

第13回 北陸銀行若手研究者助成金 研究実績報告書

氏名	所属・職名		助成金額
稲葉 有香	新学術創成研究機構・准教授		600,000円
研究課題名	高度脂肪肝の再生過程で生じるネクロプトーシスの発症メカニズムの解明		
研究の概要	<p>脂肪蓄積は、細胞死を誘発し、生活習慣病の発症・増悪に寄与する。肝臓への脂肪蓄積は、その重症度に応じて、アポトーシスから溶解性細胞死へと細胞死の様式を変化させる。特に高度脂肪肝では、溶解性細胞死であるネクロプトーシスが誘導され、肝障害の遷延化や非アルコール性脂肪肝炎(NASH)発症の誘因となる。申請者は、マウスモデルを用いた検討から、高度脂肪肝におけるネクロプトーシスの発症に、ストレス応答性転写因子ATF3が関与する可能性を見出している。本研究課題では、高度脂肪肝で生じるネクロプトーシスの制御メカニズムを解明することを目的とした。</p>		
研究の成果	<p>1)ネクロプトーシス誘導におけるATF3の役割の解明 ATF3によるRIPK3発現およびネクロプトーシスの誘導作用を、ラット肝癌由来H4IIE細胞を用いて検討した。H4IIE細胞では、ATF3を過剰発現させることにより、容量依存的に、RIPK3の遺伝子発現を誘導した。そこで、ATF3によるRIPK3発現誘導が、実際に、ネクロプトーシスを引き起こすかを検討するために、FRETライブイメージングを行った。まず、ネクロプトーシスの特異的FRETプローブであるSMARTの安定発現H4IIE細胞株を作出した。SMART安定発現H4IIE細胞では、ATF3を過剰発現すると、FRETによる色調変化と細胞の膨張の後、細胞死を来した。さらに、H4IIE細胞へのTNFα刺激は、アポトーシスの特徴である細胞収縮を伴うFRET陰性細胞死を誘導した。一方、ATF3過剰発現下では、TNFα刺激により細胞死が増加し、細胞の膨張を伴うFRET陽性細胞死を来した。RIPK3阻害剤を添加すると、ATF3過剰発現下においても、TNFα刺激はFRET陽性細胞死を誘導せず、細胞収縮を伴うFRET陰性細胞死を引き起こした。これらの知見は、ATF3の有無により、肝細胞死の様式が、アポトーシスからネクロプトーシスへと変化することを示している。</p> <p>2)ネクロプトーシス誘導因子であるRIPK3の発現制御におけるATF3の役割の解明 ATF3がRIPK3の発現制御に直接関与するか検討する為、RIPK3プロモーターを用いたレポーターアッセイを行った。ATF3は、-540から+210までの配列から成るマウスRIPK3プロモーターの活性を容量依存的に亢進させた。一方で、ATF3が結合可能なSP1結合モチーフの1塩基または2塩基置換した変異体では、ATF3依存性のプロモーター活性化が、有意に減少した。さらに、クロマチン免疫沈降法により、ATF3が、RIPK3プロモーターのSP1結合モチーフを含む配列に結合することを明らかにした。</p> <p>本研究成果は、高度脂肪肝におけるネクロプトーシスの発症に、ATF3依存的なRIPK3発現制御が重要であり、肝障害やNASHの新規治療標的となりうることを示唆している。</p>		
研究成果発表状況	<p>第94回日本内分泌学会学術総会「高度脂肪肝で生じる細胞死誘導メカニズムの解明」(完全バーチャル開催、2021年4月)</p> <p>第40回腫瘍病理セミナー・北信がんプロFD講演会 金沢女性研究者フォーラム「脂肪肝で生じる細胞死の様式変化の分子スイッチ」(金沢、2022年1月)</p>		
経費の執行状況	費目	事項 (主な使用事項を記載)	執行額(円) (費目毎総額を記入)
	物品費	培養細胞関連消耗品(遺伝子導入試薬・培養液など)	239,114円
		核酸解析関連消耗品(核酸抽出試薬・PCR試薬)	171,131円
		タンパク質解析関連消耗品(質量分析・ウェスタンブロット試薬)	189,755円
	旅費		0円
人件費・謝金		0円	
その他		0円	