

慢性肝疾患における血清Transforming Growth Factor- α
(TGF- α)及び肝組織中TGF- α とEpidermal Growth
Factor Receptor (EGFR)の発現

鳥取大学医学部内科学第二教室 (主任 川崎 寛中教授)

原田賢一・汐田剛史

Expression of Transforming Growth Factor- α in Serum and
Transforming Growth Factor- α and Epidermal Growth
Factor Receptor in Liver Tissues
of Chronic Liver Diseases

Ken-ichi HARADA and Goshi SHIOTA

*Second Department of Internal Medicine
Tottori University School of Medicine
Yonago 683-8504, Japan*

ABSTRACT

Transforming growth factor- α (TGF- α) is a potent mitogen of normal and neoplastic hepatocytes, and exhibits its effect by binding to epidermal growth factor receptor (EGFR). However, the significance of TGF- α and EGFR in liver diseases remains unclear. To evaluate the significance of TGF- α and EGFR in chronic liver diseases, we examined serum TGF- α , and gene expression of TGF- α , EGFR and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in liver tissues. Twenty-five patients with chronic hepatitis (CH), 20 with liver cirrhosis (LC), 45 with hepatocellular carcinoma (HCC) and 45 normal controls (C) were enrolled in this study. Serum TGF- α levels were measured by enzyme-linked immunosorbent assay. Gene expression of TGF- α , EGFR, PCNA and β -actin in liver tissues was examined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR). Serum TGF- α levels in controls, CH, LC and HCC were 6.5 ± 2.4 , 32.8 ± 11.3 , 383.1 ± 287.3 and 119.9 ± 47.5 pg/ml, respectively. Serum TGF- α levels in LC were higher than CH and C ($p < 0.05$ compared to CH, and $p < 0.01$ compared to controls). Serum TGF- α levels exhibited a significant positive correlation with total bilirubin and indocyanine green retention test ($p < 0.05$), and a significant negative correlation with albumin ($p < 0.05$). Also, serum TGF- α levels increased in parallel with severity of disease according to Child classification. The ratios of TGF- α , EGFR and PCNA mRNA to β -actin mRNA were not significantly

different among the diseases, although they tended to be lower in patients with LC than in other diseases. The TGF- α / β -actin ratio was correlated with EGFR/ β -actin and PCNA/ β -actin ratios ($p < 0.005$ and $p < 0.0001$, respectively), and EGFR/ β -actin ratio was related to PCNA/ β -actin ratio in all the patients, especially in HCC ($p < 0.005$). The results of the present study suggest that serum TGF- α levels are closely related to severity of liver dysfunction, and that TGF- α accelerates cell proliferation of hepatocytes and HCC cell in an autocrine fashion.

(Accepted on January 12, 1999)

Key words : transforming growth factor- α , epidermal growth factor receptor, chronic liver diseases

はじめに

TGF- α は50個のアミノ酸^{1,2)}からなる一本鎖のポリペプチドで、160個のアミノ酸からなる膜貫通型前駆体が蛋白分解されることにより生じる^{3,4)}。成熟TGF- α はEGFと約40%の相同性がある³⁾。TGF- α はEGFレセプター(EGFR)に結合し、レセプターのチロシンキナーゼを活性化する。TGF- α は強力なミトゲンであり血管新生作用を有し⁵⁾、マクロファージ活性化⁶⁾、細胞遊走⁷⁾などの機能を持ち、創傷治癒³⁾、胎児発生^{8,9)}、癌化¹⁰⁻¹³⁾に重要な役割を果たしている。

TGF- α の発現はヒト¹⁴⁻¹⁸⁾と動物^{10,19-22)}における肝細胞増殖と肝発癌に関連していると報告されてきた。TGF- α mRNAは部分肝切除後、肝細胞においてDNA合成とEGFR mRNAのピークに一致して増加するといわれている^{12,23,24)}。TGF- α とEGFRは共に免疫組織学的方法あるいはin situ hybridization法によりヒト肝細胞癌において過剰発現しているとの報告があり^{16,17,25)}、血清TGF- α は肝細胞癌患者及び部分肝切除が行われた患者で増加している^{18,26,27)}。このようにTGF- α は肝細胞あるいは肝癌細胞の増殖に強く関連していることが示唆される。しかし、ヒト肝疾患におけるTGF- α の臨床的意義は未だ明らかにされていない。

今回我々は慢性肝疾患におけるTGF- α /EGFRの臨床的意義を明らかにするために血清TGF- α と肝組織中のTGF- α 、EGFR、PCNAの遺伝子発現を検討した。

対象と方法

対象 慢性肝炎(CH)25例、肝硬変(LC)20例、肝細胞癌(HCC)45例と健常者(C)45例を対象とし

た。診断は臨床的、生化学的、画像的及び組織学的所見により行った。画像検査として腹部超音波、腹部CT、腹部血管造影検査を行った。肝組織は、CHとLCは腹腔鏡下に、HCCは腹部超音波下に採取した。患者の臨床的特徴と検査所見を表1に示す。HCC患者は全てLCを有し、HCCの腫瘍径は5 cm以下であった。TGF- α 、EGFR、PCNA mRNAの肝組織中の発現は、CH患者10例、LC3例、HCC16例で検討した。HCC例では腫瘍組織と共に周囲非腫瘍組織(nHCC)も採取した。プロトコールは1975年ヘルシンキ宣言に準拠して作成し、それぞれの患者からインフォームド・コンセントを得た。

血清TGF- α 値測定 患者血清は入院時に採取し、血清TGF- α 濃度はenzyme-linked immunosorbent assay kit (Oncogene Science, Inc., New York, USA)により測定した。

RNA抽出 総RNAはISOGEN (Nippon Gene Co., Toyama, Japan)を用いたグアニジン-チオシアン酸塩-フェノール-クロロホルム法により分離した。肝組織は肝生検後直ちに1 mlのISOGEN液と共にホモジネートし、RNA抽出まで -80°C で保存した。ホモジネートされた肝組織は室温で融解し、0.2 mlのクロロホルムを加え、15秒間転倒混和した。 4°C で15分間12,000 gで遠心分離後、水相を抽出し0.5 mlのイソプロパノールを添加後、 4°C で10分間12,000 gで遠心分離した。沈澱物を75%エタノールで洗浄後乾燥させ、30 μl DEPC (diethyl pyrocarbonate)処理水に溶解した。RNA量は260 nmの波長で分光光度計により算出した。

cDNA合成 Ready-To-Go™ T-Primed First-Strand Kit (Pharmacia Biotech Inc., USA)を用

表 1. 慢性肝疾患患者の臨床検査所見

	慢性肝炎	肝硬変	肝癌	健常者
患者数	25	20	45	45
年齢 (歳)	45 \pm 12	59 \pm 10 ^a	64 \pm 12 ^a	24 \pm 2
性 (男/女)	18/7	13/7	33/12	33/12
成因 (A/B/C/他)*	1/9/14/1	6/6/7/1	2/12/30/1	—
ビリルビン (mg/dl)	0.9 \pm 0.1	2.0 \pm 0.3	2.1 \pm 0.6	—
アルブミン (g/dl)	3.9 \pm 0.1	3.3 \pm 0.1 ^a	3.4 \pm 0.1 ^a	—
プロトロンビン時間 (%)	100 \pm 3	68 \pm 3 ^{a,c}	77 \pm 2 ^a	—
ICGR ₁₅ (%)	12 \pm 1	37 \pm 5 ^a	30 \pm 2 ^a	—
AST (IU/l)	81 \pm 26	75 \pm 10	102 \pm 24	—
ALT (IU/l)	106 \pm 18	60 \pm 9	79 \pm 18	—
ALP (IU/l)	239 \pm 12	308 \pm 21	493 \pm 120	—
GGT (IU/l)	69 \pm 10	149 \pm 34 ^b	104 \pm 17	—
LDH (IU/l)	176 \pm 9	216 \pm 10 ^b	229 \pm 10 ^a	—
AFP (ng/ml)	12 \pm 3	15 \pm 4	5,781 \pm 3,504	—
Child分類 (A/B/C)	—	6/8/3	27/14/4	—
Pugh スコア	—	8 \pm 2 ^c	7 \pm 2	—
血清TGF- α (pg/ml)	32.8 \pm 11.3	383.1 \pm 287.3 ^{b,d}	119 \pm 47.5	6.5 \pm 2.4

* 成因A, B, Cはそれぞれalcohol, hepatitis B, hepatitis Cを示す.

a: p < 0.01 compared to CH; b: p < 0.05 compared to CH; c: p < 0.05 compared to HCC;

d: p < 0.01 compared to C

い, 1 μ gのRNAからプライマーとしてoligo (dT)と逆転写酵素により相補的DNAを作成した. まずRNAをDEPC処理水に溶解し計33 μ lとし, 65°Cで5分間加温した. その後First-Strand Reaction Mixと共に37°Cで5分間加温しRNAを加えさらに37°Cで5分間加温した. 同溶液をよく混和し37°Cで60分間反応させ逆転写を行った.

PCR増幅 TGF- α , EGFR, PCNAそして内部コントロールとしての β -actin遺伝子の特異的プライマーを表2に示す. PCRはGeneAmp PCR Reagent Kit (Perkin Elmer, New Jersey, USA)を用いて施行した. 2 μ lのcDNA溶液に77.5 μ lの水を加え, 95°C5分間加熱後氷冷した. 引き続き, 10 μ lの10 \times PCR反応液, 8 μ lのdNTP混合液(それぞれのデオキシヌクレオチドの最終濃度は200 μ M), senseおよびantisenseプライマーをそれぞれ50 pmol, AmpliTaq DNA polymeraseを2.5単位添加し計100 μ lとした. 各遺伝子のPCRは以下の如く行った. TGF- α , EGFR, β -actinについては, 94°C30秒間, 58°C30秒間, 72°C90秒間を32サイクル行い, PCNAについてはそれぞれ94°C

90秒間, 55°C120秒間, 72°C30秒間で36サイクル行った. PCR産物はエチジウム・ブロマイドを含む2%アガロースゲル上で電気泳動し, 紫外線下でバンドを確認した.

Southern Blot法 アガロースゲル上に電気泳動されたPCR産物をナイロン・メンブレン(MICRON SEPARATIONS Inc., MA, USA)に転写した. プロブは既報に準じて作成した²⁸⁾. 転写されたメンブレンはプレハイブリダイゼーション溶液(6 \times SSC, 1% SDS, 5 \times Denhart液, 100 μ g/ml サケ精子DNA)と共に65°C6時間加熱し, [³²P]dCTPとRandom Primers DNA Labelling System Kit (Wako Pharmaceutical Inc., Osaka, Japan)を用い作成したプロブと共に42°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った. ハイブリダイゼーション液の組成は0.1 g/ml デキストラン硫酸塩, 0.4 mg/ml ホルムアミド, 4 \times SSC, 7 mM Tris-HCl, pH 7.4, 8 \times デンハルト液, 20 μ g/ml サケ精子DNAとした. それぞれのプロブの放射能活性は2.0 \times 10⁷ cpmとした. メンブレンは2 \times SSC, 0.1% SDSで室温10分間2回, 0.2

×SSC, 0.1% SDSで65°C10分間2回洗浄し, Kodak Scientific Imaging Film (Kodak Company, New York, USA)に12時間感光させた. バンドの強度はNIH image version 1.58 computer software (Machintosh, USA)を用いて測定し, それぞれのサンプルの発現量はTGF- α / β -actin, EGFR/ β -actin, PCNA/ β -actin比として半定量化した.

統計解析 結果は平均±標準誤差で表わした. 統計学的有意差はMann-Whitney U-testとone-way ANOVAを, 相関関係についてはSpearman順位相関検定を用い, p値<0.05を有意とした.

結 果

慢性肝疾患における血清TGF- α 値

表1に患者の臨床検査成績を示す. CH, LC, HCC患者の血清TGF- α 値はそれぞれ32.8 ± 11.3 pg/ml, 383.1 ± 287.3 pg/ml, 119.9 ±

47.5 pg/mlで, 健常者では6.5 ± 2.4 pg/mlであった. 慢性肝疾患における血清TGF- α 値は健常者より高い傾向にあり, 特にLCにおいては有意差をもって最も高値を示した(CHに比しp < 0.05, 健常者に比しp < 0.01). 表3に血清TGF- α 値と肝機能検査, Pughスコア, AFP, 腫瘍径との関連を示す. 血清TGF- α 値は総ビリルビン及びICG停滞率と有意な正の相関(それぞれr = 0.275, p < 0.01, r = 0.228, p < 0.05), アルブミンと負の相関(r = -0.212, p < 0.05)を示したが, 他の検査値とは関連を認めなかった. LCとHCC患者において血清TGF- α 値と臨床所見との関連を検討したところ(表4), Child分類については重症度を増すに連れて血清TGF- α 値は増加し, Child CではChild AとBよりも有意に高値であり(p < 0.05), 脳症を有するものは脳症のないものに比し有意に高値を示した(p < 0.05). 腹水を有する患者では血清TGF- α 値は39.7 ±

表 2. PCRに用いたプライマー

Primer Sequences		
TGF- α	Sense	5' CGCCCTGTTTCGCTCTGGGTA 3'
	Antisense	5' CTGGCTGGCAGCCACCACCG 3'
EGFR	Sense	5' ACCAGAGTGATGTCTGGAGC 3'
	Antisense	5' GATGAGGTACTCGTCGGCAT 3'
PCNA	Sense	5' AAACCTAGCTAGACTTTCCTC 3'
	Antisense	5' ATTGCCGGCGCATTTTAGTA 3'
β -actin	Sense	5' CCCAGGCACCAGGGCGTGAT 3'
	Antisense	5' TCAAACATGATCTGGGTCAT 3'

表 3. 慢性肝疾患における血清TGF- α 値と臨床パラメーターとの関連

	相関係数	P
総ビリルビン	0.275	0.0100
ICG ₁₅	0.228	0.0388
アルブミン	-0.212	0.0458
プロトロンビン時間	-0.111	N.S.
AST	0.158	N.S.
ALT	0.072	N.S.
ALP	0.071	N.S.
GGT	-0.097	N.S.
LDH	0.151	N.S.
AFP	0.118	N.S.
Pugh スコア	0.148	N.S.
腫瘍径	-0.040	N.S.

Abbreviation; N.S.: not significant

表 4. 肝硬変及び肝癌患者における血清TGF- α と臨床所見との関連

		TGF- α (pg/ml)
Child分類	A	116.4 \pm 62.6
	B	134.7 \pm 56.4
	C	888.9 \pm 808.0 ^{b,c}
肝性脳症	(+)	829.7 \pm 816.1 ^a
	(-)	123.1 \pm 40.9
腹水	(+)	39.7 \pm 28.2
	(-)	240.7 \pm 116.9
腫瘍数	多発	67.8 \pm 22.8
	単発	214.4 \pm 126.1

a: $p < 0.05$ compared to the absence of encephalopathy; b: $p < 0.05$ compared to Child class A; c: $p < 0.05$ compared to Child class B.

28.2 pg/mlであり、腹水のない患者は240.7 \pm 116.9 pg/mlであったが両者に有意差は認めなかった。腫瘍数については単発群では214.4 \pm 126.1 pg/mlであり、多発群では67.8 \pm 22.8 pg/mlで両群間には有意差を認めなかった。

慢性肝疾患におけるTGF- α , EGFR, PCNA遺伝子発現

各遺伝子のPCR産物の増加の程度をTGF- α , EGFR, β -actinについては28から38サイクルまで、PCNAについては32から42サイクルまでそれぞれ2サイクル毎に検討した。各遺伝子のサイクル数はサイクル数とバンドの強度がほぼ直線的関連を示したところをもって決定した。すなわち、TGF- α , EGFR, β -actinは32サイクル、PCNAは36サイクルとした。図1にTGF- α , EGFR, PCNA mRNAのPCR産物のバンドを示す。TGF- α , EGFR, PCNA, β -actinのバンドのサイズはそれぞれ270bp, 367bp, 324bp, 263bpであった。慢性肝疾患におけるTGF- α , EGFR, PCNAの遺伝子発現を図2に示す。各mRNAの発現強度は各疾患間で有意差は認めなかったが、LCでこれらの発現は他の疾患よりも低い傾向にあった。HCCとnHCCにおけるTGF- α mRNAの発現は類似していたが(HCC: 1.071 \pm 0.336, nHCC: 1.018 \pm 0.352), EGFR, PCNA mRNAの発現はnHCCでHCCに比べ高い傾向にあった(EGFR: nHCC, 1.922 \pm 0.687; HCC, 1.009 \pm 0.193; PCNA: nHCC, 4.273 \pm 1.503; HCC, 3.060 \pm 0.956)。

慢性肝疾患におけるTGF- α , EGFR, PCNAの遺伝子発現量

慢性肝疾患においてTGF- α とEGFR, TGF- α とPCNA, EGFRとPCNAとの間にそれぞれ有意の正の相関を認めた(図3)。図4にHCC例の腫瘍部におけるTGF- α , EGFR, PCNA間の関連を示すが、TGF- α はEGFR ($r = 0.541$, $p = 0.0361$), PCNA ($r = 0.700$, $p = 0.0067$)と正の相関があり、またEGFRとPCNAとの間にも正の相関を認めた ($r = 0.782$, $p = 0.0024$)。

考 察

TGF- α は肝細胞と肝癌細胞に対してオートクラインに作用する増殖因子の一つである。血清TGF- α 値はヒトにおいて肝部分切除後増加し、肝切除量と肝増加量に有意に相関した¹⁸⁾。TGF- α mRNAは肝細胞においてDNA合成とEGFR mRNAのピークに一致して増加すると報告されている¹²⁾。TGF- α トランスジェニックマウスにおいては高頻度に肝細胞癌が発生するが、肝腫瘍では周囲正常肝組織よりもTGF- α mRNA発現量は高いことが示されている¹⁰⁾。これらの報告はTGF- α が肝再生と肝癌発生に重要な役割を果たしていることを示唆している。

血清TGF- α 値は急性肝炎あるいは劇症肝炎患者において肝再生に伴い増加する²⁹⁾。劇症肝炎患者における血清TGF- α 最高値は非生存者に比べ生存者で有意に高値を示し、TGF- α mRNAレベルは急性肝炎患者でPCNAラベリング・インデッ

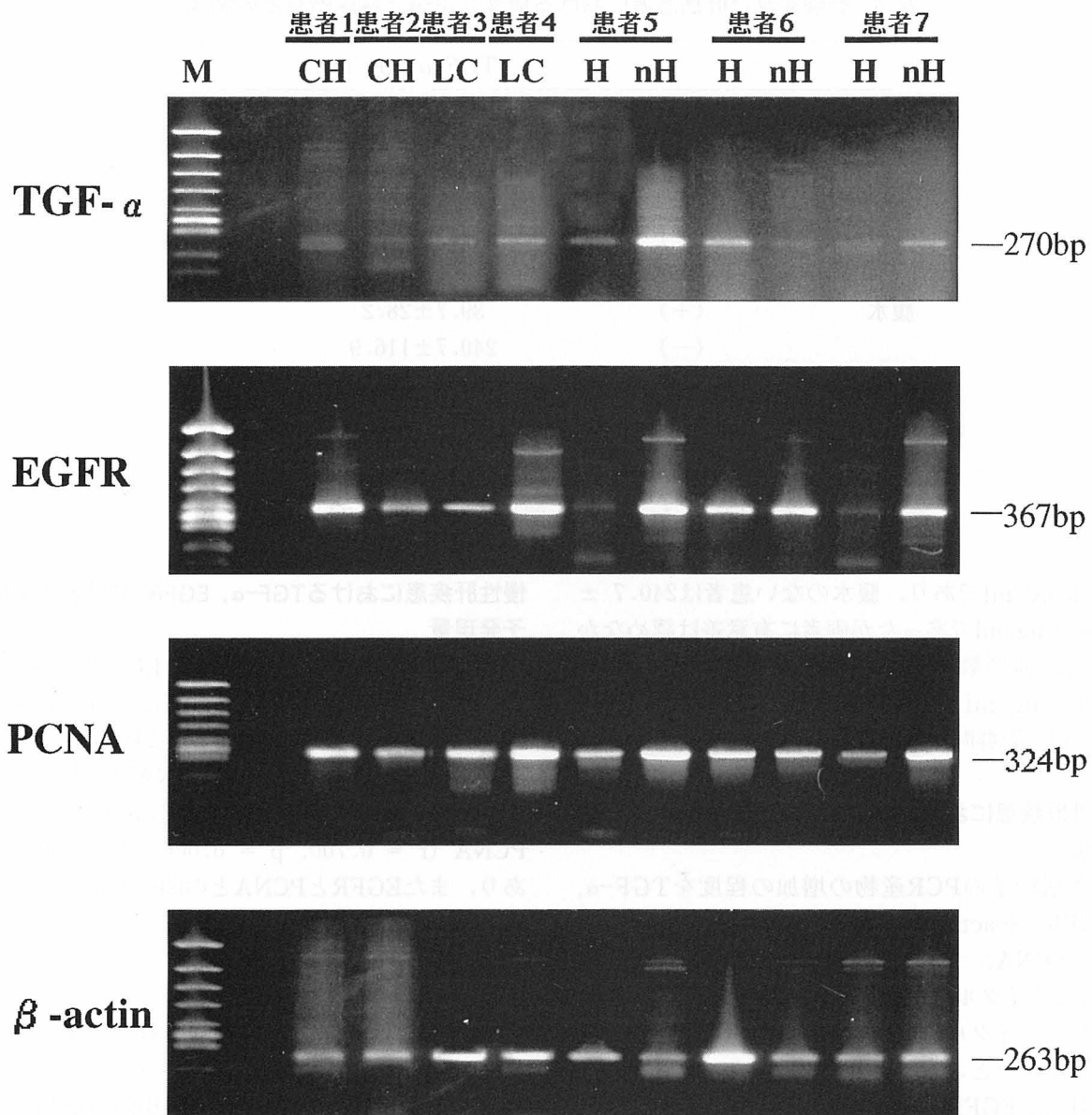


図1. 慢性肝疾患におけるreverse transcription polymerase chain reactionによるTGF- α , EGFR, PCNA and β -actin mRNAの発現. M: マーカー, CH: 慢性肝炎, LC: 肝硬変, H: 肝細胞癌, nH: 周囲非癌部.

クスとよく相関を示した¹⁵⁾. またB型慢性肝炎では肝組織中のTGF- α の発現は炎症の程度と関連していた³⁰⁾. 本研究において血清TGF- α 値は健常者よりも慢性肝疾患患者で上昇しており, Child C及び脳症を有する患者で高値を示した. さらに血清TGF- α 値は総ビリルビン値, ICG停滞率及びアルブミン値と有意な相関を認めた. 同様に血清TGF- α 値は肝硬変患者で血清アルブミンと総ビリルビン値と有意な関連がある²⁷⁾という報告があることより, 血清TGF- α 値は肝機能障

害の重症度の指標として有用と考えられた.

今回の検討では肝癌患者の血清TGF- α 値は健常者と慢性肝炎患者よりも高値であったが, 肝硬変患者よりも低値であった. 肝硬変と肝癌との間で肝組織中TGF- α とEGFRの発現に有意差はなかった. この理由としてICG停滞率やプロトロンビン時間のような肝機能検査が肝癌患者に比べ肝硬変患者で悪化していたため, 肝癌患者より肝硬変患者で肝臓におけるTGF- α のクリアランスが低下しているものと推測された.

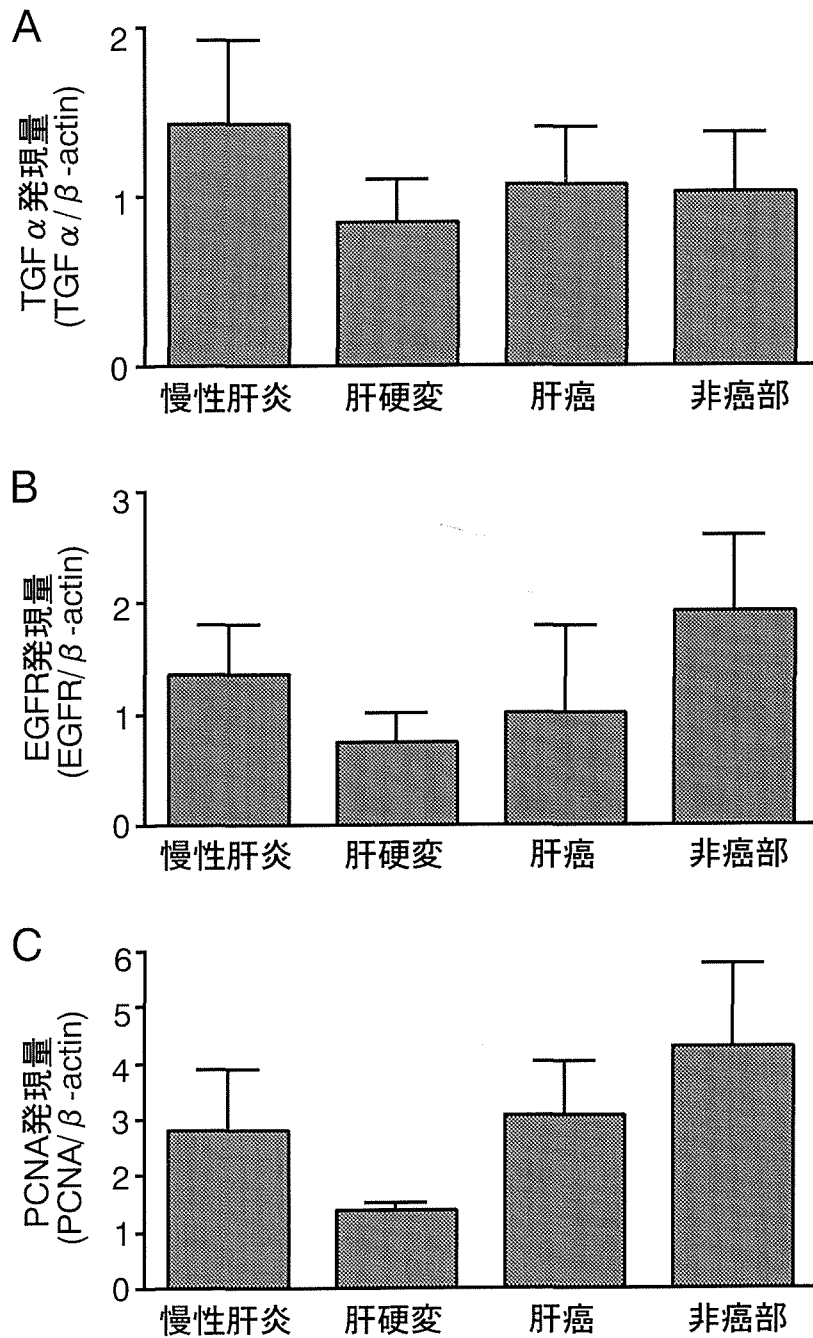


図2. 慢性肝疾患におけるTGF- α (A), EGFR (B), PCNA (C) mRNAの発現.

ジメチルニトロサミンによる化学肝発癌モデルにおいて、176個の肝腫瘍の37.5%に免疫組織化学染色法によりTGF- α が陽性となっており、23個の腺腫全例と1個の肝癌でTGF- α が陽性であり、TGF- α タンパクの増加レベルはDNAラベリング・インデックスの増加と関連していた²⁰⁾。TGF- α トランスジェニック・マウスにおいてDNA合成増加が肝腫大とDNA量増加を引き起

し²²⁾、その結果、肝癌と肝腺腫が生じ、TGF- α は正常部よりも肝癌と肝腺腫で高発現していた^{16,19)}。免疫組織化学的解析ではTGF- α は肝癌組織と同様に周囲非腫瘍部においても発現していることが示されており^{14,16,17,31)}、TGF- α は周囲非腫瘍部で24例中23例(96%)に発現し、EGFRは24例中17例(71%)に検出され、TGF- α とEGFRの発現増加が周囲非腫瘍組織における再生過程の一

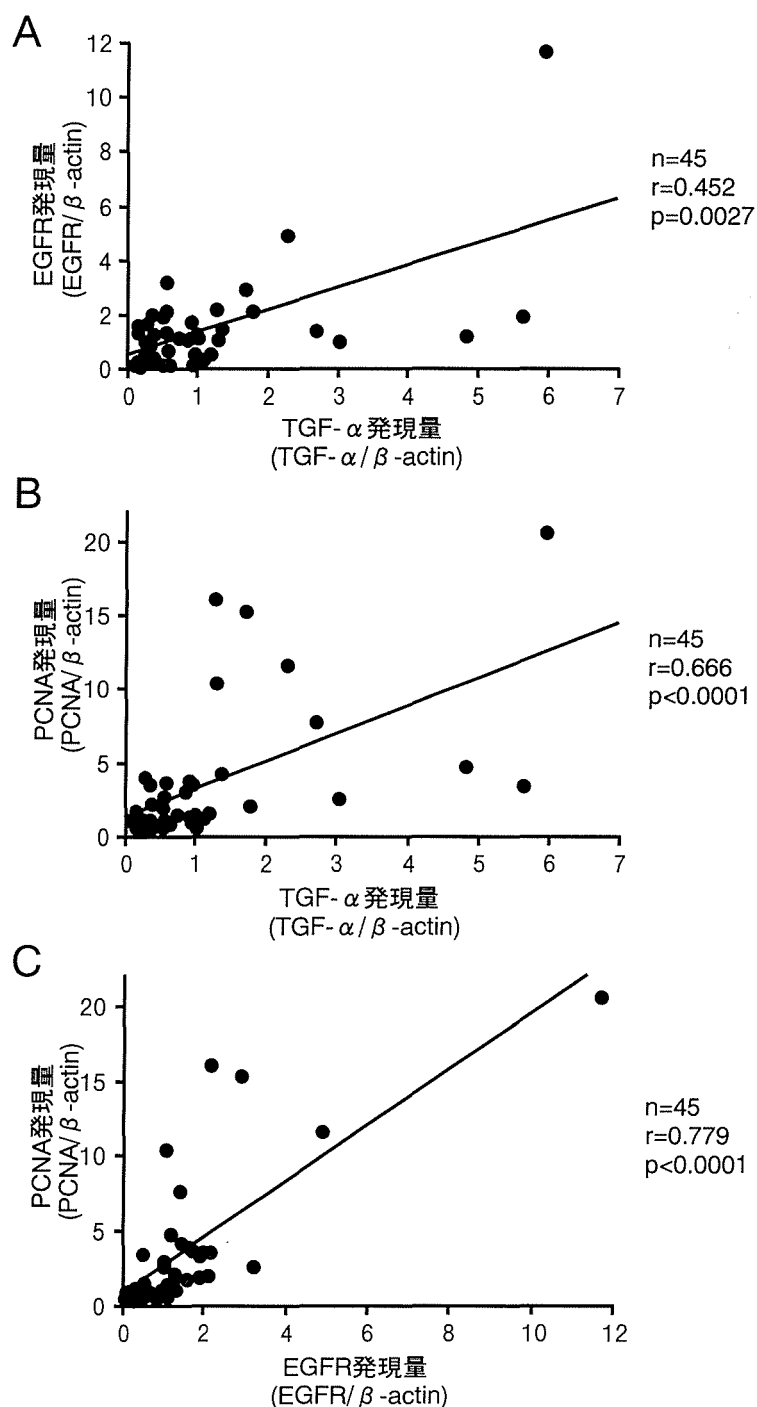


図3. 慢性肝疾患の肝組織におけるTGF- α とEGFR (A), TGF- α とPCNA (B), EGFRとPCNA (C)との関連.

部として生じていると報告されている¹⁶⁾. これらの報告では肝癌組織と同様に非腫瘍組織でもTGF- α , EGFR, PCNAが発現していると述べられている. 本研究では肝組織中のTGF- α はEGFRとPCNAと正の相関を認め, 肝癌組織でEGFRはPCNAと有意な関連を示した. これらの

ことよりTGF- α が慢性肝疾患において肝細胞と肝癌細胞の増殖に寄与しているものと考えられた.

結 語

血清TGF- α は肝機能障害の重症度の指標として有用と考えられ, さらにTGF- α とEGFRはオー

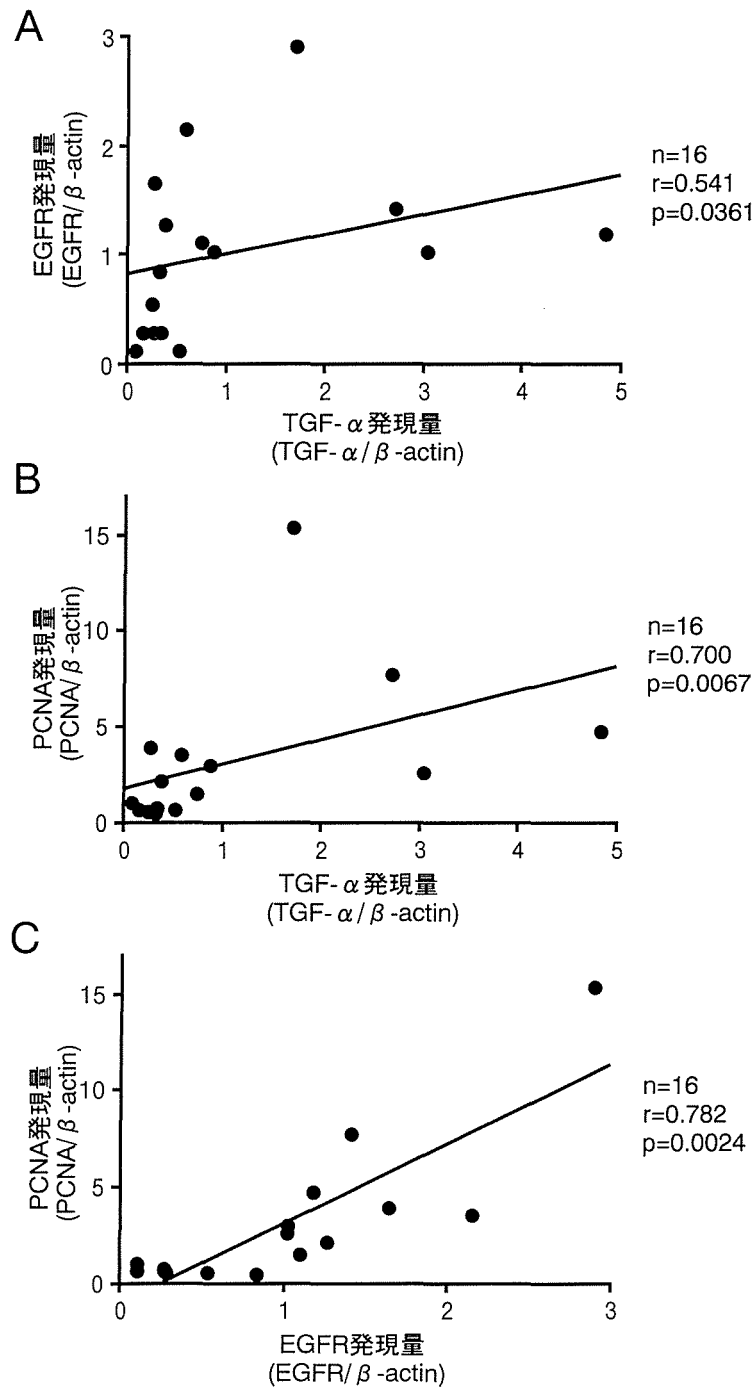


図4. 肝癌組織におけるTGF- α とEGFR (A), TGF- α とPCNA (B), EGFRとPCNA (C)との関連.

トクラインに作用し肝細胞及び肝癌細胞の細胞周期を活性化するものと考えられた。

稿を終えるにあたり、懇切なる御指導と御校閲を賜りました鳥取大学医学部内科学第二教室川崎寛中教授、また御校閲賜りました鳥取大学医学部小児科学

教室白木和夫教授、同臨床検査医学教室猪川嗣朗教授に深甚なる謝意を捧げます。さらに御協力いただきました肝臓研究室の先生方ならびに内科学第二教室員各位に深く御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第33回日本肝臓学会総会(1997年4月)及び第11回アジア太平洋肝臓病学会議(1998

年2月) において発表した。

文 献

- 1) Marquardt, H., Hunkapiller, M. W., Hood, L. E., Twardzik, D. R., De Larco, J. R., Stephenson, J. R. and Todaro, G. J. (1983) Transforming growth factors produced by retrovirus-transformed rodent fibroblasts and human melanoma cells: amino acid sequence homology with epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 4684-4688.
- 2) Reynolds, F. H. Jr., Todaro, G. J., Fryling, C. and Stephenson, J. R. (1983) Human transforming growth factors induce tyrosine phosphorylation of EGF receptors. *Nature* **292**, 259-262.
- 3) Derynck, R. (1986) Transforming growth factor- α : Structure and biological activities. *J Cell Biochem* **32**, 203-204.
- 4) Derynck, R. (1988) Transforming growth factor α . *Cell* **54**, 593-595.
- 5) Schreiber, A. B., Winkler, M. E. and Derynck, R. (1986) Transforming growth factor- α : a more potent angiogenic mediator than epidermal growth factor. *Science* **232**, 1250-1253.
- 6) Madtes, D. K., Raines, E. W., Sakariassen, K. S., Sporn, M. B., Bell, G. I. and Ross, R. (1988) Induction of transforming growth factor- α in activated human alveolar macrophages. *Cell*, 285-293.
- 7) Barrandon, Y. and Green, H. (1987) Cell migration is essential for the sustained growth of keratinocyte colonies. *Cell*, 1131-1137.
- 8) Chegini, N., Zhao, Y. and Mclean, FW. (1994) Expression of messenger ribonucleic acid and presence of immunoreactive proteins for epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor alpha (TGF- α) and EGF/TGF α receptors and ^{125}I -EGF binding sites in human fallopian tube. *Biol Reprod* **50**, 1049-1058.
- 9) Kurachi, H., Morishige, K., Imai, T., Homma, H., Masumoto, N., Yoshimoto, Y. and Miyake, A. (1994) Expression of epidermal growth factor and transforming growth factor- α in fallopian tube epithelium and their role in embryogenesis. *Horm Res* **41**, 48-54.
- 10) Jhappan, C., Stahle, C., Harkins, R. N., Fausto, N., Smith, G. H. and Merlino, G. T. (1990) TGF α overexpression in transgenic mice induces liver neoplasia and abnormal development of mammary gland and pancreas. *Cell* **61**, 1137-1146.
- 11) Massague, J. (1990) Transforming growth factor- α . *J Biol Chem* **265**, 21393-21396.
- 12) Mead, J. E. and Fausto, N. (1989) Transforming growth factor α may be a physiological regulator of liver regeneration by means of an autocrine mechanism. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 1558-1562.
- 13) Sporn, M. B. and Todaro, G. J. (1980) Autocrine secretion and the malignant transformation of cells. *N Engl J Med* **303**, 878-880.
- 14) Hsia, C. C., Axiotis, C. A., Di Bisceglie, A. M. and Tabor, E. (1992) Transforming growth factor- α in human hepatocellular carcinoma and coexpression with hepatitis B surface antigen in adjacent liver. *Cancer* **70**, 1049-1056.
- 15) Masuhara, M., Yasunaga, M., Tanigawa, K., Tamura, F., Yamashita, S., Sakaida, I. and Okita K. (1996) Expression of hepatocyte growth factor, transforming growth factor α , and transforming growth factor β_1 messenger RNA in various human liver diseases and correlation with hepatocyte proliferation. *Hepatology* **24**, 323-329.
- 16) Morimitsu, Y., Hsia, C. C., Kojiro, M. and Tabor, E. (1995) Nodules of less-differentiated tumor within or adjacent to hepatocellular carcinoma: Relative expression of transforming growth factor- α and its receptor in the different areas of tumor. *Hum Pathol* **26**, 1126-1132.
- 17) Schaff, Z., Hsia, C. C., Sarosi, I. and Tabor,

- E. (1994) Overexpression of transforming growth factor- α in hepatocellular carcinoma and focal nodular hyperplasia from European patients. *Hum Pathol* 25, 644-651.
- 18) Tomiya, T. and Fujiwara, K. (1993) Serum levels of transforming growth factor- α in patients after partial hepatectomy as determined with an enzyme-linked immunosorbent assay. *Hepatology* 18, 304-308.
- 19) Lee, G. H., Merlino, G. and Fausto, N. (1992) Development of liver tumors in transforming growth factor α transgenic mice. *Cancer Res* 52, 5162-5170.
- 20) Steinmetz, K. L. and Klaunig, J. E. (1996) Transforming growth factor- α in carcinogen-induced F344 rat hepatic foci. *Toxicol Appl Pharmacol* 140, 131-145.
- 21) Takagi, H., Sharp, R., Hammermeister, C., Goodrow, T., Bradley, M. O., Fausto, N. and Merlino, G. (1992) Molecular and genetic analysis of liver oncogenesis in transforming growth factor α transgenic mice. *Cancer Res* 52, 5171-5177.
- 22) Webber, E. M., Wu, J. C., Wang, L., Merlino, G. and Fausto, N. (1994) Overexpression of transforming growth factor- α causes liver enlargement and increased hepatocyte proliferation in transgenic mice. *Am J Pathol* 145, 398-408.
- 23) Johnson, A. C., Garfield, S. H., Merlino, G. T. and Pastan, I. (1988) Expression of epidermal growth factor receptor proto-oncogene mRNA in regenerating rat liver. *Biochem Biophys Res Commun* 150, 412-418.
- 24) Webber, E. M., Fitzgerald, M. J., Brown, P. I., Bartlett, M. H. and Fausto, N. (1993) Transforming growth factor- α expression during liver regeneration after partial hepatectomy and toxic injury, and potential interactions between transforming growth factor- α and hepatocyte growth factor. *Hepatology* 18, 1422-1431.
- 25) Harada, K., Terada, T. and Nakanuma, Y. (1996) Detection of transforming growth factor- α protein and messenger RNA in hepatobiliary diseases by immunohistochemical and in situ hybridization techniques. *Hum Pathol* 27, 787-792.
- 26) Katoh, M., Inagaki, H., Kurosawa-Ohsawa, K., Katsuura, M. and Tanaka, S. (1990) Detection of transforming growth factor alpha in human urine and plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 167, 1065-1072.
- 27) Tomiya, T. and Fujiwara, K. (1996) Serum transforming growth factor- α level as a marker of hepatocellular carcinoma complicating cirrhosis. *Cancer* 77, 1056-1060.
- 28) Shiota, G., Wang, T. C., Nakamura, T. and Schmidt, E. V. (1994) Hepatocyte growth factor in transgenic mice: Effects on hepatocyte growth, liver regeneration and gene expression. *Hepatology* 19, 962-972.
- 29) Tomiya, T. and Fujiwara, K. (1996) Liver regeneration in fulminant hepatitis as elevated by serum transforming growth factor α levels. *Hepatology* 23, 253-257.
- 30) Morimitsu, Y., Kleiner, D. E., Conjeevaram, H. S., Hsia, C. C., Di Bisceglie, A. M. and Tabor, E. (1995) Expression of transforming growth factor alpha in the liver before and after interferon alpha therapy for chronic hepatitis B. *Hepatology* 22, 1021-1026.
- 31) Park, B. C., Huh, M. H. and Seo, J. H. (1995) Differential expression of Transforming growth factor α and insulin-like growth factor II in chronic active hepatitis B, cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol* 22, 286-294.