

5. 細胞死の誘導機構

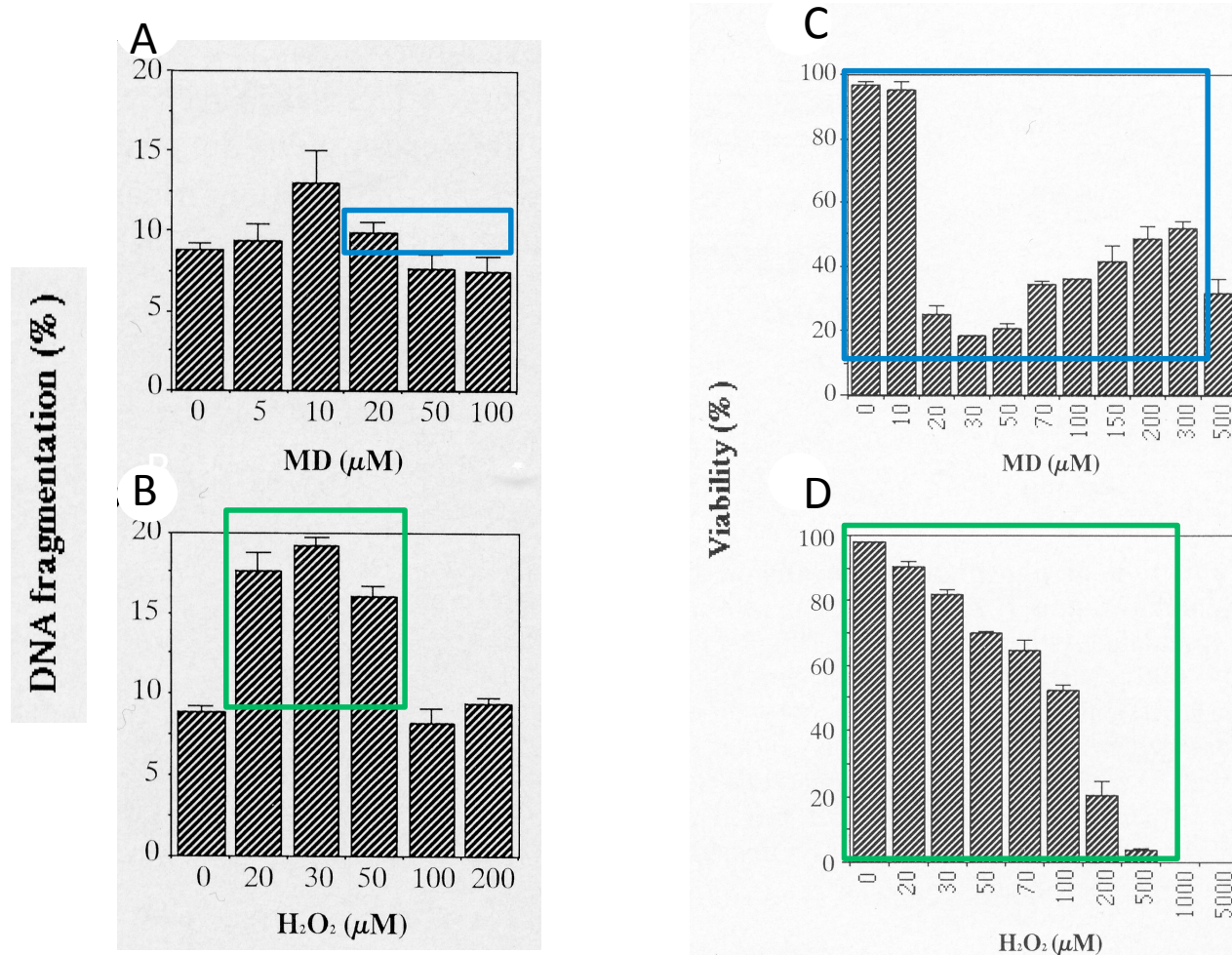
Menadione biphasically controls JNK-linked cell death in leukemia Jurkat T cells

Xiuyang Ma et al. Antioxid. Redox Signal. 4:371 (2002)

メナディオンは白血病Jurkat T細胞におけるJNKに連結した細胞死を二相性に制御する

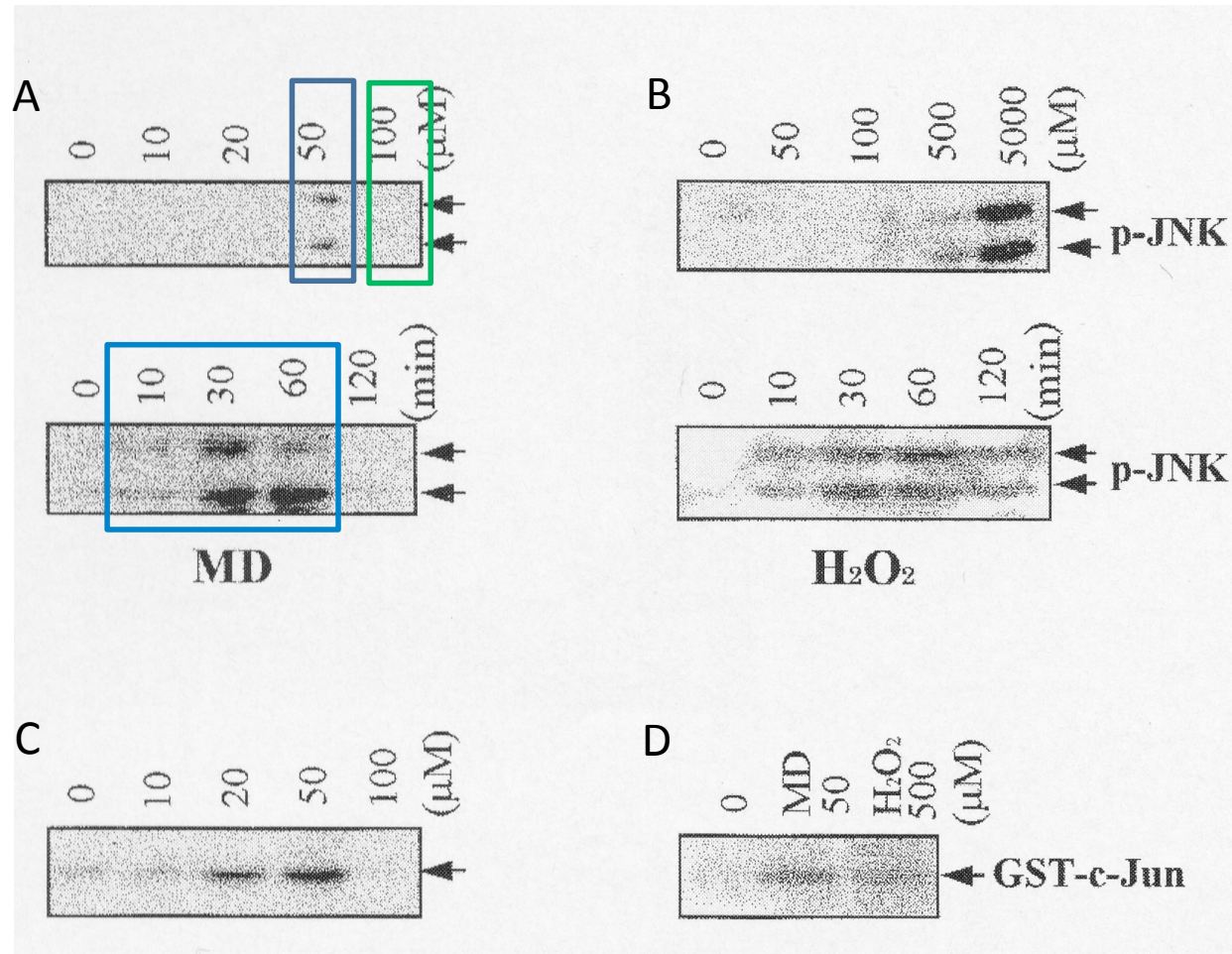
メナディオン(ビタミンK₃、MD、強い活性酸素種の産生剤)、ネクローシス(カスパーゼの活性化を伴わない細胞死)、アポトーシス、細胞死誘導の二相性コントロール、JNKのリン酸化と活性化の二相性コントロール

メナディオオン(MD)とH₂O₂によるJurkat細胞のDNAフラグメンテーションと細胞死の誘導



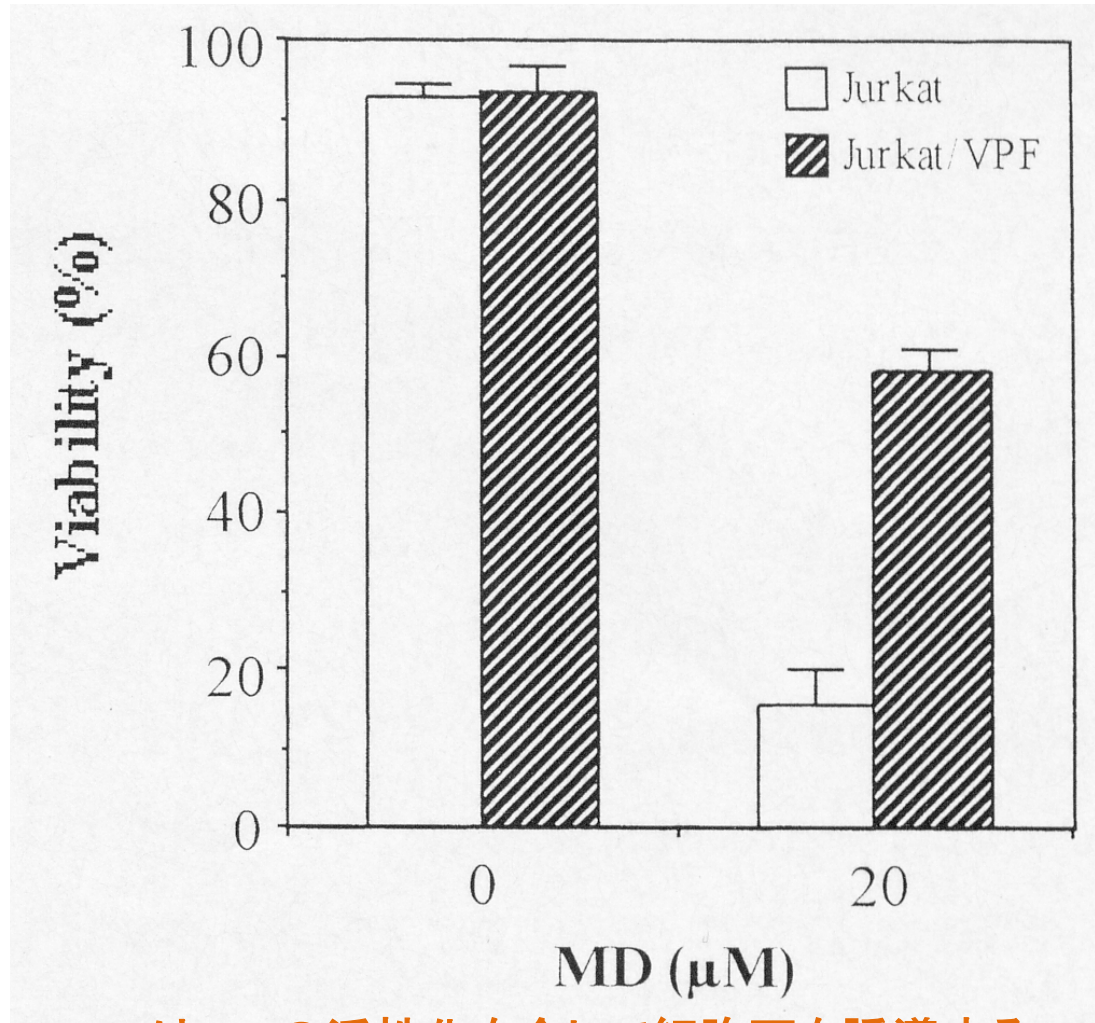
(A)メナディオオンはネクローシスを、(B) H₂O₂はアポトーシスを誘導した。
 (C) メナディオオンによる細胞死(ネクローシス)の誘導は二相性にコントロールされ、(D) H₂O₂によるアポトーシスの誘導は一相性にコントロールされた。

メナディオオンとH₂O₂によるJNKのリン酸化と活性化



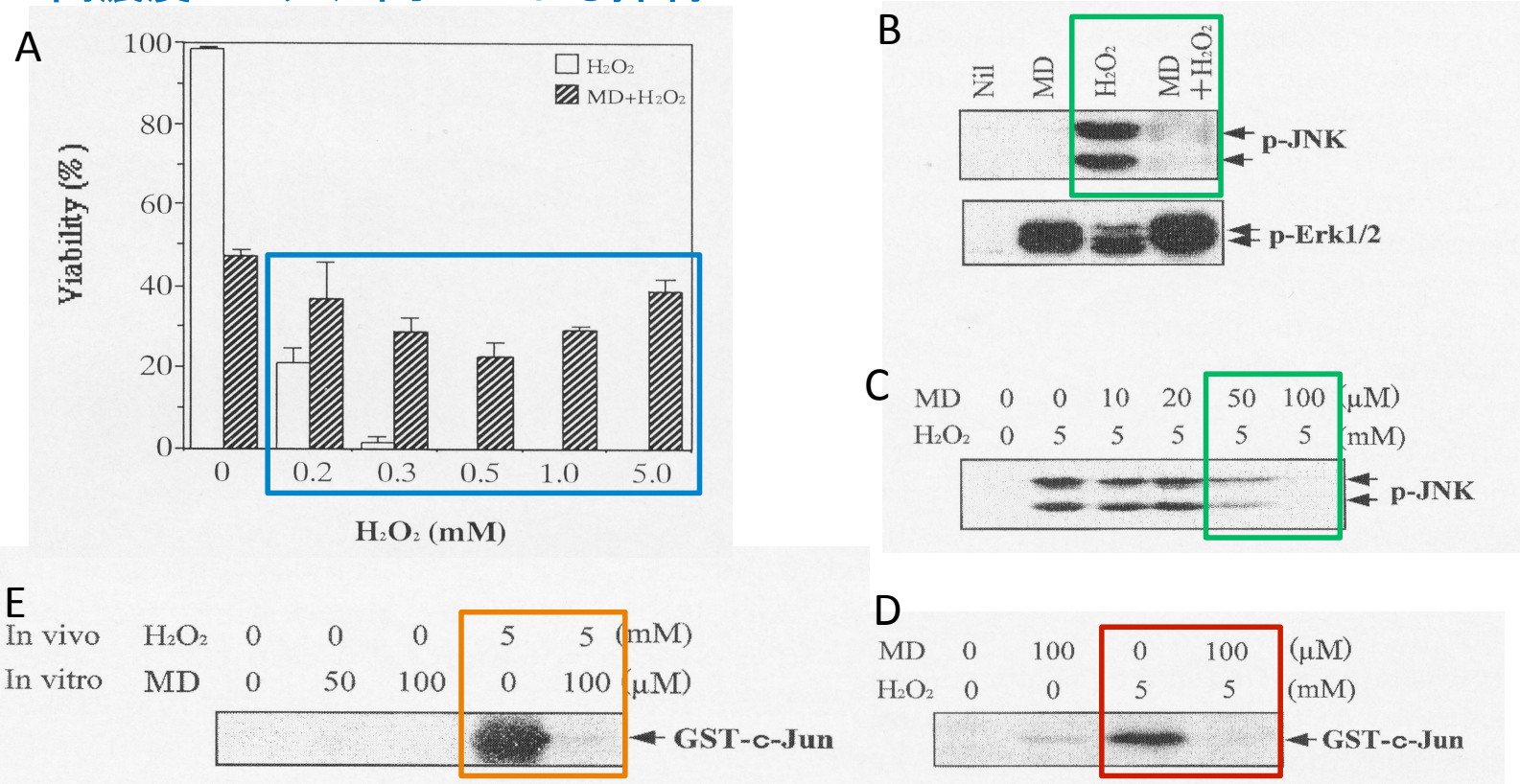
(A) 50 μMのMDはJNKのリン酸化を10～60分間誘導したが100 μMのMDは誘導しなかった。(B)H₂O₂は濃度依存性にJNKをリン酸化し、10～120分間持続させた。(A, B) JNKのリン酸化と(C, D)基質c-Junのリン酸化能は相関した。

ドミナントネガティブJNK遺伝子導入Jurkat細胞における
低濃度のメナディオンのによる細胞死の誘導の抑制



MDはJNKの活性化を介して細胞死を誘導する。

高濃度のH₂O₂による細胞死の誘導およびJNKのリン酸化と活性化の 高濃度のメナディオンによる抑制



(A) 高濃度のH₂O₂が誘導する膜の破壊を300 μMのMDは抑制した。H₂O₂が誘導するJNKの(B, C)リン酸化と(D)基質c-Junのリン酸化をMDは阻止した。(E) in vivoでH₂O₂で活性化されたJNKによる無細胞系(in vitro)での基質c-Junのリン酸化をMDはJNKに直接作用して阻止した。
メナディオンによるネクローシスの誘導はJNKによって二相性にコントロールされる。

5. 細胞死の誘導機構

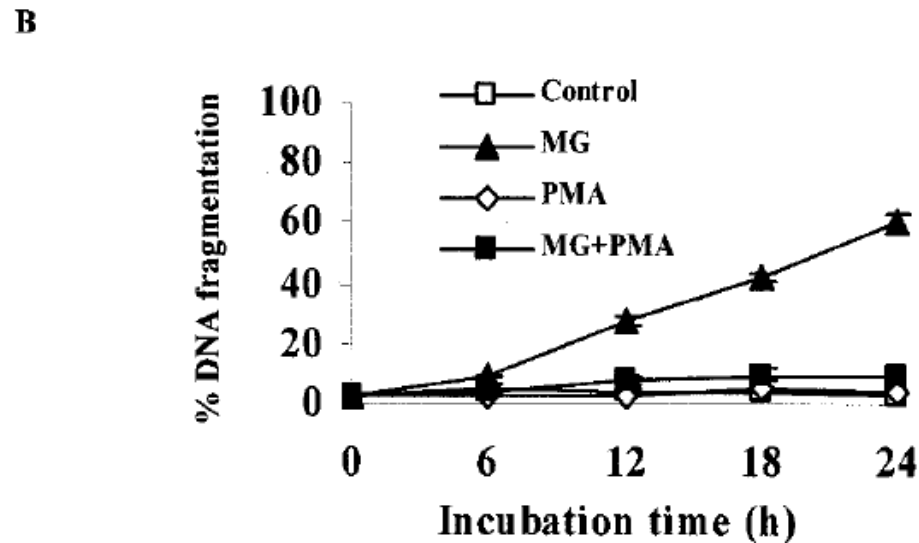
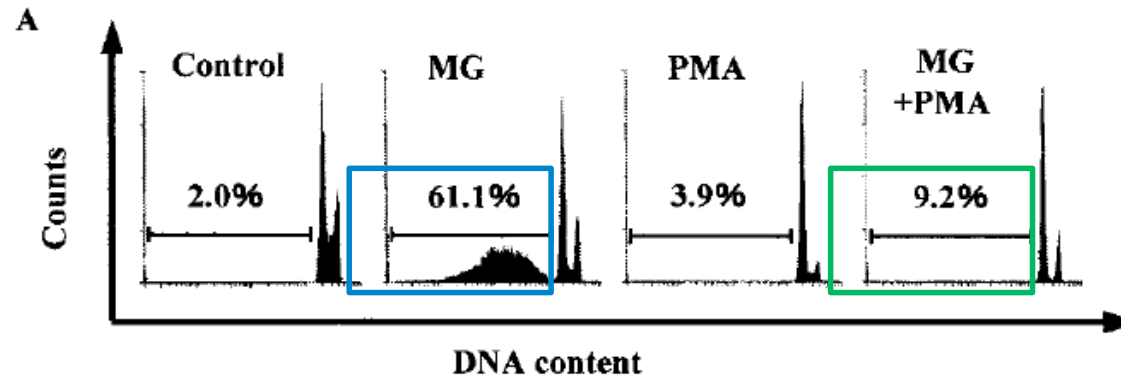
Phorbol 12-myristate 13-acetate protects Jurkat cells from methylglyoxal-induced apoptosis by preventing c-Jun N-terminal kinase-mediated leakage of cytochrome c in an extracellular signal-regulated kinase-dependent manner

Yoshikazu Takagi et al. Mol. Pharmacol. 65:778 (2004)

ホルボル12-ミリステート13-アセテート(PMA)はc-Jun N-ターミナルキナーゼ(JNK)に媒介されたチトクロームcの漏れを細胞外シグナル制御キナーゼ(ERK)依存性に防ぐことでJurkat細胞をメチルグリオキサール(MG)が誘導するアポトーシスから防御する

メチルグリオキサール、アポトーシス、PMA、ERK、JNK、カスパーゼ9/3、ミトコンドリアの膜電位の低下、チトクロームcの放出

PMAはJurkat細胞においてメチルグリオキサール(MG)が誘導するアポトーシスを阻止する

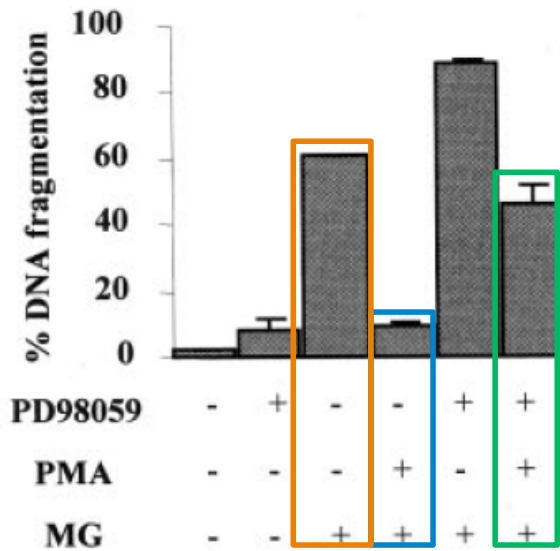


(A) MGはDNAフラグメンテーションを誘導したが、PMAはそれを抑制した。

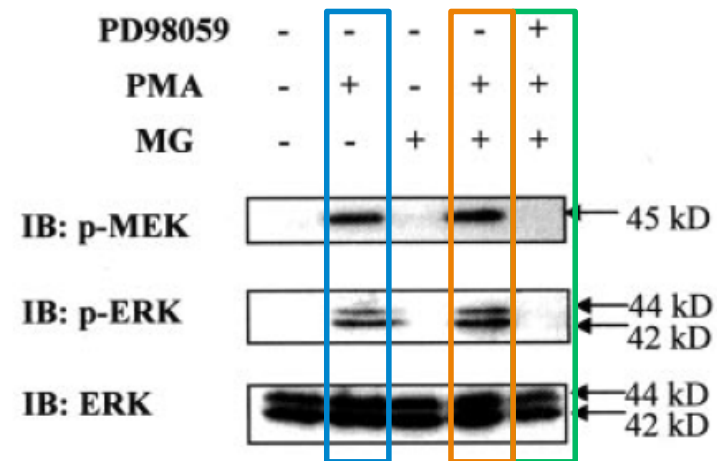
(B) その時間経過

PMAの抗アポトーシス効果はMEK/ERK経路に依存する

A

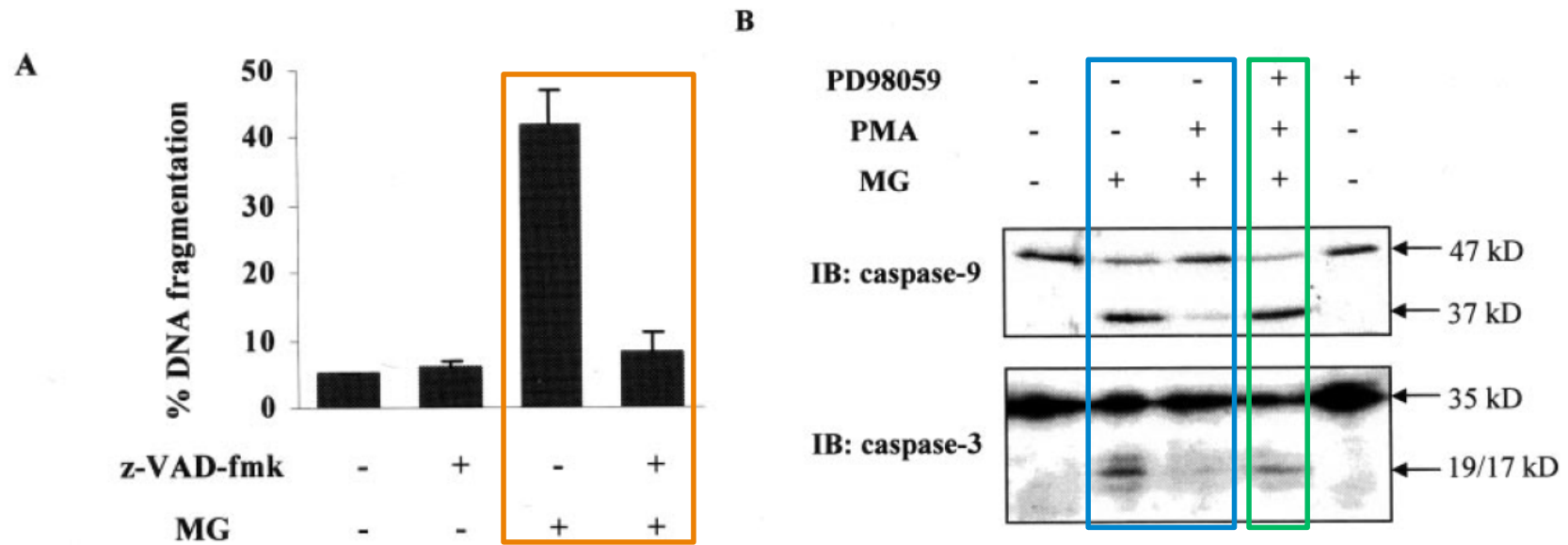


B



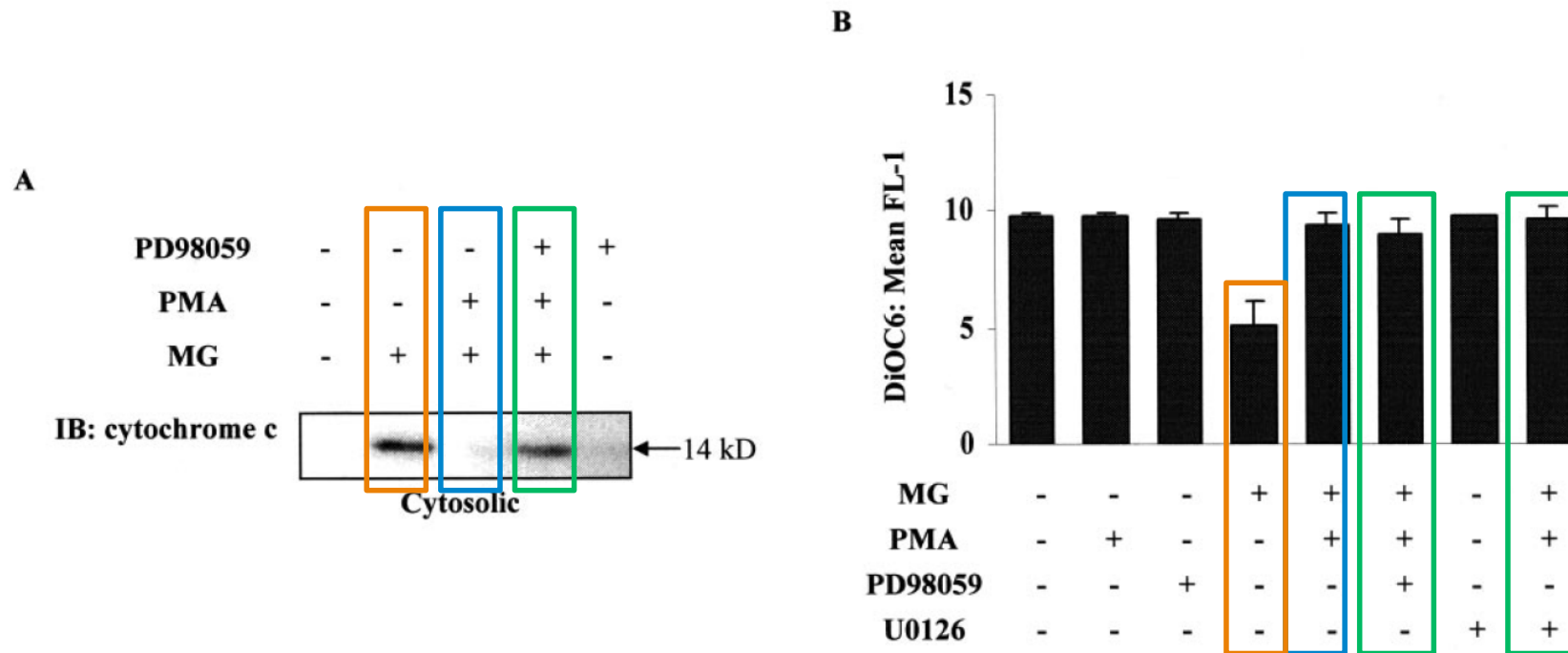
MGによる(A) DNAフラグメンテーションの誘導とERKによるその抑制はMEKのインヒビターPD98059で解除された。(B) PMAによるMEKとERKのリン酸化はMGの影響を受けないがMEKのインヒビターで阻止された。

MEK/ERK経路はMGで処理されたJukat細胞におけるカスパーゼの活性化を抑制する



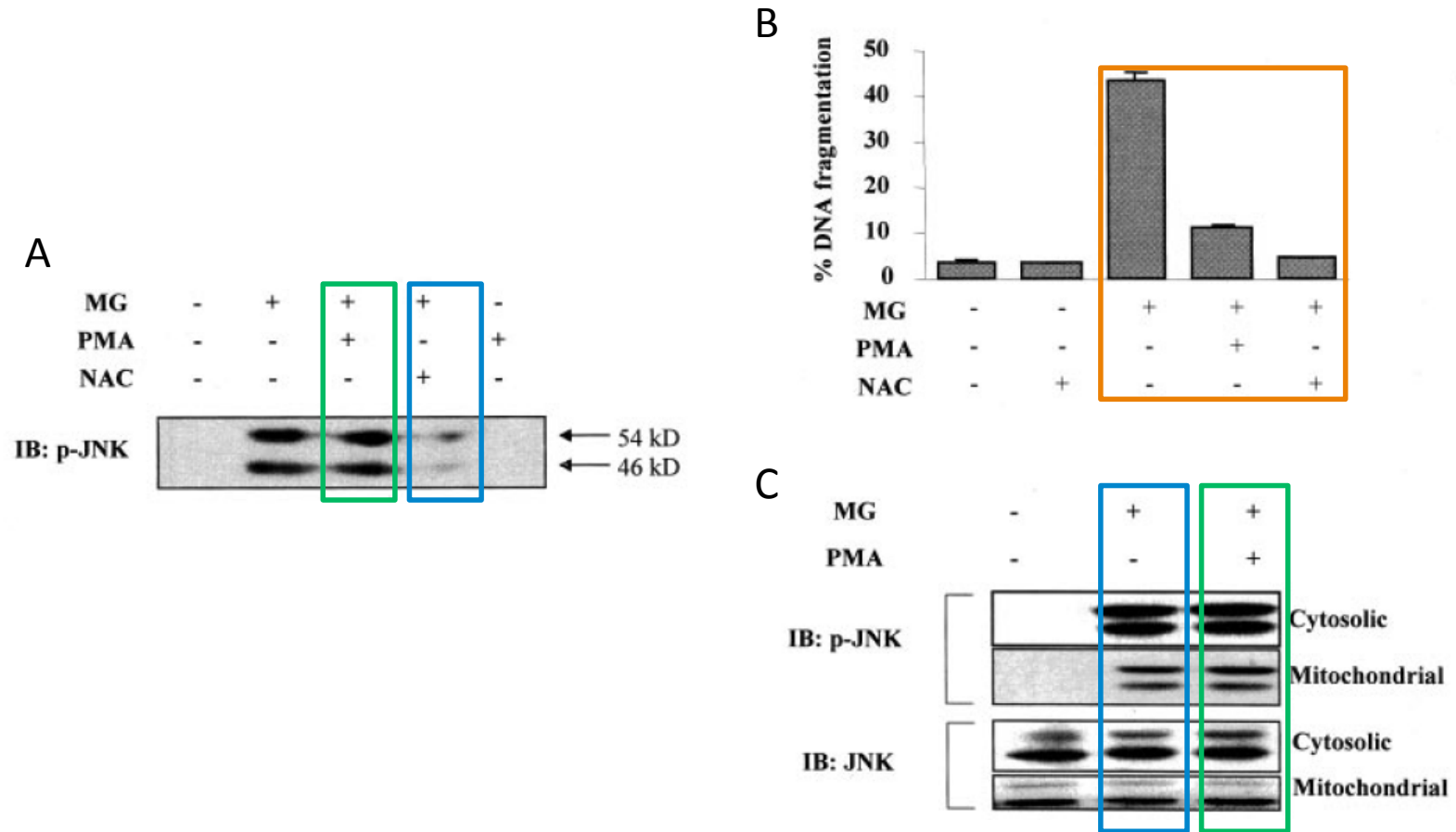
(A) MGが誘導するDNAフラグメンテーションを汎カスパーゼインヒビターのz-VADは抑制した。(B) MGが誘導するカスパーゼ9/3の活性化はPMAで阻止されたが、それはMEKのインヒビターで解除された。

MEK/ERK経路はMGが誘導するアポトーシスにおいてチトクロームcの放出を阻止するが、ミトコンドリアの膜電位を制御しない



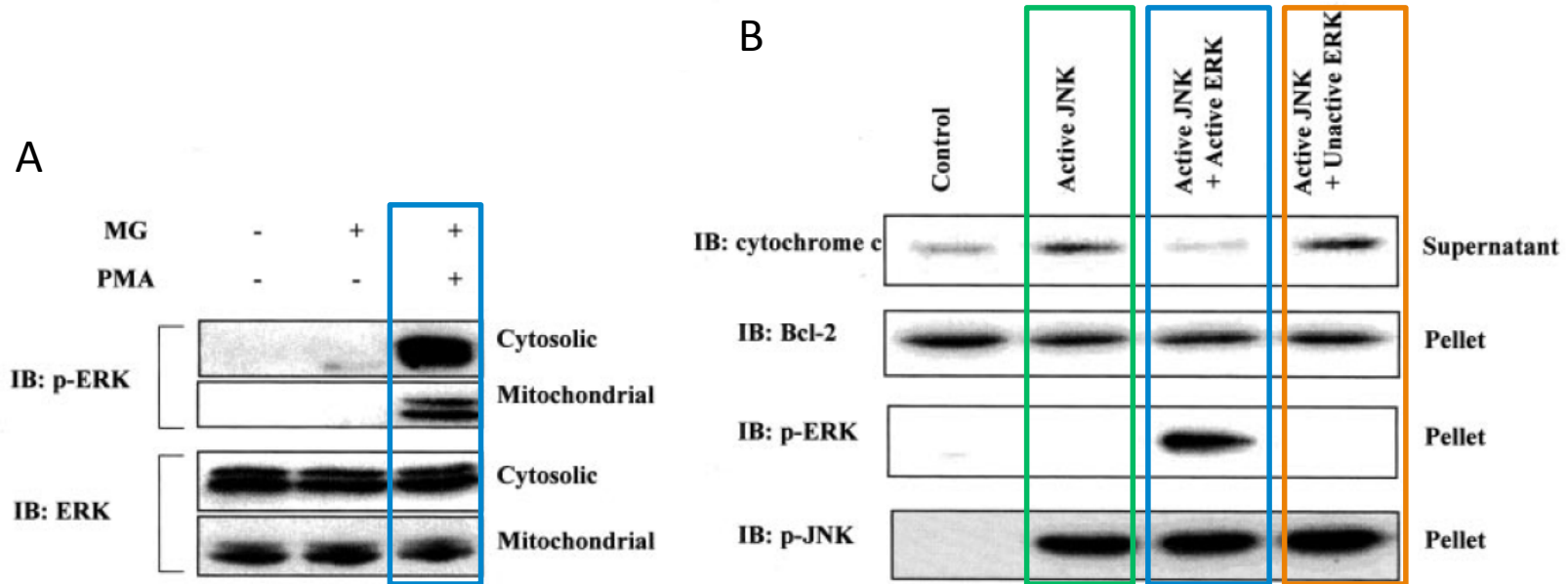
(A) MGが誘導するミトコンドリアからのチトクロームcの放出をPMAは阻止したが、MEKのインヒビターはその阻止を解除した。(B) MGが誘導するミトコンドリアの膜電位の低下はPMAで阻止されたが、MEKのインヒビターはそれを解除しなかった。

PMAはMGが誘導するJNKの活性化を抑制しない



(A) MGの誘導するJNKのリン酸化を抗酸化剤のNACは抑制したが、PMAは抑制しなかった。(B) MGが誘導するDNAフラグメンテーションをPMAもNACも抑制した。(C) MGが誘導するミトコンドリアでのJNKのリン酸化をPMAは抑制しなかった。

活性化ERKはJNKが誘導するチトクロームcの放出を阻止する



(A) PMAはミトコンドリアでのERKのリン酸化を誘導した。(B) 分離したミトコンドリアに活性化ERKを1時間作用させた後、活性化JNKを2時間作用させた。活性化JNKはミトコンドリアからのチトクロームcの放出を誘導し、活性化ERKはそれを阻止したが、不活性化ERKは阻止しなかった。

MGとPMAはそれぞれミトコンドリアにおけるJNKとERKの活性化を誘導し、活性化ERKは活性化JNKによるチトクロームcの放出を阻止することによりアポトーシスの誘導を抑制する。

6. トリプトファン代謝による免疫の調節

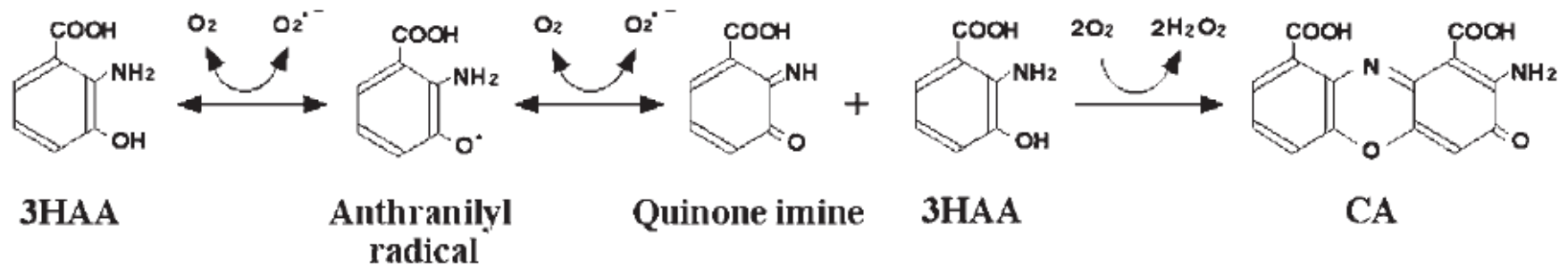
Cinnabarinic acid generated from 3-hydroxyanthranilic acid strongly induces apoptosis in thymocytes through the generation of reactive oxygen species and the induction of caspase

Rie Hiramatsu et al. J. Cell. Biochem. 103:42 (2008)

3-ヒドロオキシアントラニル酸(3HAA)から生成されるシナバリン酸(CA)は活性酸素種(ROS)の産生とカスパーゼの誘導を介して胸腺細胞にアポトーシスを強力に誘導する

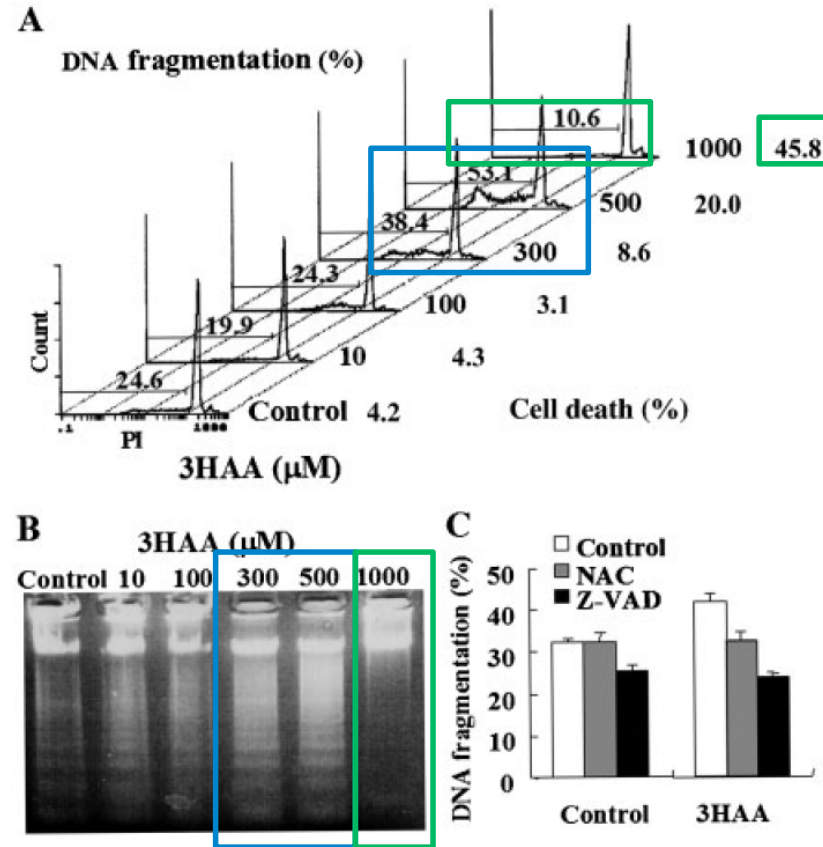
3HAA (キヌレニン経路のトリプトファン代謝産物)、トリプトファン代謝、キヌレニン経路、トリプトファンの代謝産物によるT細胞抑制、アポトーシス、シナバリン酸(CA)、SOD、カタラーゼ、活性酸素種(ROS)の産生、ミトコンドリアの膜電位の低下、カスパーゼ3

3-ヒドロキシアントラニル酸(3HAA)の酸化によるシナバリン酸の生成



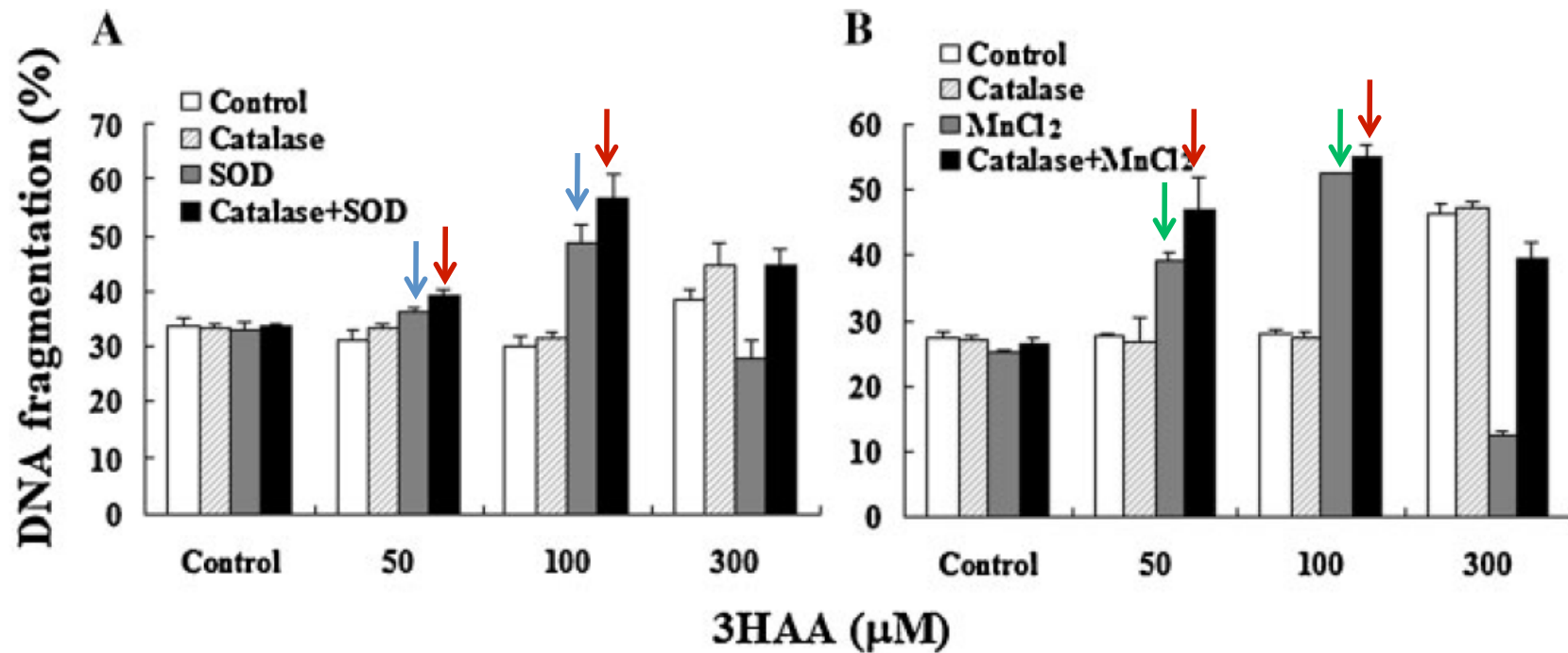
CAはアクチノマイシンDと基本構造が同じである。CAがアポトーシスを誘導する論文はない。

3HAAによって刺激された胸腺におけるアポトーシスの誘導とNACやZ-VADによる防御



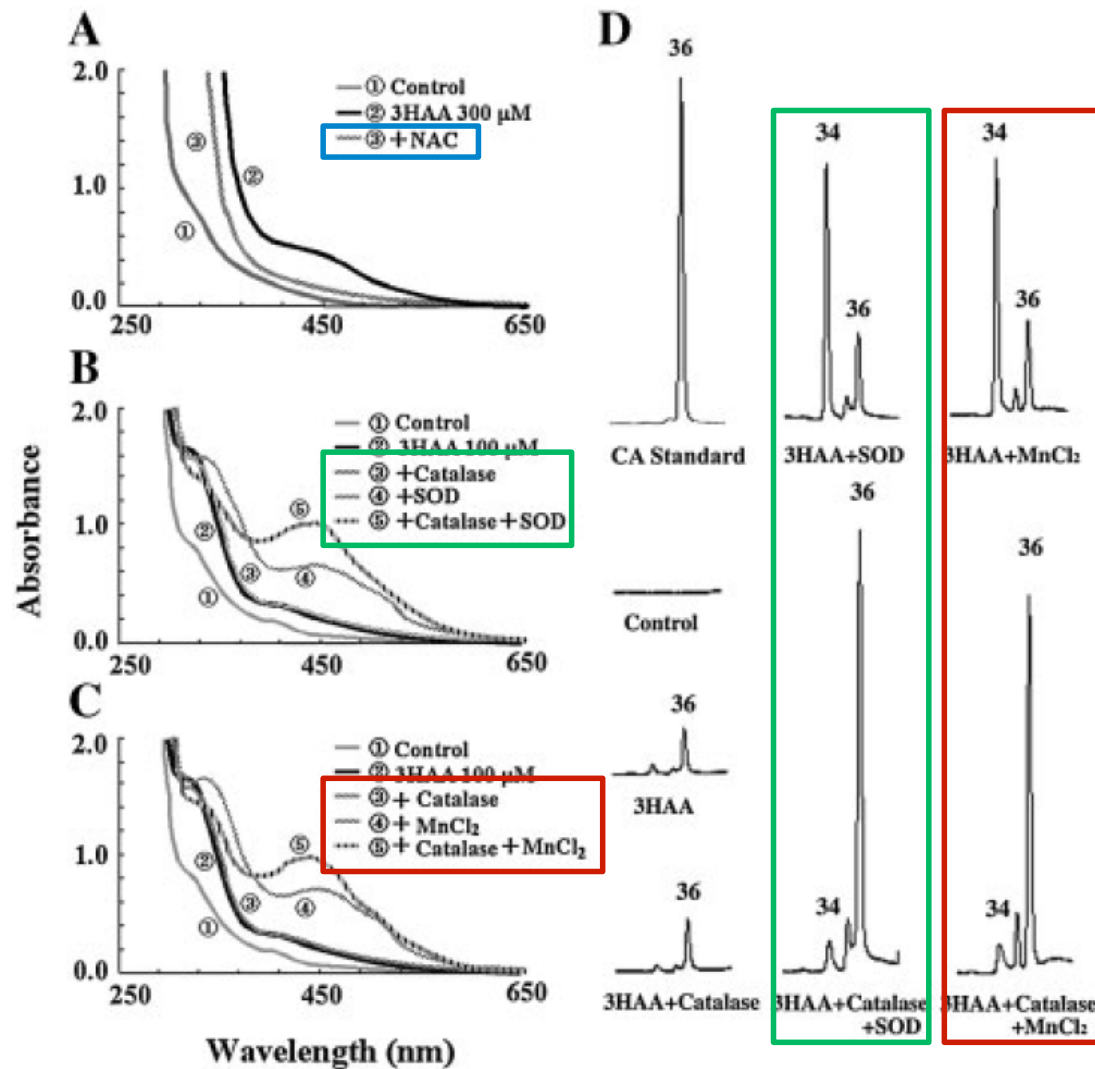
3HAAによって誘導されるDNAフラグメンテーションの(A)フローサイトメトリーと、(B)電気泳動(ラダーの形成)による解析、(A), (B)ともに300~500 μM 3HAAで強くフラグメンテーションが誘導され、1 mMの3HAAではネクローシスが誘導された。(C)抗酸化剤のNACと汎カスパーゼインヒビターのZ-VADは3HAAの誘導するDNAフラグメンテーションを抑制した。

3HAAが胸腺細胞に誘導するアポトーシスのSODやMnCl₂による増強



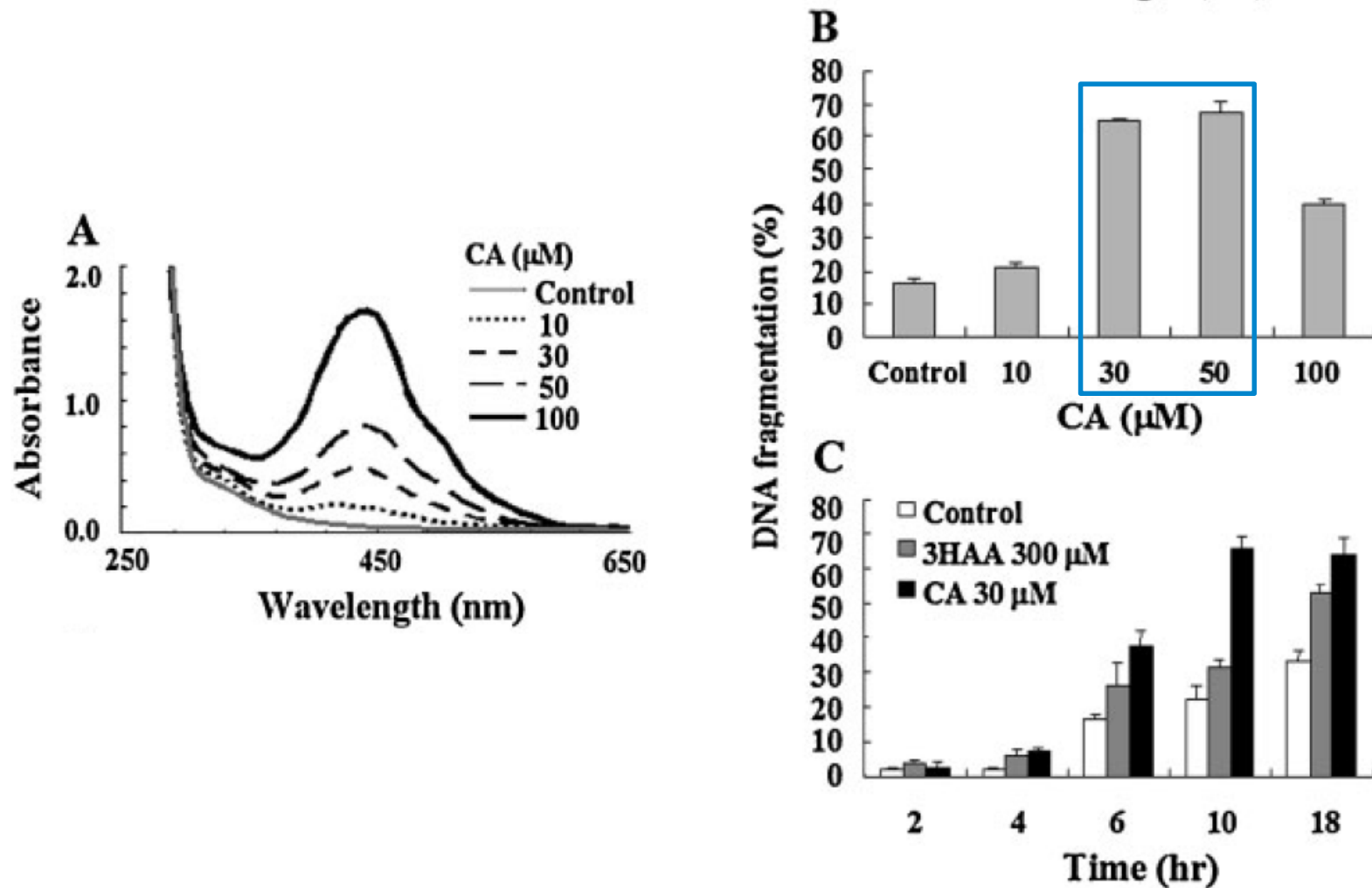
単独でDNAフラグメンテーションを誘導できない50~100 μMの3HAAに
(A) 200 U/ml のSOD、(B) 25 μMのMnCl₂を加えると、DNAフラグメンテーションが
誘導され、それは200U/mlのカタラーゼの添加によってさらに促進された。

SODやMnCl₂による3HAAの酸化を介したCA生成の増強とカタラーゼによる促進



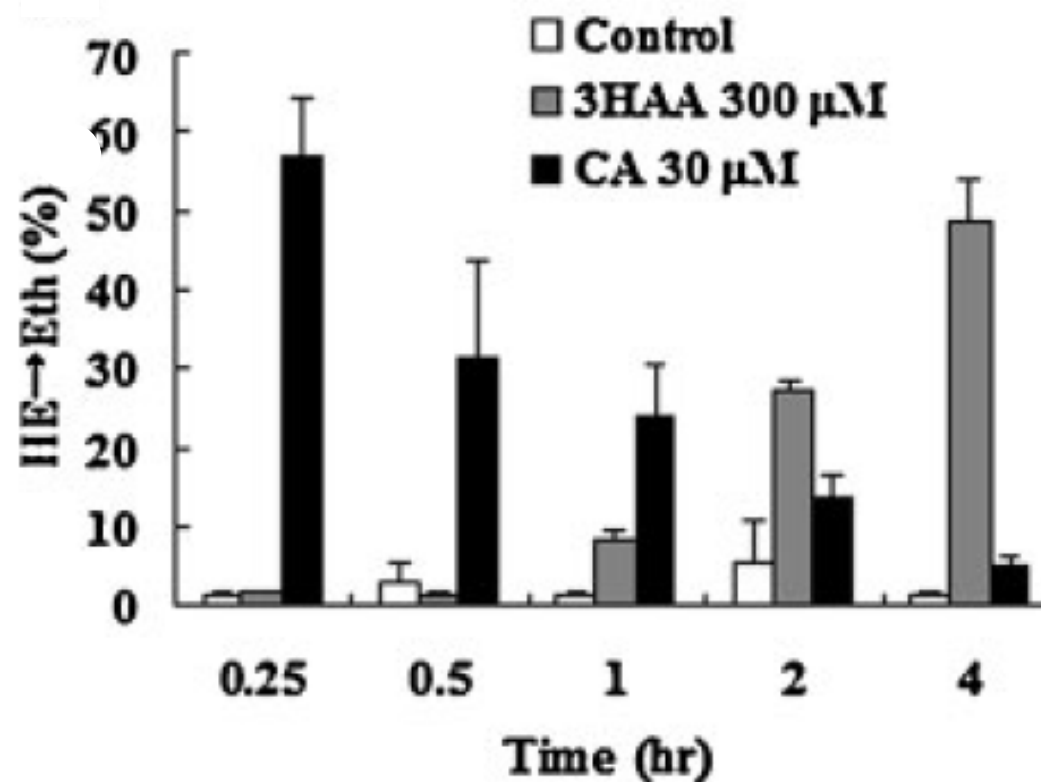
3HAAからシナバリン酸(CA)の生成の(A, B, C)吸収スペクトル(吸収のピーク:450 nm)による検出、(D) HPLCによる検出。3HAAからCAの生成の(A) NACによる阻止、(B,D) SODとカタラーゼによる増強、(C,D) MnCl₂とカタラーゼによる増強

CAは3HAAよりも10倍強いアポトーシス誘導活性を示す



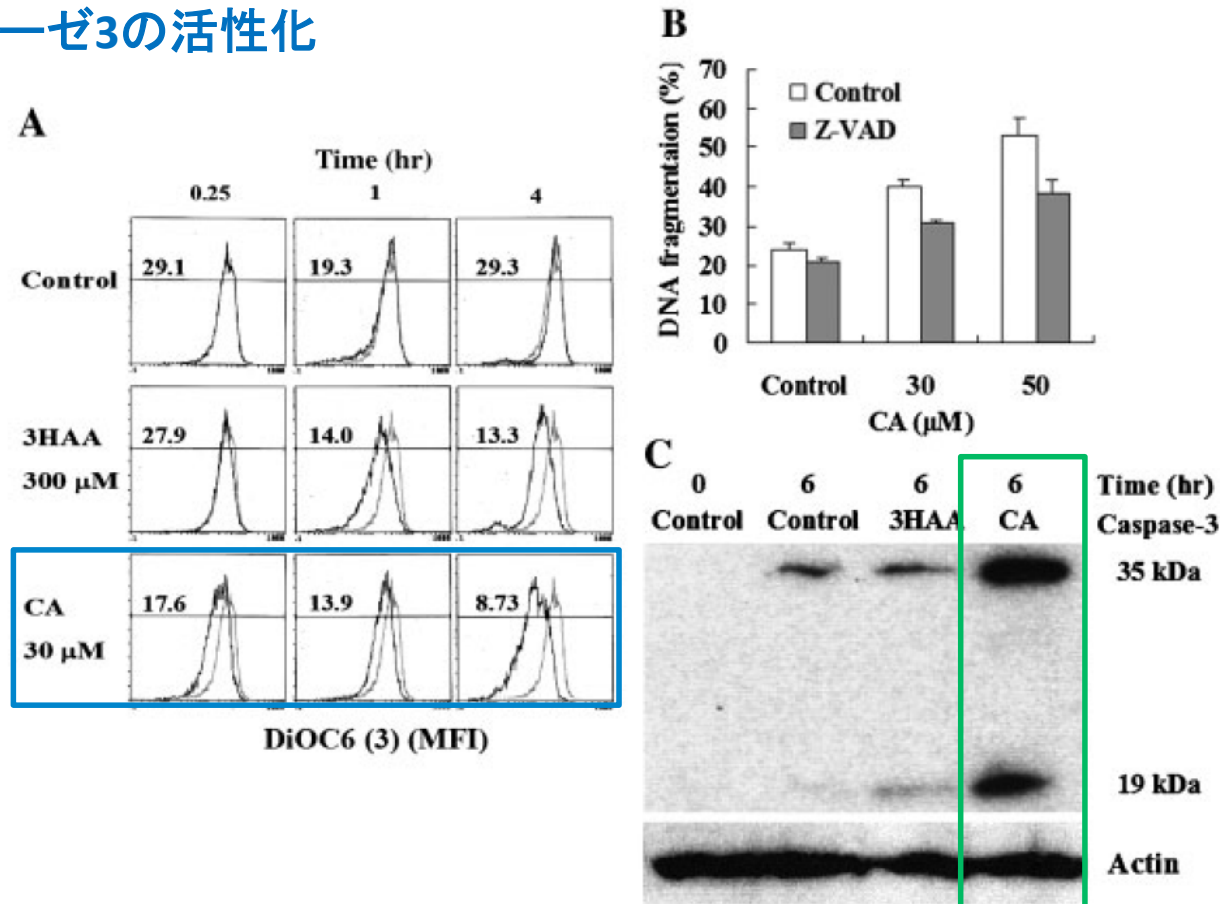
(A) 合成したCAのスペクトル、(B) 30~50 μM のCAが最も強くDNAフラグメンテーションを誘導した。(C) 30 μM のCAは300 μM の3HAAより強くDNAフラグメンテーションを誘導した。

CAによって刺激された胸腺細胞に誘導される急速で一時的な活性酸素種の産生



3HAAは活性酸素種(ROS)の産生を4時間まで徐々に増加させたが、CAは15分以内に高いROSの産生を誘導し、4時間までにコントロール近くまで減少させた。

CAで刺激された胸腺細胞における急速なミトコンドリアの膜電位の低下とカスパーゼ3の活性化



(A) 3HAAとCAによるミトコンドリアの膜電位の低下の誘導、(B) CAによるDNAフラグメンテーションの誘導と汎カスパーゼインヒビターによるその抑制、(C) CAによるカスパーゼ3のタンパク発現と活性の誘導

CAは活性酸素種の産生、ミトコンドリアの膜電位の低下、カスパーゼ3の活性化を介して胸腺細胞に強力にアポトーシスを誘導する。

6. トリプトファン代謝による免疫の調節

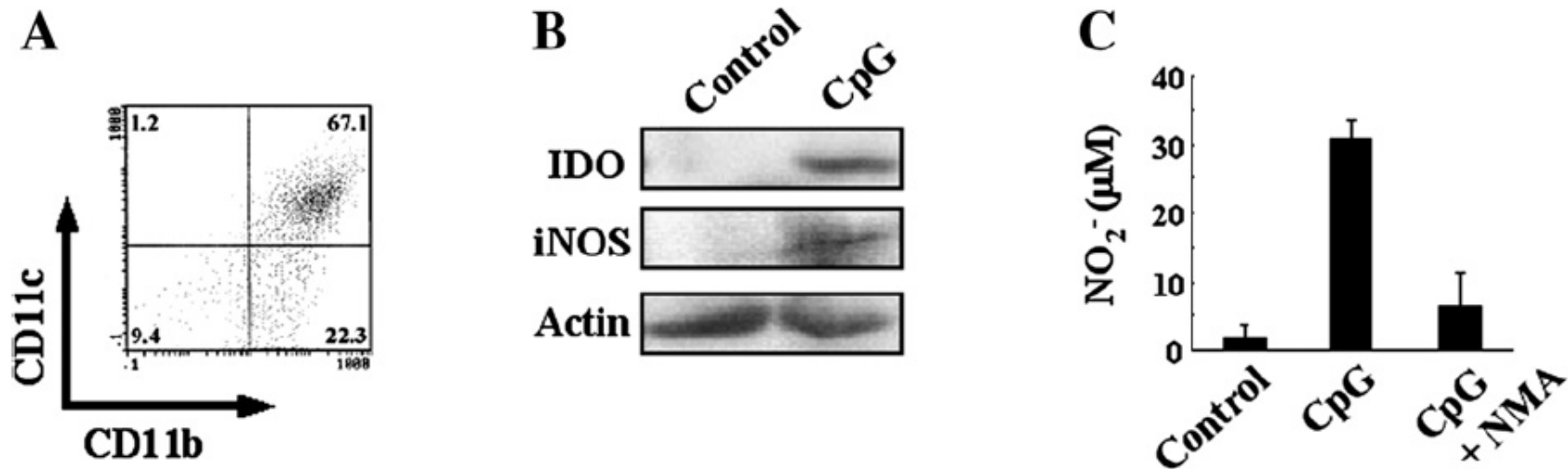
Diazotization of kynurenine by acidified nitrite secreted from indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing myeloid dendritic cells

Toshiaki Hara et al. J. Immunol. Methods 332:162 (2008)

インドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼを発現する骨髄系樹状細胞から分泌されるナイトライトと酸性で反応することによるキヌレニンのジアゾ化

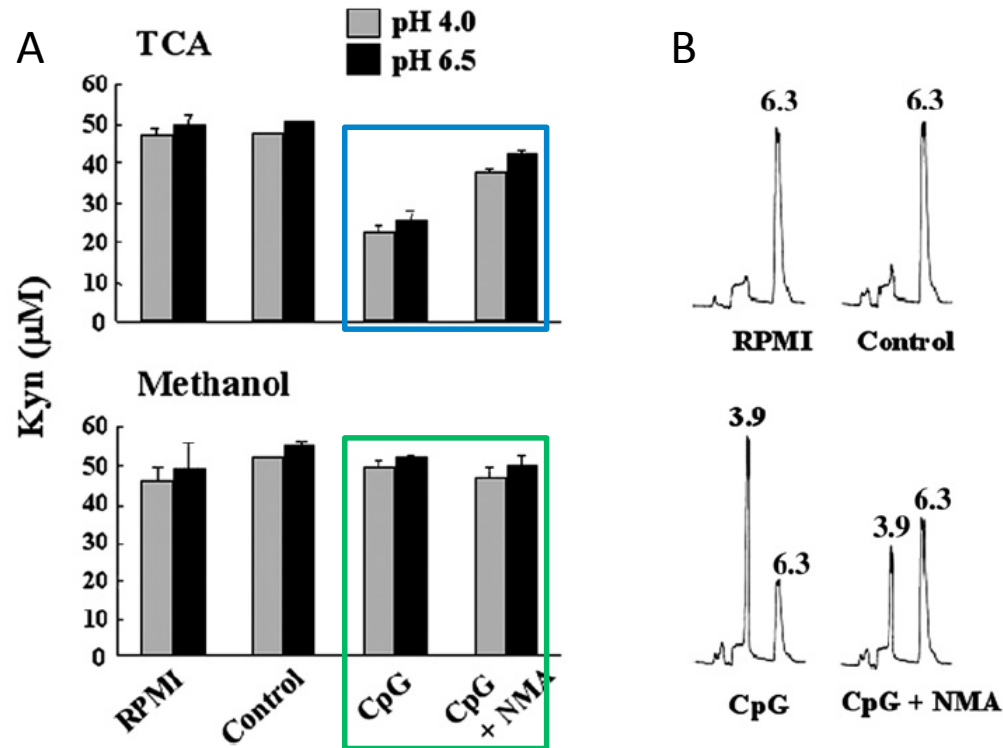
骨髄由来骨髄系樹状細胞 (BMDC)、CpG(CpGオリゴヌクレオチド、バクテリアのDNA)、IDO、トリプトファン代謝、キヌレニン、NO産生、ナイトライト(NO_2^-)、酸による除タンパク、キヌレニンのジアゾ化

CpGオリゴヌクレオチドで刺激された骨髄由来骨髄系樹状細胞(MBDC)の性状



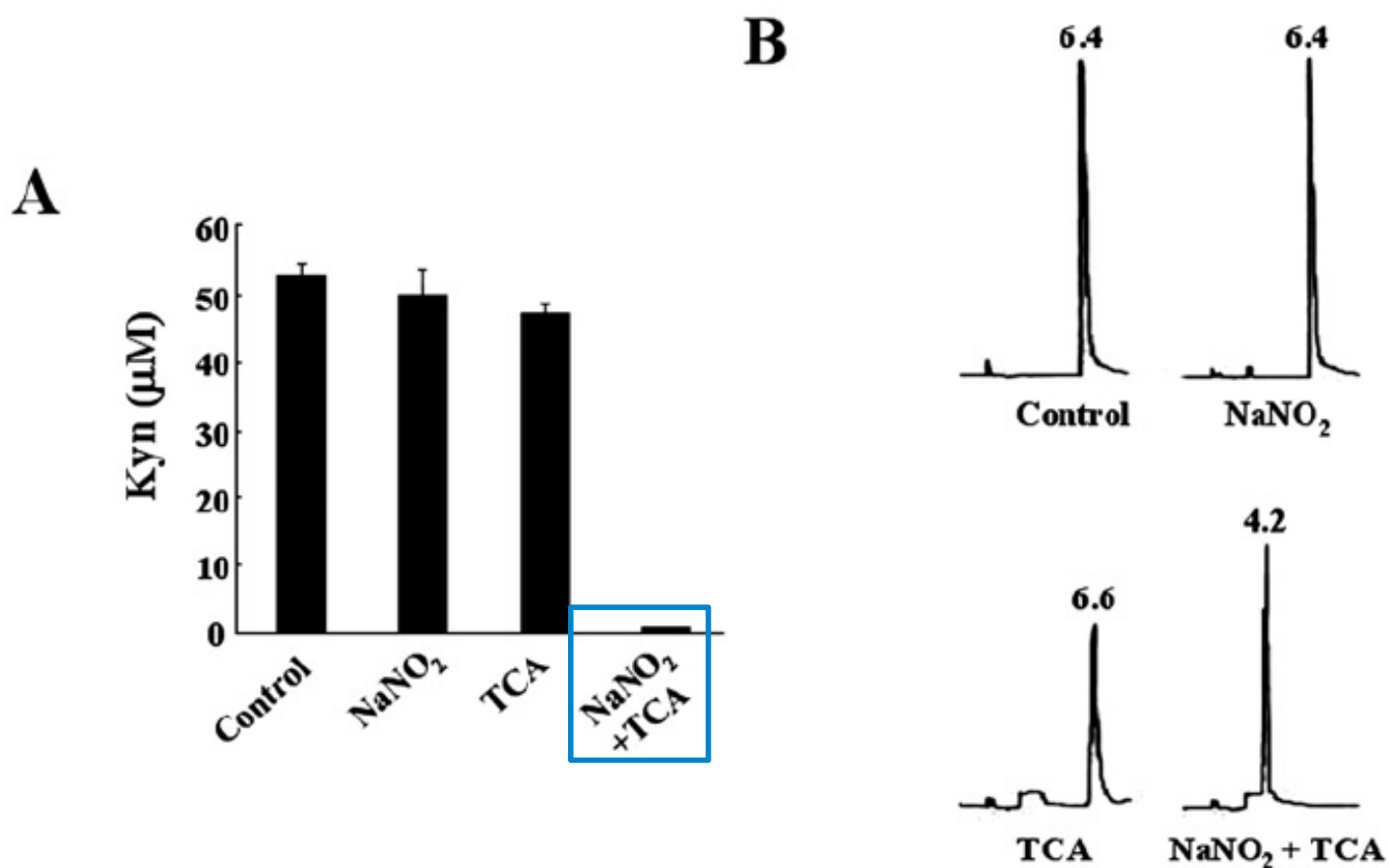
(A) 骨髄細胞をGM-CSFで6日間培養し分化させた骨髄由来骨髄系樹状細胞(BMDC)におけるCD11cとCD11bの発現、(B) CpGによるIDOとiNOSのタンパク発現の誘導、(C) CpGによるNO産生とNOSインヒビターNMAによるその抑制

CpGで刺激されたMBDCはキヌレニン(Kyn)をトリクロロ酢酸(TCA)存在下で崩壊する因子をNO産生と連結した状態で放出する



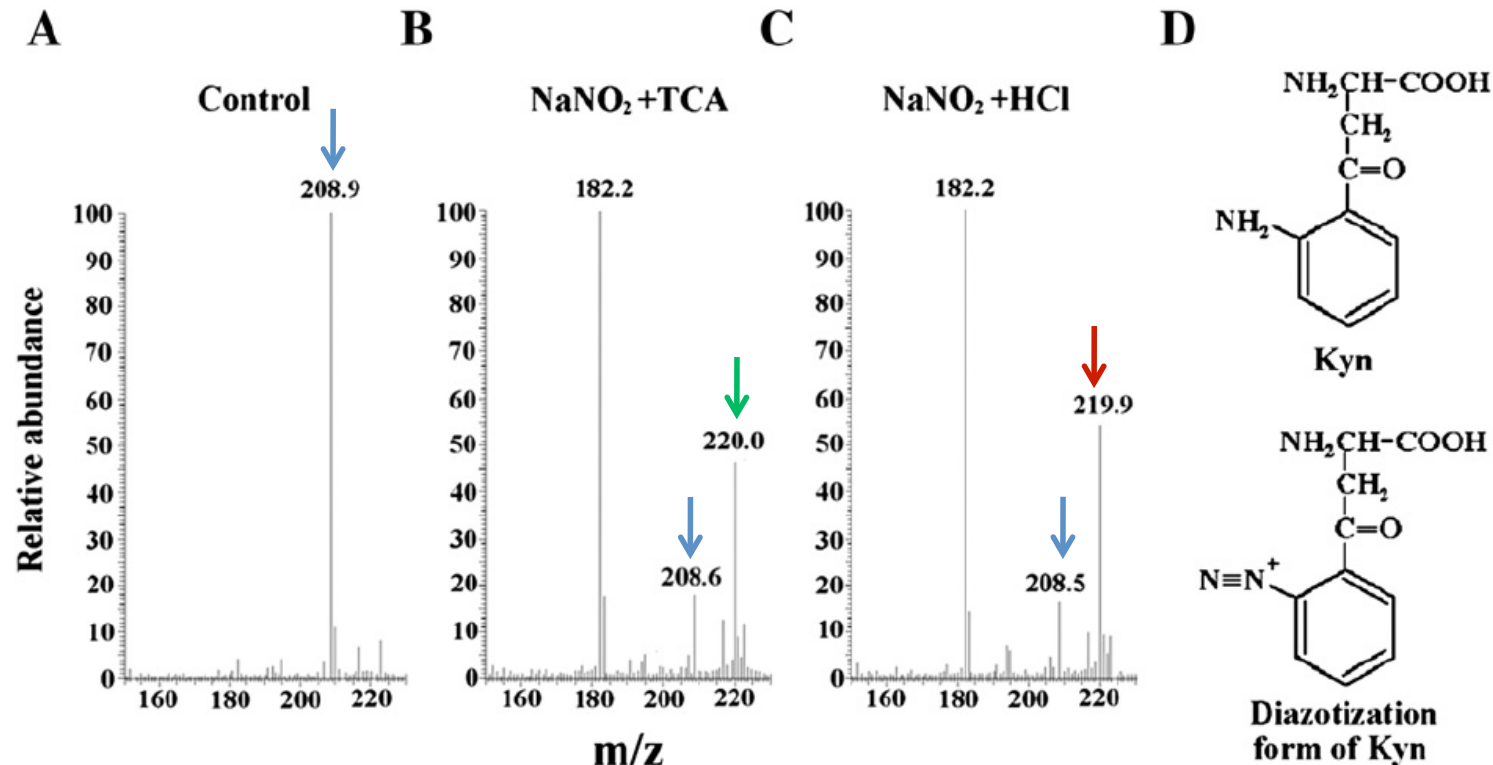
BMDCをCpGまたはCpGにNOSのインヒビターを加えて24時間刺激した培養上清に50 μMのキヌレニンを添加し、TCAとメタノールでそれぞれ除タンパクしてHPLCでキヌレニンを測定した。(A) CpG刺激した培養上清のキヌレニン濃度は低下したがCpGにNOSインヒビターを添加することにより回復した。メタノールで除タンパクすればCpG刺激によるキヌレニンの低下は防げた。(B)同様な実験によるHPLCでの溶出プロファイル

HPLCで検出される酸性でのキヌレニンとナイトライトの反応



(A) キヌレニンとNaナイトライトを5% TCA存在下で反応させてHPLCでキヌレニン量を測定するとキヌレニンは消失していた。(B) HPLCでの溶出プロファイル

酸性でナイトライトと反応して生成するキヌレニン化合物のマススペクトロメトリーによる解析



キヌレニンとNaナイトライトをTCAあるいはHClによる酸性溶液中で反応させると、キヌレニンの質量は208 m/z から220 m/z へ12 m/z 増加した。芳香族アミンが酸性でNaナイトライトと反応してジアゾ化されることからキヌレニンのジアジ化が予測された。

NOが産生される条件でキヌレニン測定のために酸で除タンパクをするとキヌレニンのジアゾ化が生じるので、メタノールで除タンパクをすべきである。

6. トリプトファン代謝による免疫の調節

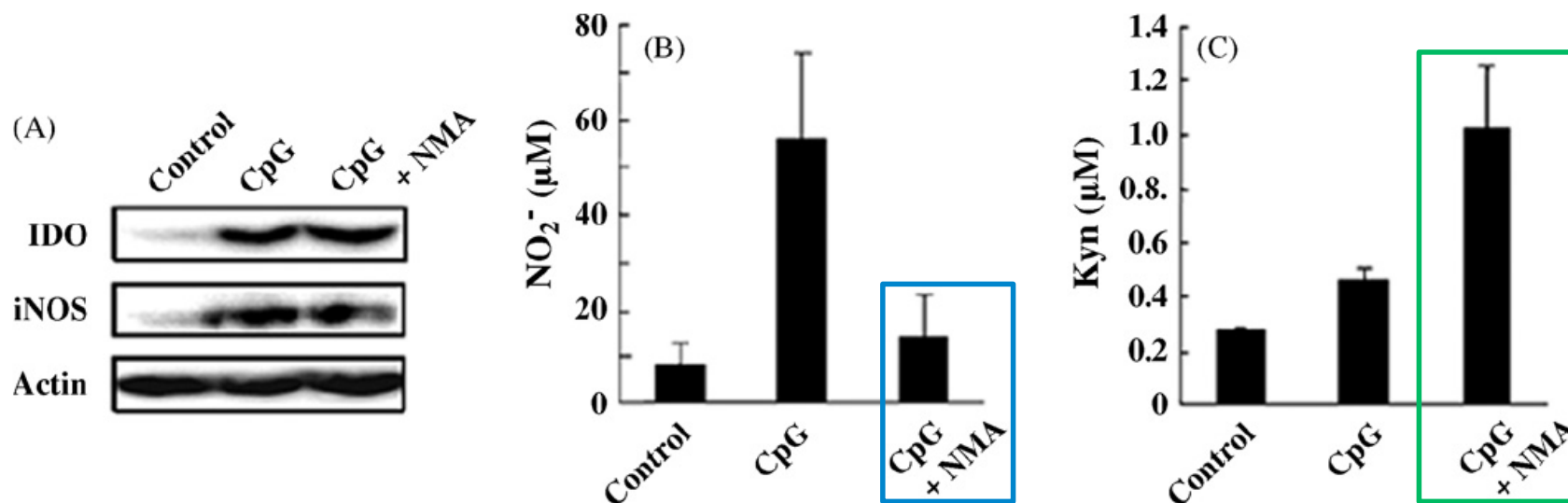
High-affinity uptake of kynurenine and nitric oxide-mediated inhibition of indolamine 2,3-dioxygenase in bone marrow-derived myeloid dendritic cells

Toshiaki Hara et al. Immunol. Lett. 116:95 (2008)

骨髄由来骨髄系樹状細胞(BMDC)における高親和性のキヌレニンの取り込みと酸化窒素によって媒介されるインドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼの抑制

BMDC、NO産生によるIDO活性の抑制、キヌレニンの取り込み、トランスポートシステムL

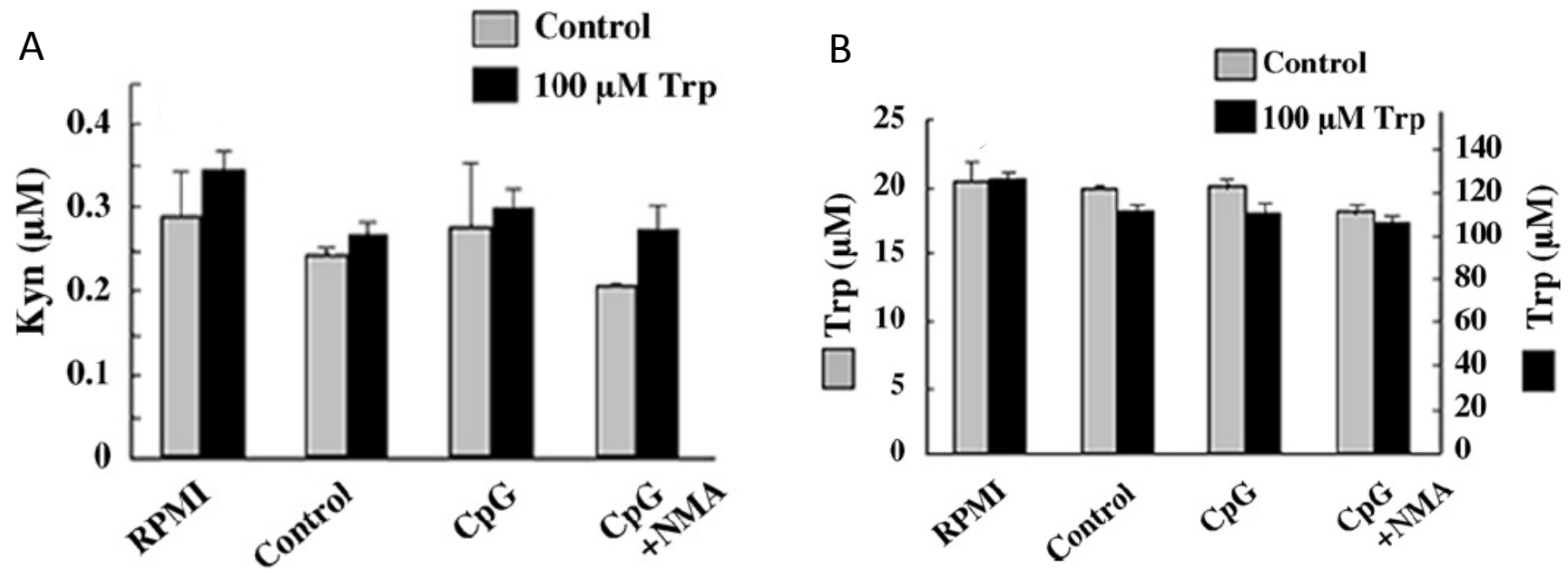
CpGで刺激されたBMDCにおけるNO産生によるIDO活性の抑制



(A) CpGで刺激されたBMDCによるIDOとiNOSタンパクの発現誘導、(B) CpGによるNO産生とNOSインヒビターによるその抑制、(C) CpGによるIDOの酵素活の誘導のNOSインヒビターによる増強

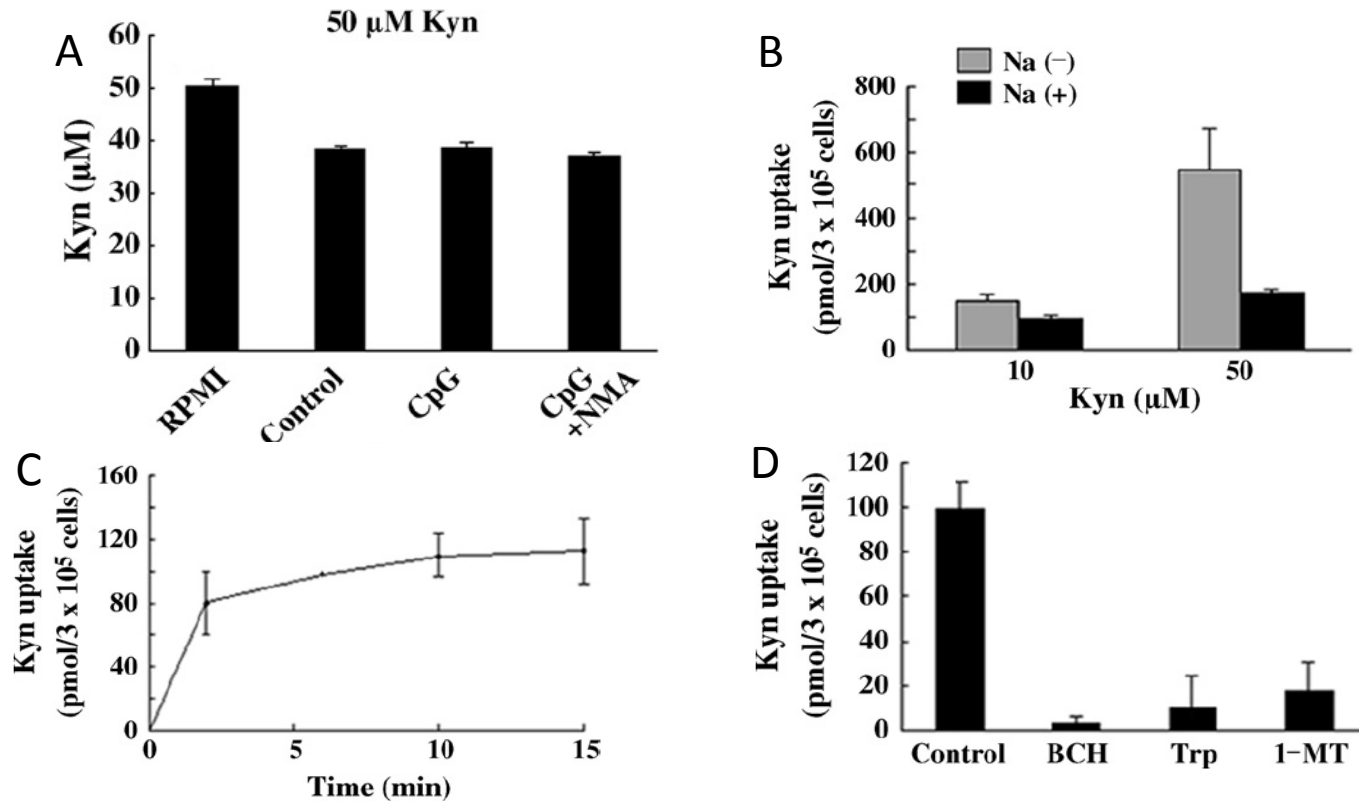
CpGによってBMDCに誘導されるIDOの活性はNO産生によって抑制される。

CpGで刺激されたBMDCはIDOタンパクを発現していてもキヌレニンを分泌しない



(A) コントロールあるいは100 μMのトリプトファンを添加し、CpGあるいはCpGとNOSのインヒビターを加えて24時間培養した培養上清中の(A) キヌレニン濃度と(B) トリプトファン濃度はほとんど変化しなかった。

BMDCはキヌレニン^oをCpG刺激に非依存性にトランスポートシステムLによって取り込む



(A)24時間の培養に加えたキヌレニンのBMDCによるCpG刺激非依存性取り込み、(B) Na非依存性のキヌレニンの15分間の取り込み、(C) キヌレニンの取り込みの経時変化、(D) キヌレニンの15分間の取り込みのトランスポートシステムLのインヒビターによる阻止。BMDCはトランスポートシステムLでキヌレニンを取り込む。

形質細胞様・リンパ系樹状細胞による免疫抑制と骨髓系樹状細胞による免疫誘導

6. トリプトファン代謝による免疫の調節

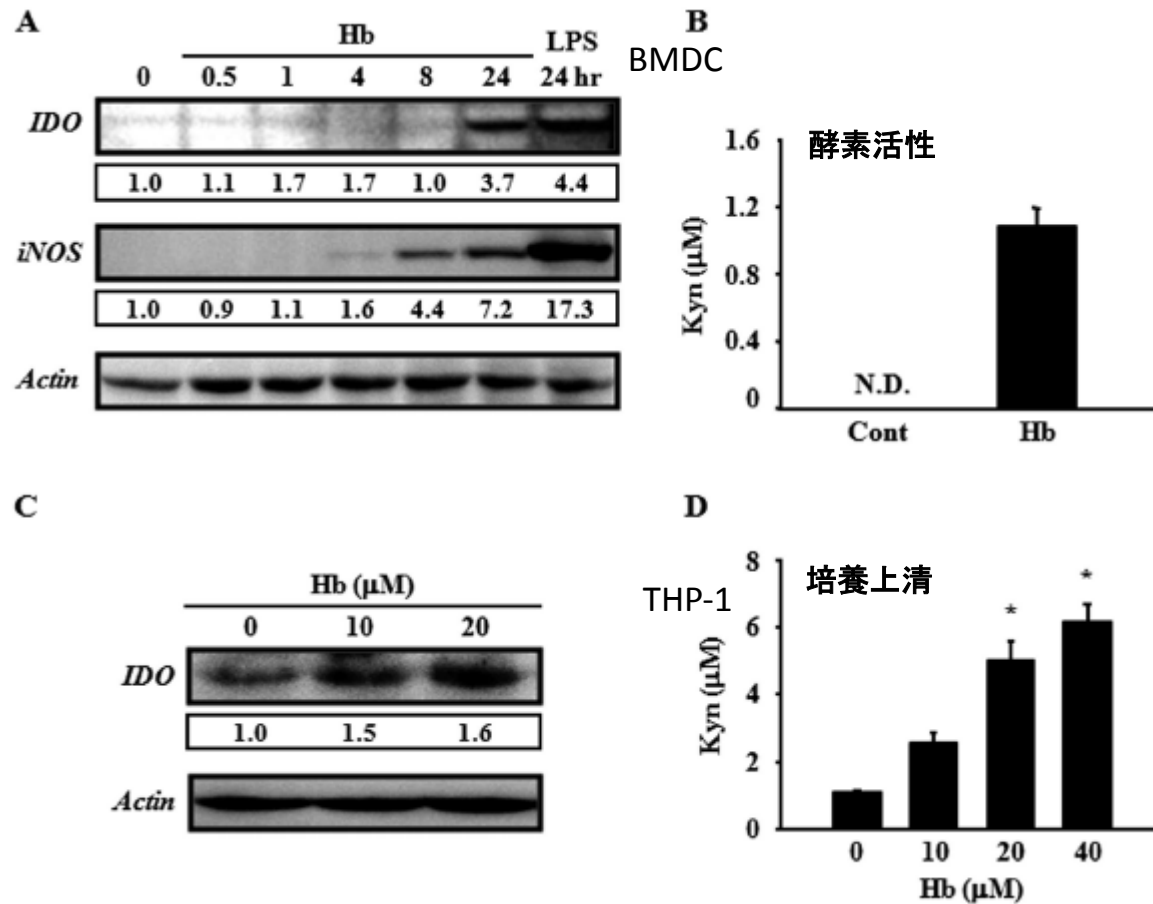
Hemoglobin induces the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase in dendritic cells through the activation of PKC, PI3K, NF- κ B and the generation of reactive oxygen species

Nanako Ogasawara et al. (in submission)

ヘモグロビンはPKC、PI3K、NF- κ Bの活性化と活性酸素種の産生を介して樹状細胞にインドールアミン2,3-ジオキシゲナーゼの発現を誘導する

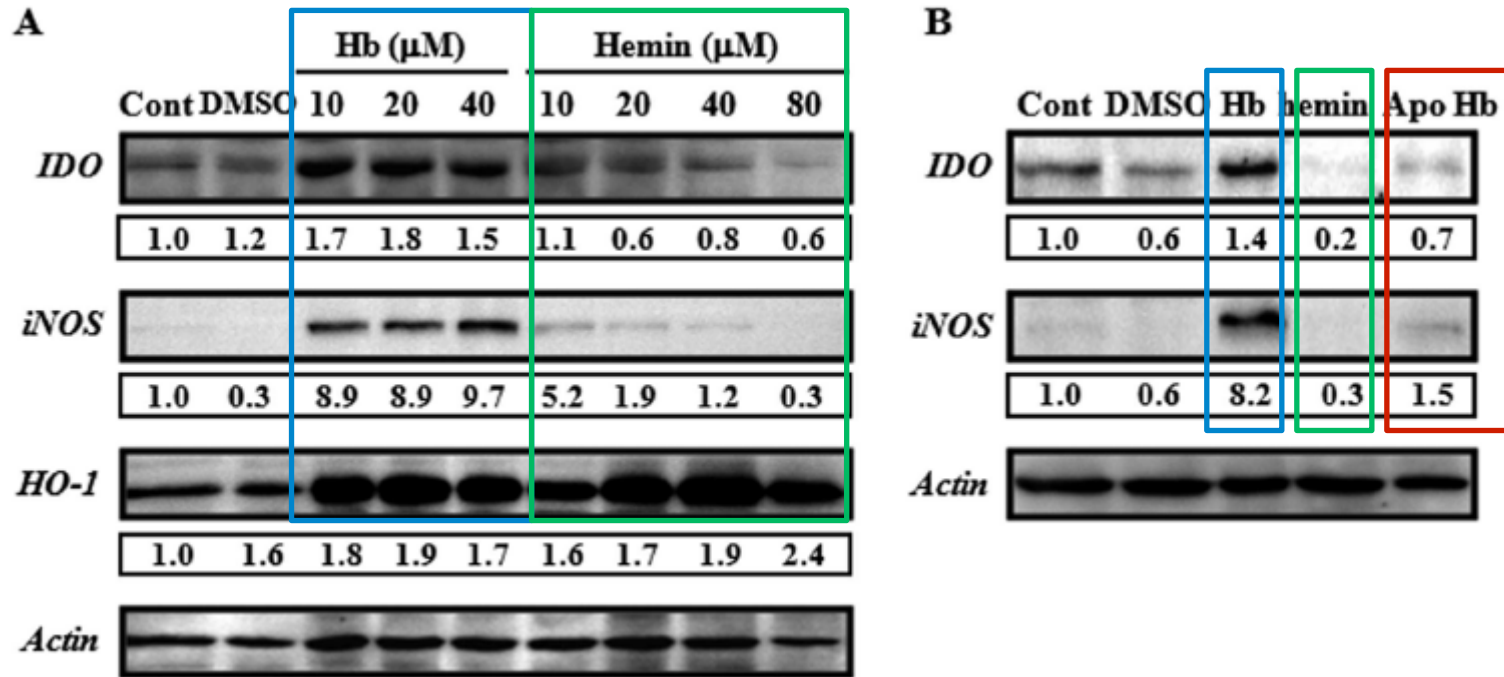
IDO、ヘモグロビン(Hb)、ヘム(ヘミン)、Hb-ハプトグロビン-CD163、ヘム-ヘモペキシン-CD91、ヘムオキシゲナーゼ1(HO-1)、溶血性貧血患者血清中のキヌレン/トリプトファン比の上昇、PKC、PI3K、NF- κ B、NF- κ Bの古典経路(RelA-p50、自然免疫)、NF- κ Bの別経路(RelB-p52、獲得免疫)、活性酸素種(ROS)の産生

ヘモグロビン(Hb)によるBMDCとTHP-1細胞でのIDO発現の誘導



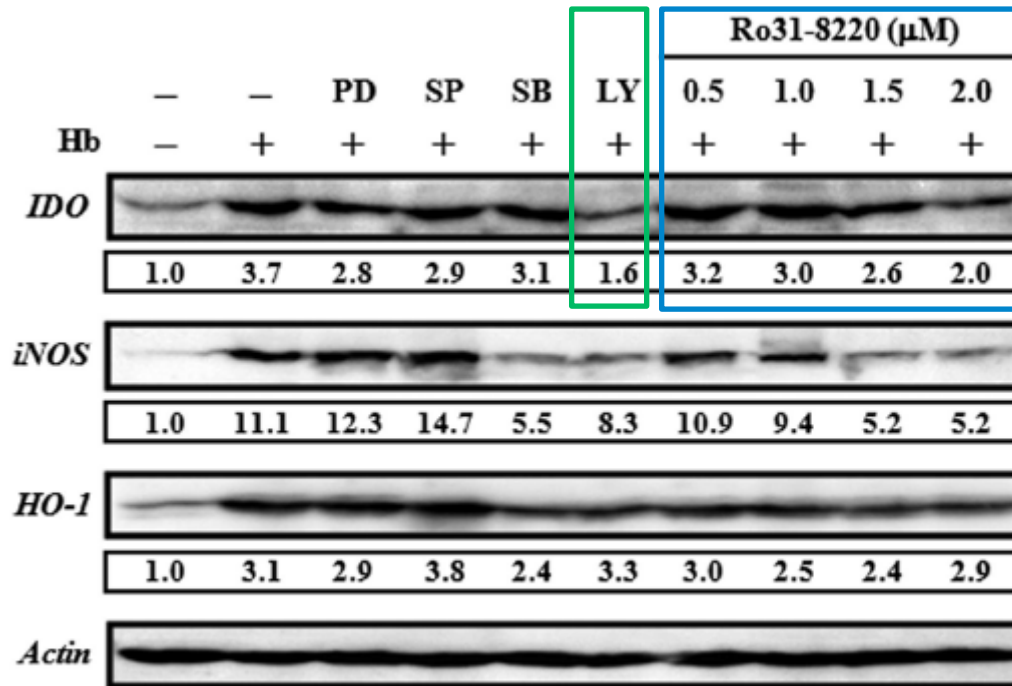
(A) Hbで刺激されたBMDCにおけるIDOとiNOSタンパクの発現、(B) Hbで刺激されたBMDCの細胞抽出液を用いたIDOの酵素活性の測定、(C) Hbで刺激されたヒト単球様THP-1細胞におけるIDOタンパクの発現、(D) Hbで刺激されたTHP-1細胞の培養上清中のキヌレニン濃度

BMDCにおいてヘモグロビンがIDO発現を誘導するには
アポヘモグロビンとヘムの両方が必要である



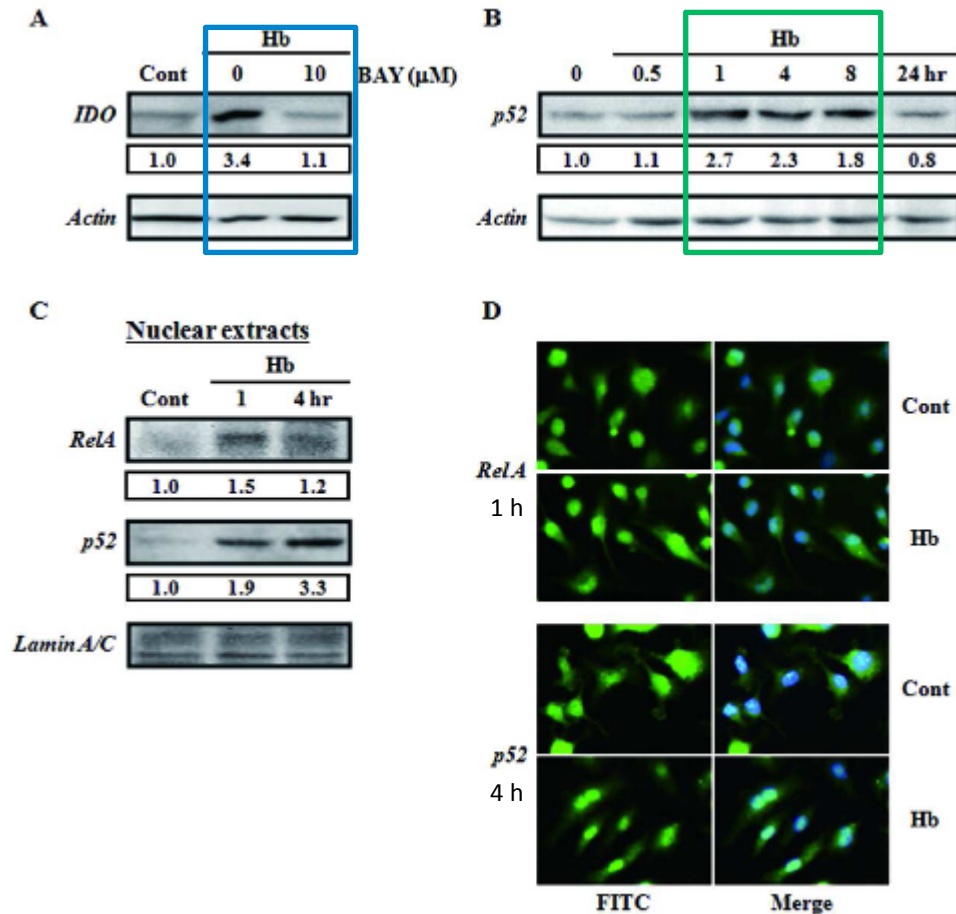
(A, B) HbはIDOとiNOSのタンパク発現を誘導したが、(A, B) ヘミンと(B) ヘムフリーのアポHbはIDOとiNOSのタンパク発現を誘導しなかった。(A) HO-1はHbでもヘミンでも発現が誘導された。

BMDCにおいてヘモグロビンがIDO発現を誘導するにはPKCとPI3Kの活性化が必要である



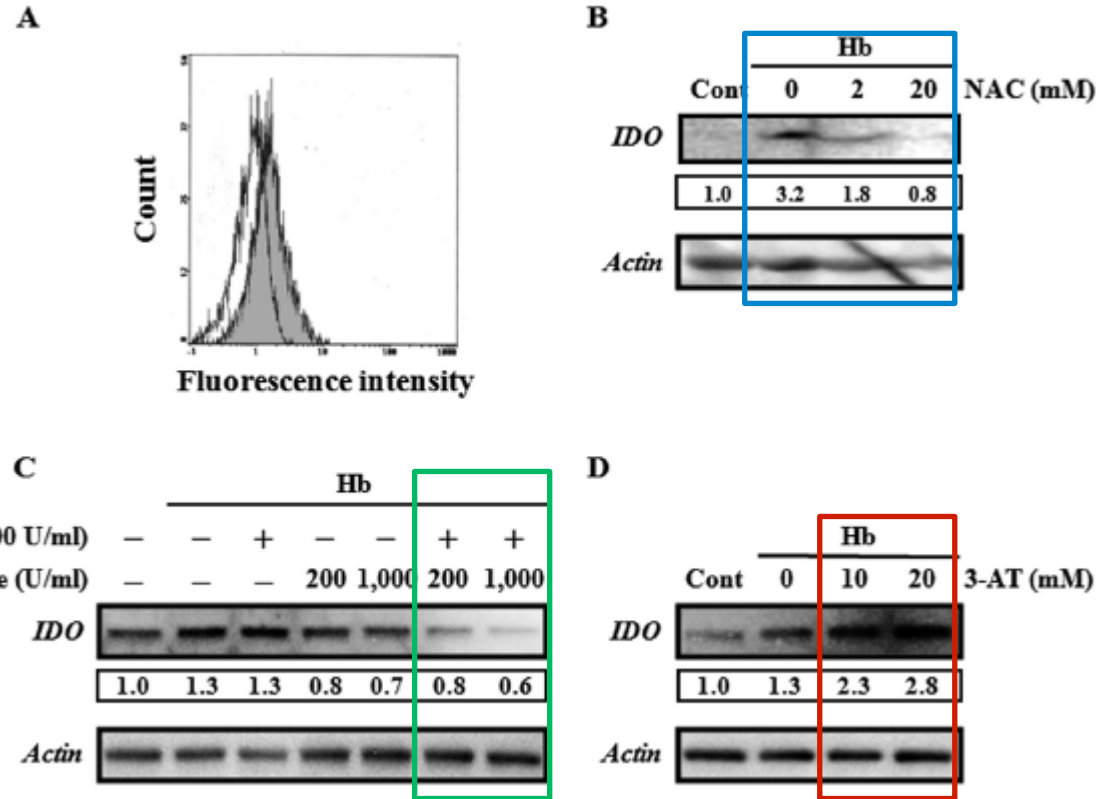
HbによるIDO発現の誘導はPKCのインヒビターであるRo31-8220とPI3KのインヒビターであるLy294002によって抑制された。

BMDCにおいてヘモグロビンがIDO発現を誘導するには
NF-κBの活性化が必要である



(A) HbによるIDO発現の誘導を古典経路のNF-κB阻害剤は抑制した。
 (B) Hbは別経路のNF-κB(p52)の産生を誘導した。(C, D) Hbは古経路のNF-κB (RelA)と別経路のNF-κB (p52)の両方を核に移行させることを(c)ウエスタンブローディングと(D)免疫染色で示した。

BMDCにおいてヘモグロビンがIDO発現を誘導するには
 活性酸素種の産生が必要である



(A) 活性酸素種(ROS)の産生、(B) NACによるIDO発現の抑制、(C) SODとカタラーゼによるIDO発現の抑制、(D) カタラーゼのインヒビターによるIDO発現誘導の増強

ヘモグロビンはPI3KとPKCの活性化、ROSの産生、NF- κ Bの活性化を介してIDO発現を誘導する。

7. 長寿遺伝子SIRT1と免疫

- 哺乳類のSIRTは長寿遺伝子と言われるイーストのSir2に相同な分子ファミリーであり、SIRT1～SIRT7が存在する。SIRTはキヌレニン経路の最終代謝産物であるNADを基質として脱アセチル化する酵素である。SIRT1はFOXO、p53、NF-κB、PGC-1αなどを脱アセチル化し転写活性を調節する因子である。
- Sir2がカロリー制限による延命に関与することがイースト、線虫、ハエなどで報告されているがヒトにおいてSIRT1が寿命に関係しているか明らかでない。
- カロリー制限や適度の運動がメタボリックシンドロームを防ぐことは認められている。この調節にSIRT1が関与しているようである。カロリー制限はミトコンドリアの数と機能の増加を介して、活性酸素種の産生を抑制し効率的なエネルギー(ATP)産生を誘導することにより効果を示すと報告されている。ブドウに多く含まれるポリフェノールのレスベラトロールはSIRT1を最も強く活性化する物質であるが、マウスモデルで過食による肝臓障害を防ぐことが報告されている。
- SIRT1欠損マウスは自己免疫疾患症状を示し、SIRT1は免疫応答に重要なNF-κBを抑制する。SIRT1は不要物の除去、栄養補給、感染防御、胸腺でのT細胞のネガティブセレクションなどに重要なオートファジー(細胞が生きるために自分の一部を食べること)に必要である。しかし、SIRT1と免疫の関係は論文が少なくほとんど明らかにされていない。
- M1の大学院生の小黒君と坂部君は免疫細胞をマイトジェンで刺激すると免疫応答と共にSIRT1タンパクの発現が誘導されることを発見し研究中である。

御静聴ありがとうございました