

平成 30 年 6 月 5 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19341

研究課題名(和文) NAFLD肝再生不全におけるGabファミリー蛋白による肝保護と革新的治療法の開発

研究課題名(英文) The role of hepatocyte Grb2-associated binder 1 in impaired liver regeneration of NAFLD

研究代表者

古田 訓丸 (FURUTA, KUNIMARO)

大阪大学・医学部附属病院・特任助教(常勤)

研究者番号：50773834

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝再生に重要な役割を果たすGab1の非アルコール性脂肪性肝疾患(NAFLD)肝再生不全における役割を検討した。WT及び肝細胞特異的Gab1欠損(KO)マウスに、高脂肪高コレステロール(HFHC)あるいは、メチオニン・コリン欠乏(MCD)食餌を8週間投与した。HFHCモデルでは、KOマウスは、WTに比し、肝重量と肝内コレステロール含量が有意に増加したが、血清ALT値は両群間に差を認めなかった。MCDモデルにおいては、KOマウスは、WTに比し、血清ALTの有意な上昇を認めた。以上より、NAFLD肝再生不全において、肝細胞Gab1は、肝内脂質代謝や肝保護作用に寄与している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Grb2-associated binder 1 (Gab1) plays a crucial role in the liver regeneration. Liver regeneration is known to be impaired in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) patients. However, the role of Gab1 in impaired liver regeneration in NAFLD has remained unclear. To investigate this issue, we examined the liver injury of hepatocyte specific Gab1 conditional knockout (KO) mice of in murine NAFLD models. Wild type (WT) and KO mice were fed with high-fat and high-cholesterol (HFHC) diet or methionine- and choline-deficient (MCD) diet for 8 weeks. In a HFHC diet model, KO mice showed a significant increase in body weight and hepatic cholesterol content compared with WT mice, however, did not show any difference in serum ALT levels. In contrast, in a MCD diet model, KO mice showed a significant increase in serum ALT levels compared with WT mice. The data indicate the possible role of Gab1 in hepatic lipid metabolism and hepatocyte injury in NAFLD.

研究分野：肝再生

キーワード：Gab1 NAFLD 肝再生

1. 研究開始当初の背景

- (1) 我が国において肝疾患は代表的な国民病の一つである。中でも、生活習慣の欧米化に基づく運動不足ならびに過栄養が引き起こす肥満症が増加しており、内臓脂肪の蓄積を基盤としたメタボリックシンドロームが社会的な問題となっている。メタボリックシンドロームの肝臓における表現型として知られる非アルコール性脂肪性肝疾患 (nonalcoholic fatty liver disease :NAFLD) は肝硬変から肝細胞癌に進展することが明らかになっており、我が国の NAFLD 患者は現在約 1000 万人いると考えられている。
- (2) 脂肪肝が肝再生障害を来すことは、臨床的に古くから知られている。特に、生体肝移植においてドナー患者の脂肪肝は、ドナー患者自身における移植後肝不全のリスク因子となり得る。特に、欧米と比較し、脳死臓器提供者が少なく、肝移植のほとんどを生体肝移植に頼らざるを得ない我が国において、脂肪肝における肝再生不全の機序解明とその克服は急務の課題と考えられる。しかしながら、脂肪肝蓄積、特に NAFLD 患者における肝再生障害の分子機構は今のところ明らかではない。
- (3) 申請者は、これまで EGF ファミリーの中で、heparin binding EGF-like growth factor (以下 HB-EGF) が、強力な肝再生因子として機能することを、同分子の遺伝子欠損マウスの作製及び解析を通じて明らかにしてきた (Takemura T, Furuta K, et al. *Hepatology Res.* 43(4):384-93.2013, Takemura T, Furuta K, et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 437(2):185-91, 2013)。
- (4) さらに、HB-EGF だけでなく IL-6 や HGF などの肝再生因子の下流で共通に機能するアダプター蛋白 Grb2-associated binder 1 に着目するに至った。Gab1 は、生体内において ERK/AKT シグナル伝達経路活性化に重要であり、また Gab1 遺伝子欠損がマウス初期発生過程に必須であることが示されている (*Mol.Cell.Biol.* 20:3695-3704,2000)。
- (5) そこで、申請者は、肝特異的 Gab1 欠損マウスの作製を行い、まず、肝細胞 Gab1 が胆管結紮誘発性及び四塩化炭素誘導モデルにおいて、肝再生異常と肝線維化を増悪させることを明らかにした (Kizu T, Furuta K, et al. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 308(7):G613-24, 2015)。
- (6) 次に、申請者は、肝細胞 Gab1 欠損が、ヒト劇症肝炎の原因になり得るアセトアミノフェン投与後の肝壊死増強と肝再生抑制を引き起こし、生存率を低下さ

せることを見出した。興味深いことに、Gab1 を介したこれらの“肝保護作用”の実態が、ストレス MAP kinase JNK のミトコンドリア移行を介したミトコンドリア機能制御によるものと判明した。

- (7) 最近、JNK のミトコンドリア移行自体、脂肪酸を介した NAFLD 病態と深く関わるとい報告 (*Journal of hepatology.* 62: 1376-1372, 2015) もあり、Gab1 の制御が、下流シグナル、特にミトコンドリア機能制御を通じて、NAFLD 肝再生不全の治療につながると考えるに至った。

2. 研究の目的

肝臓は、極めて強い自己複製能をもつ臓器として知られている。一方、本邦で増加の一途をたどる NAFLD において、肝再生が著しく障害されることが、広く知られている。特に、NAFLD における肝再生障害は、肝切除術後や急性肝障害時の肝不全増悪の危険因子と考えられ、その克服は臨床的にも重要な課題である。しかし、NAFLD における肝再生障害の詳細な分子機構は、今のところ明らかでない。本研究では、申請者が着目している Gab1 蛋白に焦点をあて、独自に開発した遺伝子欠損動物を用いたマウス NAFLD 肝再生不全の病態解明と同分子群を標的とした新規治療法の確立を目指す。最終的に臨床応用を目指した研究基盤の整備を本研究の目標とする。

3. 研究の方法

- (1) 肝細胞特異的 Gab1 欠損 (Gab1CK0) マウス (N=7) 及び対照 (WT) マウス (N=8) に対して、高脂肪高コレステロール食餌 (HFHC) を 8 週間負荷した後、マウスを屠殺し、血液及び肝組織検体を採取し、肝細胞死や肝糖脂質代謝に与える影響について検討した。
- (2) 10 ~ 12 週齢の肝細胞特異的 Gab1 欠損 (KO) マウス (N=8) 及び対照 (WT) マウス (N=8) に対して、MCD 食餌を 8 週間負荷し、肝障害に与える影響について検討を行った。

4. 研究成果

- (1) HFHC8 週負荷にて、Gab1CK0 マウスでは、WT マウスと比較して、体重が有意に増加し、肝コレステロール含量が有意に増加し、ApoA1 の肝内遺伝子発現が有意に低下した。なお、ALT に関しては両群間に有意差を認めなかった。
- (2) MCD 食餌 8 週負荷にて、Gab1CK0 マウスでは ALT : 61.8 IU/L と、WT マウスの ALT : 29.3 IU/L に比し、有意に肝障害が増悪した ($p < 0.05$)。ただし、肝重量及び肝体重比において、両群間に有意な差は認められなかった。
- (3) (1)(2)の結果より、肝細胞 Gab1 欠損は、

高脂肪食負荷後の肝内コレステロール含量を増加させたが、肝障害を増悪させなかった。他方、肝細胞 Gab1 欠損は、MCD 食餌による肝障害を増強させた。肝細胞 Gab1 がメタボリックシンドロームの肝での表現型である NAFLD に起因する肝不全において、保護的に機能している可能性を示唆するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

- (1) Ogura S, Yoshida Y, Kurahashi T, Egawa M, Furuta K, Kiso S, Kamada Y, Hikita H, Eguchi H, Ogita H, Doki Y, Mori M, Tatsumi T, Takehara T. Targeting the mevalonate pathway is a novel therapeutic approach to inhibit oncogenic FoxM1 transcription factor in human hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2018 in press
- (2) Doi A, Sakamori R, Tahata Y, Urabe A, Morishita N, Yamada R, Furuta K, Kodama T, Hikita H, Yakushijin T, Ohkawa K, Kaneko A, Imai Y, Tatsumi T, Takehara T. Frequency of, and factors associated with, hepatitis B virus reactivation in hepatitis C patients treated with all-oral direct-acting antivirals: Analysis of a Japanese prospective cohort. *Hepatol Res*. 2017 Dec;47(13):1438-1444. doi:10.1111/hepr.12919. Epub 2017 Aug 1. PubMed PMID: 28585404.
- (3) Egawa M, Yoshida Y, Ogura S, Kurahashi T, Kizu T, Furuta K, Kamada Y, Chatani N, Hamano M, Kiso S, Hikita H, Tatsumi T, Eguchi H, Nagano H, Doki Y, Mori M, Takehara T. Increased expression of Forkhead box M1 transcription factor is associated with clinicopathological features and confers a poor prognosis in human hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res*. 2017 Oct;47(11):1196-1205. doi: 10.1111/hepr.12854. Epub 2017 Feb 3. PubMed PMID: 28002884.
- (4) Furuta K, Yoshida Y, Ogura S, Kurahashi T, Kizu T, Maeda S, Egawa M, Chatani N, Nishida K, Nakaoka Y, Kiso S, Kamada Y, Takehara T. Gab1 adaptor protein acts as a gatekeeper to balance hepatocyte death and proliferation during acetaminophen-induced liver injury in mice. *Hepatology*. 2016 Apr;63(4):1340-55. doi: 10.1002/hep.28410. Epub 2016 Jan 22. PubMed PMID: 26680679.

〔学会発表〕(計 8 件)

- (1) Lipid metabolism regulates oncogenic FoxM1 transcription factor in human hepatocellular carcinoma via the mevalonate-Rho pathway Yuichi Yoshida, Satoshi Ogura, Tomohide Kurahashi, Mayumi Egawa, Kunimaro Furuta, Shinichi Kiso, Yoshihiro Kamada, Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi and Tetsuo Takehara 第 68 回米国肝臓学会議 Oct 20-24, 2017; Washington DC, USA Oct 23, 2017; Washington DC, USA
- (2) Overexpression of FoxM1 transcription factor in murine hepatocytes results in hepatocyte death and liver inflammation. Tomohide Kurahashi, Yuichi Yoshida, Satoshi Ogura, Mayumi Egawa, Kunimaro Furuta, Yoshihiro Kamada, Shinichi Kiso, Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. Oct 20, 2017; Washington DC, USA
- (3) FoxM1 転写因子を介した新たな肝癌脂質代謝制御:治療標的としての可能性について 小倉智志、吉田雄一、柄川真弓、倉橋 知英、古田訓丸、木曾真一、鎌田佳宏、竹原徹郎 第 102 回 日本消化器病学会総会 京王プラザホテル 2016 年 4 月 23
- (4) FoxM1 転写因子による慢性肝疾患の制御機構:新規マウスモデルを用いた検討 倉橋知英、吉田雄一、小倉智志、柄川真弓、古田訓丸、鎌田佳宏、木曾真一、疋田隼人、巽智秀、竹原徹郎 第 41 回日本肝臓学会東部会 2016 年 12 月 8 日 (木) 京王プラザホテル
- (5) FoxM1 転写因子を介した癌脂質代謝プログラムに基づく新たな肝癌治療戦略 小倉智志、吉田雄一、倉橋知英、柄川真弓、古田訓丸、木曾真一、鎌田佳宏、疋田隼人、巽智秀、竹原徹郎 第 41 回日本肝臓学会東部会 京王プラザホテル 2016 年 12 月 8 日
- (6) 急性肝不全病態において Gab1 は肝細胞運命の決定を担う 古田訓丸、吉田雄一、倉橋知英、小倉智志、柄川真弓、木曾真一、鎌田佳宏、竹原徹郎 第 52 回日本肝臓学会総会 ホテルニューオータニ幕張 2016 年 5 月 20 日千葉
- (7) Metabolic regulation of FoxM1 transcription factor by mevalonate-Rho pathways in human hepatocarcinoma Satoshi Ogura, Yuichi Yoshida, Tomohide Kurahashi, Mayumi Egawa, Kunimaro Furuta, Shinichi Kiso, Yoshihiro Kamada, Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi and Tetsuo Takehara 第 67 回米国肝臓学会議 Nov 11, 2016; HYNES CONVENTION CENTER, BOSTON, MA, USA
- (8) Hepatic overexpression of oncogenic FoxM1 transcription factor promotes

hepatocyte death and hepatic inflammation in mice. Tomohide Kurahashi, Yuichi Yoshida, Satoshi Ogura, Mayumi Egawa, Kunimaro Furuta, Yoshihiro Kamada, Shinichi Kiso, Hayato Hikita, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. 第 67 回米国肝臓学会 議 Nov 11, 2016; HYNES CONVENTION CENTER, BOSTON, MA, USA

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/index.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

古田 訓丸 (FURUTA KUNIMARO)

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号 : 50773834