

愛媛大学長 殿

プロジェクト代表者氏名	医学部・医学科
	山口輝昌
指導教員氏名	医学系研究科・分子細胞生理学
	矢野元

プロジェクト名：マイクログリア起炎症反応におけるグルタミン代謝の影響の検討

調査・研究の概要：

1. 問題意識

マイクログリアの過剰な炎症反応は神経変性疾患などの増悪に関与することが知られている。そこで、神経変性疾患の増悪を止めるためにマイクログリアの起炎症反応を抑制することが考えられるが、実現には至っていない。その原因として、マイクログリアの起炎症反応のメカニズムが明らかではないことが問題点として挙げられる。本研究ではその問題点について明らかにするため研究を行った。

2. 目的

マイクログリアの起炎症反応メカニズムについて免疫系との関与が重要視されているグルタミンに注目した。マイクログリアの起炎症反応におけるグルタミン代謝の役割を解析することでマイクログリアの起炎症反応の根本的な理解の前進に寄与することを目的とした。

3. 方法

マウスマイクログリア細胞株のBV2を用いて細胞レベルでの解析を行った。BV2をリポ多糖(LPS)により刺激することで起炎症反応を誘導した。LPS刺激時に細胞培養液中にグルタミンが存在する場合と存在しない場合に分け、一酸化窒素産生量や起炎症性サイトカインの発現亢進などLPS刺激に対する反応の違いを観察することで起炎症反応とグルタミンの関連について検討した。

研究成果：（800字～900字程度）

本研究によってマイクログリアにおける起炎症反応では細胞外のグルタミンが細胞内へと取り込まれたのち、グルタミン酸、グルタチオンへと代謝され、起炎症反応に関与している可能性が示唆された。具体的には、まずグルタミン不含培地にて起炎症反応を惹起した場合は、グルタミン含有培地と比較して、NO産生や起炎症性サイトカインの発現亢進などの起炎症反応が著しく減弱した。また、グルタミン含有培地においては起炎症反応を惹起するとグルタミン代謝経路の第一段階の代謝産物であるグルタミン酸の細胞内濃度が一過性に上昇したのち、急激に低下した。一方で、グルタミン不含培地では起炎症反応の惹起による細胞内グルタミン酸濃度の変動は観察されなかった。さらに、グルタミンをグルタミン酸へと変換する酵素であるGlutaminase1 (GLS1)を阻害した場合、起炎症反応による細胞内グルタミン酸濃度の変動は大きく抑制され、NO産生も抑制された。これらのことからマイクログリアにおける起炎症反応では細胞外からのグルタミンを代謝することが重要である可能性が考えられた。

続いて、グルタミン代謝と起炎症反応の関与について、グルタミン代謝産物のうち、すでに炎症反応との関連が知られているグルタチオンに着目して検討を行った。まず、グルタミン含有培地では起炎症反応によって細胞内のグルタチオン濃度は上昇した。一方でグルタミン不含培地ではその上昇は観察されなかった。マイクログリアの起炎症時には細胞内でグルタチオン需要が高まり、細胞内へ取り込まれたグルタミンを代謝することで、細胞内グルタチオンの上昇を引き起こしている可能性が考えられる。また、グルタチオンの枯渇剤によって起炎症反応は減弱傾向を示し、細胞内へと人為的にグルタチオンを導入した場合は起炎症反応は増強する傾向が観察された。このことから、マイクログリアにおいて細胞内のグルタチオンは起炎症反応に関与しうると考えられる。以上のようなことから、細胞外からのグルタミンの取り込み及びその代謝がマイクログリアの起炎症反応に深く関与していると考えられる。

今後の課題：（400字程度）

マイクログリアの起炎症反応にグルタチオンを介したグルタミン代謝経路が関与しうることが示唆されたものの、そのメカニズムは未だに明らかではない。今後の課題として、グルタミン代謝、グルタチオンがマイクログリアの起炎症反応に関与するメカニズムの検討を行うことが挙げられる。そこで現在グルタチオン合成酵素の転写因子として知られ、抗炎症作用を持つことが報告されているNrf2に着目し、検討を進めている。具体的にはNrf2のノックダウンなどを試み、グルタミン代謝経路が起炎症反応に与える影響がNrf2を介したものであるかという検討を行うことなどを計画している。

さらに、グルタミン→グルタミン酸→グルタチオンという経路のみならず、他のグルタミン代謝経路と起炎症反応との関連についても検討を行い、マイクログリアの起炎症反応とグルタミン代謝の関与をより詳細に明らかにしていきたいと考えている。

指導教員からのコメント

本研究は、近年注目を集めつつある細胞機能と代謝の関連にメスを入れつつあるもので、大変興味深い。従来種々の細胞機能は、それを惹起するシグナルによって制御されているという理解が一般的であったが、本研究にもあるように、シグナルのみでは細胞機能の発現には不十分であることが多くの例で明らかになってきた。視点を変えて考えてみればこれは極めてあたりまえのことで、本研究の例でいえば、一酸化窒素放出における「一酸化窒素の生成」にはそれを可能ならしめる代謝経路が必要であり、しかしながら平時にはそのようなものは亢進していないので、起炎症反応時にそれらが動員される必要があり、そのための要請があつてしかるべきである。「代謝」は生化学領域の古くて新しいテーマであり、やむを得ない側面はあるとはいえ、これまでの研究の潮流がシグナル解析に偏重していたというべきである。

さらに本研究は、マイクログリアを研究対象としていることにも重要な独自性がある。マイクログリアは神経系の生理的側面のみならず病理的観点でも重要な細胞群であることが分かってきているが、技術的困難から、その研究は立ち遅れていることが否めない。本研究で注目しているグルタミン代謝に関する研究も類似するものが極めて少なく、マイクログリア機能の理解において今後大変重要な知見となることがほぼ間違いない。

わたしもアドバイス・ディスカッションにおいて関与はしているものの、山口くんはこの解析において主体的に機能しており、大学からの助成は極めて重要であった。今後もこうした助成が継続されることを切望する。

A) 研究の背景

マクログリアは脳や脊髄などの中枢神経系の免疫担当細胞として機能する細胞である。近年、マクログリアの過剰な炎症反応がアルツハイマー病などの神経変性疾患の増悪に關与している可能性がある⁽¹⁾と考えられている。そのメカニズムとしては神経細胞が傷害を受けることによってマクログリアが活性化・起炎症反応を生じ、一酸化窒素などの細胞傷害性因子を放出することによってさらなる神経細胞傷害が誘発され、マクログリアが活性化するという悪循環に陥ることが想定されている。(Fig.1 参照)また、抗炎症薬として知られている Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs (NSAIDs) によってパーキンソン病のリスクが低下する可能性も示唆されている⁽²⁾。このことから、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患においてマクログリアを始めとする炎症反応が病態の進行に關与していると考えて矛盾しないと言える。そこで、神経変性疾患の病態の進行を抑制するための新たな治療標的としてマクログリアの過剰な炎症反応を抑制することが考えられる。マクログリアの起炎症反応を抑制する物質についての研究も進められているが、その作用機序が判然としないものもある。例えば、生体内の交感神経系の神経伝達物質であるノルアドレナリンはマクログリアの起炎症反応を抑制することが報告されている⁽³⁾。しかし、ノルアドレナリンのマクログリアにおける抗炎症作用も判然としない。ノルアドレナリンの細胞への作用としては主として α 受容体を介した作用と β 受容体を介した作用が知られている。 α 受容体は血管を収縮させ、 β 受容体は血管を拡張させるというように α 受容体と β 受容体の作用は一般的に異なることが多い。教科書的にはノルアドレナリンの作用は α 受容体を介した作用が主であるとされている。しかし、マクログリアにおける起炎症反応の抑制作用は α 受容体刺激でも β 受容体刺激でも得られるということが報告されており、マクログリアの起炎症反応の抑制メカニズムの理解は困難となっている。さらに、マクログリアの起炎症反応抑制の理解を困難にしている要因の一つにそもそもマクログリアの起炎症反応のメカニズムが明らかではないということが挙げられる。そこで、今回我々はまず、マクログリアの起炎症反応の根本的理解を目指した。起炎症反応を理解する上で細胞内のシグナル解析を行うことは重要であるが、前述のノルアドレナリンの事例からシグナル以外にも重要な制御機構が存在する可能性があると考えた。

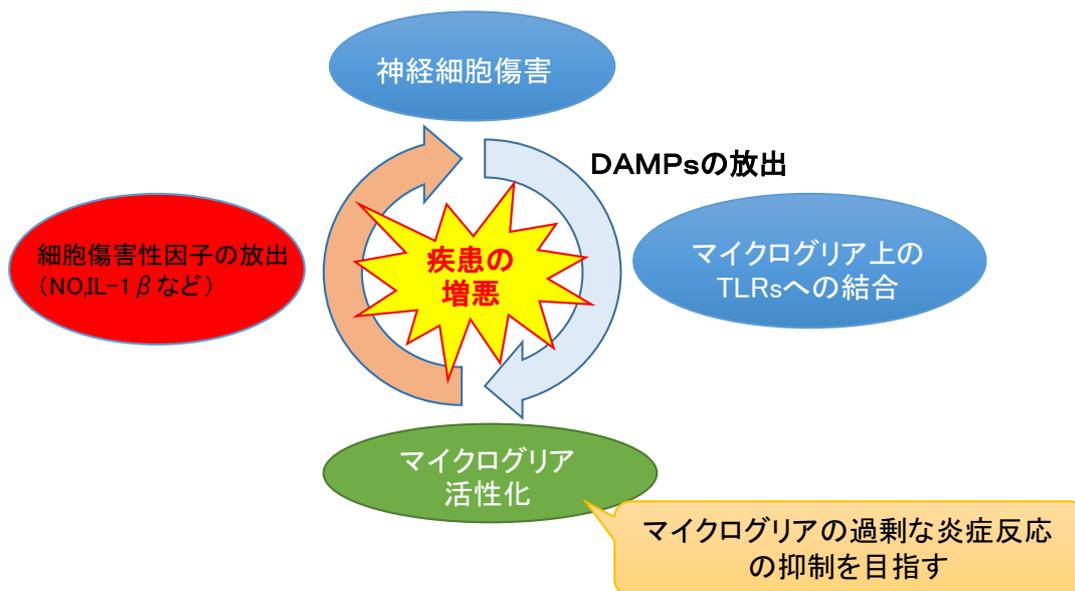


Figure 1: 疾患の増悪とマクログリアの関与

近年、免疫系の細胞において細胞内での代謝状態が注目を浴びてきている。特にグルタミンは通常時は非必須アミノ酸とされているが、炎症時などでは需要が増大し外部からのグルタミンの取り込みが必須となるとされており、条件付き必須アミノ酸と言われている。このことに加えて、グルタミンは免疫系の作用を増強させることも報告されている⁽⁴⁾。例えばT細胞において、その機能発現においてグルタミンが非常に大きな役割を担っていることが報告されている⁽⁵⁾。しかし、マクログリアにおける起炎症反応とグルタミン代謝について直接的に検討したものは、調べた限り現在までのところ見かけない。これらのことから本研究ではマクログリアの起炎症反応と細胞内でのグルタミン代謝について解析を行うことで、マクログリアの起炎症反応メカニズムの理解を目指した研究を行うこととした。

B) 実験方法

・使用した細胞

マウスマクログリア細胞株の BV2 を用いて研究を行った。

・細胞培養

DMEM 500ml に 10% Fetal bovine serum (FBS) 50ml、45% グルコース 4.3ml、ペニシリンストレプトマイシン 5ml を添加したものを培養液として使用し細胞を培養した。

・定量的 PCR

ISOGEN (Nippon gene) を用いて培養している細胞から total RNA を回収する。その後、4×DN Master Mix によって DNA を除去し、5×RT master Mix II によって mRNA の逆転写を行い cDNA を合成する。cDNA は SYBR Green、dNTP、oligo primer と共に PCR 反応させた。

・細胞への刺激の添加

BV2 細胞を 5.0×10^4 個/well として plate に撒布し、グルタミン含有培地にて 2 日間培養したのち、グルタミン含有および不含培地中それぞれにて Lipopolysaccharide (LPS) により刺激を行った。LPS 刺激約 18~24 時間後、以下の各種測定を行った。

・NO 測定

起炎症性反応の評価を、NO 産生量にて査定した。LPS 刺激約 18~24 時間後に培養上清を回収し、測定サンプルとする。サンプルと Griess 試薬とを混合し反応させた。λ = 562nm にて吸光度を測定し、サンプル中の硝酸イオン濃度を測定することで NO 産生量とした。

・Western Blot

培養上清回収後の BV2 細胞を RIPA buffer によって溶解・回収しタンパクサンプルとした。それを SDS 処理、加熱しポリアクリルアミドゲルで電気泳動する。その後、ゲルからニトロセルロース膜へと転写し、ブロッキング後一次抗体をかけ over night させ、二次抗体を添加し、発色した。

・細胞内グルタミン酸濃度測定

細胞内グルタミン酸測定は DAOS 法を用いて行った。細胞回収方法として、BV2 細胞 5 万個に対し 30 μl

の Phosphate buffered salts (PBS)と 15 μ l の 0.3N HCl を加え 5 分間振とうしたのち 30 μ l の 450mM Tris-HCl (pH8.0) を加え、細胞を回収しサンプルとした。その後、L-グルタミンオキシダーゼ、4-アミノアンチピリン、*N*-Ethyl-*N*-(2-hydroxy-3-sulfopropyl)-3,5-dimethoxyaniline, sodium salt (DAOS) と混合し 1.5 時間 37°C でインキュベートした後、 $\lambda = 595\text{nm}$ にて吸光度を測定した。

C) 実験結果

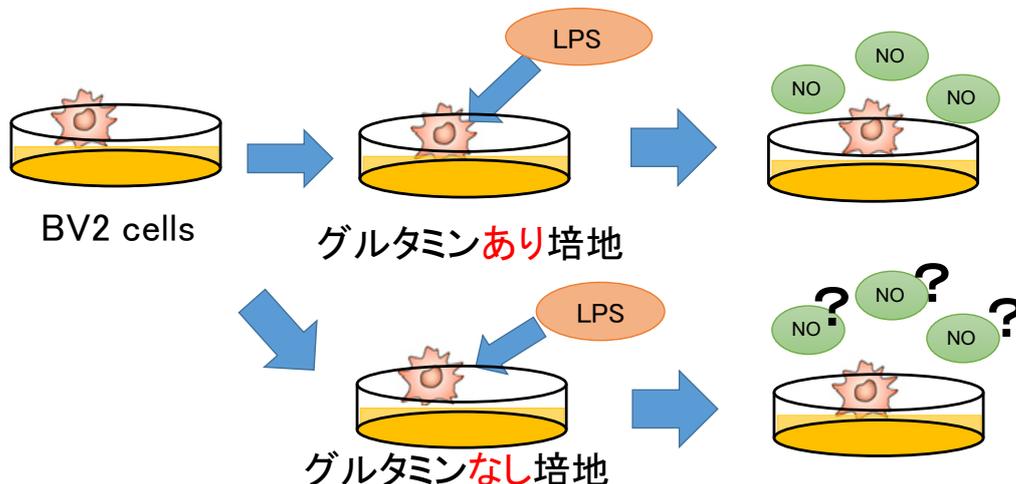
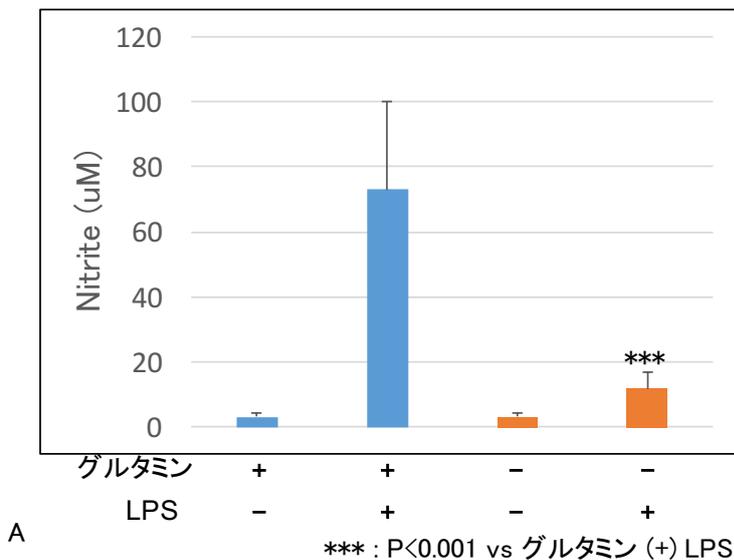
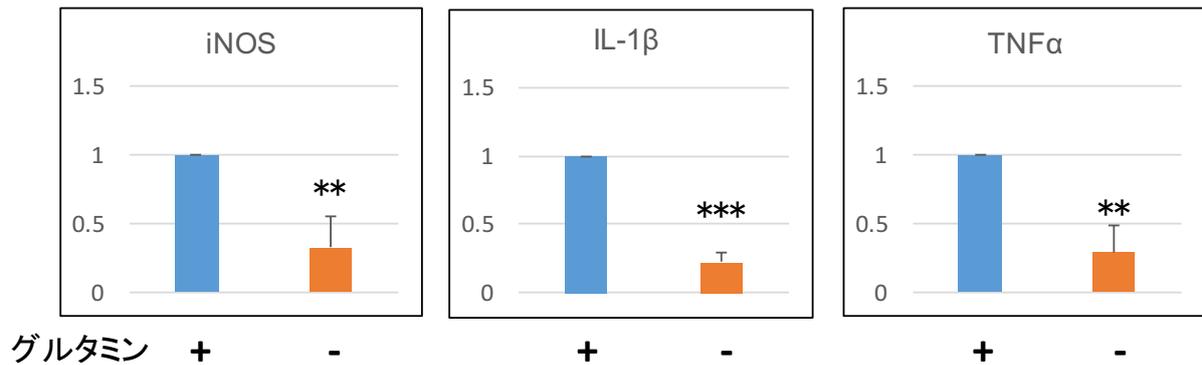


Figure 2: 本研究における実験系のシェーマ

マウスマイクログリア細胞株の BV2 を播種後 24~48 時間培養したのち、グルタミン含有培地とグルタミン不含培地にて LPS 刺激を行った。その後、18~24 時間インキュベートし NO 産生量の測定や種々の解析を行った。グルタミン含有培地とグルタミン不含培地での LPS 刺激に対する反応について比較を行い、BV2 における起炎症反応とグルタミンの関連について評価を行った。

グルタミン不含培地では LPS 刺激による起炎症反応が大きく減弱する



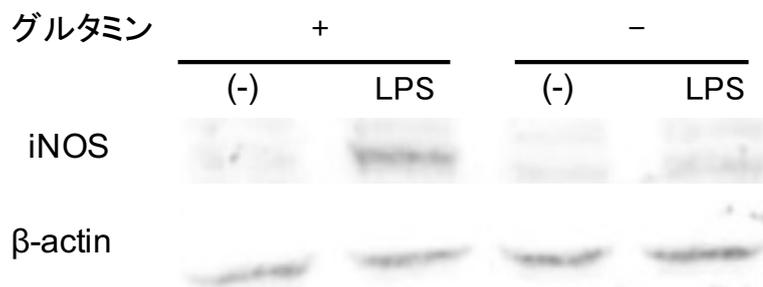


縦軸：グルタミン(+)₂でのLPS刺激によるmRNA発現上昇に対する比として表示

B

** : P<0.01 VS グルタミン (+)

*** : P<0.001 VS グルタミン (+)



C

iNOS : inducible nitric oxide synthase

Figure 3： グルタミン含有培地及び不含培地における起炎症反応の比較

A： グルタミン含有培地及び不含培地での LPS 刺激による NO 産生

B： iNOS, Interleukin-1 β (IL-1 β), Tumor necrosis factor α (TNF α) の mRNA の発現

C： グルタミン含有培地及び不含培地での LPS 刺激による iNOS のタンパク発現

細胞培養液中のグルタミンが存在しない場合ではグルタミンが存在する場合と比較して LPS 刺激による NO 産生は低下し、iNOS タンパクの発現も低下する。さらに、iNOS、IL-1 β 、TNF α などの起炎症性サイトカインの mRNA の LPS 刺激による発現亢進も低下していることが観察された。

このことから培地中のグルタミンが BV2 での LPS 刺激による起炎症反応において重要な役割を担っていることが強く示唆された。そこでマイクログリアにおける起炎症反応においてグルタミンがどのような役割を果たしているのかというアプローチでマイクログリアの起炎症反応のメカニズムの解明することを目指した。まず、細胞内のグルタミン代謝に着目して解析を行った。

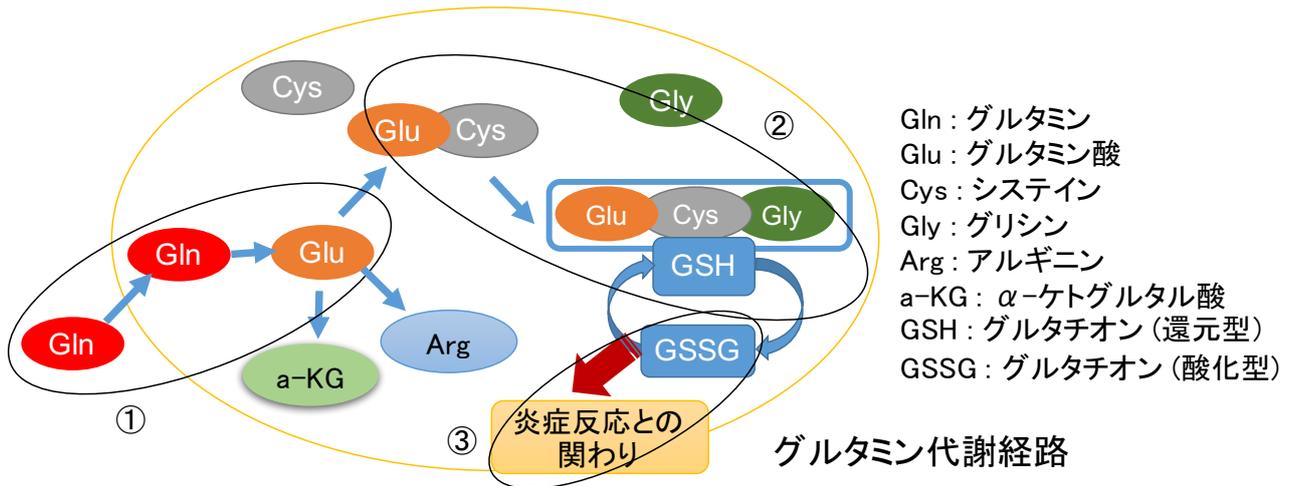


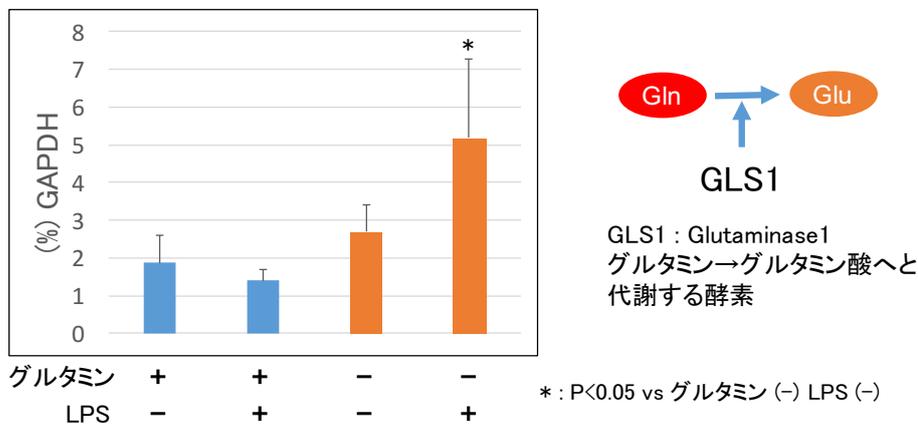
Figure 4: グルタミン代謝経路

グルタミン代謝においては、細胞外のグルタミンが細胞内に取り込まれたのちにまずグルタミン酸へと変換される。グルタミン酸は種々のアミノ酸への代謝の起点となりうるほか、グルタチオンなどのペプチドの生合成における基質となることが知られている。今回、グルタミン代謝経路の中でも炎症反応と関わるものを見出したいと考えた。文献的検討から、グルタミン代謝産物の一つとして知られているグルタチオンが炎症反応と関与している可能性が示唆されている⁽⁶⁾ことが分かった。そこで、本研究においてはグルタミン代謝の中でも以下の3つの段階に着目した。

- ①グルタミンが細胞外から取り込まれ、細胞内でグルタミン酸へと変換される
 - ②グルタミンはグルタチオン合成に関わる
 - ③グルタチオンは細胞内で起炎症反応に関与しうる
- そこで以下ではこれらのテーマに沿って検討を進めた。

①グルタミンはグルタミン酸へと代謝されているのか？

グルタミン不含培地では LPS 刺激により GLS1 の mRNA 発現が上昇する



A

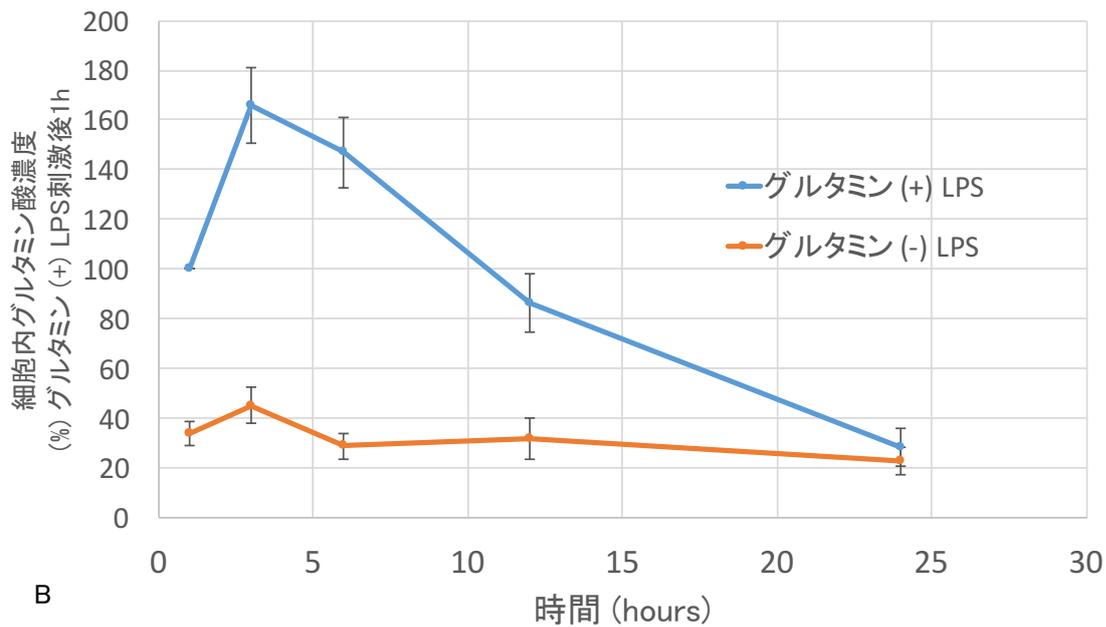


Figure 5: グルタミン代謝と起炎症反応との関与についての検討

A: グルタミン含有及びグルタミン不含培地での LPS 刺激による GLS1 の mRNA 発現

B: グルタミン含有及びグルタミン不含培地での LPS 刺激による細胞内グルタミン酸濃度の変動

細胞内におけるグルタミン代謝の第一段階としてグルタミンは Glutaminase 1 (GLS1)によりグルタミン酸へと代謝される。グルタミン含有培地では LPS 刺激による GLS1 の mRNA の発現亢進は認められなかった。一方でグルタミン不含培地では LPS 刺激によって GLS1 の発現が上昇した。さらに、細胞内のグルタミン酸濃度の変動についてはグルタミン含有培地では LPS 刺激によって細胞内のグルタミン酸濃度は一過性に上昇したのち、急激に低下した。一方でグルタミン不含培地では LPS 刺激による細胞内のグルタミン酸濃度の変動はほぼ認められなかった。

そこで、GLS1 によるグルタミン→グルタミン酸という代謝経路が BV2 における起炎症反応に関与しているのか、LPS 刺激による細胞内グルタミン酸濃度の変動は GLS1 によるものであるのかを検討するために GLS1 阻害剤を用いた検討を行った。

GLS1 によるグルタミン→グルタミン酸への代謝は起炎症反応に関与しうる

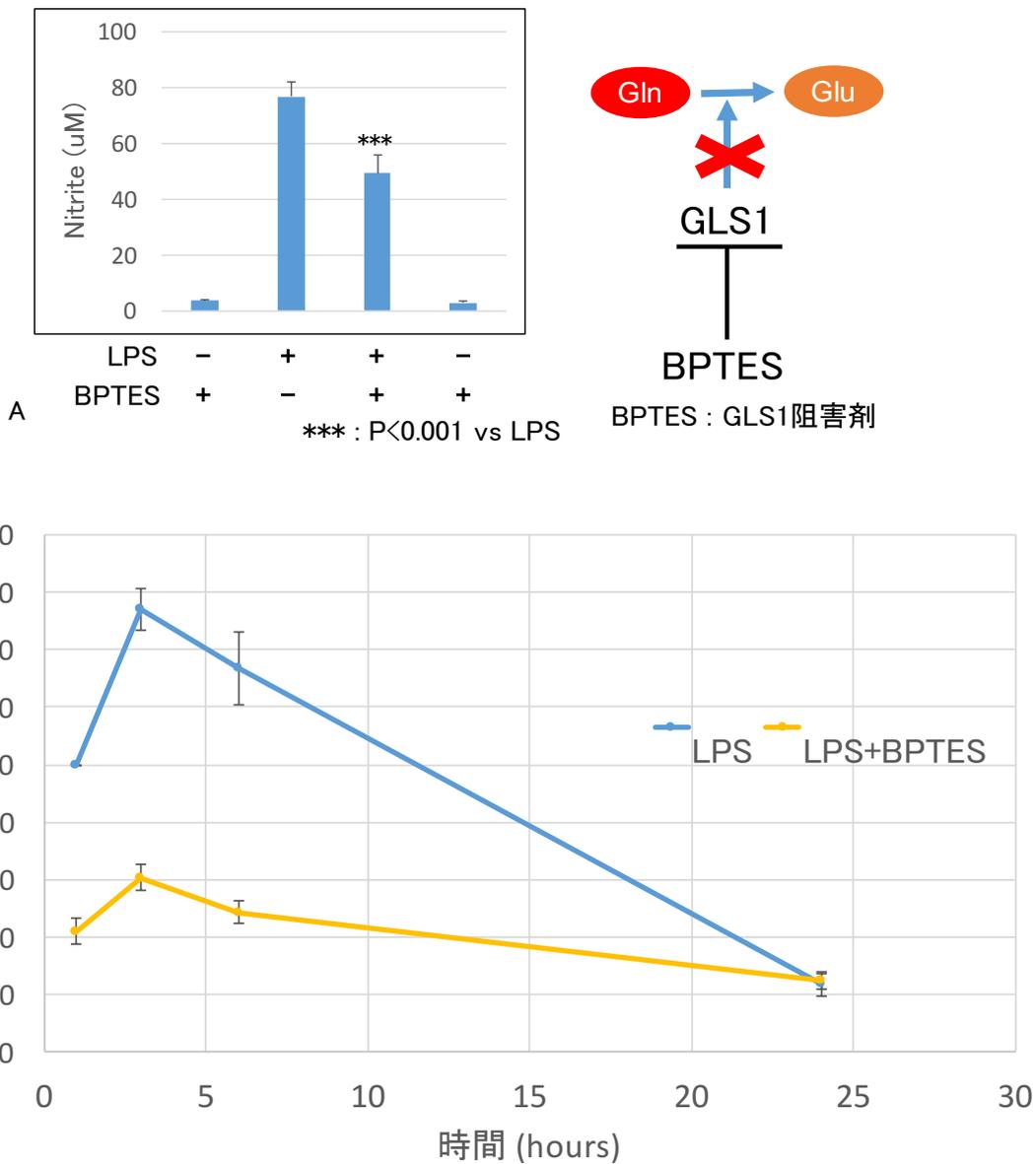


Figure 6 : GLS1 阻害剤による起炎症反応への影響及び細胞内グルタミン酸濃度の変動

A : GLS1 阻害剤による NO 産生の変化

B : GLS1 阻害剤による細胞内グルタミン酸濃度変動の変化

GLS1 阻害剤により、グルタミン含有培地における LPS 刺激による NO 産生が低下した。また GLS1 阻害剤により LPS 刺激後の細胞内のグルタミン酸濃度の変動は大きく減弱した。特に LPS 刺激によるグルタミン酸濃度の一過性の上昇が顕著に抑制された。

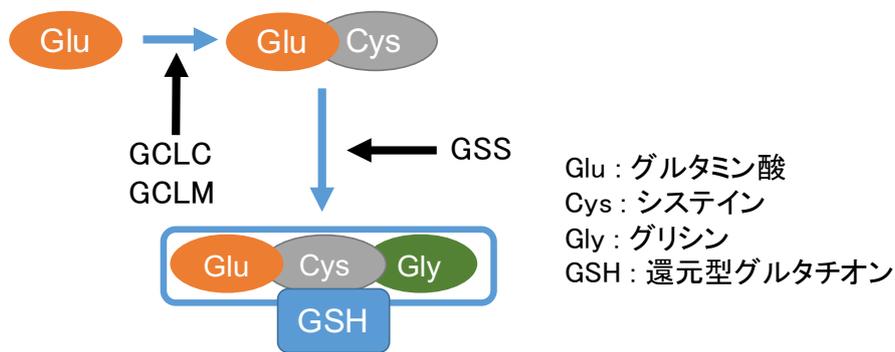
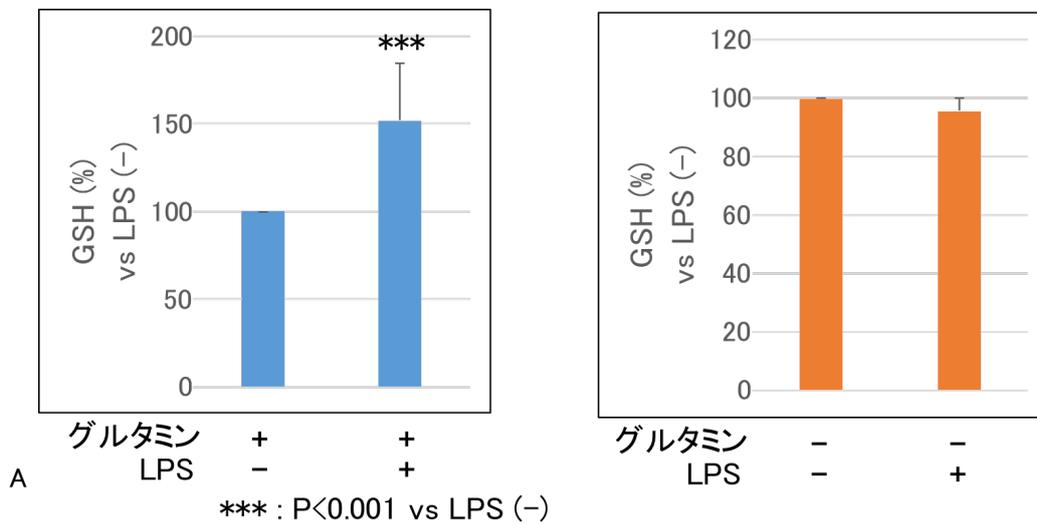
ここでテーマ①について考察する

グルタミン含有培地では LPS 刺激によって細胞内グルタミン酸濃度は上昇する。一方でグルタミン不含培地ではその上昇が観察されなかった。このことから、BV2 では細胞外からグルタミンが取り込まれ、GLS1

によってグルタミン酸へと代謝されたのち、起炎症反応に関与していると考えられる。グルタミン不含培地では細胞外からグルタミンを取り込まれず、LPS 刺激による細胞内のグルタミン酸需要が満たされず、結果として GLS1 の mRNA の発現が亢進すると推測される。

続いて、細胞内においてグルタミンはどのようにして起炎症反応に関与しているのか検討するため、グルタミン代謝産物のうち、先述のようにすでに炎症反応との関わりが知られているグルタチオンに注目した。グルタチオンとは細胞内の酸化ストレスを緩和するために働いている物質である。グルタチオンはグルタミン酸、システイン、グリシンの3つのアミノ酸からなる。グルタチオンがグルタミン酸を原料の一つとしていることから、細胞外にグルタミンが存在しないことによる細胞内グルタミン酸濃度の低下は細胞内のグルタチオン濃度の変動にも関わりうる可能性があると考え、グルタチオンに着目した。

②細胞外のグルタミンの存在は細胞内グルタチオンに影響を及ぼすのか？



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 (グルタチオン合成の第二段階反応の酵素)

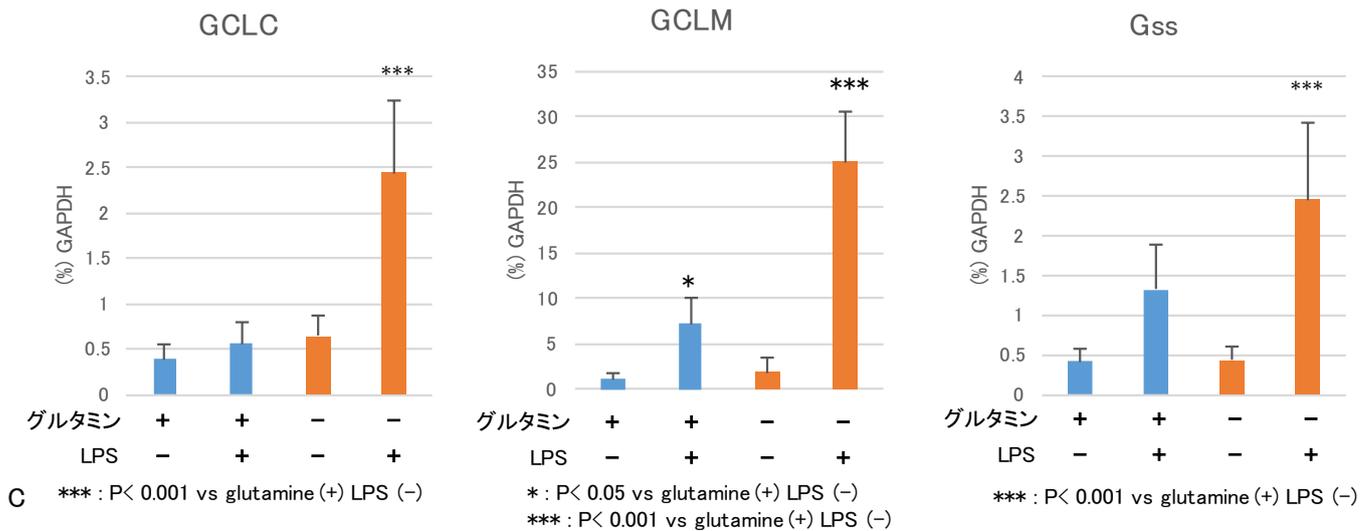


Figure 7: 起炎症反応とグルタチオンの関与

A: LPS 刺激による細胞内のグルタチオン濃度の変化

B: グルタチオン合成経路のシェーマ

C: グルタチオン合成系酵素の mRNA 発現状況

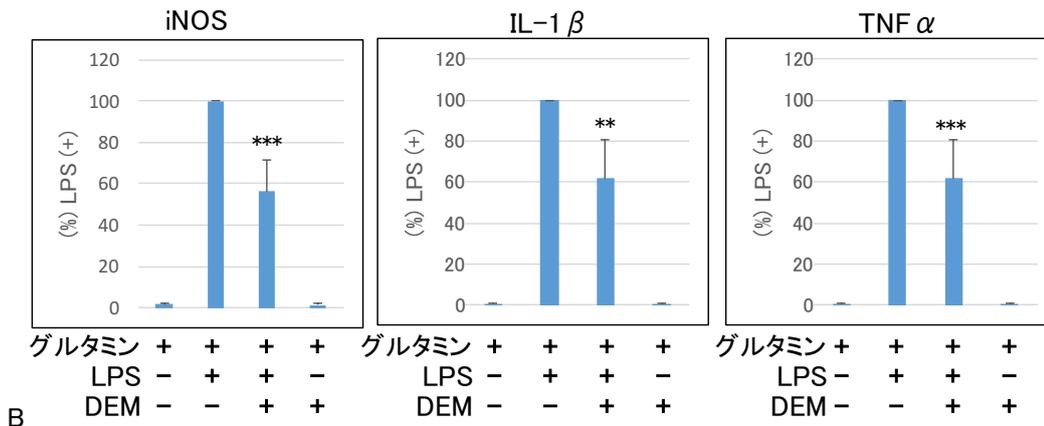
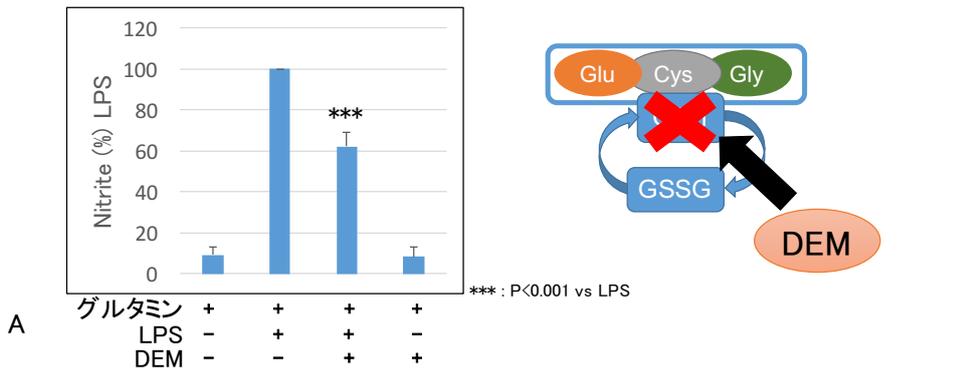
細胞内のグルタチオン濃度の変動を調べたところグルタミン含有培地では LPS 刺激によって細胞内グルタチオン濃度は上昇する。一方でグルタミン不含培地では LPS 刺激による細胞内のグルタチオン濃度の上昇は観察されなかった。さらにグルタチオン合成系の酵素の発現についても検討を行ったところ、グルタチオン合成の第一段階として働く GCLC はグルタミン不含培地での LPS 刺激時にその mRNA の発現が大きく上昇していた。また、同じくグルタチオン合成経路の第一段階の酵素として働く GCLM は LPS 刺激により mRNA の発現が亢進しており、その程度はグルタミン含有培地よりもグルタミン不含培地の方が大きく上昇していた。さらに、グルタチオン合成の第二段階の酵素である GSS についても LPS 刺激により mRNA 発現の上昇が観察されるが、特にグルタミン不含培地での LPS 刺激時に発現が上昇していた。

ここでテーマ②について考察する。

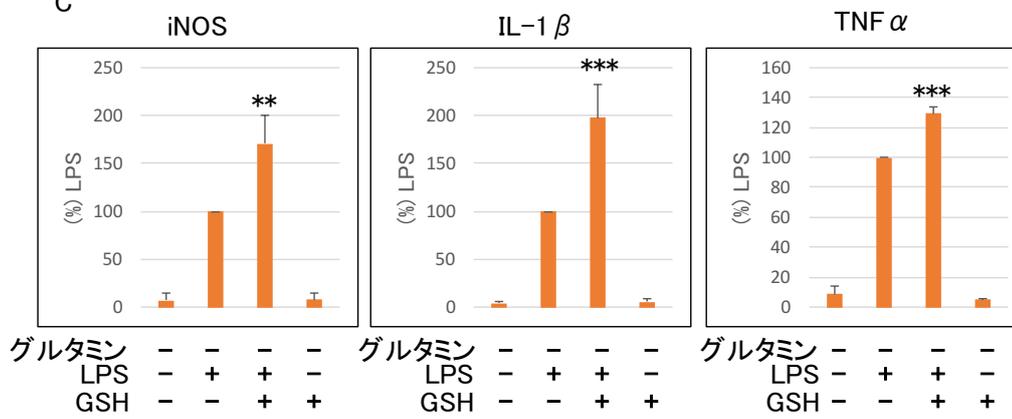
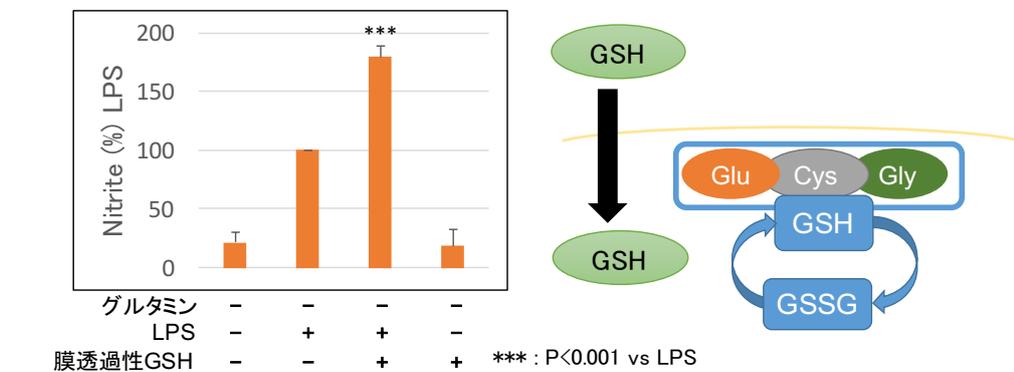
LPS 刺激による細胞内のグルタチオン濃度の上昇は細胞内のグルタチオン需要の上昇を反映していると考えられる。その際、グルタミン含有培地では細胞外から取り込まれたグルタミンを代謝することによってグルタチオンが供給されている可能性が示唆された。一方でグルタミン不含培地では細胞外からグルタミンを取り込むことができないために、細胞内のグルタチオン需要を満たされず、グルタチオン合成系の酵素の転写レベルでの発現が上昇傾向を示しているという可能性が考えられる。

次なる仮説として、『グルタチオンは起炎症反応に増強的に作用しうる』という仮説を立て、グルタチオン枯渇剤や細胞膜透過性のグルタチオンを用いてさらなる検討を進めた。

③グルタチオンは起炎症反応に関与するのか？



DEM : グルタチオン枯渇剤
 ** : P<0.01 vs LPS
 *** : P<0.001 vs LPS



GSH : ここでは膜透過性グルタチオンを指す
 ** : P<0.01 vs LPS
 *** : P<0.001 vs LPS

Figure 8 : BV2 におけるグルタチオンの起炎症反応への関与

- A : グルタミン含有培地でのグルタチオン枯渇剤による LPS 刺激依存性 NO 産生の変化
- B : グルタミン含有培地でのグルタチオン枯渇剤による起炎症性サイトカイン mRNA 発現の変化
- C : グルタミン不含培地での膜透過性グルタチオンによる LPS 刺激依存性 NO 産生の変化
- D : グルタミン不含培地での膜透過性グルタチオンによる起炎症性サイトカイン mRNA 発現の変化

グルタミン含有培地において LPS 刺激とともにグルタチオン枯渇剤 (Diethyl Maleate : DEM) を添加した場合、LPS 刺激による NO 産生や起炎症性サイトカインの mRNA 発現の発現亢進は減弱傾向を示した。さらに、グルタミン不含培地において、LPS 刺激とともに膜透過性グルタチオンを用いて人為的に細胞内へとグルタチオンを導入した場合、LPS 刺激による NO 産生、起炎症性サイトカインの mRNA 発現亢進は増強傾向を示した。

ここでテーマ③について考察する。

グルタチオンを枯渇させることで起炎症反応は減弱し、グルタチオンを細胞内に導入することで起炎症反応は増強された。結果は先述の『グルタチオンは起炎症反応において増強的に作用しうる』という仮説を支持する結果であると考えられる。

以上のようにテーマ①～③までの結果を踏まえると、BV2 の起炎症反応においては細胞外からグルタミンが取り込まれ、GLS1 によってグルタミン酸へと代謝されたのち、グルタチオンへと代謝されることで起炎症反応に関与している可能性が示唆された。

D) プロジェクト目標の達成度と本研究で得られた成果

本プロジェクトの申請時にプロジェクトの目標として①グルタミンをグルタミン酸へと変換する酵素である GLS1 の発現は LPS 刺激によって変動しうるのか否か、②その際にグルタミン存在下及び非存在下での GLS1 の発現に違いはあるのか否か、③グルタミンからグルタミン酸への代謝を阻害することでマイクログリアの起炎症反応も阻害されるのか否かという 3 つのことを明らかにするという目標を設定した。これについては実験結果の項でも述べたように①-③の目標について概ね達成できたと考えている。また、本研究で得られた成果として主なものを以下にまとめる。

- ①培地中 (細胞外) のグルタミンの存在がマイクログリアにおける起炎症反応に大きく関与している。
- ②マイクログリアにおける起炎症反応では細胞外から細胞内へのグルタミンの取り込み、グルタミン→グルタミン酸→グルタチオンという代謝経路が関与している可能性がある。
- ③細胞内のグルタミン酸濃度については LPS 刺激により時間依存的に変動しているということが観察された。
- ④培地中のグルタミンの存在は LPS 刺激によるグルタチオン合成酵素の発現に転写レベルで関与する可能性がある。
- ⑤グルタチオンはマイクログリアにおける起炎症反応を増強させる作用を有している可能性がある。

以上のように本研究からマイクログリアにおける起炎症反応においてグルタミンの存在及びその代謝が重要である可能性が示唆された。このことはマイクログリアの起炎症反応のメカニズムを解明していく上で新たな視点となり得ると考えている。

E) 現在進行中の課題

グルタミン代謝と Nrf2 の関与

今まで述べてきたように本研究においてグルタミン及びその代謝経路が起炎症反応に関与している可能性が示唆された。しかし、それらの関連についての詳細なメカニズムについては未だに明らかではない。そこでさらなるメカニズムの解明を目指して、グルタチオン合成系の酵素の転写因子として知られる⁽⁷⁾Nrf2 について着目した。Nrf2 は酸化ストレスに対する生体内の防御機構として知られている。Nrf2 は細胞内の酸化ストレスの防御機構として働くことで細胞の増殖や生存に関わっている⁽⁸⁾と考えられている。がん細胞においては Nrf2 の異常な機能の亢進が認められ、がん細胞における代謝リプログラミングにも関与していると考えられている⁽⁹⁾。さらに近年、Nrf2 は抗炎症作用を始めとする機能を有していることが明らかとなってきた⁽¹⁰⁾。アルツハイマー病モデルマウスでは Nrf2 の機能を亢進させることで、脳内のマイクログリアによる炎症反応が抑制され、認知機能が改善したということも報告されている⁽¹¹⁾。以上のようなことから、グルタミン不含培地における起炎症反応の低下の原因の一つとして Nrf2 が関与している可能性があると考え、BV2 における起炎症反応と Nrf2 の関与についても検討を行うこととした。

Nrf2 の制御システムは以下のようなものである。Nrf2 は酸化ストレスが存在しない状況では Keap1 というタンパク質によって常に分解されている。しかし、酸化ストレスにより、Keap1 の働きは阻害され、Nrf2 が分解を逃れ、安定化することによって機能するという制御システムとなっている。

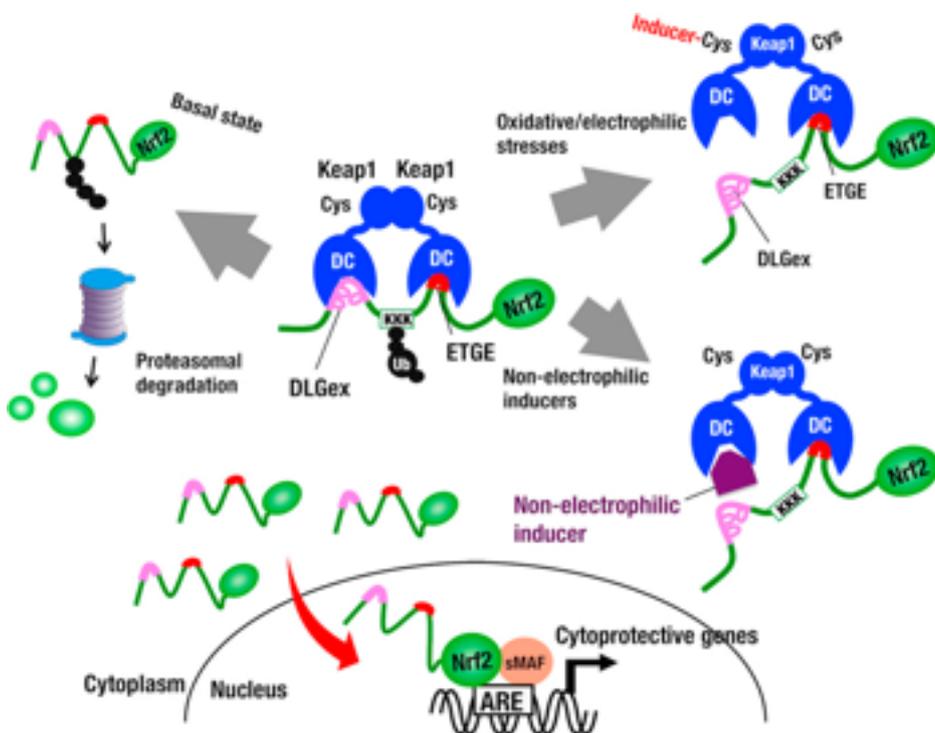


Figure 9 : Nrf2 の制御システムについて (8)より引用

上記のような Nrf2 の制御システムとこれまでの我々の実験結果を組み合わせるとグルタミン不含培地では細胞内グルタチオン濃度が低下することで、酸化ストレスが大きくなっているということが予想される。つまり、グルタミン不含培地という条件下では細胞内で増大した酸化ストレスへの防御機構として Nrf2 及びその活性が上昇しており、そのことが抗炎症作用をもたらしている可能性があるという仮説を立てた。そこで、グルタミン含有培地及びグルタミン不含培地において Nrf2 の発現を測定するとともに Nrf2 の活性を調べるため Nrf2 の転写産物の一つとして知られる Heme oxygenase (HO-1) について、LPS 刺激による mRNA の発現変化について検討を行った。

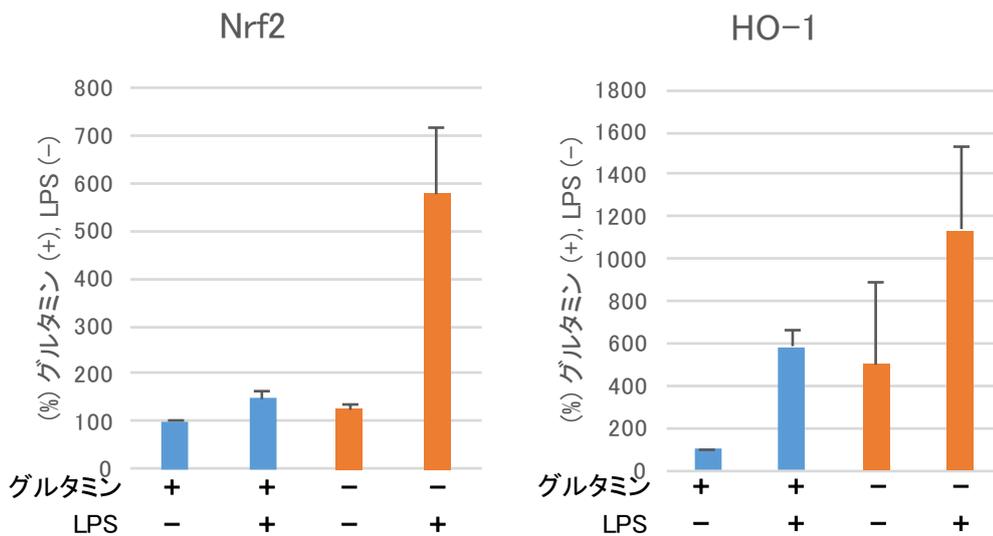


Figure 10: グルタミン含有培地及び不含培地における Nrf2, HO-1 の発現状況

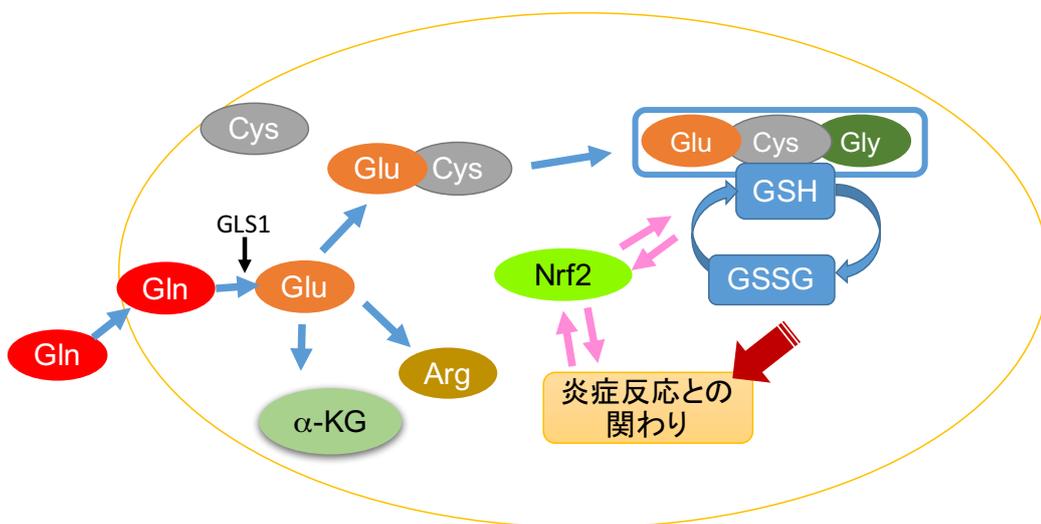
Nrf2 の mRNA 発現についてはグルタミン含有培地では LPS 刺激による変化は認められない。一方でグルタミン不含培地では LPS 刺激によりその発現は大きく上昇した。また、Nrf2 の活性化により発現が誘導される HO-1 の発現についてはグルタミン含有培地においても発現の上昇が観察された。グルタミン不含培地では LPS 刺激を加えていない場合でも発現が上昇し、LPS 刺激を加えるとさらに発現が上昇した。

LPS 刺激により Nrf2 の活性は上昇する可能性が示唆された。さらに、LPS 刺激のみならず、細胞外にグルタミンが存在しない環境そのものが Nrf2 の活性化を誘導しているという先述の仮説にも矛盾しない結果が得られた。つまり、細胞内のグルタミン代謝の変化が Nrf2 を活性化させ、抗炎症的に働いているという可能性が推測される。グルタミン代謝系と Nrf2 の関与については転写レベルのみならず、タンパクレベルでの制御についてさらなる解析を行っていく必要があると考えている。

F) 今後の展望

今後の研究計画としてまずはグルタミン代謝系と Nrf2 の関与についてさらなる解析を行う。具体的にはグルタミン含有培地、不含培地において Nrf2 関連タンパクの発現状況の解析を行う。また、グルタミン代謝が Nrf2 に与える影響について検討するため GLS1 阻害剤や GLS1 のノックダウンを試み、細胞内での Nrf2 の発現量、核内移行、活性などを評価する。さらに、グルタミン代謝系の起炎症反応への関与は Nrf2 を介したものであるのか検討するために Nrf2 の阻害剤や Nrf2 のノックダウンなどを試みる。これらによりグルタミ

ン代謝と Nrf2 が相互に与える影響を検討することでマイクログリアの起炎症反応メカニズム理解に向けた新たな視点となりうると考えている。



加えて、グルタミン→グルタミン酸→グルタチオンという経路のみならず、グルタミン酸の代謝物としてのみならず、エピジェネティックな遺伝子発現制御機構との関連が示唆されている α -ケトグルタル酸⁽¹²⁾を介した経路など、未検討のグルタミン代謝経路について解析を行うことも検討している。これによりマイクログリア起炎症反応とグルタミン代謝の包括的な理解を深めるとともに、マイクログリア起炎症反応においてそれぞれの代謝経路が担う役割を検討することができると考えている。

本研究はグルタミン代謝の制御によりマイクログリアの起炎症反応を制御することを目標としている。現段階では細胞レベルでの検討という基礎的な段階であるが、今後も研究を継続し、細胞レベルから得られた知見をもとに生体レベルへと発展させていきたいと考えている。本研究の目標が達成されれば、マイクログリアの起炎症反応の制御というポイントがパーキンソン病やアルツハイマー病を始めとする神経変性疾患の新たな治療標的となり得る可能性があると考えている。

G) 参考文献

- (1) Hickman S, Izzy S, Sen P, Morsett L, El Khoury J. Microglia in neurodegeneration. *Nat Neurosci.* 2018;21(10):1359-1369.
- (2) Rees K et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs as disease-modifying agents for Parkinson's disease: evidence from observational studies. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011 Nov 9
- (3) Yurika Ishii et al. Anti-inflammatory effects of noradrenaline on LPS-treated microglial cells: Suppression of NFkB nuclear translocation and subsequent STAT1 phosphorylation *Neurochemistry International* 90 (2015) 56e66
- (4) 深柄和彦 Immunonutrients の作用機序 静脈経腸栄養 Vol.22 No.3 2007 277-281
- (5) Araujo L et al. Glycolysis and glutaminolysis cooperatively control T cell function by limiting metabolite supply to N-glycosylation *Elife.* 2017 Jan 6

- (6) Mak TW et al. Glutathione Primes T Cell Metabolism for Inflammation [published correction appears in Immunity. 2017 Jun 20;46(6):1089-1090]. Immunity. 2017;46(4):675-689.
- (7) Lu SC. Glutathione synthesis. Biochim Biophys Acta. 2013;1830(5):3143-3153.
- (8) Suzuki T, Yamamoto M. Molecular basis of the Keap1-Nrf2 system. Free Radic Biol Med. 2015;88(Pt B):93-100.
- (9) Taguchi K, Yamamoto M. The KEAP1-NRF2 System in Cancer. Front Oncol. 2017;7:85. Published 2017 May 4.
- (10) Kobayashi EH et al. Nrf2 suppresses macrophage inflammatory response by blocking proinflammatory cytokine transcription. Nat Commun. 2016;7:11624. Published 2016 May 23.
- (11) Uruno A et al. Nrf2 Suppresses Oxidative Stress and Inflammation in App Knock-In Alzheimer's Disease Model Mice. Mol Cell Biol. 2020;40(6):e00467-19. Published 2020 Feb 27.
- (12) Liu PS, Wang H, Li X, et al. α -ketoglutarate orchestrates macrophage activation through metabolic and epigenetic reprogramming. Nat Immunol. 2017;18(9):985-994.

H) 学会発表等

- ・ 山口輝昌、矢野元、田中潤也 マイクログリア起炎症反応におけるグルタミン代謝の解析
第 17 回医科学研究発表会 2019.9.19 (愛媛大学医学部)
- ・ 山口輝昌、矢野元、田中潤也 マイクログリア起炎症反応におけるグルタミン代謝要求性の解析
西日本医学生学術フォーラム 2019.11.23 (大阪大学)
- ・ 山口輝昌 マイクログリア起炎症反応メカニズムの解析～グルタミン代謝から考える～
第 9 回サイエンス・インカレ 2020.2.29-3.1 (立命館大学びわこ・くさつキャンパス) 書類選考通過、新型コロナウイルスの影響により開催中止
- ・ Teruaki Yamaguchi, Hajime Yano, Junya Tanaka Exploration of the role of glutamine metabolism in pro-inflammatory reaction of microglia 第 97 回日本生理学会大会 (別府) 2020.3.17-3.19 新型コロナウイルスの影響により開催中止