

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：32643

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23659103

研究課題名(和文) 栄養物質トランスポーター分子がマウス小脳皮質出生後形態形成において担う機能の解析

研究課題名(英文) Analyses on possible roles that nutrient transporters can play in the postnatal development of murine cerebellar cortex.

研究代表者

阿部 弘之 (ABE, Hiroyuki)

帝京大学・医療技術学部・講師

研究者番号：80309335

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新生仔マウス小脳皮質の発達において、栄養物質を細胞内に取り込むトランスポーター分子が何か役割を担うのか、担う場合にはそれがどのような役割なのかを明らかにすることを試みた。まず、トランスポーター分子の発現を抑制するための試薬を新生仔マウス小脳へ注入するための方法を確立し、本年度日本実験動物学会総会(札幌市)において発表した(論文投稿準備中)。次に、無機リン酸を取り込む際に使われるトランスポーターの1種の発現を、遺伝子配列に基づいて特異的に抑制する試薬を準備し、新生仔マウス小脳へ注入する前に、培養細胞を用いてその効果を確認した。今後、新生仔マウス小脳へ注入し、その効果を調べる予定である。

研究成果の概要(英文)：Present research focuses on studying possible roles that nutrient transporters can play in the postnatal development of murine cerebellar cortex. First, we established a simple method to inject reagents into the cerebellum of newborn mouse in order to suppress the expression of nutrient transporters based on the activity of the injected reagent, and presented the achievements in the 61st. Annual Meeting of Japanese Association for Laboratory Animal Science (Sapporo, JAPAN) (manuscript in preparation). Next, we designed a reagent that specifically suppresses the expression of a nutrient transporter based on the nucleotide sequence of its gene, and confirmed its effects on a murine cultured cell line. This reagent will be injected in the cerebellum of newborn mouse, and its possible effects on the postnatal development of cerebellar cortex will be studied.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・解剖学一般(含組織学・発生学)

キーワード：トランスポーター GLUT1 PiT1 PiT2 小脳 発達

1. 研究開始当初の背景

(1) 本研究に関連する国内外の研究動向及び位置づけ

あらゆる細胞は、生命活動に必要な栄養物質を、細胞膜表面に局在する栄養物質トランスポーターを介して取り込んでいる。通常、ある栄養物質の摂取に関与する栄養物質トランスポーター遺伝子には、複数種類の類似遺伝子が存在している。例えば、主要なグルコーストランスポーターの1つ GLUT1 の場合、ヒトやマウスの場合、他に 10 種類以上もの類似分子をコードする遺伝子が存在している。これは、栄養物質の摂取を確実に保証するための安全機構であるとみなされ、個々のトランスポーター分子に特有の機能の有無については十分に検討されてこなかった。しかし、最近、GLUT1 を含め、たった1種のトランスポーター分子の遺伝子欠損マウスが、類似分子によって代償されず、胎生致死に陥る例が複数示された(Wang D. et al. 2006. A mouse model for Glut-1 haploinsufficiency. Hum Mol Genet. 15(7):1169-79., Beck L. et al. 2010. The phosphate transporter PiT1 (Slc20a1) revealed as a new essential gene for mouse liver development. PLoS One. 5(2):e9148. など)。これらの結果は、個々のトランスポーター分子が、発生過程において、類似分子によって代償されない特異的な役割を担う可能性があることを示唆するものとして注目されている。

(2) これまでの研究成果と、着想に至った経緯

我々は、栄養物質トランスポーター分子に特異的に結合する各種レトロウイルス被膜蛋白分子を改変した新規プローブを用いて、各種栄養物質トランスポーター分子発現を中枢神経組織に於いて検索した(Laguer E. and Abe H (co-top authors). et al. 2010. Regional characterization of energy metabolism in the brain of normal and MPTP-intoxicated mice using new markers of glucose and phosphate transport. J. Biomed. Sci. 17:91.)。さらに、小脳顆粒細胞前駆細胞が増殖・分化・遊走を行う場である新生仔マウス小脳外顆粒層に於いて、グルコーストランスポーターGLUT1、および2種の無機リン酸トランスポーターPiT1・PiT2が、それぞれ特徴的な局在を示すことを見出した(Abe H. et al. 論文投稿準備中)。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が新生仔マウス小脳皮質外顆粒細胞層において見出したグルコーストランスポーターGLUT1 および無機リン酸トランスポーターPiT1、PiT2 の特徴的な局在に着目し、新生仔マウス小脳皮質形態形成過程において、当該トランスポーター分子発現を人為的に変化させることにより、出生後小脳皮質形態形成過程において当該栄養物質トランスポーター分子が果たす機能の有無、

さらにはそうした機能の実態を明らかにすることである。これらを通じて、その一見極めて house keeping な機能ゆえ、形態形成の様な高次生命現象における役割について検討されることが多くはなかった栄養物質トランスポーターの、新たな *in vivo* における機能を見出すことを最終目的とする。

3. 研究の方法

(1) 下記方法(2)に記載した実験を遂行するための、新生仔マウス小脳への、低侵襲的で小脳皮質発達を妨げない試薬微量注入法の確立

生後2-4日目のマウス(ICR系統)に対し、低体温麻醉下、マイクロシリッジに30G脳内接種針を装着して、マイクロインジェクター及び手動マニピュレーターで操作することにより、大脳半球への標識試薬(ダルベッコリン酸緩衝液に溶解した Evans Blue 色素、FITC 標識ピオチン化デキストラン、Hoechst 33342、脂溶性蛍光色素 PKH67 など)の微量注入を行う。最初に大脳半球への注入を行う理由は、小脳に比べて、体表から容易にその位置を確認でき、大きさも格段に大きいため、ほぼ確実に脳内接種針を刺入できることが期待されるためである。標識試薬注入後、経時的に大脳を摘出して注入部位(着色領域)を組織学的に検索し、星状膠細胞の反応性増殖(reactive gliosis)などの痕跡組織が形成されていないか、大脳半球的発達が試薬注入によって妨げられないかを検討した後、同様の方法を小脳半球への試薬注入に適用する

(2) *In vivo* 実験用アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた、栄養物質トランスポーター分子の特異的発現抑制と、その小脳皮質出生後発達過程への効果の検討

培養マウス細胞株を用いた *In vivo* 実験用アンチセンスオリゴヌクレオチドの効果の確認

グルコーストランスポーターGLUT1、無機リン酸トランスポーターPiT1およびPiT2の、タンパク質レベルでの発現を抑制するために、Vivo-Morpholino antisense oligo-Nucleotide (vMO) (GeneTools社)を用いる。vMOは、mRNAの翻訳開始点付近に相補的に結合し、翻訳を抑制する合成オリゴヌクレオチドであり、成体ラット脳組織への適応例が複数報告されている(Reissner K. J. et al. 2012. J. Neurosci. Methods. 203:354-360., Sartor G. C. and Aston-Jones G. 2012. J. Neurosci. 32:4623-4631 など)。*In vivo* 投与後、特に遺伝子導入操作を加えることなく各種細胞に取り込まれる様、特殊な修飾基が付加されており、核酸分解酵素に抵抗性の安定な分子である。3種のトランスポーター発現抑制用vMO、及び、既知のマウスmRNAに相補的に結合しないことが判っている陰性対照vMOを、培養マウス細胞株NIH-3T3の培養

上清に加え、1-3 日間培養した後、定法に従って蛍光抗体法およびウエスタンブロット法によって標的トランスポーター分子のタンパク質レベルの発現が抑制されているかどうかを確認する。

In vivo 実験用アンチセンスオリゴヌクレオチド (vMO) の新生仔マウス小脳への投与と、その効果の検討

これらの vMO を、生後 2-4 日目のマウス (ICR 系統) 小脳に、上記 (1) で確立した方法で投与する。この際、vMO 溶液に標識色素を加えておき、注入領域の同定に用いる (以下の観察は、vMO 注入領域の内外で比較する)。生後 5 - 7 日目、12 - 14 日目、および 19 - 22 日目の時点で小脳を摘出・固定後 OCT コンパウンド中に包埋し、薄切して形態学的解析を行う。まず、小脳皮質の全般的構築を観察するために、ヘマトキシリン-エオジン染色を行う。特に、内・外顆粒層の厚さ・細胞密度、分子層の厚さ、プルキンエ細胞層の細胞密度に注意して観察する。

4. 研究成果

(1) 新生仔マウス大脳半球への、低侵襲的で発達を妨げない試薬微量注入法の確立

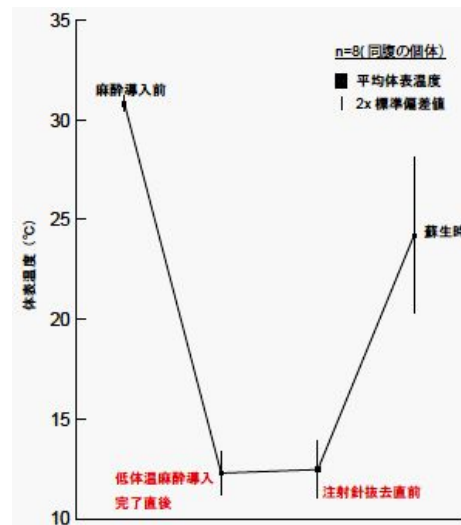
新生仔マウスの、安全かつ簡便な麻醉法の確立

低体温麻醉法を用いて麻醉導入を行ったところ、大多数の固体において 2-3 分で下肢をピンセットで引っ張っても反応しない状態となり、試薬注入が可能な状態となった。また、30 分間低体温麻醉状態においても、死亡することなく蘇生する事が判明した。本法による低体温麻醉下に大脳半球へ試薬の微量注入を行った場合、試薬注入操作中、または注入操作完了直後に死亡した固体は、被検全 22 個体中皆無であった。

試薬注入操作中、および、試薬注入開始前後の体表温度を測定したところ、低体温麻醉導入完了直後および注射針抜去直前の体表温度は 10-14.5 (平均 12.4) であった。冷却を続けていても体温が下がり続けることはないので、低体温麻醉状態においても何らかの体温維持機構が働いている可能性が示唆された (図 1)。

新生仔マウス大脳半球への、低侵襲的で発達を妨げない試薬微量注入法の確立 (図 2)

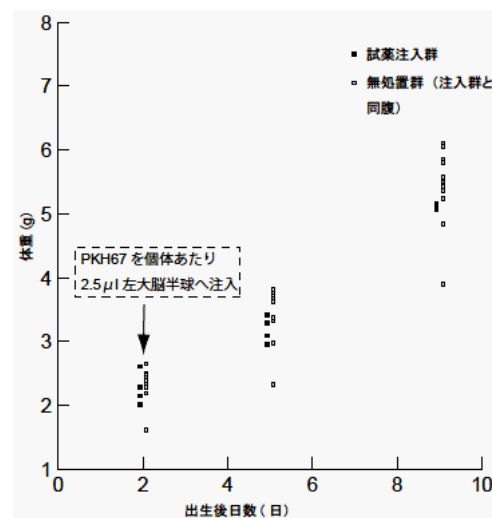
1 個体あたり 2.5 μ l の試薬を大脳半球へ注入しても、成長 (体重の増加) には有意な影響がない事が判明した (図 3)。また、脳の外見にも特に変化は生じず (図 4)、脳体重比も影響を受けなかった (図 5)。



(図 1) 低体温麻醉下試薬注入時の体表温度変化

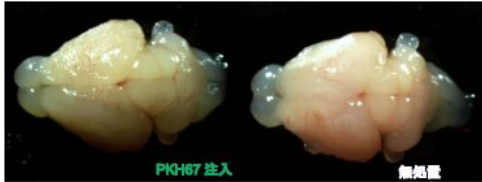


(図 2) 低体温麻醉下の、大脳半球への試薬注入

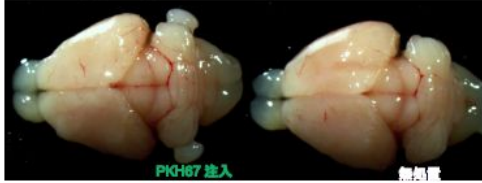


(図 3) 大脳半球への PKH67 注入後の体重の推移

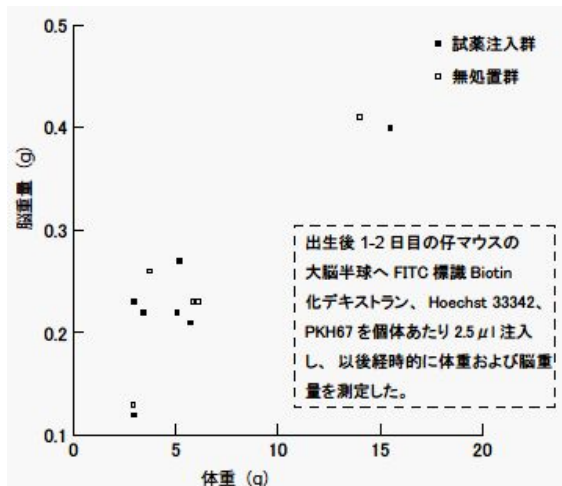
<< 注入後3日目 >>



<< 注入後7日目 >>



(図 4) 大脳半球への PKH67 注入後の脳外観



(図 5) 大脳半球への試薬注入後の成長過程における脳体重比の推移

さらに、脂溶性の蛍光色素 PKH67 は、新生仔マウス大脳組織試薬注入部位の細胞上に、注入後少なくとも3日間は残存することが判明した(図 6)。

以下の諸点については、現在検索中である：

・ Evans Blue 色素、FITC 標識ビオチン化デキストラン、Hoechst 33342 の注入部位における検出

・ PKH67 については、注入後 1 - 2 週間後での注入部位における検出

・ 試薬注入部位に星状膠細胞の反応性増殖 (reactive gliosis) が生じないかどうかの検討

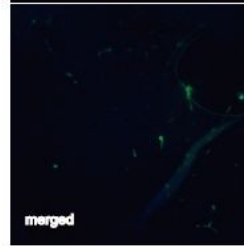
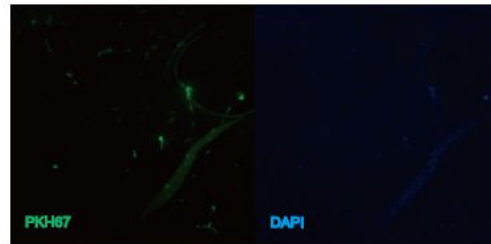
(2) *In vivo* 実験用アンチセンスオリゴヌクレオチドを用いた、栄養物質トランスポーター分子の特異的発現抑制と、その小脳皮質出生後発達過程への効果の検討

培養マウス細胞株を用いた *In vivo* 実験用アンチセンスオリゴヌクレオチドの効果の確認

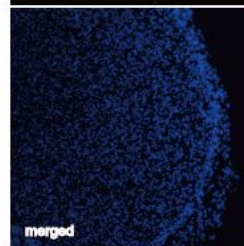
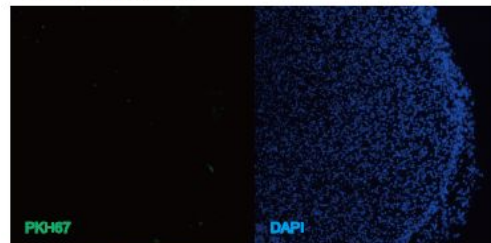
Vivo-Morpholino antisense oligonucleotide (vMO) を用い、無機リン酸トラ

ンスポーター Pit2 のタンパク質発現を抑制することを試みた。vMO は、培養細胞培養上清に添加するだけで細胞内に取り込まれ、標的 mRNA 分子に相補的に結合して翻訳を抑制する。まず、マウス *Pit2* mRNA 特異的 vMO (vMOPit2-1) の作用を、マウス線維芽細胞株 NIH-3T3 を用いて検討した。NIH-3T3 の培養上清へ、vMOPit2-1 または陰性対照 vMO (standard control vMO) を、50 μM の濃度で添加し、3 日後に抗マウス Pit2 抗体を用いて蛍光染色を行った。この際、対比染色として Hoechst 33342 (核) および CellTrace BODIPY methyl ester (CTBPY) (細胞内膜構造) で染色した。

<< PKH67 注入固体 (注入後3日目) >>



<< 同腹無処置固体 >>

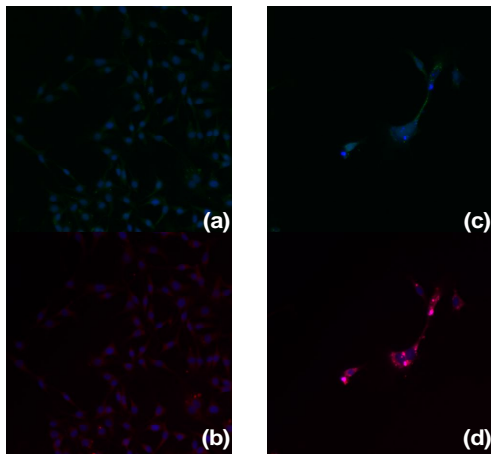


(図 6) 大脳半球試薬注入後 3 日目における、PKH67 局在の検出 (核染色用蛍光色素 DAPI を含む封入剤を使用した)

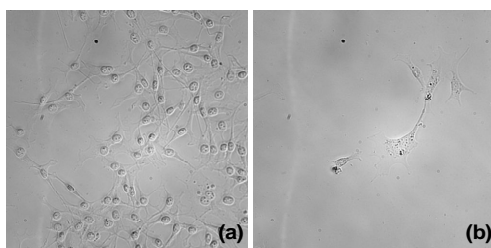
その結果、以下の所見を得た (図 7、図 8)：

- a. vMOPit2-1 を添加した場合、培養プレートに附着している細胞の数が極めて少なく、円形の、明らかに異常な形態の細胞が容易に見いだせた。
- b. vMOPit2-1 を添加した場合の方が、CTBPY 染色強度が明らかに強かった。
- c. 抗マウス Pit2 抗体による染色強度は、CTBPY 染色強度で補正したところ、

vMOmPiT2-1 添加した場合の方が弱くなった。
d. 抗マウス PiT2 抗体による染色では、vMOmPiT2-1 添加した場合に、細胞質内に顆粒状の染色がしばしば見られた。



(図7) マウス *PiT2* mRNA 特異的 vMO (vMOmPiT2-1) 添加後3日目における、抗マウス PiT2 抗体による免疫蛍光染色
(a) 陰性対照 vMO 添加、Hoechst 33342(核) + Alexa 488 (PiT2) (b) 陰性対照 vMO 添加、Hoechst 33342 (核) + CellTrace BODIPY (細胞内膜構造) (c) vMOmPiT2-1 添加、Hoechst 33342 (核) + Alexa 488 (PiT2) (d) vMOmPiT2-1 添加、Hoechst 33342 (核) + CellTrace BODIPY (細胞内膜構造)



(図8) マウス *PiT2* mRNA 特異的 vMO (vMOmPiT2-1) 添加後3日目における、位相差顕微鏡観察像 (図8と同じ視野)
(a) 陰性対照 vMO 添加 (b) vMOmPiT2-1 添加

ウエスタンブロット法による PiT2 蛋白発現量の検討は、現在進めている。また、PiT1、GLUT1 についても、同様の作業を進めていく予定である。

In vivo 実験用アンチセンスオリゴヌクレオチド(vMO)の新生仔マウス小脳への投与と、その効果の検討

新生仔マウス大脳への試薬注入法がほぼ

確立できたので、同様の方法を用いて各トランスポーター分子の発現を抑制する vMO の新生仔マウス小脳への投与を今後実施する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

宮川 誠、阿部 弘之：新生仔マウス脳への簡便な試薬微量注入実験系の確立と、出生後小脳発達機構解析への応用。第 61 回日本実験動物学会総会、2014 年 5 月 15 日、札幌コンベンションセンター (札幌市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

阿部 弘之 (ABE, Hiroyuki)

帝京大学・医療技術学部・講師

研究者番号：80309335

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：