



Title	Loss of Gab1 adaptor protein in hepatocytes aggravates experimental liver fibrosis in mice
Author(s)	木津, 崇
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/51981
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

Synopsis of Thesis

氏 名 Name	木津 崇
論文題名 Title	Loss of Gab1 adaptor protein in hepatocytes aggravates experimental liver fibrosis in mice (肝細胞におけるアダプター蛋白質Gab1欠損は、マウス肝線維化を増悪させる)
論文内容の要旨 〔目的(Purpose)〕 慢性肝障害における肝線維化進展は、その終末像としての肝硬変症、さらには肝細胞癌発症につながると考えられる。従って、肝線維化制御機構の解明は、臨床的に重要な課題である。肝線維化過程においては、これまでHGFやHB-EGFなど様々な増殖因子の関与が報告されている。しかしながら、肝細胞における増殖因子及びその受容体である受容体型チロシンキナーゼ (RTK) の肝線維化の制御機構は未だ不明な点が多い。一方で、Grb2-associated binder 1 (Gab1) は、様々なRTKの下流で機能するアダプター蛋白質で、その遺伝子欠損マウスが胎生致死となることから初期発生や細胞増殖、分化に重要な役割を担うと考えられている。しかしながら、これまで、肝線維化過程におけるGab1の役割は全く不明である。そこで私は肝細胞特異的Gab1欠損マウスを用いて、肝線維化過程における肝細胞Gab1の意義について検討することを目的とした。 〔方法 (Methods)〕 肝特異的Albumin promoter Cre トランスジェニックマウスとマウスGab1遺伝子のエクソン2をloxP配列で挟んだGab1floxマウスとの交配により、肝特異的Gab1欠損マウス (Gab1CKO) を作製した。対照として、同腹のGab1floxマウス (Control) を用いた。両群マウスに対して総胆管結紮術 (BDL) 及び四塩化炭素 (CCl₄) 投与を行い、BDL術後10日目、CCl₄ (0.5ml/Kg BW, 2回/週) 6週投与後に、それぞれ肝線維化を評価した。また、肝線維化誘導過程における肝障害、再生、肝内炎症の変化については、BDL後5日目に評価した。最後に、Gab1CKOにおける肝線維化変化に関わる分子を、cDNAマイクロアレイを用いて網羅的に探索し、その候補分子の機能を、初代培養肝細胞やマウス肝細胞株BNL CL 2、さらにはBDL誘発性肝線維化モデルを用いて解析した。 〔成績(Results)〕 BDL後10日目において、Controlでは、肝組織におけるsirius red陽性肝線維化領域の誘導とGab1のリン酸化を確認した。一方Gab1CKOでは、Controlに比し、sirius red陽性肝線維化領域が約2.0倍と有意に増加し、肝ヒドロキシプロリン含量も約1.5倍と有意に増加した。また、Gab1CKOでは、Controlに比し、肝内αSMA陽性細胞が増加し、定量的real-time RT-PCR法にて、Coll1a1、Coll1a2、αSMA、TGFβの肝線維化関連マーカー遺伝子発現量が有意に増加していることを確認した。同様に、CCl₄ 投与においても、Gab1CKOでは、Controlに比し、肝線維化が有意に増強した。さらに、BDL後5日目の障害肝において、Gab1CKOでは、Controlに比し、TUNEL染色陽性肝細胞数の増加、Ki 67陽性肝細胞数の減少、IL6、Ccl2、CD68の炎症関連マーカー遺伝子発現の増加をそれぞれ認め、肝障害の増悪、肝再生障害ならびに肝内炎症の増強が示唆された。 次に、肝線維化組織を用いた網羅的遺伝子解析を行ったところ、BDL後10日のGab1CKOでControlに比し上昇している遺伝子として、肝線維化促進作用を有するケモカインCCL5が同定された。実際、その遺伝子発現量は、Gab1CKOでは、Controlに比し、5.09倍と有意に増加しており、肝線維化組織中のCCL5陽性肝細胞の増加及び蛋白量の増加を認めた。一方、非実質細胞におけるCCL5発現細胞数や蛋白発現量は、両群間で差を認めなかった。さらに、両群マウス由来初代培養肝細胞をLPSで刺激したところ、Gab1CKOでは、Controlに比し、培養肝細胞中のCCL5遺伝子発現量と上清中のCCL5蛋白発現量の有意な増加を認めた。siRNA 法によりGab1をノックダウンしたBNL CL 2を用いた検討により、LPS刺激依存性のNF-κB活性の増強を認め、Gab1欠損によるCCL5発現亢進への関与が示唆された。最後に、CCL5受容体アンタゴニストを、BDL誘発性肝線維化モデルに投与したところ、Gab1CKOにおける肝線維化増強を有意に抑制し、実際にCCL5発現誘導が肝線維化増強に寄与していることが示唆された。 〔総括(Conclusion)〕 肝細胞におけるGab1欠損は、マウス肝線維化を増悪させた。その機序として、肝細胞Gab1欠損による肝障害の増強に加えて、肝細胞由来のケモカインCCL5分泌が関与している可能性が考えられた。以上より、肝細胞Gab1を介したシグナル経路が、肝線維化治療の新たな標的となる可能性が示唆された。	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 木津 崇

	(職)	氏 名
論文審査担当者	主 査 大阪大学教授	竹原 敏子
	副 査 大阪大学教授	南 池 章
	副 査 大阪大学教授	森 正 樹

論文審査の結果の要旨

慢性肝疾患において、肝線維化進展は、肝硬変や肝細胞癌の発症につながる。一方、肝線維化過程においては、様々な増殖因子が関与するが、肝細胞における増殖因子シグナル伝達と肝線維化進展との関係については未だ不明な点が多い。Grb2-associated binder 1 (Gab1) は、様々な増殖因子のシグナル伝達を調節する重要なアダプター蛋白質である。従って、肝線維化過程における肝細胞Gab1の機能を解明することは、肝細胞の増殖因子シグナル伝達と肝線維化の関係を理解する上で重要な課題である。本論文は肝細胞Gab1の肝線維化過程における役割を、肝細胞特異的Gab1欠損マウスを作製し、その分子機構を詳細に解析したものである。肝細胞特異的Gab1欠損マウスでは、野生型マウスに比し、総胆管結紮術 (BDL) 及び四塩化炭素誘発性の肝線維化が増悪することを明らかにした。網羅的遺伝子解析にて、肝細胞Gab1欠損マウスにおける肝線維化増悪に関与する遺伝子として、肝線維化促進作用を有するCCL5を同定した。初代培養肝細胞や肝細胞株を用いた検討により、肝細胞においてGab1欠損がNF- κ B活性ならびにCCL5発現を増強させることを明らかにした。CCL5受容体アンタゴニスト投与は、肝細胞特異的Gab1欠損マウスにおけるBDL誘発性肝線維化増強を抑制した。

これらの研究の結果は、肝細胞Gab1が肝線維化に対して保護的に働くことを明確に示したものである。さらに本研究は肝細胞Gab1を介したシグナル経路が、肝線維化治療の新たな標的となる可能性を示した優れた論文であり、学位に値すると考える。