アストログリア細胞のグルタミントランスポーター機能に関する分子薬理学的研究

氏　　　　名	小椋　正人
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博甲第1114号
学位授与の日付	平成２１年3月２３日
学位授与の要件	課程博士(学位規則第４条第１項)
学位授与の題目	アストログリア細胞のグルタミントランスポーター機能に関する分子薬理学的研究
論文審査委員（主査）	谷浦　秀夫（医薬保健研究域・准教授）
論文審査委員（副査）	米田　幸雄（医薬保健研究域・教授），玉井　郁巳（医薬保健研究域・教授），加藤　将夫（医薬保健研究域・教授），中村　暢宏（医薬保健研究域・准教授）

The prevailing view is that glutamine (Gln) transporter (GlnT) is a member of the system A transporter superfamily with a role to fuel the glutamate/Gln cycle at nerve terminals in glutamatergic neurons. In the present study, we have evaluated the possible functional expression of GlnT by astrocytes. Exposure to lipopolysaccharide (LPS) leads to marked down-regulation of the expression of GlnT responsible for the incorporation of extracellular Gln through the inhibition of its promoter activity in cultured astrocytes. Prior exposure to LPS significantly prevented astrocytes from cytotoxicity of oxidative stress such as hydrogen peroxide. Exposure to the adenylyl cyclase activator forskolin for 24 h led to a significant increase in mRNA expression of GlnT, with an increase in [^{3}H]Gln accumulation sensitive to a system A transporter inhibitor, in cultured astrocytes, but not neurons. Forskolin stimulated GlnT promoter activity in a manner sensitive to a protein kinase A inhibitor H89 in rat astrocytic C6 glioma cells. Transient overexpression of GlnT significantly exacerbated the cytotoxicity of hydrogen peroxide in cultured astrocytes. In the brain, therefore, GlnT could play a dual role as a determinant of the vulnerability to oxidative stress in astrocytes and as a supplier to fuel the neurotransmitter glutamate in neurons.

【緒言】

グルタミン（Gln）は、哺乳動物中枢神経系において興奮性アミノ酸であるグルタミン酸（Glu）、および抑制性アミノ酸であるγ-aminobutyric acid の前駆物質としての機能を有すると理解されている。脳脊髄液中には 500 μM の Gln が存在するといわれており、Glu 神経系神経細胞は Gln トランスポーター（GlnT）を介して Gln を取り込み、グルタミナーゼの働きにより Glu に変換し神経伝達を行っていると考えられている。一方、アストログリア細胞において Gln は未だ神経細胞に対する供給物質としての位置づけであり、Gln の輸送とともにその生理学的および病態生理学的役割については十分に解明されていないのが現状である。さらに、グリア細胞の機能的役割の解明は重要性が高く、いまだ解明されていない中枢神経系疾患などの治療の新たなターゲットとなる可能性を秘めている。そこで本研究では，神経細胞において機能的に発現すると考えられている GlnT に着目し、グリア細胞における GlnT 発現の可能性探索とともに、さらにはその病態生理学的役割の究明研究に着手した。

【方法】

大脳皮質および海馬由来初代培養神経細胞は、18日齢のラット胎仔脳から単離した細胞を8および9日目まで培養したのち実験に用いた。培養アストログリア細胞は，妊娠20日齢のラット胎仔脳から単離した細胞を、1週間後に播き継ぎ、さらに1-2週間培養して実験に用いた。
さらに、アストログリア細胞のモデル細胞であるC6 Glioma細胞を用いて、GlnT安定発現株の作製を行った。Gln輸送活性の測定には[^{3}H]Glnを用いた。細胞内Gln濃度測定にはo-phthalaldehydeの蛍光誘導体化の後、高速液体クロマトグラフィー法（HPLC）を用いて測定した。NO産生活性は，蓄積されたNO_2をDAN試薬法により蛍光定量することで評価した。Reactive Oxygen Species（ROS）産生活性は、ROS感受性蛍光指示薬であるHydroethidine（HEt）を用いて評価した。細胞の生存率はMTT活性、PI染色法および免疫染色法を用いて測定した。トランスフェクション実験には、リポフェクタミンとplus試薬を用いた。レポーターアッセイにはDual-Luciferase Reporter Assay Systemを用いて、ルシフェラーゼ活性を測定した。転写因子のプロモーター領域への直接的な相互作用を観察するために、クロマチン免疫沈降法（ChIPアッセイ）を用いた。また、半定量的RT-PCR法を用いてGlnT mRNA発現量の変化についても解析した。

【結果】

GlnT mRNA発現量は大脳皮質由来の場合、神経細胞とアストログリア細胞ではほぼ同程度の発現量であった。トランスポーターの機能性を検討するため大脳皮質由来培養アストログリア細胞と神経細胞における[^{3}H]Gln輸送活性を評価すると、ともに温度依存性とナトリウム依存性の[^{3}H]Gln取り込み活性が観察された。GlnTはシステムA型トランスポーターに分類されるが、その特異的阻害薬N-methylaminoisobutyric acid（MeAIB）によって両細胞とも[^{3}H]Gln輸送活性の有意な減少が観察された。

一般的にグリア細胞の活性化実験によく用いられるリポポリサッカライド（LPS）に大脳皮質由来培養アストログリア細胞を24時間曝露したのち、細胞活性化の指標として培養液中に蓄積されるNO_2量を測定したところ、LPS濃度依存的なNO_2蓄積量増加が認められた。また、LPSに24時間曝露したアストログリア細胞を用いて、GlnT mRNA発現量を半定量的RT-PCR法により解析した結果、LPS曝露により発現量が有意に減少することが判明した。このときのGln輸送活性を測定したところ、LPS曝露細胞では有意な取り込み活性の低下が認められた。この取り込み活性の減少が、GlnTに起因しているか詳細に検討する目的で阻害薬MeAIB感受性[^{3}H]Glnを解析したところ、LPS曝露に伴い有意に減少した。さらに、GlnTプロモーター領域をクローニングし、レポーターアッセイを行ったところ、LPS曝露により有意なルシフェラーゼ活性の減少が観察された。

一方、cAMPシグナルを招来するForskolin曝露に伴って、大脳皮質由来培養アストログリア細胞におけるGlnT mRNA発現量が著明に増加した。レポーターアッセイによる検討を行ったところ、ForskolinはGlnT転写活性を増加させた。また、この増加はProtein Kinase A阻害薬であるH89により完全に阻害された。さらに、アドレナリン等のcAMPアナログがForskolinと同様にGlnT転写活性を増加させた。次に、どのプロモーター領域がGlnT転写の活性化に重要なのかを検討する目的で、GlnT欠損変異プロモーターを用いて解析を行ったところ、cAMPシグナルによるGlnTプロモーターの活性化に約-200までの領域が重要であることが判明した。そこで、この領域におけるリン酸化cAMP Response Element Binding Protein（CREB）抗体を用いたChIPアッセイを行ったところ、アストログリア細胞におけるForskolin曝露に伴い、陽性シグナルを観察した。

脳虚血時、アストログリア細胞は活性化され、生じる酸化的ストレスに抵抗性を示すことがよく知られている。そこで、GlnTと酸化的ストレス感受性との関係を解析する目的で、LPS誘発性活性化アストログリア細胞に対して過酸化水素細胞死を誘導すると、有意な保護作用が観察された。過酸化水素細胞死とGlnTとの関連性を検討するため、過酸化水素とMeAIBを同時に曝露したところ有意な

保護作用が観察された。さらに、細胞外 Gln の増加や GlnT の過剰発現によってアストログリア細胞の過酸化水素細胞死は増悪された。

この GlnT の過剰発現が酸化的ストレス脆弱性を引き起こすメカニズムを解析する目的で、GlnT 安定発現 C6 Glioma 細胞株を作製した。GlnT 安定発現株において HPLC を用いて細胞内 Gln 濃度を測定したところ、著明な細胞内 Gln 濃度の増加が観察された。さらに、過酸化水素曝露細胞死を検討したところ、MTT 活性の著明な減少および PI 陽性細胞数の増加が観察された。この時、GlnT たんぱく質は細胞膜上ではなく、細胞間接着面において局在性が観察され、さらに、ROS 産生能は GlnT 安定発現株において著明に増加していた。この GlnT によるアストログリア細胞の機能調節が神経細胞に及ぼす影響を検討する目的で、Glu 誘発性海馬神経細胞死に対する GlnT 安定発現株のコンディション培地の影響を解析したところ、著明な回復効果が観察された。GlnT 安定発現 C6 Glioma 細胞におけるコンディション培地が Glu 神経細胞死を回復させたことから、何らかの液性因子が神経細胞に働きかけている可能性がある。一般的に、アストログリア細胞は多数の神経栄養因子を産生することで、神経細胞の機能調節を担っている。そこで、神経栄養因子発現量を解析したところ GlnT 安定発現株において、NGF および NT4/5 mRNA 発現量の著明な増加が観察された。

【考察】

本研究により、神経細胞と同様に大脳皮質由来培養アストログリア細胞に機能的な GlnT が発現しており、このトランスポーターは LPS による細胞活性化により、転写レベルでの負の調節を受け、mRNA 発現量の減少、機能の低下が起こることが明らかとなった。さらに、GlnT が負の調節を受けることによって酸化的ストレスに抵抗性を示す。今回の検討からアストログリア細胞の酸化的ストレス抵抗性は脳内における細胞活性化の動静や細胞外 Gln 濃度によって制御されることが示唆された。一方、Forskolin による cAMP シグナルの招来は、CREB のリン酸化および GlnT プロモーターへの直接的な相互作用を介した GlnT 転写の活性化をもたらし、さらには、GlnT mRNA 発現量および機能活性を増加させた。また、アストログリア細胞において、GlnT の発現量増加は酸化的ストレス脆弱性を惹起すると共に、Glu 誘発性神経細胞死に対しては神経栄養因子を介した防御作用を発揮する可能性が示唆された。アストログリア細胞は脳虚血やアルツハイマー病，パーキンソン病などの神経変性疾患において，その発症，増悪に関与する可能性が報告されており，アストログリア細胞の機能調節が神経変性疾患治療および悪化防止に重要な役割を果たすと考えられる（Fig. 1.)。

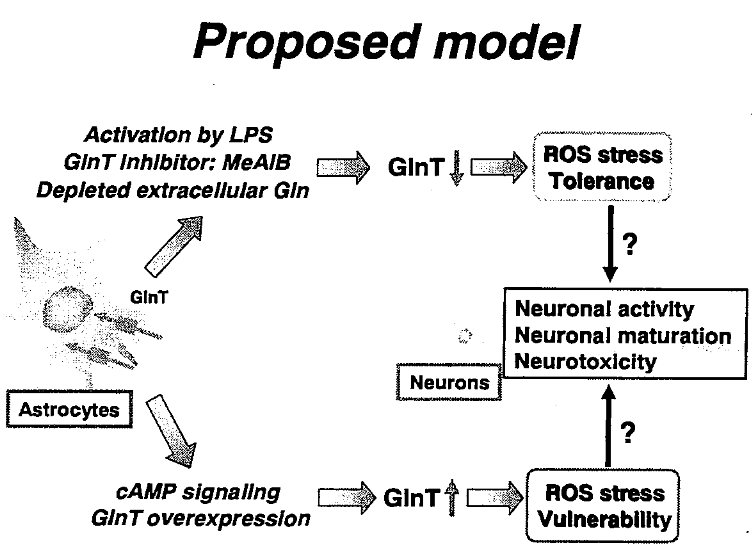

Fig.1. Proposed model.

学位論文審査結果の要旨

本研究では、グルタミントランスポーター(GlnT)の脳内における役割を解明する目的で、アストログリア細胞における機能的発現の可能性探索とともに機能的意義追究を行った。

ラット脳由来培養アストログリア細胞およびミクログリア細胞には、GlnT の mRNA 発現が観察されただけでなく、選択的阻害薬に感受性を示す温度依存性[^{3}H]Gln 輸送活性が検出された。GlnT mRNA 発現と GlnT プロモーター活性はともに、LPS による細胞活性化により抑制されたが、cAMP シグナルにより PKA 依存的に促進された。GlnT 安定発現 C6 グリオーマ細胞を構築したところ、安定発現細胞では ROS 産生量の著明な上昇とともに、過酸化水素曝露に伴う細胞死が増悪される事実が判明した。次いで、安定発現株コンディション培地を添加したところ、培養神経細胞におけるグルタミン酸誘発性神経細胞死に対する著明な回復効果が出現した。事実、安定発現細胞では複数の神経栄養因子 mRNA 発現量の著明な上昇が観察された。したがって、アストログリア細胞における GlnT 機能的発現がはじめて証明されただけでなく、GlnT はアストログリア細胞の酸素ストレス感受性だけでなく、神経細胞の生存を決定する要因の一つである可能性が示唆される。

以上の研究成績は、GlnT がアストログリア細胞で機能的発現する事実を初めて実証しただけでなく、今後の神経変性疾患の予防と治療を指向する創薬戦略展開への貢献が期待される点で高く評価されるので、審査委員会は本論文が博士（薬学）に値すると判断する。