

論 文 要 旨

Polyamines mediate glutamine-dependent induction of the intestinal epithelial heat shock response.

〔 グルタミンによる腸管上皮熱ショック蛋白
の発現はポリアミンを介している 〕

岩下 祐司

【序論および目的】

グルタミンは、腸管上皮における主たる栄養源であり、腸管上皮の保護作用を有する。腸管上皮に対する保護作用の機序の一つに、熱ショック蛋白 (Heat shock protein ; Hsp) の発現誘導がある。誘導型 Hsp の中で Hsp70 と Hsp25 は、炎症性サイトカインの産生抑制作用や抗アポトーシス作用を有し、ストレス条件下において、グルタミンの存在により発現が増強されることが明らかになっている。しかしながら、グルタミンによる誘導型 Hsp 発現制御のメカニズムは未だ明らかでない。我々は、グルタミンによる腸管上皮の誘導型 Hsp 発現増強に、グルタミンの代謝産物であるオルニチンやポリアミンが関与しているかを調べた。

【材料および方法】

ラット小腸上皮細胞株 IEC-18 を用いて、熱ショック条件下あるいは非熱ショック条件下で以下の (1) ~ (7) について検討した。熱ショックは 42°C、30 分間で行った。Hsp70、Hsp25 の発現を、蛋白はウエスタンブロット法で、mRNA はリアルタイム RT-PCR で解析した。また、Hsp の発現を制御する転写因子 Heat Shock Factor-1 (HSF-1) の細胞内局在及び DNA 結合を、それぞれウエスタンブロット法及び Electromobility shift assays (EMSA) にて解析した。

- (1) Hsp (Hsp70 及び Hsp25) 発現へのグルタミンの影響
- (2) HSF-1 の局在変化と DNA 結合へのグルタミンの影響
- (3) グルタミン非存在下で、Hsp 発現へのオルニチンの影響
- (4) グルタミン非存在下で、HSF-1 の局在変化と DNA 結合へのオルニチンの影響
- (5) グルタミン非存在下で、Hsp 発現へのポリアミンの影響
- (6) グルタミン存在下に、ポリアミン生合成の律速酵素 (オルニチン脱炭酸酵素 : ODC) の阻害薬 (α -difluoromethylornithine : DFMO) を加えた場合、更にそれにポリアミンを添加した場合の Hsp 発現
- (7) グルタミン存在下に、DFMO を加えた場合、更にそれにポリアミンを添加した場合の HSF-1 の局在変化と DNA 結合

【結果】

- (1) 非熱ショック条件下ではグルタミンは Hsp 発現に影響を与えなかったが、熱ショック条件下においてグルタミンは Hsp 発現を著明に増強した。
- (2) 非熱ショック条件下ではグルタミンは HSF-1 の DNA 結合に影響を与えなかったが、熱ショック条件下においてグルタミンは DNA 結合を増強した。グルタミンの HSF-1 の局在変化への影響は、非熱ショック条件下、熱ショック条件下のどちらにおいても認められなかった。
- (3) グルタミン非存在下で、熱ショックによる Hsp 発現をオルニチンは増強した。
- (4) グルタミン非存在下で、オルニチンは熱ショックによる HSF-1 の局在変化に影響を与えなかったが、熱ショックによる DNA 結合を増強した。
- (5) グルタミン非存在下で、熱ショックによる Hsp 発現をポリアミンは増強した。
- (6) グルタミン存在下に DFMO を加えると、熱ショックによる Hsp の発現は著明に抑制された。更にそこにポリアミンを加えることで Hsp の発現が回復した。
- (7) DFMO、ポリアミンともに、熱ショックによる HSF-1 の局在変化に影響を与えなかった。しかし、熱ショックによる HSF-1 の DNA 結合は DFMO により強く抑制された。更にそこにポリアミンを加えると、再び DNA 結合が認められた。

【結論及び考察】

グルタミンはポリアミンの前駆体であるとともに、ポリアミン生合成の律速酵素 (ODC) の活性を高めることが知られており、ポリアミン生合成に強く影響している。ポリアミンはあらゆる生体中に含まれ、細胞分裂や増殖の制御、RNA や蛋白の合成促進に必須の物質である。消化管においても、粘膜の恒常性維持に必要とされている。グルタミンはグルタミン酸を介してピロリン 5-カルボン酸塩へと変換され、そこからオルニチン、ポリアミンへと変換される。この経路には、プロリンやアルギニンも関与しており、消化管のポリアミン生合成の原料とされているが、過去の検討よりプロリンやアルギニンは腸管上皮での Hsp 発現増強作用はないことが確認されている。今回の検討で、腸管上皮細胞におけるポリアミンの主な供給源が、グルタミンであることが示された。

Hsp の発現には HSF-1 の活性化が必要である。HSF-1 活性化のプロセスには、3 量体の形成、核内への移行、リン酸化、DNA 結合がある。我々の過去の検討より、グルタミンは 3 量体形成、リン酸化には影響しないことが明らかになっている。今回の検討によりグルタミンは HSF-1 の核内移行にも影響しないが、DNA 結合を増強して、Hsp の発現増強に関わっていることが示された。オルニチンも HSF-1 の DNA 結合を増強させた。また、ODC 阻害薬である DFMO により、グルタミンによる DNA 結合は消失し、ここに更にポリアミンを加えることにより再び結合が認められたことから、HSF-1 の DNA 結合にはグルタミンからポリアミンへの変換が必須であることが示された。

今回の検討により、ポリアミンによる腸管上皮細胞 Hsp の発現誘導作用が明らかになった。腸管上皮においてグルタミンは、ポリアミン合成を促進させて HSF-1 の DNA 結合を増強し、Hsp 発現を亢進させることで腸管の恒常性維持に関与していると考えられた。

(American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology

301:G181-G187 2011 年 7 月掲載)

論文審査の要旨

報告番号	総研第144号		学位申請者	岩下 祐司
審査委員	主査	岸田 昭世 教授	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	古川 龍彦 教授	副査	谷本 昭英 教授
	副査	堀内 正久 准教授	副査	石神 純也 講師

Polyamines mediate glutamine-dependent induction of the intestinal epithelial heat shock response

(グルタミンによる腸管上皮熱ショック蛋白の発現はポリアミンを介する)

グルタミンは腸管上皮における主たる栄養源で、腸管上皮の保護作用を有し、すでに炎症性腸疾患の治療に用いられている。一方、熱ショック蛋白質 (Heat shock protein : Hsp) は熱などのストレス状況下で発現し、細胞を保護する蛋白質ファミリーである。Hsp70 や Hsp25 はグルタミンの存在により発現が増強することから、グルタミンによる腸管上皮の保護作用に関与する可能性がある。しかし、グルタミンによる Hsp70 および Hsp25 の発現制御のメカニズムは未だ充分には解明されていない。今回、学位申請者らは腸管上皮細胞を用いて、熱ショック (42°C 30分) 存在下および非存在下で、グルタミンおよびその代謝産物であるオルニチン、ポリアミンの Hsp 発現への関与について検討した。また、オルニチンからポリアミンへの変換を阻害する α -difluoromethylornithine (DFMO) を用いてその影響を検討した。Hsp の発現はウエスタンブロット法と real time RT-PCR で解析し、Hsp の発現を制御する転写因子 HSF-1 の DNA 結合能を Electromobility shift assay にて解析した。

その結果、本研究で以下の知見が得られた。

- 1) 熱ショック条件下で、グルタミンは Hsp70、Hsp25 発現を著明に増強した。
- 2) オルニチンおよびポリアミンは、グルタミン非存在下で熱ショックによる Hsp70、Hsp25 発現を増強した。
- 3) DFMO は、グルタミン依存性の熱ショックによる Hsp70、Hsp25 の発現亢進を著明に抑制し、その抑制はポリアミンの添加により回復した。
- 4) グルタミンおよびオルニチンは熱ショックによる HSF-1 の DNA 結合能を増強した。
- 5) DFMO は、グルタミン存在下で亢進する熱ショックによる HSF-1 の DNA 結合能を著明に抑制し、その抑制はポリアミンの添加により解除された。
- 6) グルタミン、オルニチン、ポリアミンおよび DFMO は、熱ショックによる HSF-1 の局在変化に影響を与えなかった。

グルタミンは、ストレス状況下において腸管上皮細胞の Hsp 発現を増強させるが、これにはグルタミンからオルニチンを経由したポリアミンへの変換が必須であることが示された。また、Hsp の発現に必要な HSF-1 活性化のプロセスのうち、DNA 結合の増強にポリアミンが関わっていることが明らかとなった。

本研究は、グルタミンの腸管上皮保護作用の一つである Hsp 発現増強のメカニズムに関して、グルタミンによる Hsp 発現増強作用にはポリアミンへの変換が必要であること、その作用はポリアミンによる HSF-1 の DNA 結合能増強によることを明らかにした点で、非常に興味深い。よって、本研究は学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第144号		学位申請者	岩下 祐司
審査委員	主査	岸田 昭世 教授	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	古川 龍彦 教授	副査	谷本 昭英 教授
	副査	堀内 正久 准教授	副査	石神 純也 講師

主査および副査の5名は、平成23年9月28日、学位申請者 岩下 祐司 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のよう
な質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 今回実験で使用したラット小腸上皮細胞の採取場所はわかっているのか。空腸、回腸でグルタミンに対するレスポンスに差があるか。

(回答) 回腸由来の細胞である。腸管内でグルタミン、ポリアミンの分布に差があるため、部位によりレスポンスにも差がある可能性は考えられるが、今回は検討していない。

質問2) EMSA で whole cell extract を使用した理由はなにか。

(回答) 共同研究者が以前 whole cell extract を使用した EMSA を行い、明瞭な結果を報告している。そこで今回も同じ方法を使用した。

質問3) EMSA のプローブに、内因性の配列由来のものを使用せず tandem repeat の合成オリゴを使用した理由はなにか。

(回答) この点についても、以前の検討と同じ方法で行ったことが理由である。

質問4) HSF-1 の局在変化や DNA 結合の解析について、グルタミンでは熱ショックの有無で検討をしているが、オルニチンでは熱ショックのみでしか検討していない。その理由はなにか。

(回答) 熱ショックのない状態で、グルタミンは HSF-1 局在変化や DNA 結合に影響を及ぼさない。グルタミン代謝の下流にあるオルニチン、ポリアミンの作用も同様と考え、熱ショックのない状態では検討しなかった。

質問5) EMSA で使用したプローブの特異性はあるか。ルシフェラーゼアッセイ等は必要ないか。

(回答) 特異性については、以前 HSF-1 に対する特異的抗体を用いてスーパーシフトを確認しており、今回は同じプローブを使用している。EMSA の結果が明瞭であったため、ルシフェラーゼアッセイまでは行っていない。

質問6) HSF-1 の核内移行のメカニズムはわかっているのか。

(回答) HSF-1 は、平常の状態では熱ショック蛋白質 (Hsp) と結合して存在しているが、熱ストレスにより Hsp から解離し、核内へ移行するというメカニズムが提唱されている。しかし、最近の報告では必ずしもこれを支持する結果は得られていない。

質問7) DFMO による Hsp25 の発現抑制が Hsp70 と比べて弱い理由はなにか。

(回答) 大変興味深い点であるが、まだ検討していない。

質問8) プロリンとアルギニンで Hsp 発現増強が得られない理由はなにか。

(回答) アルギニンに関しては、腸管上皮細胞への取り込みが非常に乏しいことが理由として考えられる。プロリンの取り込みは良好であるにも関わらず、Hsp 発現を増強させない。現時点でその理由は解明できていない。

質問9) グルタミンの生理的濃度で Hsp 発現増強がみられているが、さらに低い濃度でも発現増強が得られるか。

(回答) 共同研究者が以前行った検討では、0.3mM のグルタミンで Hsp 発現増強が見られている。

質問10) ポリアミンの取り込みの機序はわかっているのか。

(回答) 腸管上皮細胞での取り込みにはいくつかの輸送系が示唆されているが、未だ確定していない。

質問 1 1) グルタミンの投与経路としては、血管内投与、静脈内投与のどちらがよいのか。

(回答) 腸管上皮へのグルタミンの供給源は動脈血より約 30%、経口から約 70%とされており、静脈投与でも効果は得られるが、経口投与の方が効率がよいと考えられる。

質問 1 2) 炎症性腸疾患での腸管組織中のグルタミン濃度の低下は、取り込みの減弱が関与しているのか。

(回答) 現時点では炎症性腸疾患においてグルタミンの取り込みが減弱するという報告はなく、炎症の慢性持続によってグルタミンが消費され、腸管組織中の濃度が低下するという機序が考えられている。

質問 1 3) ポリアミンによって DNA の電荷が中和されることで Hsp 発現が増強されるのではないかと考察しているが、その場合にはシークエンスに関係なく、非特異的に増強されるためバックグラウンドのバンドが強くなるのではないのか。

(回答) 実際にはバックグラウンドのバンドの増強は見られておらず、ポリアミンの作用は DNA の電荷が中和以外の作用もあるものと考えられる。

質問 1 4) グルタミン由来のポリアミンが、Hsp 発現に関与する割合は大きくないのか。

(回答) 今回は検討を行っていない。

質問 1 5) ポリアミンは大腸癌のマーカーとして使用されており、ポリアミンの過剰摂取は大腸癌を増加させるとの報告もあるが、実際どうなのか。

(回答) 尿中ポリアミンは実際に大腸癌のマーカーとして使用されている。理由としては、癌細胞では ODC の活性が上昇しており、多量のポリアミンを生成していることが考えられる。ポリアミンは正常腸管上皮細胞の増殖に重要であるが、癌でも同様に増殖を促進させるかもしれない。高濃度のポリアミンは細胞傷害性もあり、ポリアミンの過剰摂取は必ずしも生体により影響を与えない可能性がある。

質問 1 6) 経口で投与された場合、血液中のグルタミン濃度は上昇するのか。

(回答) 経口で投与されたグルタミンは、ほぼ全てが腸管上皮細胞によって消費され、血中には移行しない。血中のグルタミンは、ほとんどは骨格筋から生成されたものであると考えられる。

質問 1 7) グルタミンは経口投与が有効と考えられるが、どうして血漿中の生理的濃度レベルで実験したか。

(回答) 消化管内での生理的濃度の報告ははっきりしたものがなく、血漿の生理的濃度を使用した。

質問 1 8) 今回用いた小腸細胞は、基本的な小腸機能を保存した細胞株か。

(回答) 小腸機能の実験に多く用いられている細胞株である。今回の実験前に改めて機能の確認はしていない。

質問 1 9) ポリアミンは変性し易く扱いに注意が必要だが、メディウムに加えたポリアミンの安定性はどうか。

(回答) ポリアミン、特にスベルミジンは変性し易く、調製時には厳密に管理した。メディウムに加えた後は、できるだけ短時間で検討するように努めた。

質問 2 0) Hsp の作用のターゲットとしては、膜蛋白など特異的なものがあるのか。

(回答) Hsp70・Hsp25 は数多くの変性蛋白と結合し得ると言われており、基質特異性は低いと考えられる。

質問 2 1) 実験では 5%の血清を用いたとのことだが、血清の関与はないのか。

(回答) Hsp の発現に血清は関与しないと報告されているが、血清の影響を抑えるため、Hsp の発現検討の際には血清濃度を 1%に減らした。

質問 2 2) グルタミン除去の際に、24 時間前までグルタミン添加の培地を使用しているが理由はなにか。

(回答) 継代直後の細胞は、グルタミンがないと死滅してしまうため、70%コンフルエントになるまではグルタミンを添加せざるを得なかった。

質問 2 3) HSF-1 のリン酸化にはカゼインキナーゼ 2 が関与しているとのことだが、他の酵素の関与はないのか。

(回答) HSF-1 のリン酸化には、カゼインキナーゼ 2 以外にも MAPK、JNK など複数の酵素が関わっていると報告されている。

質問 2 4) グルタミンを 24 時間除去した場合、細胞内のポリアミンの濃度はどうなるか。

(回答) グルタミン除去による細胞内ポリアミン濃度の変化は、今回検討していない。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士(医学)の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。