

## 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 TNF<math>\alpha</math> 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、TNF<math>\alpha</math> 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、TNF<math>\alpha</math> 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	