用いた。

結 果

1 リンパ球増殖能に及ぼす TGF- β の影響 (図 1)

C 57 BL/6 マウス脾細胞を Con A とともに, TGF- β

の存在下あるいは非存在下に培養して、TGF- β のリンパ球増殖能に及ぼす影響を検討したところ、培養4日目まではTGF- β はリンパ球増殖を有意に抑制したが、培養8日目以降では、TGF- β はリンパ球増殖に促進的に作用した(図1, 左). LPSによるリンパ球幼若化反応にあっても、TGF- β は、同様に、短期培養では抑制的に作用し、長期培養では増殖能を維持・促進させる方向に作用した(図1, 右).

2 培養リンパ球のIg産生に及ぼすTGF- β の影響

C57BL/6マウス脾細胞をLPSで刺激し、TGF- β 存在下あるいは非存在下に14日間培養し、Ig産生細胞数に及ぼす影響を検討した。IgM産生については培養6日目まではTGF- β は抑制的に作用したが、培養8日目以降ではむしろ促進的に作用した(図2, 左)。同様にIgG産生についても、TGF- β は培養4日目までは抑制的に、培養8日目以降では促進的に作用した(図2, 右)。他の種々のマウス種の培養脾細胞について、培養2日目および10日目のIgM産生細胞数を検討した成績でも、TGF- β 添加時のIgM産生細胞数は、非添加時に比較し、培養2日目には少なく、逆に培養10日目には多いという共通した結果を得た(図3)。また、図には示さないが、IgG産

生細胞数も同様にTGF- β 添加時には、非添加時に比し、培養2日目には少ないが逆に培養10日目には多かった。

以上のように、LPSとともにTGF- β を添加し10日間培養するとIgMおよびIgG産生細胞数は、LPS単独培養時に比べ増加することが判明したので、次に培養6日目にTGF- β を再度添加し、その4日後にIg産生細胞数を検討した(表1)。TGF- β を再度添加すると、再度添加しない場合に比しIg産生細胞数は減少した。なお、LPS培養6日目に、はじめてTGF- β を添加するとLPS単独培養時に比べIg産生細胞数は減少した。

3 NK活性に及ぼすTGF- β の影響(図4)

C57BL/6マウス脾細胞を10 U/mlのリコンビナントIL-2とともに培養し、0.1 ng/ml, 1.0 ng/mlのTGF- β 添加のNK活性に及ぼす影響について検討した。いずれの濃度条件下でも培養2日目のNK活性はTGF- β 添加により抑制されたが、逆に、培養10日目にはTGF- β 添加によりNK活性は亢進した。

4 TGF- β 肝内および腹腔内持続投与の脾細胞Ig産生に及ぼす影響

活性型TGF- β (50 ng/0.2 ml PBS)あるいはPBS 0.2 mlを7日間かけて肝内あるいは腹腔内に持続微量注入

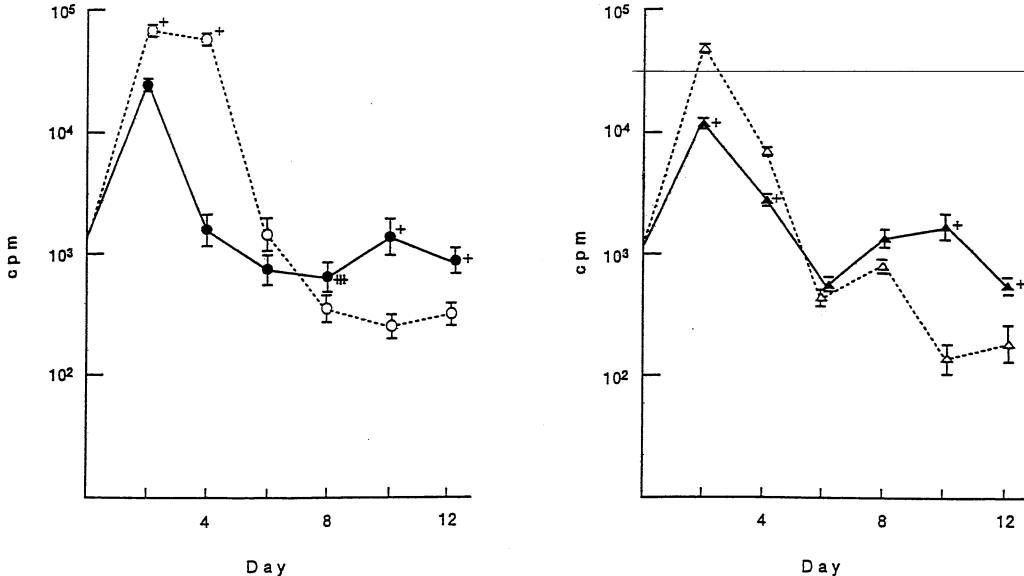


図1. Con A (左) と LPS (右) に対するリンパ球増殖能に及ぼす TGF- β の影響
C57BL/6 マウス脾細胞 (10^6 個/ml) を Con A ($2 \mu\text{g/ml}$) または LPS ($20 \mu\text{g/ml}$) とともに TGF- β (0.1 ng/ml) の存在下 (実線) あるいは非存在下 (破線) に12日間培養した。 ^3H -thymidine ($1 \mu\text{Ci}/1 \mu\text{l}$) を培養終了4時間前に添加し、その放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。3測定値の平均と S. D. を表示し、各測定日における TGF- β の存在下および非存在下のリンパ球増殖反応を比較した。
(+, $p < 0.01$ ++, $p < 0.05$)

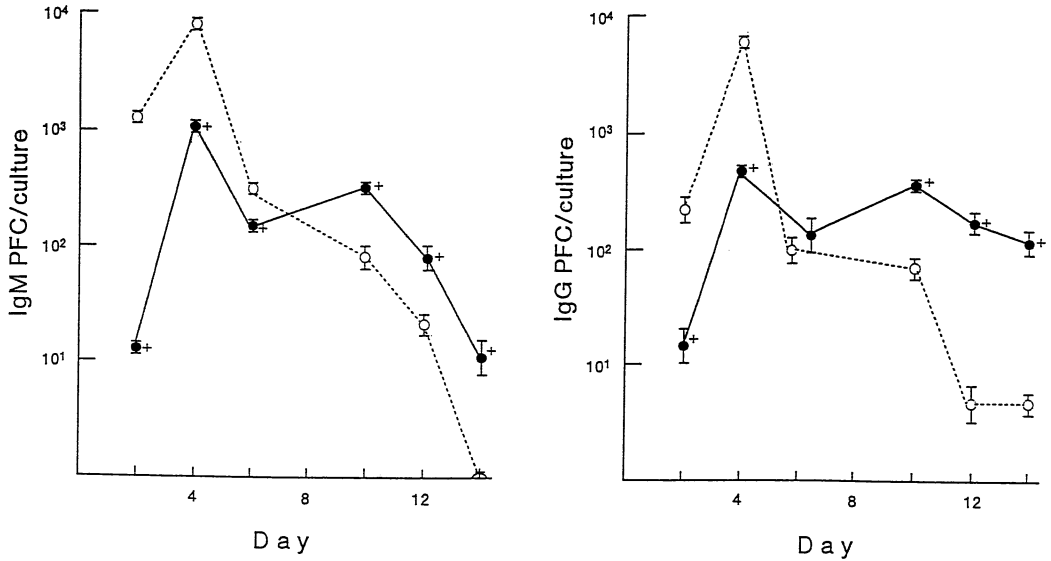


図2. LPS 刺激したリンパ球の IgM, IgG 産生に及ぼす TGF-β の影響
 C57BL/6 マウス脾細胞 (10⁶ 個/ml) を LPS (20 μg/ml) とともに TGF-β (0.1 ng/ml) の存在下 (●) あるいは非存在下 (○) に14日間培養し, IgM (左) と IgG (右) の PFC 数を測定した. 4 測定値の平均と S. D. を表示し, 各測定日における TGF-β の存在下および非存在下の PFC 数を比較した. (+, p<0.01 +++, p<0.05)

表1. TGF-β 再添加の Ig 産生に及ぼす影響

C57BL/6 マウス脾細胞 (10⁶ 個/ml) を LPS (20 μg/ml) とともに TGF-β (0.1 ng/ml) の存在下あるいは非存在下に培養した. 第6日目に TGF-β (0.1 ng/ml) を再度添加し, 第10日目に IgM と IgG の PFC 数を測定した. 3 測定値の平均と S. D. を表示した.

Day 0	Day 6	IgM PFC	IgG PFC
LPS	(-)	1050 ± 39	1215 ± 46
LPS+TGF-β	(-)	3260 ± 269	5910 ± 381
LPS+TGF-β	TGF-β	2040 ± 65	3470 ± 194
LPS	TGF-β	525 ± 29	655 ± 66

* : p<0.05

表2. TGF-β 肝内持続投与の脾細胞 IgG, IgA 産生に及ぼす影響

TGF-β (50 ng/0.2 ml PBS) または PBS (0.2 ml) を肝内に浸透圧ミニポンプを使用して7日間持続注入し, 第8日目に IgG と IgA の PFC 数を測定した. 4 測定値の平均と S. D. を表示した.

	IgG PFC/10 ⁶ spleen cells		IgA PFC/10 ⁶ spleen cells	
	PBS	TGF-β	PBS	TGF-β
C3H/HeN	136 ± 48	363 ± 84	263 ± 74	502 ± 96
C57BL/6	58 ± 14	87 ± 9	95 ± 32	139 ± 27
A/J	38 ± 11	131 ± 8	710 ± 189	1143 ± 380

* : p<0.05 ** : p<0.01

し、終了翌日に脾細胞のIg産生細胞数を検討した。まずIgM産生細胞数に及ぼす影響をみると(図5), TGF- β を肝内に持続投与したマウスでは、PBS投与マウスに比べ、脾のIgM産生細胞数は増加し、これはC3H/

HeN, C57BL/6, A/Jのいずれのマウス種においても認められた。一方、TGF- β を腹腔内に持続投与した場合には、脾のIgM産生細胞数はPBS投与時と比べて有意差は無く、IgM産生の亢進は認めなかった。次に、IgG, IgA

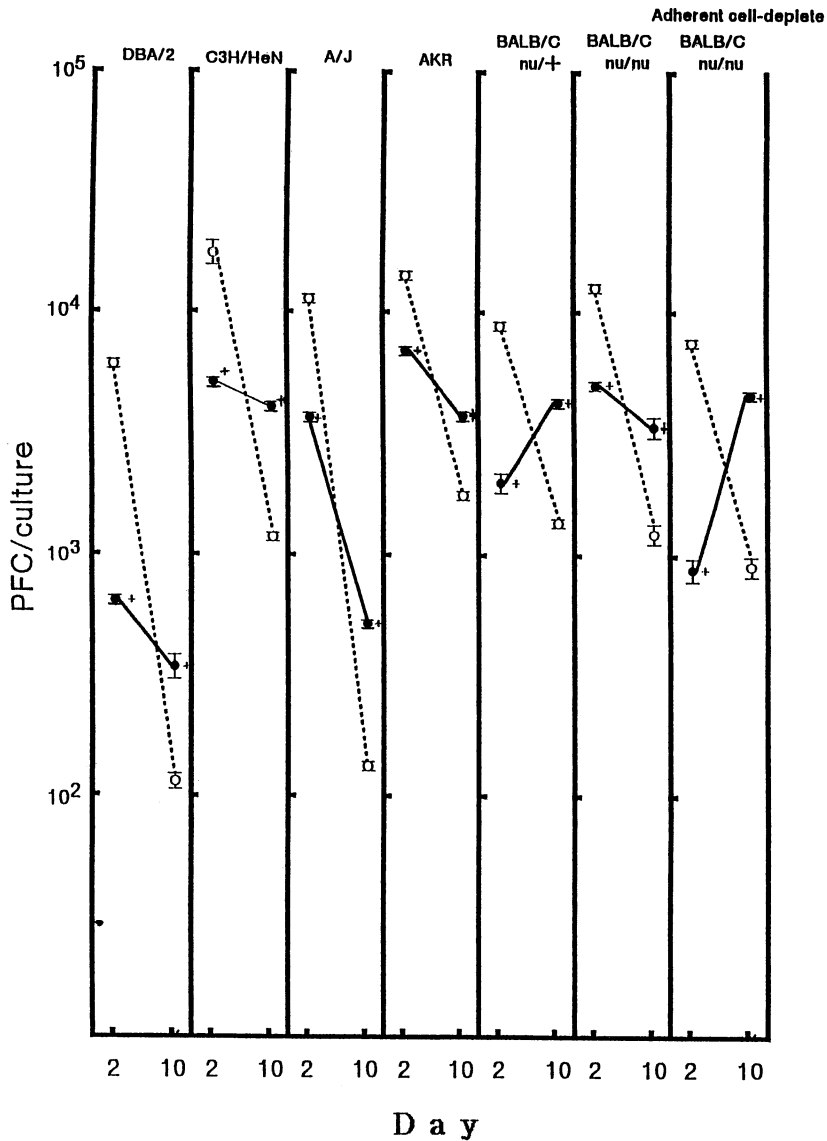


図3. 各種マウス系統によるLPS刺激した脾細胞のIgM産生に及ぼすTGF- β の影響

脾細胞(10⁶個/ml)をLPS(20 μ g/ml)とともにTGF- β (0.1 ng/ml)の存在下(●)あるいは非存在性(○)に10日間培養した。第2日目と第10日目にIgMのPFC数を測定した。4測定値の平均とS.D.を表示し、各測定日におけるTGF- β の存在下および非存在下のPFC数を比較した。

(+, p<0.01)

産生に TGF- β の肝内持続投与の影響についても検討したところ(表 2), TGF- β 投与 C3H/HeN, C57BL/6 マウスでは, PBS 投与マウスに比べ, 脾細胞の IgG, IgA 産生細胞数の増加がみられた. また, A/J マウスでも TGF- β 投与により IgG 産生細胞数の増加を認めた.

5 TGF- β 肝内持続投与期間の脾細胞 Ig 産生に及ぼす影響

活性型 TGF- β 25 ng を 7 日間かけて微量持続注入する速度で, すなわち, 毎時 0.15 ng の速度で肝内に持続注入し, TGF- β 注入開始後 3 日目, 7 日目, 10 日目, 14 日目, 28 日目に脾細胞の Ig 産生を検討したところ(図 6), IgM, IgA 産生細胞数は経過とともに増加傾向を示し, 7 日目以後は TGF- β 投与開始前(0 日目)に比し有意に増加した.

6 脾細胞の抗 SRBC 抗体産生に及ぼす TGF- β 肝内持続投与の影響(表 3)

活性型 TGF- β 50 ng を 7 日間で微量持続注入し, その第 2 日目に SRBC 10^8 個をマウス腹腔内に接種した. TGF- β 持続注入が終了した翌日, 脾細胞の抗 SRBC 抗体産生を検討したところ, TGF- β 肝内持続投与マウスでは, PBS 投与マウスに比し, 脾細胞の抗 SRBC 抗体産生が亢進していた.

7 細胞株の IL-6 産生に及ぼす TGF- β の影響(表 4)

Chang liver 細胞の IL-6 産生は, TGF- β により影響を受けなかったが, HuCC-T1 細胞の IL-6 産生は TGF- β により濃度依存的に亢進した.

考 察

元来, 線維芽細胞の増殖促進因子として発見された TGF- $\beta^{1)}$ は, 現在では, 細胞増殖の制御のみならず, 炎症と修復, 骨形成, 免疫調節など種々の生理作用を有することが知られている^{2,3)}.

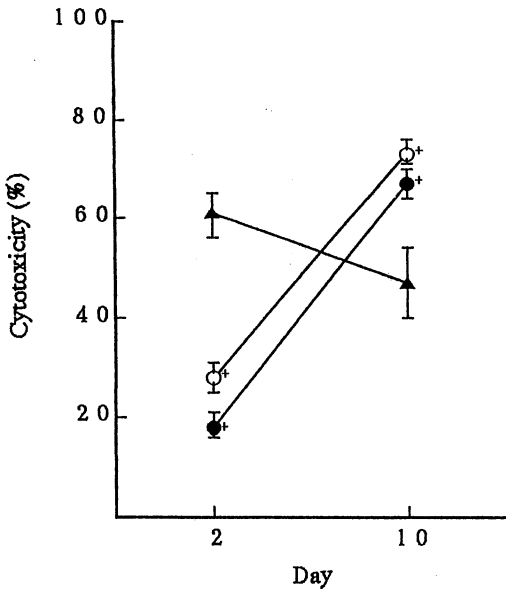


図 4. NK 活性に及ぼす TGF- β の影響
C57BL/6 マウス脾細胞 (10^6 個/ml) を TGF- β の存在下(○-0.1 ng/ml, ●-1 ng/ml)あるいは非存在下(▲)に recombinant IL-2 (10 U/ml) とともに10日間培養した. YAC-1 標的細胞に対する細胞障害活性は E:T 比 30:1 にて第 2 日目と第 10 日目に測定した. 4 測定値の平均と S. D. を表示し, 各測定日における TGF- β の存在下および非存在下の cytotoxicity を比較した.

(+, $p < 0.01$)

表 3. TGF- β 肝内持続投与の脾細胞抗 SRBC 抗体産生に及ぼす影響

TGF- β (50 ng/0.2 ml PBS) または PBS (0.2 ml) を肝内に浸透圧ミニポンプを使用して 7 日間持続注入し, その第 2 日目に SRBC 10^8 個をマウス腹腔内に接種した. 第 8 日目に SRBC 特異的 IgM 産生細胞を測定した. 6 測定値の平均と S. D. を表示した.

(Exp 1-1 回目, Exp 2-2 回目の実験結果を, none-肝内注入はなく SRBC 腹腔内接種のみでの実験結果を示す)

intrahepatic administration	Number of anti-SRBC producing cells (/ 10^6 cells)	
	Exp. 1	Exp. 2
TGF- β	777 \pm 173	858 \pm 190
PBS	484 \pm 89	601 \pm 77
none	520 \pm 65	609 \pm 70

* : $p < 0.05$

表 4. 培養細胞株の IL-6 産生に及ぼす TGF- β の影響

Chang liver 細胞および HuCC-T1 細胞を各濃度の TGF- β とともに 48 時間培養したのち, 培養上清中の IL-6 濃度を ELISA 法にて測定した.

Cell line	TGF- β (ng/ml)			
	0	0.1	1.0	10.0
HuCC-T1	96.5	104.3	156.2	600.0
Chang liver	108.0	107.0	115.7	112.4

IL-6 (pg/ml)

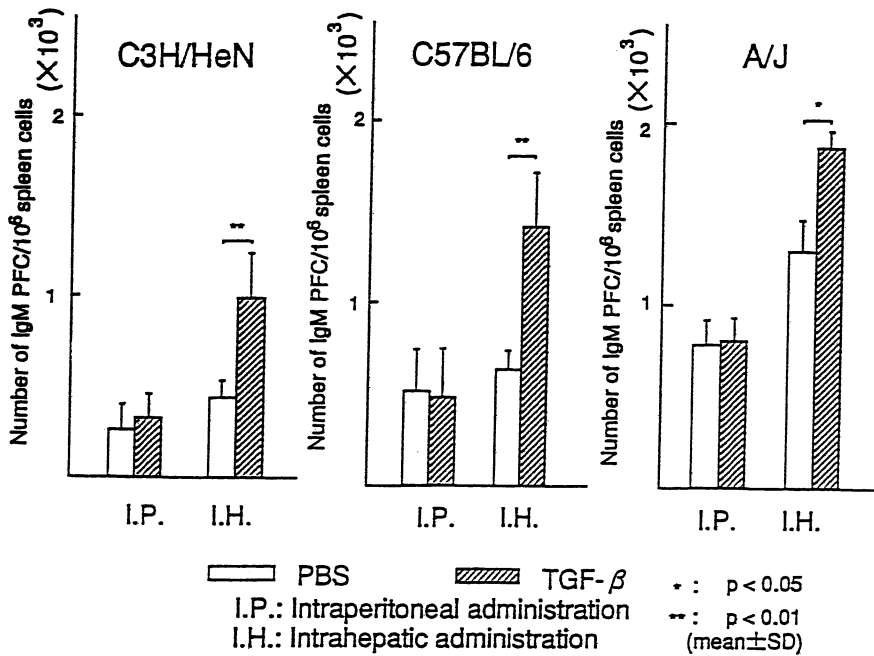


図5. TGF- β 肝内持続投与の脾細胞 IgM 産生に及ぼす影響
TGF- β (50 ng/0.2 ml PBS) または PBS (0.2 ml) を肝内または腹腔内に浸透圧ミニポンプを使用して7日間持続注入し、第8日目に PFC 数を測定した。4 測定値の平均と S. D. を表示した。

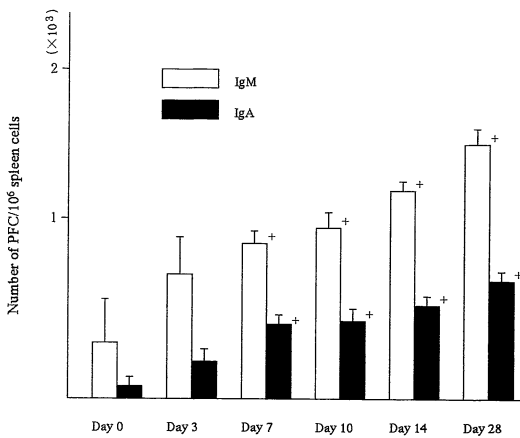


図6. TGF- β 肝内持続投与期間の脾細胞 Ig 産生に及ぼす影響

TGF- β を3.6 ng/day の速度で肝内に持続注入し、経時的に IgM と IgA の PFC 数を測定した。4 測定値の平均と S. D. を表示し、TGF- β 投与開始前 (Day 0) と各測定日の PFC 数を比較した。

(+, $p < 0.05$)

このうち、免疫系に及ぼす TGF- β の作用は、主として抑制的であるとされ、T 細胞、B 細胞、マクロファージの増殖やサイトカイン産生を抑制することが数々報告されてきた⁴⁻¹³⁾。一方で、TGF- β は、IL-2 存在下に LPS で刺激したマウス B リンパ球の IgA 産生を増強するとの報告²⁷⁻²⁹⁾もあるが、一般には免疫系に対して抑制的に作用するとの見解が大勢を占めている。しかし、これらの報告のほとんどは、TGF- β の存在下でリンパ球を1-3日間短期培養して得た成績に基づくものであった。本研究でも、確かに1-4日目の培養初期においては、TGF- β はリンパ球増殖能、Ig 産生およびNK 活性を抑制する方向に働いたが、長期にわたり培養を続けると、TGF- β 添加によりリンパ球増殖能はむしろ保持され、Ig 産生やNK 活性も亢進することが判明した。このような、TGF- β の Ig 産生に対する抑制、亢進の2相性反応は種々の系統のマウスに共通の現象であった。すなわち、今回の研究において、TGF- β は培養早期にはリンパ球機能を抑制するが、その後は維持し、さらに亢進する方向に作用することが明らかとなった。

ところで、活性化した T 細胞、B 細胞、マクロファ-

ジ自身が TGF- β を産生することが知られており、これら細胞の培養上清中の TGF- β 濃度を測定すると 0.1—30 ng/ml に達すると報告されている^{5,8,10}。本研究では、培養液に添加した TGF- β 濃度は 0.1 ng/ml であり、リンパ球自身が産生する内因性 TGF- β 量に比べ相当少量である。このように外来性に添加された TGF- β が少量であるにもかかわらずリンパ球機能に影響を与えた理由として、添加 TGF- β が塩酸処理によりすでに活性型となっていることが考えられる^{2,3}。すなわち、培養リンパ球の産生する内因性 TGF- β のほとんどは、生理活性を有しない潜在型として培養液中に分泌されるのに対し、添加 TGF- β はたとえ少量でも活性型であるためと考えられる。

さて、TGF- β の他の重要な生物学的活性のひとつとして、炎症・創傷の治癒過程において細胞外マトリックス蛋白の産生を促し、その分解を抑制することが知られている^{2,3}。近年、肝硬変をはじめ膠原病、肺線維症など臓器線維化を主徴とする疾患では、線維化をきたす標的臓器において TGF- β の発現が証明されてきている^{14—21}。以前より、著者は高 Ig 血症がこれらの疾病に共通するひとつの血清学的特徴であることに関心を寄せており、線維化臓器の TGF- β 産生亢進が高 Ig 血症の成立に関与している可能性を想定した。そこで、浸透圧ミニポンプを用いて TGF- β を肝臓内に持続投与し、脾細胞の Ig 産生に及ぼす影響を検討したところ、TGF- β の肝内持続投与は脾細胞の Ig 産生亢進をもたらすことが判明した。この成績は上述した線維化を主徴とする疾病群にみられる高 Ig 血症の成立に、疾病臓器における TGF- β 産生亢進が関与する可能性を示唆している。in vitro リンパ球長期培養実験成績とともに、TGF- β の免疫系に及ぼす影響が必ずしも抑制方向ではないことを示すものである。

ところで、TGF- β 肝内持続投与時に観察された脾細胞の Ig 産生亢進は、TGF- β 腹腔内持続投与では認められなかった。この事実は TGF- β の肝内投与が特別に意味を有することを示唆する。肝内あるいは腹腔内に投与した活性型 TGF- β は、血液中の α_2 マクログロブリンなどにより不活化³⁰されるため、活性型のまま脾臓に到達し、リンパ球機能に影響するとは考え難い。TGF- β を肝内に持続投与した際は、肝内で TGF- β により他のサイトカイン産生が誘導され、その結果脾細胞の Ig 産生も影響を受けたと考えるのが妥当である。

そこで、著者は、Ig 産生に対し促進的に作用することが知られているサイトカイン IL-6 に注目し、数種の肝由来ヒト細胞株の IL-6 産生を調べた結果、Chang liver

肝細胞株が IL-6 を産生することを見出した。そこでこの Chang liver 細胞と胆管細胞癌患者腹水より樹立され既に IL-6 を産生することの知られていた HuCC-T 1 株³¹を用いて、細胞株の IL-6 産生に及ぼす TGF- β の影響を検討した。その結果、TGF- β は Chang liver 細胞の IL-6 産生には影響を及ぼさなかったが、HuCC-T 1 の IL-6 産生を増強することが明らかになった。この TGF- β による IL-6 産生増強は、ラット腸管上皮細胞株 IEC-6 でも観察されている³²。加えて、IL-6 産生は株化細胞のみならず、ヒト肝より分離した正常胆管上皮でも認められ、その IL-6 産生は IL-1 や PMA 刺激により増強されることも報告³³されている。これらの事実と今回の実験成績から TGF- β が胆管上皮に作用し、IL-6 産生を増強する可能性がまず考えられる。

ところで、Ig 産生を促すサイトカインは IL-6 以外にもあり、最近 IL-10 の関与が注目されている。すなわち、ある種の肝細胞株の培養上清が Ig 分泌刺激作用を有すること、さらにその作用が IL-10 に起因し、しかも、TGF- β がそのマウス肝細胞株の IL-10 産生を増強することが報告されている³⁴。本実験でも、肝内に投与された TGF- β が、不活化される前に肝内に存在する肝細胞、胆管上皮に作用し、IL-6、IL-10 などの何らかのサイトカイン産生を促した可能性は十分に考えられる。

TGF- β 肝内持続投与時に脾細胞の抗原非特異的 Ig 産生が亢進することは上述したが、さらに腹腔内投与した特異抗原 (SRBC) に対する脾細胞の抗体産生についても検討したところ、同様に TGF- β 肝内投与マウスでは、特異抗体 (抗 SRBC 抗体) 産生細胞数の増加を認めている。

以上のように、TGF- β の肝内持続投与により脾細胞の Ig 産生が亢進するという今回の成績は、慢性肝炎や肝硬変における高 Ig 血症の成立に、肝での長期におよぶ TGF- β の産生亢進が関わっている可能性を示唆するものと言える。

結 語

TGF- β の免疫調節作用について検討し次の結果を得た。

1 TGF- β を添加してマウス末梢単核球を長期培養すると、リンパ球増殖能はむしろ保持され、さらに Ig 産生能も、TGF- β 非添加時に比べ亢進した。

2 浸透圧ミニポンプを用いて TGF- β を持続的にマウス肝内に投与したところ、脾細胞の Ig 産生の亢進を認めた。この脾細胞の Ig 産生亢進は、抗原非特異的および特異的 Ig 産生のいずれにおいても観察された。

3 TGF- β は胆管上皮由来 HuCC-T 1 細胞の IL-6 産生を亢進させた。

これらの成績は、臓器線維化を組織学的特徴とする肝硬変、膠原病、肺線維症などの疾病群に共通して観察される高 Ig 血症の成因に、標的組織において TGF- β の発現亢進が関与する可能性を示唆していると考えられた。

稿を終わるにあたり、御指導、御校閲を賜りました福井 博教授に深甚の謝意を捧げるとともに、御校閲、御助言を賜りました本学病態検査学講座中野 博教授ならびに寄生虫学講座石坂重昭教授に深謝いたします。さらに本研究の遂行にあたり直接の御指導を賜りました吉川正英博士に感謝いたします。また終始、御協力いただきました第 3 内科学教室の諸兄に感謝の意を表します。

文 献

- 1) **Deralco, J. E. and Todaro, G. J.** : Growth factors from murine sarcoma virus-transformed cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75** : 4001-4005, 1978.
- 2) **Massague, J.** : The transforming growth factor- β family. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6** : 597-641, 1990.
- 3) **Roberts, A. B. and Sporn, M. B.** : Transforming growth factor β . *Adv. Cancer Res.* **51** : 107-145, 1988.
- 4) **Wahl, S. M., Hunt, D. A., Wong, H. L., Dougherty, S., McCartney-Francis, N., Whal, L. M., Ellingsworth, L., Schmidt, J. A., Hall, G., Roberts, A. B. and Sporn, M. B.** : Transforming growth factor- β is a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* **140** : 3026-3032, 1988.
- 5) **Kehrl, J. H., Wakefield, L. H., Roberts, A. B., Jakowlew, S., Alvarez-Mon, M., Derynck, R., Sporn, M. B. and Fauci, A. S.** Production of transforming growth factor β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. *J. Exp. Med.* **163** : 1037-1050, 1986.
- 6) **Kehrl, J. H., Alvarez-Mon, M. and Fauci, A. S.** : Type β transforming growth factor suppresses the growth and differentiation of human B and T lymphocytes. *Clin. Res.* **33** : 610 A, 1985.
- 7) **Ranges, G. E., Figari, I. S., Espevik, T. and Palladino, M. A.** : Inhibition of cytotoxic T cell development by transforming growth factor β and reversal by recombinant tumor necrosis factor α . *J. Exp. Med.* **166** : 991-998, 1987.
- 8) **Kehr, J. H., Roberts, A. B., Wakefield, L. H., Jakowlew, S., Sporn, M. B. and Fauci, A. S.** : Transforming growth factor- β is an important immunoregulatory protein for human B lymphocytes. *J. Immunol.* **137** : 3855-3860, 1986.
- 9) **Shalaby, M. R. and Ammann, A. J.** : Suppression of immune cell function in vitro by recombinant human transforming growth factor- β . *Cell Immunol.* **112** : 343-350, 1988.
- 10) **Assoian, R. K., Fleurdelys, B. E., Stevenson, H. C., Miller, P. J., Madtes, D. K., Rains, E. W., Ross, R. and Sporn, M. B.** : Expression and secretion of type β transforming growth factor by activated human macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84** : 6020-6024, 1987.
- 11) **Espevik, T., Figgrim, I. S., Shalaby, M. R., Lackides, G. A., Lew, G. D., Shepard, M. and Palladino, M. A.** : Inhibition of cytokine production by cyclosporin A and transforming growth factor- β . *J. Exp. Med.* **166** : 571-576, 1987.
- 12) **Tsunawaki, S., Sporn, M. B., Ding, A. and Nathan, C.** : Deactivation of macrophages by transforming growth factor- β . *Nature* **334** : 260-262, 1988.
- 13) **Rook, A. H., Kehrl, J. H., Wakefield, L. M., Roberts, A. B., Sporn, M. B., Burlington, D. B., Lane, H. C. and Fauci, A. S.** : Effects of transforming growth factor- β on the functions of natural killer cells depressed cytolytic activity and blunting of interferon responsiveness. *J. Immunol.* **136** : 3916-3920, 1986.
- 14) **Milani, S., Herbst, H., Schuppan, D. and Surrenti, C.** : Transforming growth factors beta 1 and beta 2 are differentially expressed in fibrotic liver disease. *Am. J. Pathol.* **139** : 1221-1229, 1991.
- 15) **Nagy, P., Schaff, Z. and Lapis, K.** : Immunohistochemical detection of transforming growth factor β 1 in fibrotic liver diseases. *Hepatology* **14** : 269-273, 1991.
- 16) **Roulot, D., Durand, H., Coste, T., Rautureau, J., Strosberg, D., Benarous, R. and Marullo,**

- S. : Quantitative analysis of transforming growth factor β 1 messenger RNA in the liver of patients with chronic hepatitis C: Absence of correlation between high levels and severity of disease. *Hepatology* **21** : 298-304, 1995.
- 17) **Bedossa, P., Peltier, E., Terris, B., Franco, D. and Poynard, T.** : Transforming growth factor β 1 (TGF- β 1) and TGF- β 1 receptors in normal, cirrhotic, and neoplastic human livers. *Hepatology* **21** : 760-766, 1995.
 - 18) **Igarashi, A., Nashiro, K., Kikuchi, K., Sato, S., Ihn, H., Fujimoto, M., Grotendorst, G. R. and Takehara, K.** : Connective tissue growth factor gene expression in tissue sections from localized scleroderma, keroid, and other fibrotic skin disorders. *J. Invest. Dermatol.* **106** : 729-733, 1996.
 - 19) **Corrin, B., Butcher, D., McAnulty, B. J., Dubois, R. M., Black, C. M., Laurent, G. J. and Harrison, N. K.** : Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 in the lungs of patients with systemic sclerosis, cryptogenic fibrosing alveolitis and other lung disorders. *Histopathology* **24** : 145-150, 1994.
 - 20) **Vaillant, P., Menard, O., Vignaud, J. M., Martinet, N. and Martinet, Y.** : The role of cytokines in human lung fibrosis. *Monaldi Arch. Chest. Dis.* **51** : 145-152, 1996.
 - 21) **Khalil, N., O'Connor, R. N., Flanders, K. C. and Unruh, H.** : TGF-beta 1, but not TGF-beta 2 or TGF-beta 3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **14** : 131-138, 1996.
 - 22) **Gronowicz, E., Coutinho, A. and Melcher, F.** : A plaque assay for all cells secreting immunoglobulin of a given type of class. *Eur. J. Immunol.* **6** : 588-590, 1976.
 - 23) **Jerne, N. K. and Nordin, A. A.** : Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science* **140** : 405-406, 1963.
 - 24) **Hully, J. R., Chang, L., Schwall, R. H., Widmer, H. R., Terrell, T. G. and Gillett, N. A.** : Induction of apoptosis in the murine liver with recombinant human activin A. *Hepatology* **20** : 854-861, 1994.
 - 25) **Kaji, T., Hiraga, S. and Yamamoto, C.** : Characterization of tumor necrosis factor alpha-induced alternation of glycosaminoglycans in cultured cells: comparison among vascular smooth-muscle cells, vascular endothelial cells, Chang liver cells and LLC-PK 1 cells. *Biol. Pharm. Bull.* **16** : 834-839, 1993.
 - 26) **Miyagiwa, M., Ichida, T., Tokiwa, T., Sato, J. and Sasaki, H.** : A new human cholangiocellular carcinoma cell line (HuCC-T 1) producing carbohydrate antigen 19/9 in serum-free medium. *In Vitro Cell Dev. Biol.* **25** : 503-510, 1989.
 - 27) **Kim, P. H. and Kagnoff, M. F.** : Transforming growth factor β 1 is a costimulator for IgA production. *J. Immunol.* **144** : 3411-3416, 1990.
 - 28) **Van Vlasselaer, P., Punnonen, J. and de Vries, J. E.** : Transforming growth factor- β directs IgA switching in human B cells. *J. Immunol.* **148** : 2062-2067, 1992.
 - 29) **Defrance, T., Vanbervliet, B., Briere, F., Durand, I., Rousset, F. and Banchereau, J.** : Interleukin 10 and transforming growth factor β cooperate to induce anti-CD40-activated native human b cells to secrete immunoglobulin A. *J. Exp. Med.* **175** : 671-682, 1992.
 - 30) **O'Connor-McCourt, M. D. and Wakefield, L. M.** : Latent transforming growth factor β in serum: a specific complex with α 2-macroglobulin. *J. Biol. Chem.* **262** : 14090-14099, 1987.
 - 31) **Okada, K., Shimizu, Y., Nambu, S., Higuchi, K. and Watanabe, A.** : Interleukin-6 functions as an autocrine growth factor in a cholangiocarcinoma cell line. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **9** : 462-467, 1994.
 - 32) **McGee, D. W., Beagley, K. W., Aicher, W. K. and McGhee, J. R.** : Transforming growth factor- β enhances interleukin-6 secretion by intestinal epithelial cells. *Immunology* **77** : 7-12, 1992.
 - 33) **Matsumoto, K., Fujii, H., Michalopoulos, G., Fung, J. J. and Demetris, A. J.** : Human biliary epithelial cells secrete and respond to cytokines and hepatocyte growthfactors in vitro : Interleukin-6, hepatocyte growth factor and epidermalgrowth factor promote DNA synthesis in vitro. *Hepatology* **20** : 376-382, 1994.

- 34) **Ishizaka, S., Saito, S., Yoshikawa, M., Kimoto, M. and Nishiyama, T.** : IL-10 production in mouse hepatocytes augmented by TGF- β . Cytokine 8 : 837-843, 1996.

IMMUNOMODULATORY EFFECTS OF TRANSFORMING
GROWTH FACTOR-BETA (TGF- β)
—THE ENHANCING EFFECTS OF TGF- β
ON IMMUNOGLOBULIN PRODUCTION—

YUJI MATSUI

The Third Department of Internal Medicine, Nara Medical University

Received April 17, 1998

Abstract : Transforming growth factor- β (TGF- β) is known to stimulate the proliferation of mesenchymal cells and exert suppressive effects on many immune responses including immunoglobulin (Ig) production of lymphocytes. Recently, the hyperexpression of TGF- β has been immunohistochemically proven in the livers and lungs in patients with liver cirrhosis and pulmonary fibrosis, respectively. However, the patients with these diseases commonly show hyper-, not hypo-, gammaglobulinemia as a characteristic humoral finding. We made a hypothesis that the increased production of TGF- β in the organs undergoing fibrosis might play a role in the pathogenesis of hypergammaglobulinemia, and we investigated the effects of TGF- β on immune responses in *in vitro* and *in vivo*. TGF- β strikingly inhibited the proliferation responses, NK activity and polyclonal Ig production of murine splenocytes during the first 4 days of cultures. However, after a 5-day culture period, the addition of TGF- β in the culture enhanced all of these immune responses. Furthermore, continuous intrahepatic administration of TGF- β using osmotic minipump augmented polyclonal Ig production of spleen cells. In addition, an antigen-specific Ig production of spleen cells was also enhanced by the continuous injection of TGF- β following an intraperitoneal immunization of the antigen, sheep red blood cells. On the other hand, the intraperitoneal administration of TGF- β had no effect on either polyclonal or antigen-specific Ig production of spleen cells, suggesting that the augmented Ig production of spleen cells was not due to a direct effect of TGF- β on spleen cells. Although the precise mechanism of hypergammaglobulinemia in the patients with liver cirrhosis is unknown, the continuous production of TGF- β in the livers chronically affected with fibrosis is considered to play an important role in the pathogenesis of hypergammaglobulinemia in those patients. (奈医誌. J. Nara Med. Ass. 49, 215~225, 1998)

Key words : transforming growth factor- β , immunoglobulin production, fibrosis, cytokine