

Title	Conditional knockout of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the liver accelerates carbon tetrachloride-induced liver injury in mice
Author(s)	竹村, 貴代
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/59806
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	竹村 貴代
博士の専攻分野の名称	博士 (医学)
学位記番号	第 25733 号
学位授与年月日	平成25年1月17日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科内科系臨床医学専攻
学位論文名	Conditional knockout of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the liver accelerates carbon tetrachloride-induced liver injury in mice (肝における HB-EGF の欠損は四塩化炭素投与によるマウス肝障害を増悪させる)
論文審査委員	(主査) 教授 竹原 徹郎 (副査) 教授 楽木 宏実 教授 森 正樹

論文内容の要旨

〔目的(Purpose)〕

Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) は膜貫通型の蛋白として細胞表面に存在し、様々な刺激により shedding (切断) を受け、可溶性 HB-EGF として EGF レセプター (EGFR) および ErbB4 に結合することにより、細胞内にシグナル伝達を行っている。私共はこれまでに、HB-EGF transgenic mouse を用い、部分肝切除後の肝再生過程において、HB-EGF の過剰発現が、肝再生を促進するということを証明した。一方、HB-EGF は、心臓の発生過程に重要な役割を果たしており、HB-EGF 欠損マウスは、胎生期あるいは周産期に死亡するため成体肝における解析は困難である。そこで、今回私は IFN 誘導型コンディショナルノックアウトマウスを作製し、四塩化炭素投与による急性肝障害時における HB-EGF の役割について検討した。

〔方法 (Methods)〕

IFN 誘導性 Mx1-cre 遺伝子を有する HB-EGF^{lox/lox}; Mx1-cre マウスに IFN 誘導体 (pIpC) を投与し KO マウスを作製した。対照として pIpC を投与した HB-EGF^{lox/lox} マウス (WT マウス) を用いた。WT および KO マウスに四塩化炭素 1ml/kg を腹腔内投与し、24、48、72 時間、5、7 日後に屠殺し、肝障害及び、肝再生を評価した。肝障害については、血清 ALT 値や肝組織学的検討 (Hematoxylin and Eosin 染色、TUNEL 染色) による解析を行った。また、肝障害後の再生過程について、BrdU 陽性細胞数や Western blotting 法による PCNA 蛋白発現量により検討した。さらに、in vitro の検討として、マウス肝細胞株 AML12 を用い、TNF- α 刺激により細胞傷害を誘発し、HB-EGF の効果を caspase3/7 assay にて検討した。また、創傷治癒過程における HB-EGF の効果について検討するため、scratch wound healing assay を行った。

〔成績 (Results)〕

1) KO マウスの確認: pIpC 投与後、KO マウスでは肝における HB-EGF の遺伝子はほぼ 100% 欠損

していることを PCR 法により確認した。また、四塩化炭素投与後 24 時間の時点において、WT マウスでは、四塩化炭素投与前と比較し、HB-EGF の遺伝子発現が 15 倍以上に増加しているのに比し、KO マウスではほとんど発現誘導を認めなかった。2) 肝障害の評価: KO 群では四塩化炭素投与 24 時間後の血清 ALT 値が WT 群に比し有意に高く (約 2.2 倍)、TUNEL 染色による組織学的検討においてもアポトーシスの誘導が著明であった (約 3 倍)。一方、組織学的に中心静脈周囲の壊死領域は両群間に差を認めなかった。3) 肝再生の評価: PCNA 蛋白の発現は 48 時間では有意に KO 群で発現が減弱していたが、BrdU 陽性細胞数はいずれの時間帯においても、両群間に有意な差は認めなかった。4) in vitro の検討では、HB-EGF は TNF- α による細胞傷害を軽減させ、scratch wound healing assay では HB-EGF は細胞遊走を促進することにより、創傷治癒を早めた。これらの効果は ERK inhibitor である U0126 の併用により減弱した。

〔総括(Conclusion)〕

HB-EGF の遺伝子欠損は、急性肝障害時に肝細胞のアポトーシスを増強し、肝障害を増悪させた。また、in vitro の検討から、HB-EGF は TNF- α によって誘導されるアポトーシスを抑制し、創傷治癒を促進させた。以上より HB-EGF は肝細胞保護作用を持つことが示唆された。

論文審査の結果の要旨

Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) は、これまで肝再生に重要な増殖因子であると報告されているが、ノックアウトマウスは胎生致死のため、生体肝における機能は十分に解析されていなかった。彼らは、Mx1-cre/loxP システム用い、コンディショナルノックアウトマウスを作成し、今回は四塩化炭素誘因性の急性肝障害時における HB-EGF の役割について検討した。HB-EGF の欠損は、四塩化炭素投与後の肝障害のうち、アポトーシスを著明に増強させたが、炎症後の肝再生については差を認めなかった。また、マウス肝細胞株 AML12 と TNF- α を用いたアポトーシス誘導実験の結果から、HB-EGF の添加は、TNF- α 誘導性のアポトーシスを抑制し、さらに創傷治癒実験では治癒を促進した。

HB-EGF は数ある EGF ファミリーの一つであり、HB-EGF の欠損のみではほかの増殖因子が相補的に働くため再生過程には影響を与えないが、アポトーシスに関しては、HB-EGF 特異的な作用であることを示唆している。

ノックアウトマウスの作成は他になく、また増殖因子として知られる HB-EGF の抗アポトーシス効果を示したことは、学位の授与に値すると思われる。