

令和 3 年 6 月 16 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 31 年度

受付番号 201960331

氏名



(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地 : Cleveland (国名：アメリカ合衆国)

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。

非肝炎ウイルス性肝細胞癌におけるレトロトランスポゾン変化の解明

3. 派遣期間：令和 元 年 7 月 1 日 ~ 令和 3 年 5 月 30 日

4. 受入機関名及び部局名

受入機関名 : Cleveland Clinic Lerner Research Institute

部局名 : Department of Inflammation and Immunity

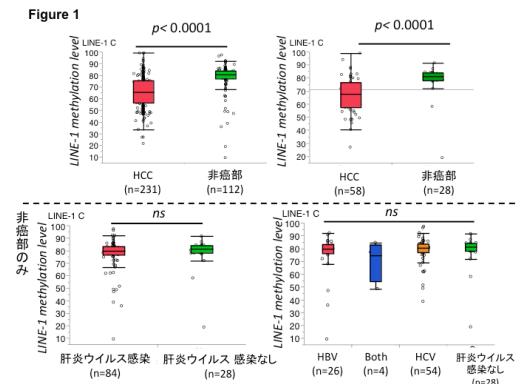
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入)****(も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

(注) 「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

非肝炎ウイルス性肝癌における癌部、非癌部の LINE-1 メチル化の評価

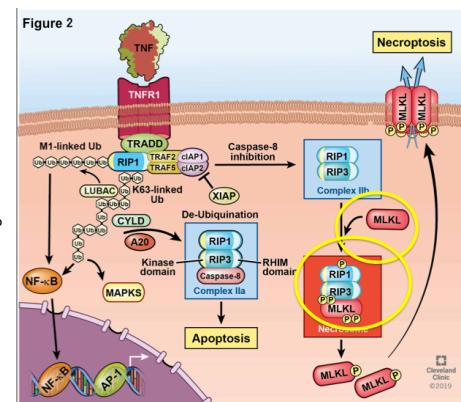
2001年1月から2016年2月の間、HCCに対し肝切除を施行した231例を対象に、癌部、非癌部のLINE-1のメチル化を測定し、臨床病理学的所見及び予後との相関を評価した。切除された肝癌は病理検査にて全てHCCと確認された。この231例の癌部、非癌部をマクロダイセクションによって標本を削り出し、DNAを抽出した。バイサルファイト後、パイロシークエンス法によりLINE-1のメチル化レベルを測定した。計111例のHCCの癌部、非癌部のLINE-1メチル化を測定したところ、癌部では非癌部に比べ有意にLINE-1のメチル化レベルが低値であった（癌部： 64.1 ± 1.4 、非癌部： 77.4 ± 1.3 、 $P < 0.0001$ ）。また、C型肝炎ウイルス感染症例（ 63.7 ± 1.7 vs 67.5 ± 1.7 ）、DCP ≥ 40 mAU/mL症例（ 64.4 ± 1.1 vs 68.7 ± 1.7 ）では癌部のLINE-1メチル化レベルは有意に低値であった。非癌部のLINE-1メチル化を評価したところ、肝炎ウイルス感染の有無による統計学的な有意差は認めなかった。（Figure 1）。



肝炎アルコール性肝炎誘発マウスにおける肝障害、necroptosis の発現の評価

非肝炎ウイルスの主な病院はアルコール性肝炎あるいは非アルコール性肝炎である。本研究室では非肝炎ウイルスによる肝障害の研究も行っており、こちらの成果についても以下述べる。

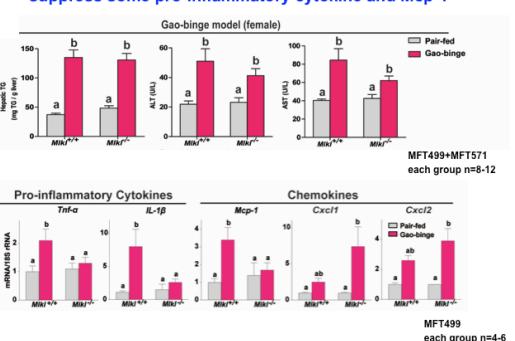
アルコール性肝炎による肝障害のメカニズムとして、プログラム細胞死が深く関わっている。代表的なプログラム細胞死としてはアポトーシスが長らく研究されており、アルコール性肝炎においてもアポトーシスによる肝障害が数多く報告されている。しかしながら、アポトーシスを薬剤（Caspase inhibitor等）によって阻害した場合においても、肝障害が軽減されることはない。これは右図に示すように、細胞死シグナルがアポトーシスからネクロトーシスへ移行し細胞死が誘導されるためである（Figure 2）。このネクロトーシスにおいてMLKLはexecutorとしての役割を果たしていることから、MLKLの制御がアルコール性肝炎の制御において重要な意義を持つと予想される。



我々は、6-8周齢のfemaleのMLKLKOマウスを用いて、アルコール肝炎モデルマウスを作成し（Gao-binge model）、アルコール肝障害におけるMLKLの意義について検討を行った。結果、肝障害の指標であるTG、AST, ALTはwild typeにおいてはアルコール食に予想通り反応し有意な上昇を認めたが、MLKLKOにおいてもその傾向は同様であり、pair食群に比べて有意な改善は認めなかった。HE染色において脂肪蓄積の評価も行ったが、MLKL欠損による改善効果は認めなかった（Figure 3）。一方で、NASHモデルマウスにおいてはMLKLKOにおいてTG,AST, ALTの上昇が抑制され、コントロール食と同等のレベルであった（data not shown）。

次に、qRT-PCRによりマウス肝における炎症性サイトカインの発現について評価した。Wild typeにおいては、Gao-binge群はpair食群に比べpro-inflammatory cytokineであるTNF α やIL-1 β およびchemokineであるMCP-1の発現が有意に上昇下が、MLKL欠損によりその上昇は抑制された（Figure 3）。一方でCXCL1やCXCL2の発現はMLKLKOによりアルコール食群で有意に上昇した。これらの結果から、アルコール刺激下でのMLKLの役割は、肝臓における炎症の亢進に関わることが考えられた。

Figure 3
MLKL deficiency does not protect completely, but suppress some pro-inflammatory cytokine and MCP-1



アルコール性肝炎誘発マウス、非アルコール性肝炎誘発マウスにおける MLKL 発現の違い

次に、異なる成因の肝炎モデルマウスにおける MLKL の発現を評価することとした。高脂肪食を 12 週投与した非アルコール性肝炎モデルマウス(NASH モデル)と前述のアルコール肝炎モデルマウス(Gao-binge model)の肝臓における MLKL の発現を比較したところ、NASH モデルでは有意に高脂肪食群で MLKL の発現が有意に上昇した。一方で、Gao-binge model では pair 食群と比べて MLKL の発現に有意な差は認めなかった。また、マウス肝薄切切片を用いた免疫組織化学染色にて pMLKL の発現を比較したところ、NASH モデルでは有意に高脂肪食群で pMLKL の発現が有意に上昇したが、Gao-binge model では pair 食群と比べて pMLKL の発現に有意な差は認めなかった (data not shown)。これまでの報告により、MLKL は細胞膜に移動し、オリゴマーを形成した後、孔を作成する step を経ることによりことによりネクロトーシスを引き起こすこと

がわかっている(Figure 4)。我々は NASH モデル、Gao-binge model における wild type マウス肝より抽出した細胞膜蛋白の lysate を用いて Western blot 法により、MLKL の発現を評価した。その結果、NASH モデルでは細胞膜におけるオリゴマー化した MLKL の発現が確認でき、特に高脂肪食群で MLKL の発現が有意に亢進していたが、Gao-binge model では pair 食群、Gao-binge 群ともに MLKL の発現を認めなかった(Figure 4)。

これらの結果を validation するため、我々は wild type のマウスから primary hepatocyte を得た後、飽和脂肪酸である palmitic acid(16 時間)と ethanol (48 時間)をそれぞれ用いて treatを行った。Palmitic acid で treat した primary hepatocyte (NASH モデル)では MLKL の発現が細胞膜と overlap していたが、ethanol treat 群では細胞質での MLKL の発現上昇は認めたが、細胞膜における overlap は認めなかった。これらの結果より、MLKL の発現および移動形式が両モデルで異なること、かつ肝障害における役割が異なることが示唆された。

アルコール性肝炎、NASH 患者サンプルにおける RIP1,RIP3 および MLKL の発現

① 肝臓組織による評価

ヒトの肝臓サンプルを用いて、アルコール性肝炎(AH)、NASH におけるネクロトーシス

関連タンパクの発現の違いを評価した。健常者、AH 及び NASH 患者の肝臓から lysate を作成し、Western blot 法にて評価を行った。興味深いことに、pMLKL は AH 患者 NASH 患者で健常者に比べ有意に発現が上昇していたが、加えて NASH 患者は AH 患者に比べ有意に pMLKL の発現が上昇していた。一方で、RIP1 及び pRIP1においては AH 患者で NASH 患者や健常者に比べ有意に発現が上昇していた。RIP3においては AH 及び NASH 間での

発現の有意差は認めず、両者共に健常者より発現が有意に上昇していた(Figure 5)。

次に、AH 及び NASH 肝生検切片を用いて、免疫組織化学染色により pMLKL の発現を比較した。AH 及び NASH では健常者に比べ pMLKL の発現が有意に上昇しており、かつ NASH では AH よりも有意に pMLKL が上昇しており、Western blot の結果と同様の結果であった。さらに興味深い事に、pMLKL の発現パターンが AH と NASH で異なっており、AH では細胞質に dot 状に認められたのに対し、NASH では細胞質が均一に染色された (data not shown)。これらのことから、human においても MLKL を含むネクロトーシス関連蛋白の発現は、AH および NASH により異なることが示唆された。次に、AH 及び NASH 肝生検切片を用いて、免疫組織化学染色により pMLKL の発現を比較した。AH 及び NASH では健常者に比べ pMLKL の発現が有意に上昇しており、かつ NASH では AH よりも有意に pMLKL が上昇しており、Western blot の結果と同様の結果であった。さらに興味深い事に、pMLKL の発現パターンが AH と NASH で異なっており、AH では細胞質に dot 状に認められたのに対し、NASH では細胞

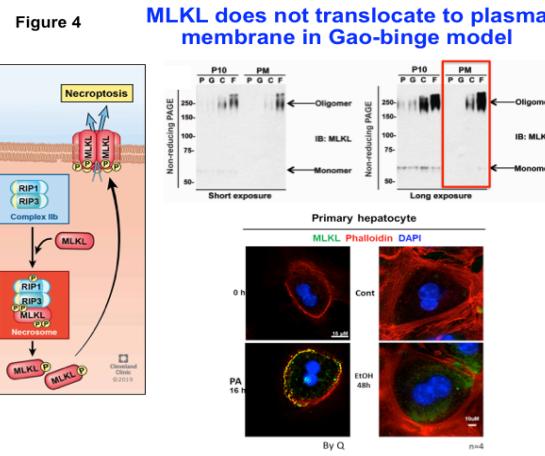
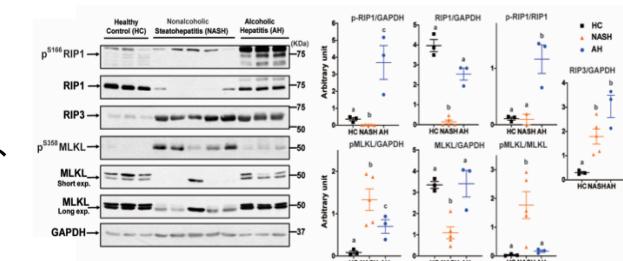


Figure 5 RIP1, RIP3 and MLKL are totally different between NASH and AH in human liver



質が均一に染色された (data not shown)。

② 血清サンプルによる評価

ヒトの血清サンプルを用いて、AH、NASH におけるネクロトーシス関連タンパクの発現の違いを評価した。健常者、AH 及び NASH 患者の血清サンプルを用い、ELISA 法にて評価を行った。興味深いことに、AH 患者における RIP1 および RIP3 は健常者および NASH 患者に比べそれぞれ有意に発現が低下および上昇していた。MLKL は高度 AH ($20 \leq \text{MELD score} < 26$)において健常者および NASH 患者に比べて発現が有意に上昇していた (Figure 6)。さ

らに、AH における RIP3 に着目し解析を行った。RIP3 は死亡した患者群で有意に高値を示し、ROC 曲線で解析すると、RIP1 および MLKL に比べて RIP3 は診断後 90 日死亡を予測する有効な因子であることがわかった。加えて、RIP3 の高値群 ($\text{RIP3} \geq 16305 \text{ pg/mL}$) は低値群に比べて有意に予後不良であることがわかった (Log-rank $p < 0.001$)。これらのことから、ネクロトーシス関連蛋白の発現は病因により異なること、血清中の RIP3 が AH における有効な予後予測バイオマーカーになり得ることが示唆された (Figure 7)。

アルコール性肝炎誘発マウスにおける MLKL による Autophagy の制御

我々はこれまでに NASH モデルマウスにおいて、MLKL が Autophagy を抑制することにより、肝障害を誘導することを報告した (Wu, Nagy et al. 2020)。アルコールモデルマウスにおいても同様の機序が肝障害の亢進に関与するのか Gao-binge モデルマウス肝及び primary hepatocyte を用いて評価した。まず western blot 法により、autophagy marker である p62 及び LC3 の発現を評価した。Gao-binge モデルにおいて、p62 及び LC3 の発現は pair 食群と比べ有意差はなかった。一方で、autophagy の発現の誘導や lysosome の形成に関与する TFEB の発現は、Gao-binge 投与群で発現が低下の傾向にあった。

次に、wild type 及び MLKLKO のマウスから抽出した primary hepatocyte を ethanol を用いて 48 時間 treat した。この際、autophagy の状況を可視化するため mRFP-GFP-LC3 reporter を用いた。この reagent により Autophagosome は黄色に、autolysosome は赤色に認識される。Ethanol は lysosome の形成や autophagosome と lysosome の fusion step を阻害する事により autophagy を阻害している。我々の結果も ethanol treat によりこの fusion step が阻害され、autophagosome の数が有意に増加した。一方で、MLKLKO の primary hepatocyte においてはこの step が阻害された。興味深い事に、RIP3KO では wild type と同様にこの fusion step は ethanol により rescue された (Figure 8)。これらのことから、MLKL は RIP3 と独立して、autophagosome と lysosome の fusion step を阻害することが示唆された。

まとめと今後の予定

本研究により非肝炎ウイルス性肝炎における LINE-1 メチル化状態と、肝癌における癌部、非癌部の LINE-1 メチル化の状態を評価することができた。さらに、動物モデルを用いることにより、非肝炎ウイルス性、アルコール性肝障害のメカニズムであるプログラム細胞死について、ネクロトーシスの key 蛋白である MLKL に着目して、アルコール性肝炎、非アルコール性肝炎における MLKL の役割についての相違に関する興味深い知見を得ることができた。本研究内容は、JCI insight に publish された (Miyata, Wu and Nagy et al. JCI insight 2020)。今後は上記の内容をさらに掘り下げ、LINE-1 メチル化と肝障害、アルコール性肝炎における MLKL の肝障害のメカニズムについて研究を続けていきたいと思う。

Figure 6 RIP1, RIP3 and MLKL are totally different between NASH and AH in human plasma

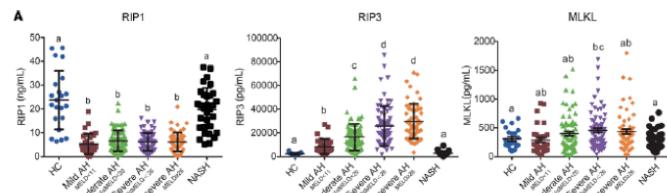


Figure 7 RIP3 may be a novel biomarker to predict prognosis in patients with AH

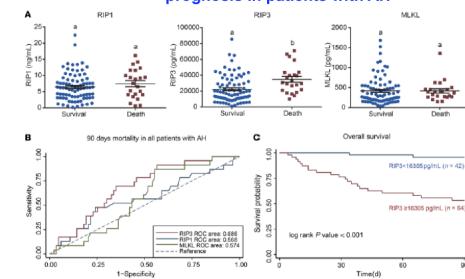


Figure 8 MLKL attenuates autophagy flux in EtOH treatment in primary hepatocyte

