

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590975

研究課題名(和文)ヘパリン結合性上皮増殖因子様増殖因子による肝線維化抑制機序の解明

研究課題名(英文)The role of heparin-binding EGF-like growth factor in liver fibrosis

研究代表者

木曾 真一(KISO, Shinichi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：40335352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：肝再生因子 HB-EGFの肝線維化過程における役割、特に肝星細胞(HSC)活性化に与える影響は明らかではない。HB-EGF遺伝子欠損マウス(KO)を作製し、同マウスの胆管結紮術(BDL)による肝線維化を検討した。KOではBDLによる肝線維化領域が増加し、collagen1、TIMP-1の肝内遺伝子発現が有意に増加し、F4/80、CD68の肝内遺伝子発現もKOで増加した。培養HSCにおいて、HB-EGFの添加はcollagen1遺伝子発現を抑制し、TGF- $\beta$ 依存性転写活性を抑制し、TGIFの核内発現を増加させた。HB-EGFが実験的マウス肝線維化に対して保護的に作用することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We reported that Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) was a hepatotropic factor in vivo. However, the role of HB-EGF in liver fibrosis remains still unclear. Our aim is to evaluate the involvement of HB-EGF in liver fibrogenesis of mice. Gene expression of HB-EGF was increased in bile duct ligation (BDL)-induced fibrotic livers. We generated conditional HB-EGF knockout (KO) mice and were subjected to BDL. After BDL, KO mice exhibited enhanced liver fibrosis with increased expression of collagen. Finally, we used mouse hepatic stellate cells (HSCs) to examine the role of HB-EGF in the activation of these cells and showed that HB-EGF antagonized TGF- $\beta$ -induced gene expression of collagen in mouse primary HSCs. HB-EGF did not prevent the TGF- $\beta$ -induced nuclear accumulation of Smad3, but did lead to stabilization of the Smad transcriptional co-repressor TG-interacting factor. In conclusion, our data suggest a possible protective role of HB-EGF in cholestatic liver fibrosis.

研究分野：消化器病学

キーワード：肝線維化 肝再生 HB-EGF 肝星細胞

1. 研究開始当初の背景

Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) が、肝部分切除後や急性肝障害後の肝再生において肝再生因子として重要な役割を果たしていることを、HB-EGF トランスジェニックマウスや HB-EGF KO マウスを用い明らかにしてきた。しかし、HB-EGF の肝線維化に対する作用は、いまだ十分には解明されていない。

2. 研究の目的

肝における線維化進展に重要な役割を果たしている肝星細胞 (HSC) は、TGF- $\beta$  を中心とした様々な液性因子間のクロストークによるシグナル制御を受けている。今回我々は、HB-EGF の“肝線維化制御因子”としての可能性について、HB-EGF 遺伝子欠損マウス及びマウス HSC 培養系を用いて検討を行った。

3. 研究の方法

1) IFN 誘導性 Mx1-Cre 遺伝子を有する HB-EGF flox;Mx1-cre マウスに IFN 誘導体 (pIpC) を投与し HB-EGF KO マウス (以下 KO) を作製、対照として pIpC 投与した HB-EGF flox マウス (以下 WT) を用いた。WT 及び KO に胆管結紮術 (BDL) を行い、術後 10 日目の肝組織像及び肝内遺伝子発現を検討した。

2) HSC 活性化に対する HB-EGF の影響については、collagen1 遺伝子発現を指標に検討した。また、TGF- $\beta$  応答性 9xCAGA Luc を導入した HSC を作製し、TGF- $\beta$  依存性の転写活性に対する HB-EGF の影響を検討した。

3) TGF- $\beta$  シグナル特異的な転写抑制因子である TGIF の HSC 核内発現に対する HB-EGF の影響について検討した。

4. 研究成果

1) KO では WT に比し BDL による肝線維化領域が約 1.4 倍に増加し ( $p < 0.05$ )、collagen1、TIMP-1 の肝内遺伝子発現が有意に増加した ( $p < 0.05$ )。また、F4/80、CD68 の肝内遺伝子発現は KO で有意に増加したが ( $p < 0.05$ )、TNF、IL-6 等の炎症性サイトカインの肝内遺伝子発現には差を認めなかった。(2) HSC において、HB-EGF の添加は collagen1 の遺伝子発現を約 50% 抑制し ( $p < 0.05$ )、TGF- $\beta$  依存性転写活性を約 70% 抑制した ( $p < 0.001$ )。3) HB-EGF は HSC において TGIF の核内発現を増加させた。

以上の結果から、HB-EGF は、肝線維化に対して抑制的に機能し、その一つの分子機序として肝星細胞における TGF- $\beta$  シグナルに対する関与が示唆された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 19 件)

Kizu T, Yoshida Y, Furuta K, Ogura S, Egawa M, Chatani N, Hamano M, Takemura T, Ezaki H, Kamada Y, Nishida K, Nakaoka Y, Kiso S, Takehara T.

Loss of Gab1 adaptor protein in hepatocytes aggravates experimental liver fibrosis in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2015 April 1; 308(7):613-624. 査読有 DOI: 10.1152/ajpgi.00289.2014.

Chatani N, Kamada Y, Kizu T, Ogura S, Furuta K, Egawa M, Hamano M, Ezaki H, Kiso S, Shimono A, Ouchi N, Yoshida Y, Takehara T.

Secreted frizzled-related protein 5 (Sfrp5) decreases hepatic stellate cell activation and liver fibrosis. *Liver Int.* 2014 Dec 8. 査読有 DOI: 10.1111/liv.12757.

Kamada Y, Akita M, Takeda Y, Yamada S, Fujii H, Sawai Y, Doi Y, Asazawa H, Nakayama K, Mizutani K, Fujii H, Yakushijin T, Miyazaki M, Ezaki H, Hiramatsu N, Yoshida Y, Kiso S, Imai Y, Kawada N, Takehara T, Miyoshi E.

Serum Fucosylated Haptoglobin as a Novel Diagnostic Biomarker for Predicting Hepatocyte Ballooning and Nonalcoholic Steatohepatitis. *PLoS One.* 2013 Jun 21;8(6):e66328. Print 2013. 査読有 DOI: 10.1371/journal.pone.0066328.

Kamada Y, Fujii H, Fujii H, Sawai Y, Doi Y, Uozumi N, Mizutani K, Akita M, Sato M, Kida S, Kinoshita N, Maruyama N, Yakushijin T, Miyazaki M, Ezaki H, Hiramatsu N, Yoshida Y, Kiso S, Imai Y, Kawada N, Takehara T, Miyoshi E.

Serum Mac-2 binding protein levels as a novel diagnostic biomarker for prediction of disease severity and nonalcoholic steatohepatitis. *Proteomics Clin Appl.* 2013 Jun 14. 査読有 DOI: 10.1002/prca.201200137.

Takemura T, Yoshida Y, Kiso S, Kizu T, Furuta K, Ezaki H, Hamano M, Egawa M, Chatani N, Kamada Y, Imai Y, Higashiyama S, Iwamoto R, Mekada E, Takehara T. Conditional loss of heparin-binding EGF-like growth factor results in enhanced liver fibrosis after bile duct ligation in mice.

*Biochem Biophys Res Commun.* 2013 Jul 26;437(2):185-9 査読有 DOI: 10.1016/j.bbrc.2013.05.097.

Hamano M, Ezaki H, Kiso S, Furuta K, Egawa M, Kizu T, Chatani N, Kamada Y, Yoshida Y, Takehara T. Lipid overloading during liver regeneration causes delayed hepatocyte DNA replication by increasing ER stress in mice with simple hepatic steatosis. *J Gastroenterol.* 2014 Feb;49(2):305-16. 査読有 DOI: 10.1007/s00535-013-0780-7.

Harada N, Hiramatsu N, Oze T, Yamada R, Kurokawa M, Miyazaki M, Yakushijin T, Miyagi T, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Oshita M, Mita E, Hagiwara H, Inui Y, Katayama K, Tamura S, Yoshihara H, Imai Y, Inoue A, Hayashi N, Takehara T. Incidence of hepatocellular carcinoma in HCV-infected patients with normal alanine aminotransferase levels categorized by Japanese treatment guidelines. *J Gastroenterol.* 2013 Apr;48(4):535-43. 査読有 DOI: 10.1007/s00535-012-0657-1.

Kamada Y, Kiso S, Yoshida Y, Chatani N, Kizu T, Hamano M, Egawa M, Takemura T, Ezaki H, Furuta K, Hayashi N, Takehara T. Pitavastatin ameliorated the progression of steatohepatitis in ovariectomized mice fed a high fat and high cholesterol diet. *Hepatology Res.* 2013 Apr;43(4):401-12. 査読有 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2012.01082.x.

Takemura T, Yoshida Y, Kiso S, Saji Y, Ezaki H, Hamano M, Kizu T, Egawa M, Chatani N, Furuta K, Kamada Y, Iwamoto R, Mekada E, Higashiyama S, Hayashi N, Takehara T. Conditional knockout of heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor in the liver accelerates carbon tetrachloride-induced liver injury in mice. *Hepatology Res.* 2013 Apr;43(4):384-93. 査読有 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2012.01074.x.

Nishida T, Hiramatsu N, Mizuki M, Nagatomo I, Kida H, Tazumi K, Shinzaki S, Miyazaki M, Yakushijin T, Tatsumi T, Iijima H, Kiso S, Kanto T, Tsujii M, Takehara T. Managing hepatitis B virus carriers with systemic chemotherapy or biologic therapy in the outpatient clinic. *Hepatology Res.* 2013 Apr;43(4):339-46. 査読有 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2012.01073.x.

Hamano M, Kamada Y, Kiso S, Furuta K, Kizu T, Chatani N, Egawa M, Takemura T, Ezaki H, Yoshida Y, Watabe K, Hamasaki T, Umeda M, Furubayashi A, Kinoshita K,

Kishida O, Fujimoto T, Yamada A, Tsukamoto Y, Tsutsui S, Takehara T, Hayashi N, Matsuzawa Y. Adiponectin negatively correlates with alcoholic and non-alcoholic liver dysfunction: Health check-up study of Japanese men. *Hepatology Res.* 2013 Mar;43(3):238-48. 査読有 DOI: 10.1111/j.1872-034X.2012.01066.x.

Yamamoto S, Watabe K, Araki H, Kamada Y, Kato M, Kizu T, Kiso S, Tsutsui S, Tsujii M, Kihara S, Funahashi T, Shimomura I, Hayashi N, Takehara T. Protective role of adiponectin against ethanol-induced gastric injury in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2012 Apr 15;302(8):G773-80. 査読有 DOI: 10.1152/ajpgi.00324.2011.

Kamada Y, Mori K, Matsumoto H, Kiso S, Yoshida Y, Shinzaki S, Hiramatsu N, Ishii M, Moriwaki K, Kawada N, Takehara T, Miyoshi E. N-Acetylglucosaminyltransferase V regulates TGF- $\beta$  response in hepatic stellate cells and the progression of steatohepatitis. *Glycobiology.* 2012 Jun; 22(6):778-87. 査読有 DOI: 10.1093/glycob/cws012.

Kurokawa M, Hiramatsu N, Oze T, Yakushijin T, Miyazaki M, Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Ishida H, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Iio S, Doi Y, Yamada A, Oshita M, Kaneko A, Mochizuki K, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Inui Y, Katayama K, Yoshihara H, Imai Y, Hayashi E, Hayashi N, Takehara T. Long-term effect of lamivudine treatment on the incidence of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis B virus infection. *J Gastroenterol.* 2012 May;47(5):577-85. 査読有 DOI: 10.1007/s00535-011-0522-7.

Oze T, Hiramatsu N, Song C, Yakushijin T, Iio S, Doi Y, Oshita M, Hagiwara H, Mita E, Ito T, Inui Y, Hijioka T, Tamura S, Yoshihara H, Inoue A, Imai Y, Hayashi E, Kato M, Miyazaki M, Hosui A, Miyagi T, Yoshida Y, Tatsumi T, Kiso S, Kanto T, Kasahara A, Hayashi N, Takehara T. *J Gastroenterol.* 2012 Mar;47(3):334-42. 査読有 DOI: 10.1007/s00535-011-0498-3.

〔学会発表〕(計 14 件)

Furuta K, Yoshida Y, Kizu T, Ogura S, Egawa M, Chatani N, Kamada Y, Kiso S, Takehara T.

Loss of Grb2-associated binder 1 results in enhanced hepatocyte necrosis and high mortality in mice with acute liver failure. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2014年11月9日 Boston, MA (USA)

Yoshida Y, Kizu T, Furuta K, Ogura S, Egawa M, Chatani N, Kamada Y, Kiso S, Takehara T.  
Grb2-associated binder 1 protects against liver fibrosis via suppression of CCL5 production from hepatocytes.  
The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2014年11月9日 Boston, MA (USA)

吉田 雄一、木津 崇、古田 訓丸、小倉 智志、柄川 真弓、茶谷 徳啓、江崎 久男、鎌田 佳宏、木曾 真二、竹原 徹郎  
肝線維化に対する新規治療標的としての肝細胞 Gab1-CCL5 経路の意義  
第50回日本肝臓学会総会 2014年5月29日 ホテルニューオータニ (東京)

Furuta K, Yoshida Y, Kizu T, Ogura S, Egawa M, Chatani N, Hamano M, Ezaki H, Kamada Y, Kiso S, Takehara T.  
Grb2-associated binder 1 docking protein is crucial for mortality in a mouse model of acute liver failure.  
The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2013年11月4日 Washington, DC(USA)

Kizu T, Yoshida Y, Furuta K, Ogura S, Egawa M, Chatani N, Hamano M, Ezaki H, Kamada Y, Kiso S, Takehara T.  
Loss of Gab1 scaffolding adaptor protein in the hepatocytes exacerbates cholestasis-induced liver fibrosis in mice.  
The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2013年11月4日 Washington, DC(USA)

木津 崇、吉田 雄一、古田 訓丸、椿尾 真弓、茶谷 徳啓、濱野 美奈、江崎 久男、鎌田 佳宏、木曾 真二、竹原 徹郎  
アダプター蛋白質 Gab1 は胆汁うっ滞に伴う肝線維化に対して保護的に働く：ケモカイン CCL5 の関与  
第49回日本肝臓学会総会 2013年6月6日 京王プラザホテル (東京)

茶谷 徳啓、鎌田 佳宏、古田 訓丸、木津 崇、柄川 真弓、濱野 美奈、江崎 久男、木曾 真二、吉田 雄一、竹原 徹郎  
アディポサイトカイン Secreted frizzled-related protein (Sfrp5)の Maus 肝線維化における意義

第17回日本肝臓学会大会 2013年10月9日 グランドプリンスホテル新高輪 (東京)

Egawa M, Yoshida Y, Kiso S, Tomokuni A, Kizu T, Furuta K, Takemura T, Hamano M, Chatani N, Ezaki H, Kamada Y, Nagano H, Doki Y, Mori M, Takehara T.  
Crucial role of FoxM1 transcription factor as a predictor of clinical outcomes in patients with hepatocellular carcinoma.  
The 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases 2012年11月12日 Boston, MA (USA)

吉田 雄一、木曾 真二、竹原 徹郎  
肝再生療法の新規標的分子としてのアダプター蛋白質 Gab1 の意義とその肝幹細胞制御について  
第48回日本肝臓学会総会 2012年6月7日 ANA クラウンプラザホテル (金沢)

竹村 貴代、吉田 雄一、古田 訓丸、木津 崇、柄川 真弓、茶谷 徳啓、濱野 美奈、江崎 久男、鎌田 佳宏、木曾 真二、竹原 徹郎  
HB-EGF (heparin-binding EGF-like growth factor) は肝線維化に対して抑制的に働く：遺伝子欠損マウスおよび培養肝星細胞を用いた検討  
第48回日本肝臓学会総会 2012年6月8日 ホテル日航金沢 (金沢)

木津 崇、吉田 雄一、古田 訓丸、柄川 真弓、竹村 貴代、茶谷 徳啓、濱野 美奈、江崎 久男、鎌田 佳宏、木曾 真二、竹原 徹郎  
マウス肝線維化進展過程におけるアダプター蛋白質 Gab1 の関与  
第48回日本肝臓学会総会 2012年6月8日 ホテル日航金沢 (金沢)

竹村 貴代、吉田 雄一、古田 訓丸、木津 崇、柄川 真弓、茶谷 徳啓、濱野 美奈、江崎 久男、松本 仁、鎌田 佳宏、木曾 真二、竹原 徹郎  
Heparin-binding EGF-like growth factor (HB-EGF) による肝線維化制御：TGF-シグナルとのクロストークについて  
第54回日本消化器病学会大会 2012年10月10日 神戸国際展示場 (神戸)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況 (計0件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

木曾 真一 (KISO, Shinichi)  
大阪大学・大学院医学系研究科・  
特任准教授  
研究者番号：4 0 3 3 5 3 5 2

### (2)研究分担者

吉田 雄一 (YOSHIDA, Yuichi)  
大阪大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：3 0 4 5 7 0 1 4

渡部 健二 (WATABE, Kenji)  
大阪大学・医学部附属病院・准教授  
研究者番号：5 0 3 7 9 2 4 4

### (3)連携研究者