

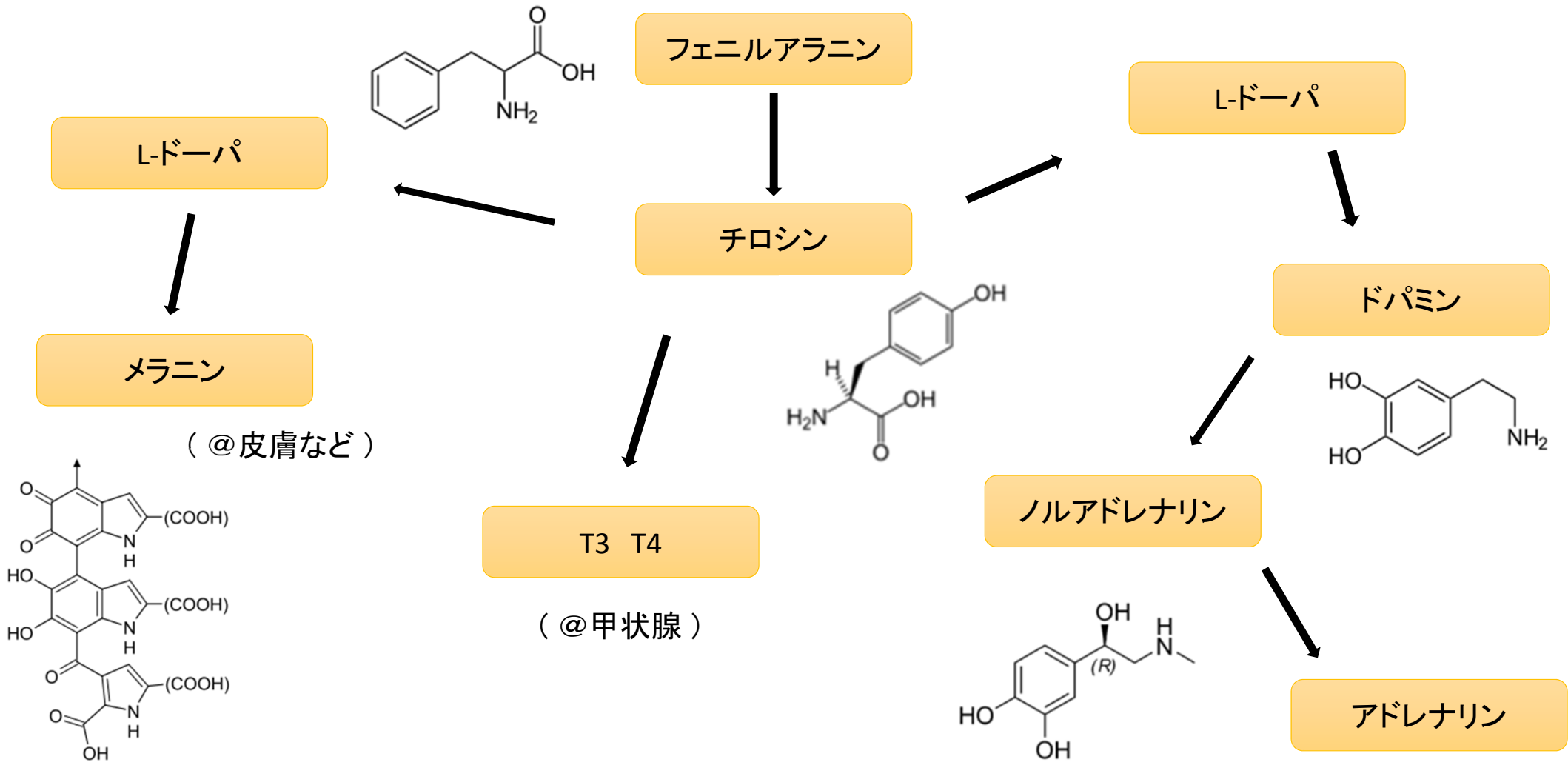
マイクログリアの起炎症性反応における グルタミン代謝の意義について

渡邊稜、長塩皓大、矢野元、田中潤也

愛媛大学医学部分子細胞生理学

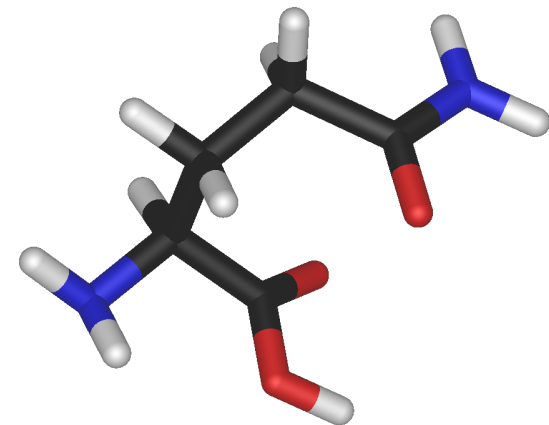
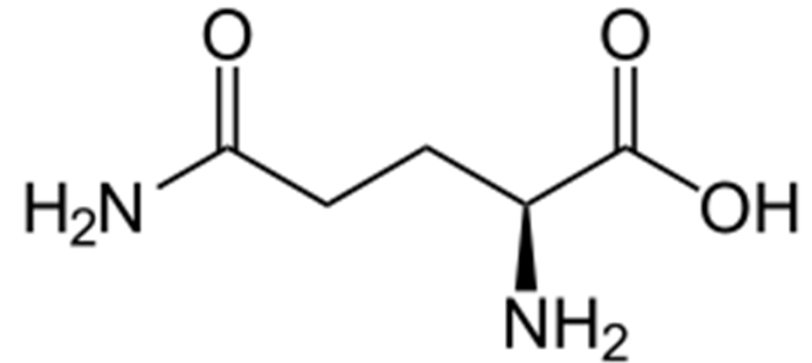
※1回生説明スライド

体内で起こるアミノ酸代謝の例



免疫細胞においてグルタミンの代謝が非常に重要であることが知られている

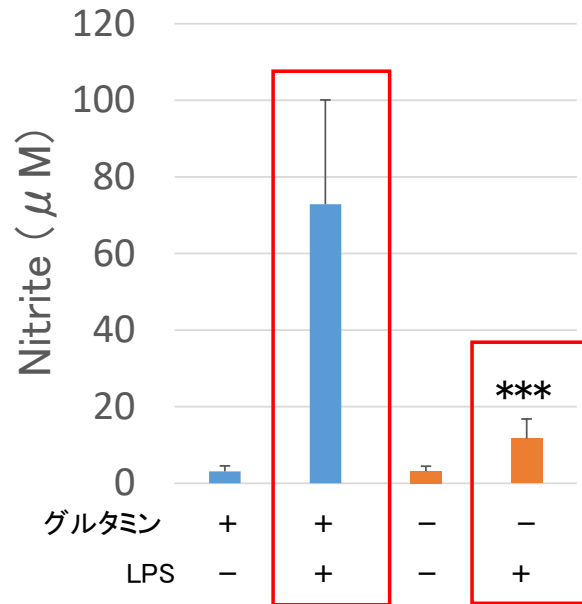
- グルタミンは平常時であれば非必須アミノ酸であるが、炎症時では細胞外からの取り込みが必須となる“準必須アミノ酸”と考えられている
- グルタミンはグルタミン酸、2-オキソグルタル酸など様々なアミノ酸や2-オキソ酸へ代謝される。
- グルタミンは腫瘍細胞や免疫細胞のエネルギー源としても考えられている



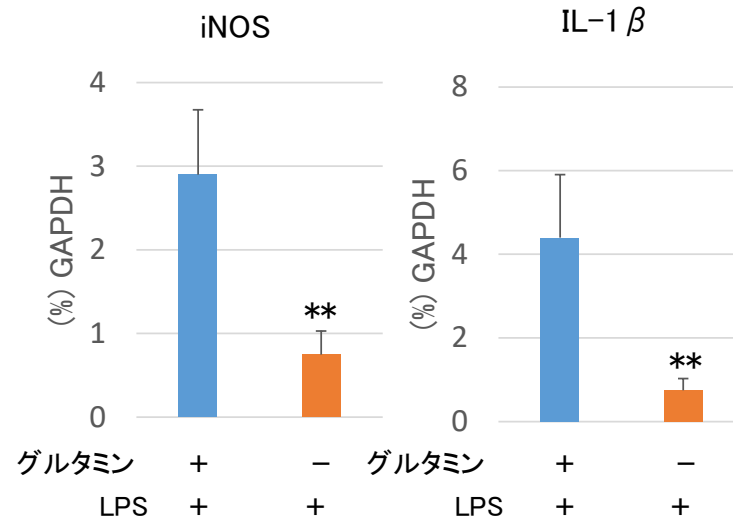
細胞外のグルタミンは起炎症反応において重要である

【一酸化窒素(NO)産生量の変化】

【炎症関連遺伝子の発現量の変化】



*** : P<0.001 vs グルタミン (+), LPS (+)

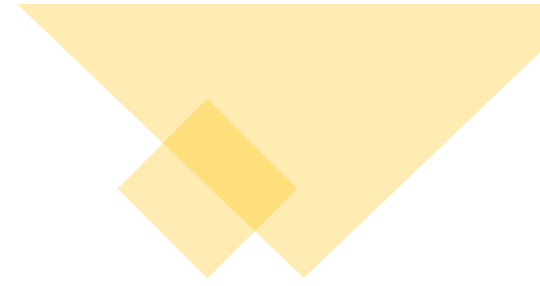



iNOS : inducible NO synthase

IL-1β : Interleukin-1β

** : P<0.01 vs グルタミン (+), LPS (+)


グルタミン (-) では LPS 刺激による NO 産生や iNOS, IL-1β の mRNA 発現が低下する



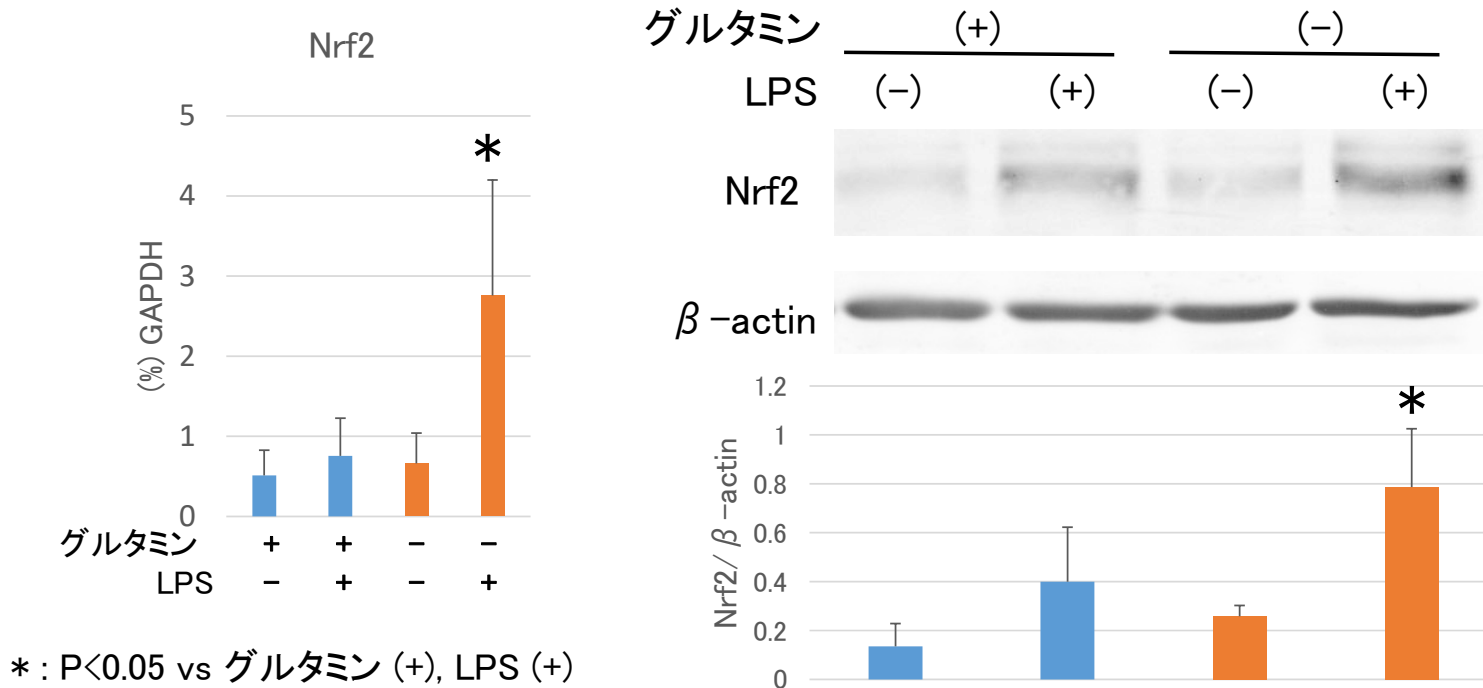
Nrf2 とは

Nrf2 とは**ストレス応答性転写因子**の一つであり、細胞における酸化ストレス防御機構において中心的な役割を担っているとされている。

近年では**炎症反応に関与する**ことが明らかになってきている他、がん研究においても注目されている転写因子である。

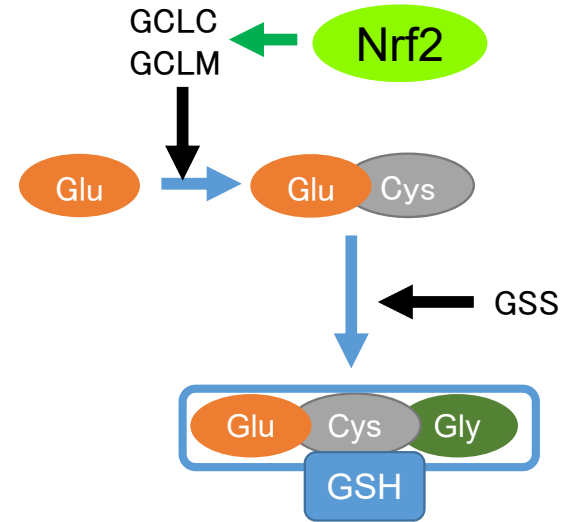
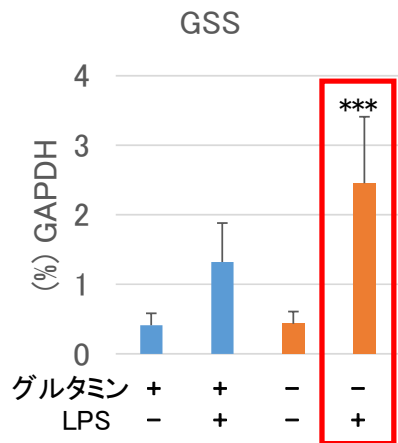
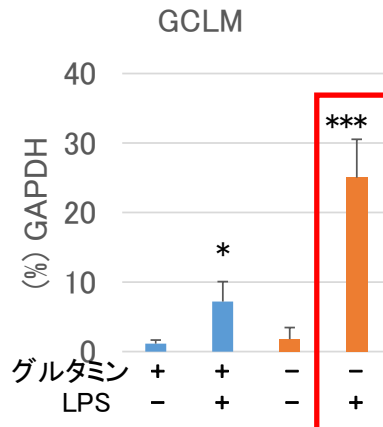
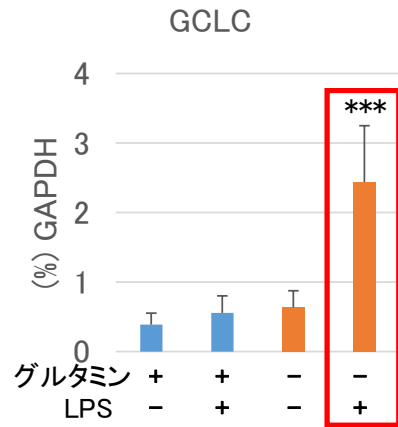


起炎症反応への Nrf2 の関与



グルタミン (-)では Nrf2 を介した抗炎症作用が関与している可能性がある

グルタミン (-)では Nrf2 下流因子の発現が上昇する



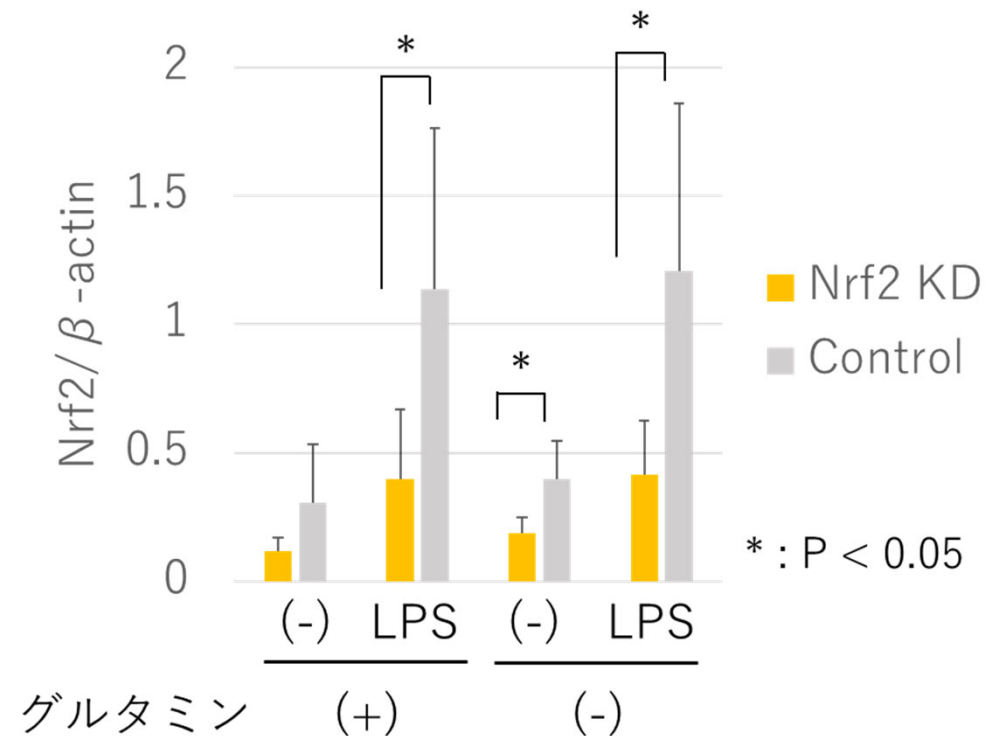
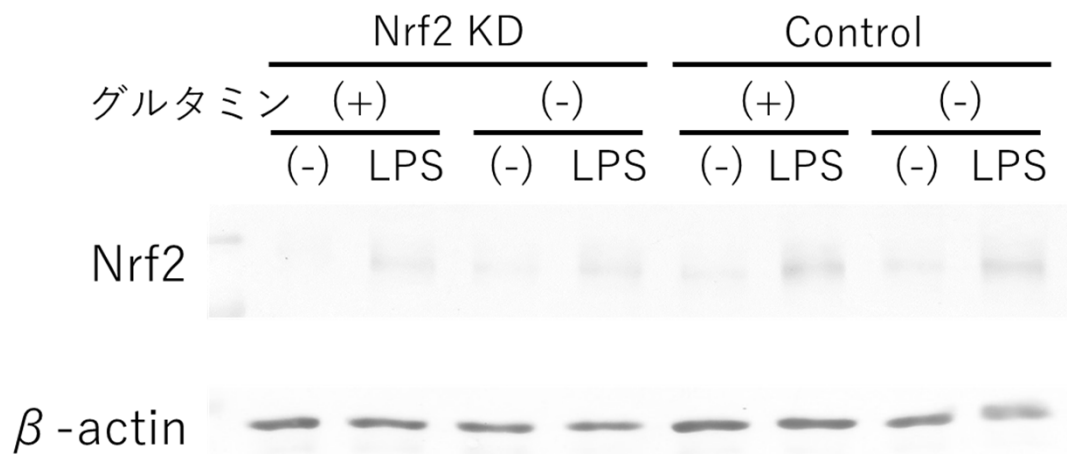
GCLC : Glutamate-cysteine ligase, catalytic subunit
 GCLM : glutamate-cysteine ligase, modifier subunit
 GCLC, GCLMはグルタチオン合成の第一段階反応の酵素
 GSS : Glutathione synthase
 GSSはグルタチオン合成の第二段階反応の酵素

Glu : グルタミン酸
 Cys : システイン
 Gly : グリシン
 GSH : 還元型グルタチオン

* : P < 0.05 vs グルタミン (+), LPS (-)
 *** : P < 0.001 vs グルタミン (+), LPS (-)

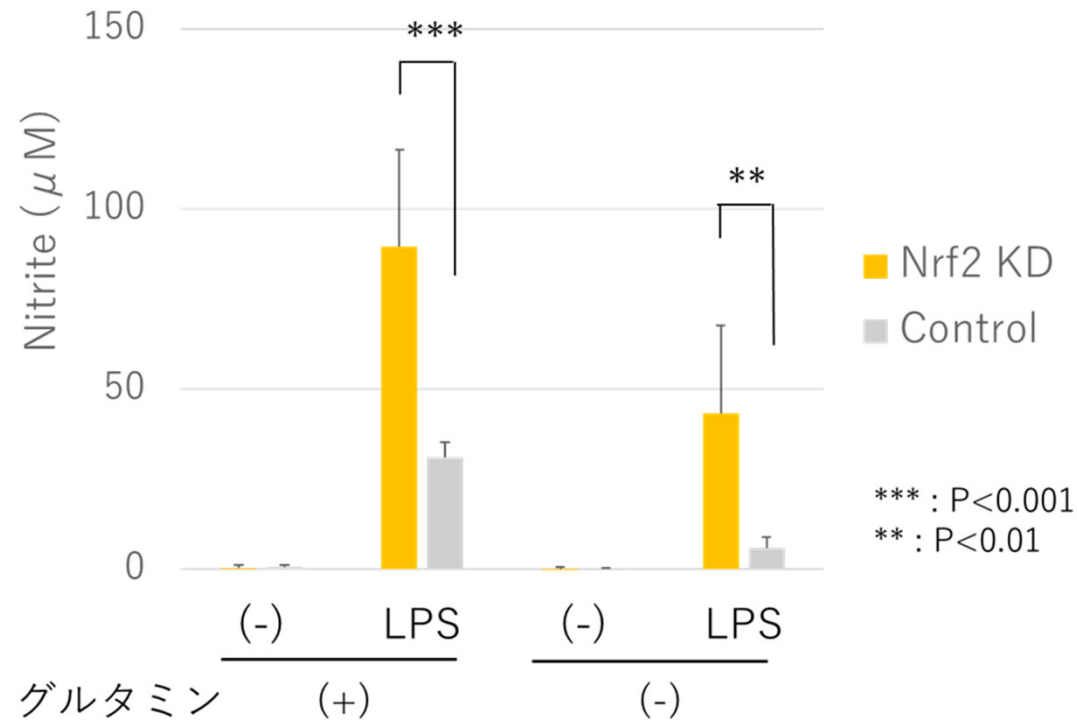
グルタミン (-)では LPS 刺激により
Nrf2 が活性化されている可能性がある

Nrf2の影響を調べるため、ノックダウン細胞を作成した



ノックダウン細胞において
LPS 依存的な **Nrf2 タンパク質量の増加の程度が減弱**している

Nrf2 KD下ではグルタミン(-)でも炎症反応が進行する



ノックダウン細胞では、グルタミン不在下においても
LPSにより誘導される Nitrite 産生が亢進する。

まとめ

- 細胞外のグルタミンが無い状況下では、マイクログリアの起炎症作用が減弱する。
- グルタミン飢餓条件下での LPS 刺激では、転写因子「Nrf2」の mRNA 量とタンパク量がともに増加する。
- Nrf2 KD 細胞では、グルタミン飢餓であっても NO の産生が認められ、これは Nrf2 による抗炎症作用が発揮されなくなったためである可能性がある。

ご視聴いただきありがとうございました。

ご意見・ご質問等ございましたら
h401108m@mails.cc.ehime-u.ac.jp (愛媛大学; 渡邊稜)まで
ご連絡いただけましたら幸いです。

For discussion

For discussion

① 細胞外グルタミンの存在は NF- κ B のふるまいを変えうることが示された。

→ 核内へ移行はするが、転写因子としての活性が下がるのはどうしてか？

② グルタミン飢餓状態では Nrf2 の転写が増加することが分かった。

→ グルタミンの存在が転写制御にどのような影響をあたえるのか？

③ マイクログリアはグルタミンを基質にして細胞外アミノ酸環境を変化させている可能性が示された。

→ この変化はどういった目的・意義があるのだろうか？

For discussion

① 細胞外グルタミンの存在は NF- κ B のふるまいを変えうることが示された。

→ 核内へ移行はするが、転写因子としての活性が下がるのはどうしてか？

② グルタミン飢餓状態では Nrf2 の転写が増加することが分かった。

→ グルタミンの存在が転写制御にどのような影響をあたえるのか？

③ マイクログリアはグルタミンを基質にして細胞外アミノ酸環境を変化させている可能性が示された。

→ この変化はどういった目的・意義があるのだろうか？

For discussion

① 細胞外グルタミンの存在は NF- κ B のふるまいを変えうることが示された。

→ 核内へ移行はするが、転写因子としての活性が下がるのはどうしてか？

② グルタミン飢餓状態では Nrf2 の転写が増加することが分かった。

→ グルタミンの存在が転写制御にどのような影響をあたえるのか？

③ マイクログリアはグルタミンを基質にして細胞外アミノ酸環境を変化させている可能性が示された。

→ この変化はどういった目的・意義があるのだろうか？

For discussion

① 細胞外グルタミンの存在は NF- κ B のふるまいを変えうることが示された。

→ 核内へ移行はするが、転写因子としての活性が下がるのはどうしてか？

② グルタミン飢餓状態では Nrf2 の転写が増加することが分かった。

→ グルタミンの存在が転写制御にどのような影響をあたえるのか？

③ マイクログリアはグルタミンを基質にして細胞外アミノ酸環境を変化させている可能性が示された。

→ この変化はどういった目的・意義があるのだろうか？

今後の展望

- LPS刺激による起炎症反応がグルタミン(-)で低下していることに Nrf2 は関与しているのか？
→Nrf2 の関与を直接確認するため **Nrf2 ノックダウンBV2にて検討中**
- **グルタミン**の有無による細胞外代謝産物の変化はどのような機序によるものなのか？またその意義はなにか？
→**グルタミン酸**を中心とする細胞内アミノ酸代謝の経路を検討。
→細胞外のアミノ酸が**その後の免疫反応を惹起する可能性**について検討。

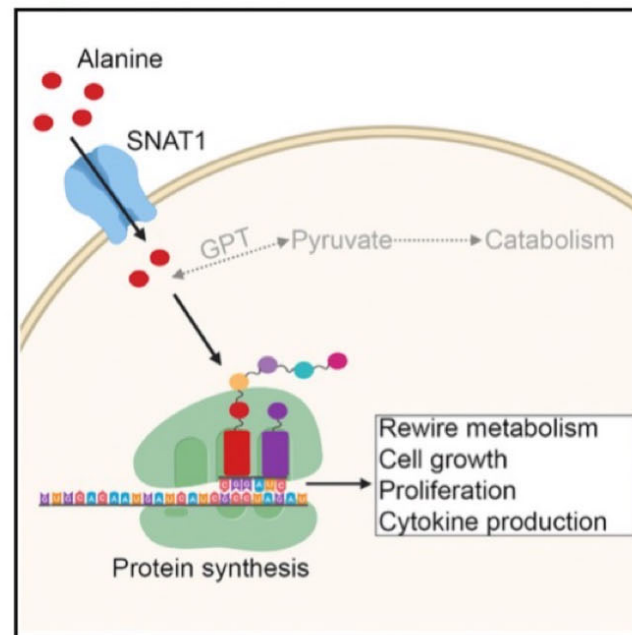
補足① 細胞外のアラニンはTリンパ球を活性化するのに必要

Cell Reports

Report

T Cell Activation Depends on Extracellular Alanine

Graphical Abstract



Highlights

- Alanine is an essential amino acid for T cells to exit quiescence
- Alanine deprivation during early activation leads to functional impairment
- T cells do not catabolize alanine during early activation
- Extracellular alanine supports protein synthesis

In Brief

In health, T lymphocytes are in a resting state. However, stimulation with their cognate antigen induces massive growth and proliferation. Ron-Harel et al. demonstrate that T cells rely on extracellular alanine for activation. Consumed alanine is used primarily for protein synthesis, and alanine deprivation inhibits T cell metabolism and effector functions.

Ron-Harel et al., 2019, Cell Reports 28, 3011–3021 September 17, 2019 a 2019 The Author(s). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.08.034>

補足② アスパラギン酸・アンモニアの意義の検討

NFκB in the Mechanism of Ammonia-Induced Astrocyte Swelling in Culture

A.P. Sinke¹, A.R. Jayakumar², K.S. Panickar^{2,5}, M. Moriyama^{2,6}, P.V.B. Reddy², and M.D. Norenberg^{2,3,4}

Abstract

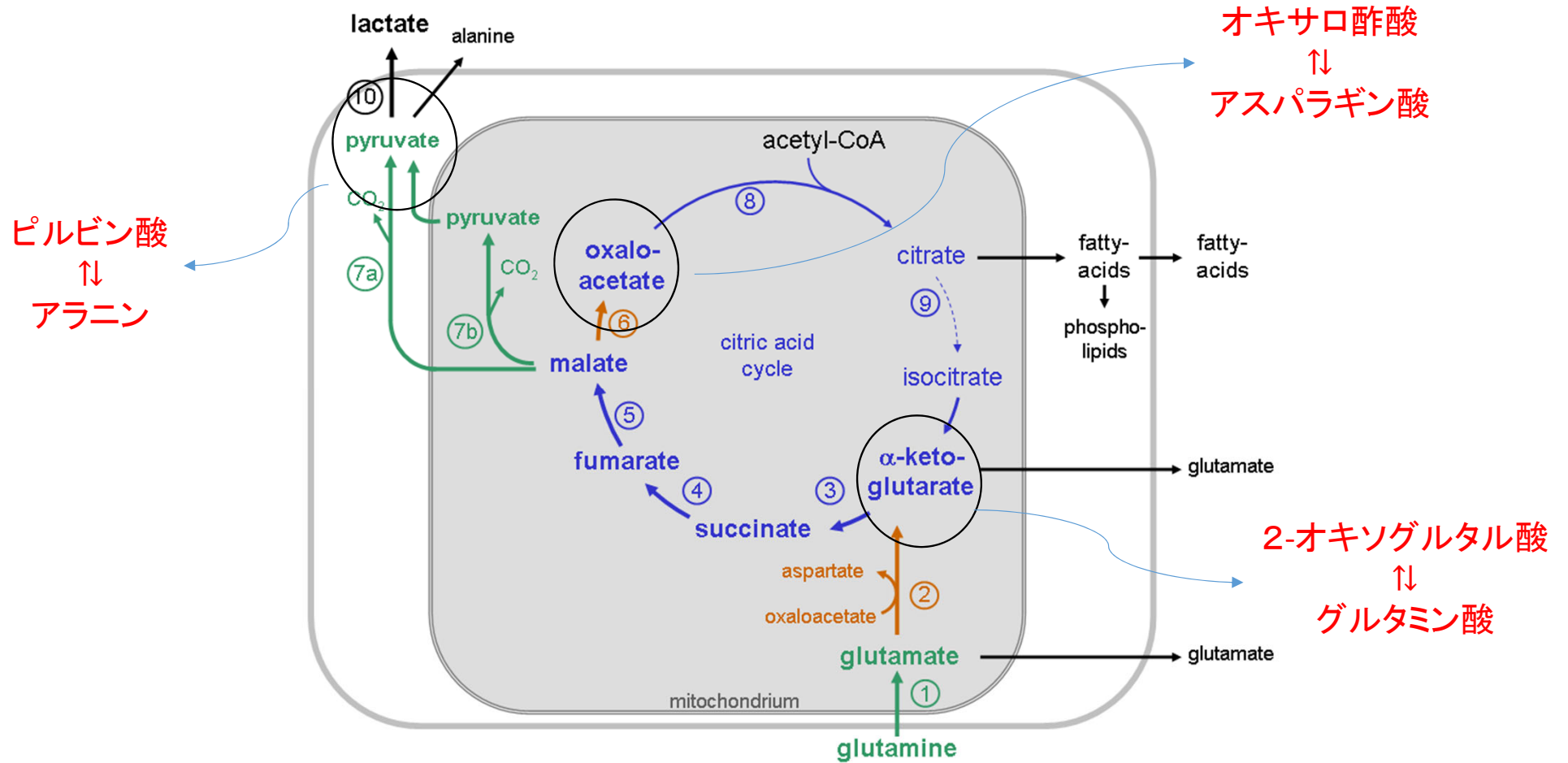
Astrocyte swelling and brain edema are major neuropathological findings in the acute form of hepatic encephalopathy (fulminant hepatic failure, FHF), and substantial evidence supports the view that elevated brain ammonia level is an important etiological factor in this condition. Although the mechanism by which ammonia brings about astrocyte swelling remains to be determined, oxidative/nitrosative stress and mitogen-activated protein kinases (MAPKs) have been considered as important elements in this process. One factor known to be activated by both oxidative stress and MAPKs is nuclear factor κB (NFκB), a transcription factor that activates many genes, including inducible nitric oxide synthase (iNOS). Since the product of iNOS, nitric oxide (NO), is known to cause astrocyte swelling, we examined the potential involvement of NFκB in ammonia-induced astrocyte swelling. Western blot analysis of cultured astrocytes showed a significant increase in NFκB nuclear translocation (a measure of NFκB activation) from 12 h to 2 days after treatment with NH₄Cl (5 mM). Cultures treated with antioxidants, including superoxide dismutase, catalase and vitamin E, as well as the MAPKs inhibitors SB239063 (an inhibitor of p38-MAPK), and SP600125 (an inhibitor of c-Jun N-terminal kinase, JNK) significantly diminished NFκB activation by ammonia, supporting a role of oxidative stress and MAPKs in NFκB activation. The activation of NFκB was associated with increased iNOS protein expression and NO generation, and these changes were blocked by BAY 11-7082, an inhibitor of NFκB. Additionally, ammonia-induced astrocyte swelling was inhibited by the NFκB inhibitors BAY 11-7082 and SN-50, thereby implicating NFκB in the mechanism of astrocyte swelling. Our studies indicate that cultured astrocytes exposed to ammonia display NFκB activation, which is likely a consequence of oxidative stress and activation of MAPKs. NFκB activation appears to contribute to the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling, apparently through its upregulation of iNOS protein expression and the subsequent generation of nitric oxide.

・アンモニア
→アストロサイトへの作用の可能性？

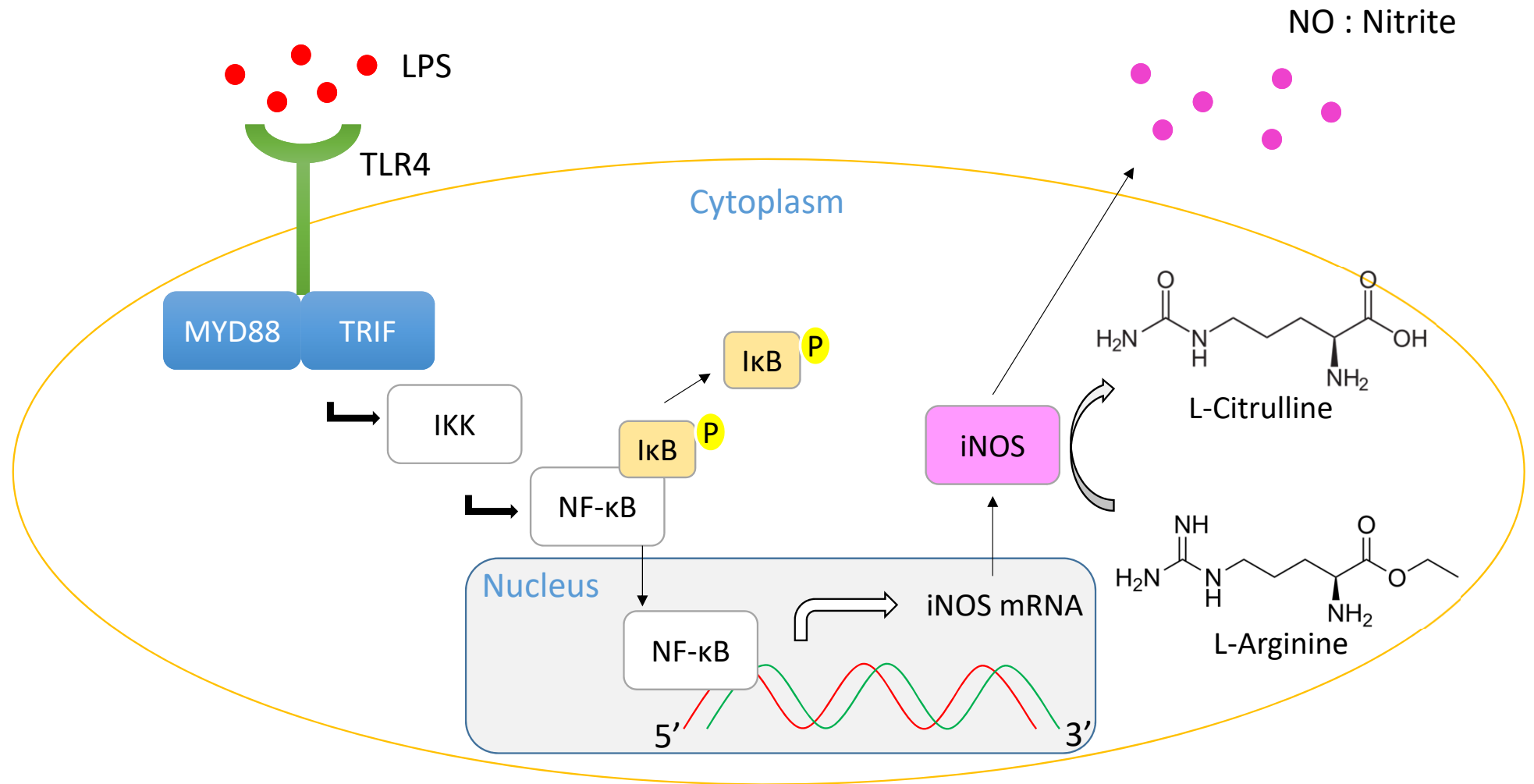
・アスパラギン酸
→細胞外放出の意義はまだ不明

- Sinke, A. P., Jayakumar, A. R., Panickar, K. S., Moriyama, M., Reddy, P. V., and Norenberg, M. D. (2008). NFκB in the mechanism of ammonia-induced astrocyte swelling in culture. *J. Neurochem.* 106, 2302–2311. doi: 10.1111/j.1471-4159.2008.05549.x

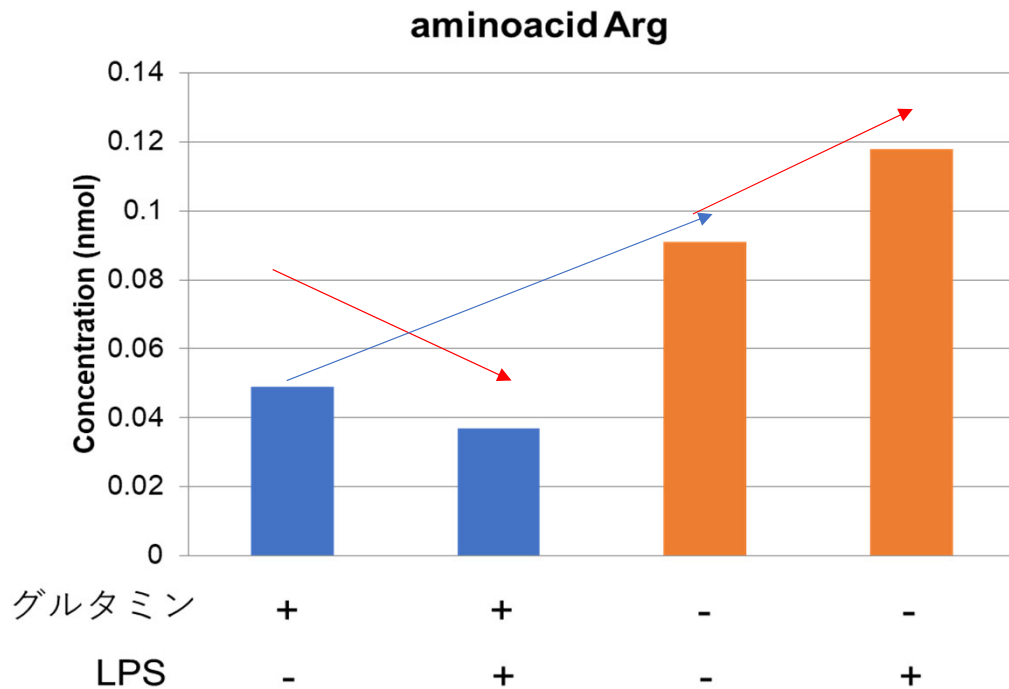
補足③ アミノ酸とエネルギー代謝経路の関係



補足④ NO 産生経路について



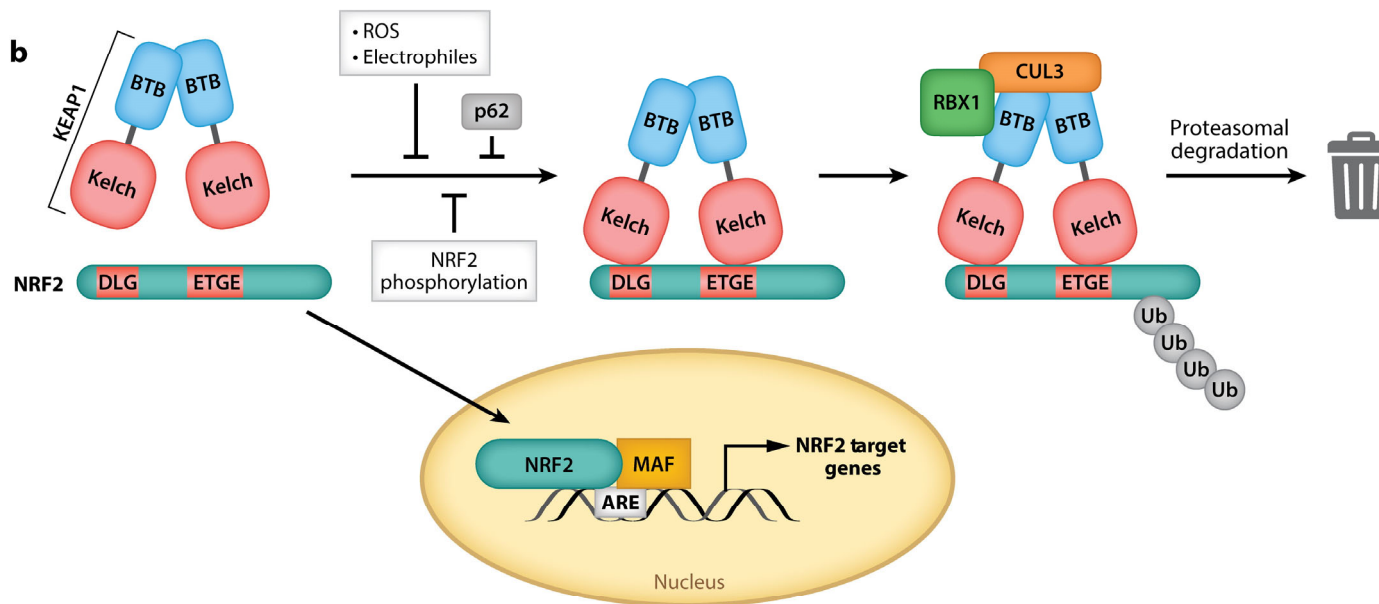
補足④ NO 産生経路について



- ・iNOSの基質であるアルギニンの細胞内濃度の変化
- ・グルタミン飢餓条件下では細胞内アルギニン濃度の上昇がみられた

- ・グルタミン飢餓条件下では、NOの産生が低下することから、基質であるアルギニンの消費がなされないために細胞内濃度が上昇する可能性がある。

補足⑤ KEAP1-NRF2 system について



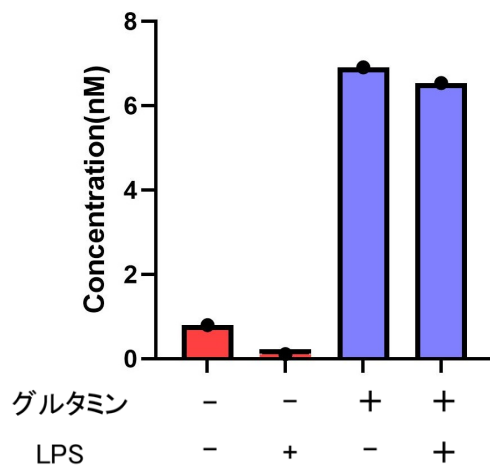
- 非ストレス下では Nrf2 は Keap1 によって細胞質に留められ、ユビキチン-プロテアソーム系により分解を受ける。

- Nrf2 は、その転写レベルでの発現の調節の機序がいまだ明らかではない。

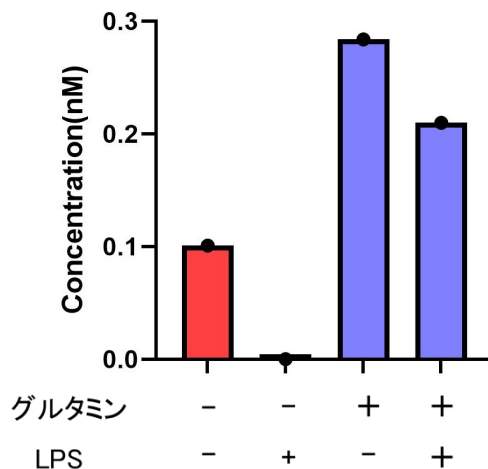
補足⑥ アミノ酸測定結果

【細胞内】

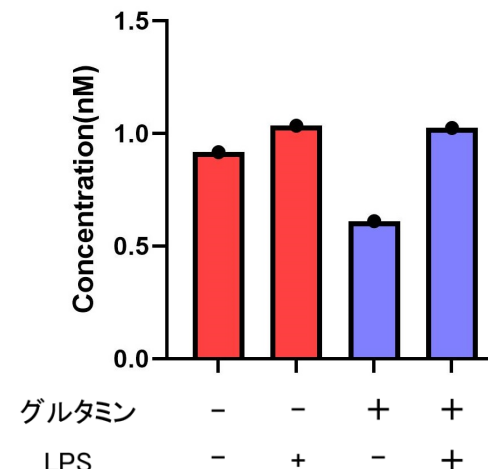
【アラニン】



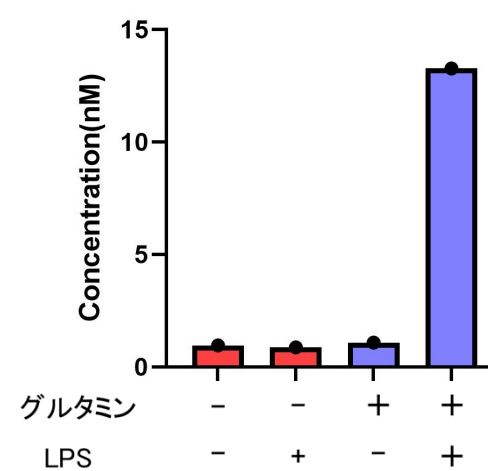
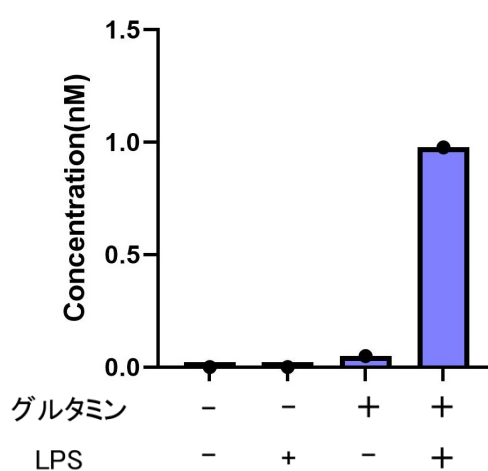
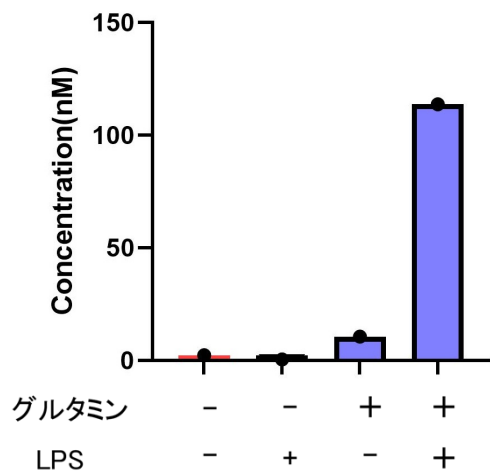
【アスパラギン酸】



【アンモニア】



【細胞外】

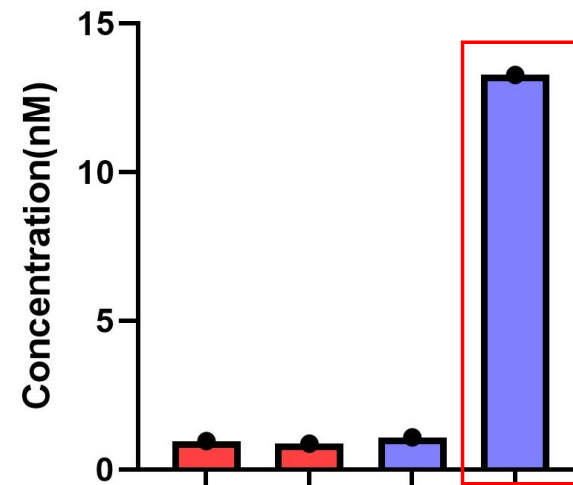
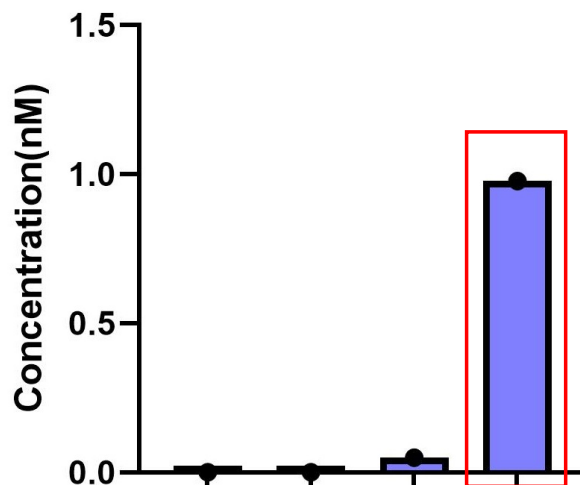
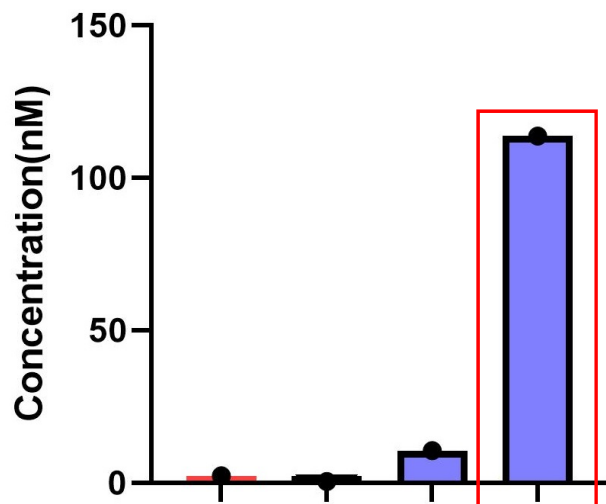


細胞外のグルタミンの有無により 細胞外のアラニン・アスパラギン酸・アンモニアの増加を認める

【アラニン】

【アスパラギン酸】

【アンモニア】

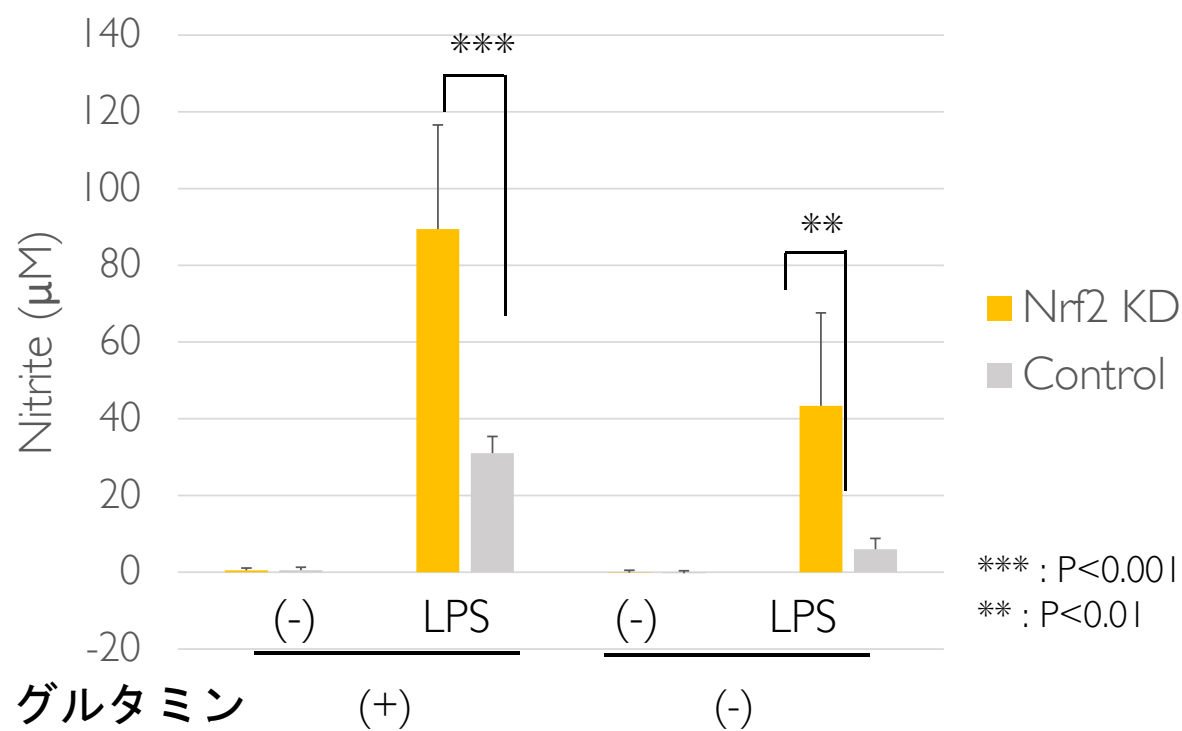
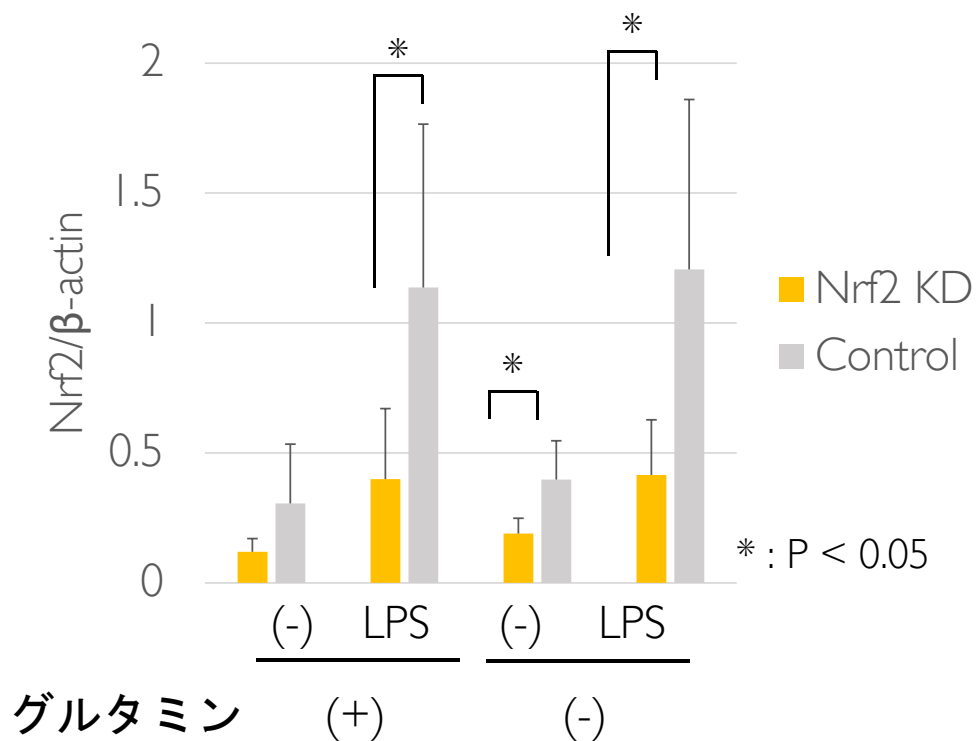


グルタミン	-	-	+	+
LPS	-	+	-	+

グルタミン	-	-	+	+
LPS	-	+	-	+

グルタミン	-	-	+	+
LPS	-	+	-	+

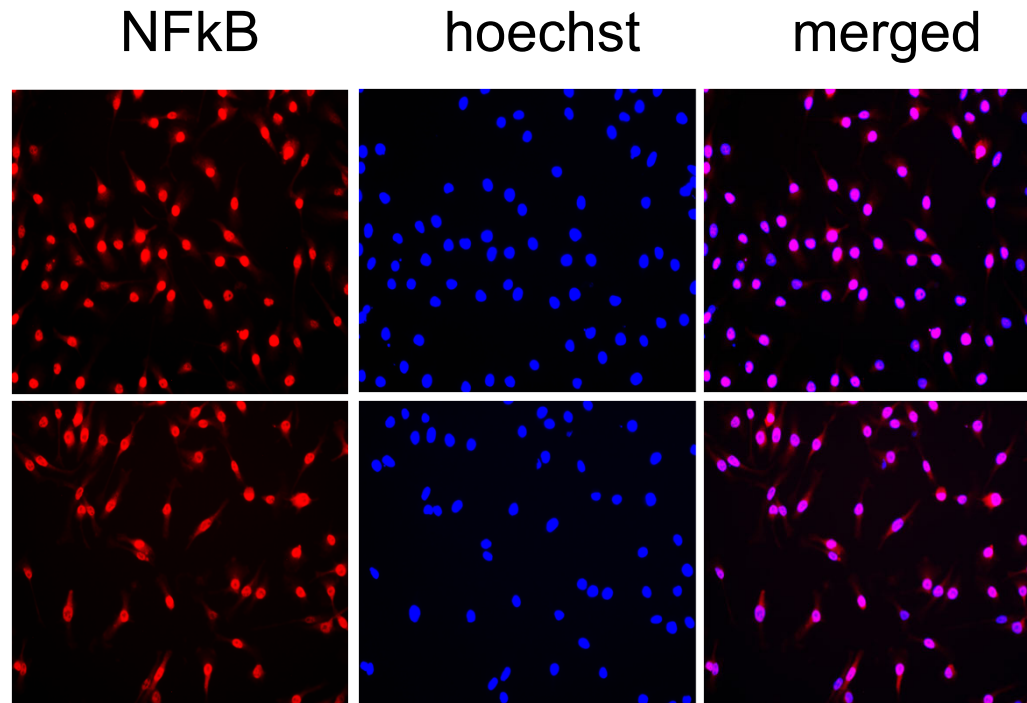
補足⑦ Nrf2 KD による検討



補足⑧ Gln(-)による NF- κ B の核内移行への影響

細胞外グルタミンの存在は
NF κ Bの核内移行に影響を与える

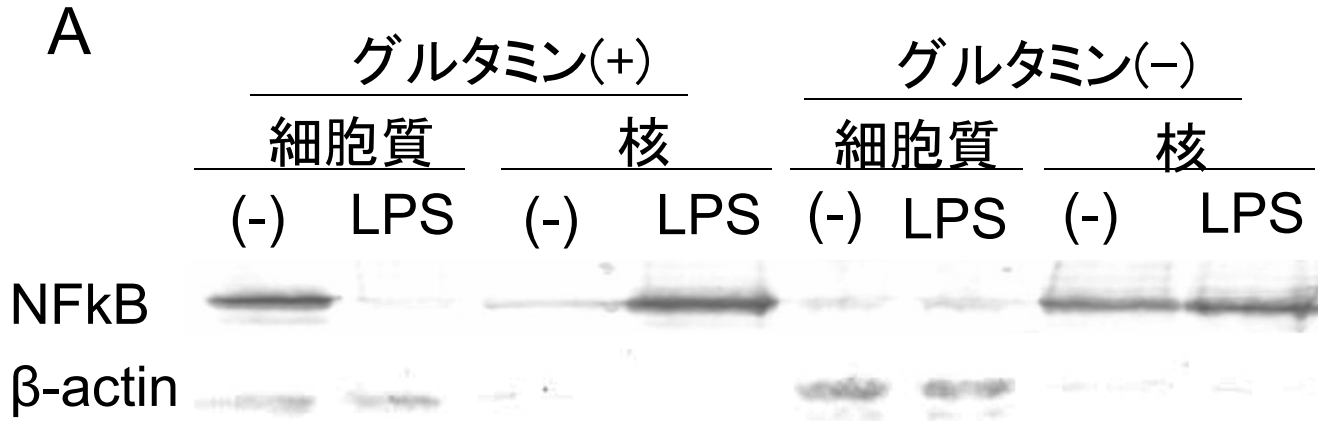
グルタミン (+)
LPS (+)



グルタミン (-)
LPS (+)

グルタミン(-), LPS(+)
でのNF κ Bの核内移行は
グルタミン(+), LPS(+)
と比べて減弱していた

補足⑨ Gln(-)による NF-κB の核内移行への影響



A:核抽出液調製による、細胞質画分、核画分についてのイムノブロット解析

B:NFκB Response Element (NRE) のBV2 細胞へ導入による、ルシフェラーゼレポーターアッセイ

グルタミン非存在下では LPS 未刺激でも NFκB が核内移行し、LPS 刺激においてもグルタミン存在下と比べて核内移行は減少する



グルタミン非存在下ではNFκBの動態がグルタミン存在下と異なる

