

|              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Title        | Gab1 adaptor protein acts as a gatekeeper to balance hepatocyte death and proliferation during acetaminophen-induced liver injury in mice                                                                                                                                                        |
| Author(s)    | 古田, 訓丸                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
| Citation     | 大阪大学, 2016, 博士論文                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| Version Type |                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/55759">https://hdl.handle.net/11094/55759</a>                                                                                                                                                                                                              |
| 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、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"&gt;</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">&lt;/a&gt;</a> 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<br>Name                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     | 古田 訓丸                                                                                                                                                                                               |
| 論文題名<br>Title                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  | Gab1 adaptor protein acts as a gatekeeper to balance hepatocyte death and proliferation during acetaminophen-induced liver injury in mice<br>(アダプター蛋白質Gab1はマウスアセトアミノフェン誘導性肝障害において肝細胞の死と増殖との調和を維持する) |
| 論文内容の要旨                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |                                                                                                                                                                                                     |
| 〔目的 (Purpose)〕                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                     |
| 解熱鎮痛薬であるアセトアミノフェン (APAP) の過量摂取は多くの欧米諸国において急性肝不全の主な原因である。APAP による肝不全では、まず酸化ストレス誘導性のミトコンドリア (Mt) 障害に伴う肝細胞死が起こり、続いて壊死組織周囲の肝細胞で代償性の増殖機転が働く。従って肝細胞の死と増殖、双方を念頭においた治療法の開発が望まれる。一方、Grb2-associated binder 1 (Gab1) は、増殖因子受容体等からの刺激により自身がチロシンリン酸化を受け、extracellular signal regulated kinase (ERK) や AKT などの増殖シグナルを伝達するアダプター蛋白質である。肝細胞の Gab1 については、再生や線維化など様々な肝病態に関わることが知られている。心筋細胞においては、Gab1 が酸化ストレスにともなう細胞死に対し保護的役割を果たすことが報告された。このような背景を踏まえ、本研究ではマウスモデルを用い、Gab1 のAPAP肝障害病態への関与について、肝細胞の死と増殖に着目して検討した。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                     |
| 〔方法 (Methods)〕                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                     |
| 肝細胞特異的 Gab1 欠損マウス (Gab1CKO) として Gab1flox;Albumin-Cre マウスを、対照 (Control) として Gab1flox マウスを用いた。両群のマウスに対し絶食後、APAP 致死量 (250 mg/kg) もしくは低用量 (150 mg/kg) を腹腔内注射し、生存率、肝障害、細胞増殖、薬物代謝について評価した。また、両群のマウスからコラゲナーゼ還流法を用いて採取した初代培養肝細胞に APAP を添加し、上清の LDH 活性から死細胞数を評価した。さらにヒト肝細胞株 HepaRG を用い、siRNA による Gab1 発現抑制あるいはアデノウイルスベクターを用いた過剰発現の影響を検討した。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                     |
| 〔成績 (Results)〕                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |                                                                                                                                                                                                     |
| まず APAP 致死量投与後、Control の肝臓で Gab1 がチロシンリン酸化を受けていることを確認した。投与後72時間における Gab1CKO の生存率は 25% (3/12) と、Control の 75% (9/12) に比し有意に低下した (Log-rank, $p < 0.05$ )。また、投与後6時間において、Gab1CKO では Control に比し肝壊死領域が有意に増大 (74% vs 53%)、血清 ALT 値は有意に高値 (6650 U/l vs 3605 U/l) であり、肝障害の増強が示唆された。さらに Gab1CKO では肝組織 TUNEL 陽性細胞が 2.2 倍と有意に増加、細胞壊死の指標である血清 HMGB-1 は 2.4 倍と有意に増加しており、Gab1CKO における肝細胞死の亢進が示された。一方、低用量の検討で、Gab1CKO では Control に比し、細胞増殖のピーク (投与後48時間) における Ki67 陽性肝細胞が 47% と有意に抑制され、Ccnd1, Ccnd1, Ccne2といった細胞周期関連分子の遺伝子発現が有意に低下したことから、肝再生不全が示唆された。Gab1CKO では障害肝における生存シグナル ERK 及び AKT の活性が投与後6時間をピークに抑制され、逆にストレスシグナル c-jun N-terminal kinase (JNK) の活性が投与後早期 (1.5時間) で増強した。さらに APAP 投与後の肝実質から単離した Mt 分画と細胞質分画の検討では、Gab1CKO において JNK の Mt 移行が亢進し、本来 Mt に内在する apoptosis-inducing factor や MtDNA の細胞質への放出が促進されており、Mt 障害の増強が示唆された。In Vitro において、Gab1CKO由来の初代培養肝細胞では Control 由来肝細胞に比し APAP 添加後の細胞死が亢進した。また HepaRG を用いた検討では、Gab1 発現抑制により、APAP 添加による Mt の膜電位低下および Mt 酸化ストレスの増強がみられ、さらに死細胞数が増加した。この細胞障害活性の亢進は、Gab1 過剰発現により部分的に回避された。 |                                                                                                                                                                                                     |
| 〔総括 (Conclusion)〕                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |                                                                                                                                                                                                     |
| 肝細胞 Gab1は、ミトコンドリア障害を介したストレスシグナルを抑制することで細胞死を回避し、さらに代償性の細胞増殖を正に制御した。APAP 誘発性急性肝不全において、肝細胞 Gab1 は肝細胞の死と増殖のバランスを維持する鍵分子であることが示唆された。                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                |                                                                                                                                                                                                     |

論文審査の結果の要旨及び担当者

|               |     |              |
|---------------|-----|--------------|
| (申請者氏名) 古田 訓丸 |     |              |
| 論文審査担当者       | (職) | 氏 名          |
|               | 主 査 | 大阪大学教授 竹原 敬一 |
|               | 副 査 | 大阪大学教授 森 正樹  |
|               | 副 査 | 大阪大学教授 森 正樹  |

論文審査の結果の要旨

先進諸国で問題となるアセトアミノフェン (APAP) 誘発性肝不全は、酸化ストレス誘導性ミトコンドリア (Mt) 障害に伴う肝細胞壊死が主病態だが、その分子機構は不明な点が多い。一方、アダプター蛋白質 Grb2-associated binder 1 (Gab1) は、MAP キナーゼ制御を介して様々な器官の発生や病態に関与する。そこで、肝細胞特異的 Gab1 欠損マウス (*Gab1*CKO) と対照マウス (Control) に対し APAP を投与し、Gab1 の本病態での役割を検討した。この結果、*Gab1*CKO では Control に比し投与後生存率の有意な低下と、より広範な肝壊死ならびに血清 ALT 値の有意な上昇を認めた。また、*Gab1*CKO 障害肝では ストレス応答性 MAPキナーゼJNK (c-Jun N-terminal kinase) のMtへの移行及びMt特異的蛋白の細胞質への漏出が亢進し、Mt 障害の増強が示唆された。さらに、*Gab1*CKO では APAP 投与後の肝細胞増殖が低下していた。以上より、肝細胞 Gab1 は肝細胞死を回避し、かつ肝細胞増殖を促進することで APAP 肝障害に対し保護的作用を有す可能性が示唆された。

これらの研究の結果は、肝細胞 Gab1 が APAP 誘導性肝障害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、薬剤性肝障害のみならず、急性肝不全に対する新たな治療標的となる可能性を示した優れた論文であり、学位の授与に値すると思われる。